



HAL
open science

Étude de deux acteurs dans le développement des complications hépatiques liées à l'obésité: la vitamine D et FNDC5/Irisine

Clémence Canivet

► To cite this version:

Clémence Canivet. Étude de deux acteurs dans le développement des complications hépatiques liées à l'obésité: la vitamine D et FNDC5/Irisine. Médecine humaine et pathologie. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2019. Français. NNT : 2019AZUR6036 . tel-03505898

HAL Id: tel-03505898

<https://theses.hal.science/tel-03505898v1>

Submitted on 1 Jan 2022

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.

THESE DE DOCTORAT

Etude de deux acteurs dans le développement des complications hépatiques liées à l'obésité : la vitamine D et FNDC5/Irisine

Clémence CANIVET

INSERM - C3M – Equipe 8 « Maladies chroniques du foie associées à l'obésité et à l'alcool »

Présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en SVS

de l'Université Côte d'Azur

Dirigée par : Philippe GUAL / Rodolphe ANTY

Soutenue le 19 décembre 2019 à 14h

Devant le jury, composé de :

Rodolphe ANTY, Université Côte d'Azur

Giulia CHINETTI, Université Côte d'Azur

Anne DUTOUR-MEYER, Aix-Marseille Université

Pierre GOURDY, Université Toulouse III

Philippe GUAL, Université Côte d'Azur

Catherine POSTIC, Université Paris Descartes

Etude de deux acteurs dans le développement des complications hépatiques liées à l'obésité : la vitamine D et FNDC5/Irisine

Jury :

Présidente du jury :

Giulia CHINETTI, PU-PH, MD, PharmD, HDR
Pharmacie, CHU de Nice
INSERM U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Equipe 9
Université de la Côte d'Azur

Rapporteurs :

Anne DUTOUR-MEYER, PU-PH, MD, PhD, HDR
Unité d'endocrinologie, diabétologie et maladie métabolique, AP-HM
Inserm U1062, INRA 1260
Aix Marseille Université

Catherine POSTIC, Directeur de recherche, DR1, PhD, HDR
Inserm U1016, CNRS UMR 8104
Institut Cochin,
Université Paris DESCARTES

Examineur :

Pierre GOURDY, PU-PH, MD, PhD, HDR
Service de diabétologie, maladie métabolique et nutrition, CHU Toulouse
UMR 1048/INSERM
Université Toulouse III – Paul Sabatier

Co-directeurs de thèse :

Philippe GUAL, Directeur de recherche, DR2, PhD, HDR
INSERM U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Equipe 8
Université de la Côte d'Azur

Rodolphe ANTY, PU-PH, MD, PhD, HDR
Unité d'Hépatologie, CHU de Nice
INSERM U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Equipe 8
Université de la Côte d'Azur

RESUMES et MOTS-CLES

Titre de la thèse Etude de deux acteurs dans le développement des complications hépatiques liées à l'obésité : la vitamine D et FNDC5/Irisine

Mots-clés NAFLD, stéatose, NASH, FNDC5, vitamine D, boulimie

Résumé

Les maladies du foie gras non alcooliques (NAFLD) constituent un problème majeur de santé publique avec une prévalence mondiale d'environ 25 %. La NAFLD est de plus en plus reconnue comme la maladie hépatique chronique la plus répandue. Le spectre des maladies hépatiques va de la stéatose (stéatose hépatique) à la stéato-hépatite non alcoolique (NASH) (stéatose, inflammation, lésion hépatique) et par la suite à l'activation des voies de la fibrogenèse, qui sont associées à un risque élevé de développer une cirrhose et un carcinome hépatocellulaire. Le traitement de la NASH est encore limité en raison de l'absence de traitement pharmacologique efficace ainsi que du manque d'outils de diagnostic efficaces et pratiques. La NAFLD est associée à l'obésité et au syndrome métabolique et la présence d'un diabète de type 2 peut augmenter le risque de maladies du foie. Inversement, la NAFLD est également un facteur de risque pour de nombreuses maladies métaboliques, notamment le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires. Les mécanismes sous-jacents à la progression de la NAFLD sont multifactoriels et mal compris. Mieux comprendre la pathogenèse de la NASH amènera à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

La première partie de mon travail, portant sur des aspects cliniques, a évalué des facteurs pouvant être associés au développement de la NAFLD : 1) les troubles du comportement alimentaire de type boulimie, étaient associés, comme on pouvait s'y attendre, à l'obésité, mais indépendamment de la gravité de la NAFLD et 2) la concentration sérique de la vitamine D, qui présente des effets antioxydants et anti-fibrosants, n'était pas diminuée avec la sévérité des NAFLD.

En parallèle, nous avons étudié le niveau d'expression et le rôle d'une nouvelle « hépatokine », Fibronectin type III domain containing 5 (FNDC5) et sa forme soluble, l'irisine, dans le développement de la NAFLD. Chez l'Homme et dans des modèles murins de NAFLD, l'expression hépatique de FNDC5 était augmentée avec la stéatose et la souffrance hépatocytaire tandis que la concentration circulante d'irisine n'était pas modifiée. Cette production locale de FNDC5 était principalement influencée par un stress génotoxique et se comportait comme un facteur de protection local contre la NAFLD en empêchant la stéatose et les lésions des hépatocytes. Enfin, le polymorphisme rs3480 de *FNDC5* était protecteur de la stéatose sévère indépendamment du SNP rs738409 de *PNPLA3*, de l'âge, du sexe féminin, de l'indice de masse corporelle et de la présence d'un diabète de type 2 dans une cohorte de 613 patients. En conclusion, nos données humaines et expérimentales suggèrent fortement que l'expression hépatique de FNDC5 pourrait ralentir le développement des NAFLD en régulant négativement la stéatogénèse et la mort hépatocytaire.

Thesis title Study of two actors in the development of hepatic complications related to obesity: vitamin D and FNDC5/Irisin

Keywords NAFLD, steatosis, NASH, FNDC5, vitamin D, binge eating disorder

Abstract

Non-Alcoholic Fatty Liver Diseases (NAFLD) is a major public health concern with global prevalence of 25%. NAFLD is increasingly recognized as the most common chronic liver disease. The spectrum of the hepatic diseases ranges from steatosis (fatty liver) to nonalcoholic steatohepatitis (NASH) (steatosis, inflammation, liver injury) and subsequently to the activation of fibrogenic pathways, which correlates with a high risk of developing cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The treatment of NASH is still limited because of the lack of effective pharmacological treatment as well as lack of effective and practical diagnostic tools. NAFLD is associated with obesity and metabolic syndrome and the presence of type 2 diabetes can increase the risk of liver diseases. Inversely, NAFLD is also a risk factor for many metabolic diseases, including type 2 diabetes and cardiovascular disease. The mechanisms underlying the progression of NAFLD are multifactorial and not well understood. Better understand the pathogenesis of NASH will lead to identify new potential therapeutic targets.

One part of my work focused on clinical aspects in a large cohort of obese patients regarding factors that potentially regulate the development of NAFLD. We here reported that: 1) binge eating disorders were associated as expected with obesity but independently of NAFLD severity and 2) the circulating level of vitamin D, well-known to display anti-oxidant and anti-fibrotic properties, was not diminished with NAFLD severity.

In parallel, we investigated the expression level and the role of a new "hepatokine", Fibronectin type III domain containing 5 (FNDC5) and its soluble form irisin in NAFLD. We reported that hepatic expression of FNDC5 increased in the presence of hepatic steatosis and liver injury without impacting the systemic level of irisin in mouse models of NAFLD and in obese patients. This local production of FNDC5 was mainly influenced by genotoxic stress and behaved as local protective factor against NAFLD by preventing hepatocyte steatosis and injury. Finally, the single nucleotide polymorphism (SNP) *FNDC5* rs3480 was protective of severe steatosis independently of *PNPLA3* SNP rs738409, age, female, BMI and type 2 diabetes in a cohort of 613 patients. In conclusion, our human and experimental data strongly suggest that hepatic expression of FNDC5 could dampen the development of NAFL by negatively regulating steatogenesis and hepatocyte death.

REMERCIEMENTS

Au professeur Giulia Chinetti : je vous remercie d'avoir accepté de présider mon jury de thèse et de juger mon travail. Veuillez accepter mes plus sincères remerciements.

Au professeur Anne Dutour-Meyer : je vous remercie d'accepter de juger et de rapporter mon travail. J'ai beaucoup apprécié ma formation durant mon Master 2 à Marseille dont vous étiez la responsable.

Au docteur Catherine Postic : c'est pour moi un honneur que vous acceptiez de juger et de rapporter mon travail de thèse. Vous êtes une grande Chercheuse et votre carrière est un exemple pour moi.

Au professeur Pierre Gourdy : Je vous remercie d'avoir accepté d'examiner mon travail. Vous avez réussi avec brio à allier la clinique et la recherche. J'ai beaucoup d'admiration pour cela.

Au docteur Philippe Gual : mon cher Philippe,
Cela fait maintenant 4 ans que l'on travaille ensemble. Je te remercie pour tes connaissances scientifiques, ta gentillesse, ta disponibilité, ton écoute et tes bons gâteaux !! Merci de m'avoir initiée à la science fondamentale, d'avoir accepté de co-diriger mon travail de thèse de Sciences et d'avoir fait de moi une scientifique. J'ai énormément appris à tes côtés. Merci pour toutes les réponses aux « j'ai une petite question ». Tout n'a pas toujours été facile mais tu as toujours été très compréhensif et je t'en suis très reconnaissante. Nous pourrons, je l'espère, continuer à collaborer sur des projets translationnels.

Au professeur Rodolphe Anty : mon cher Rodolphe,
Sache que je suis très fière d'être ta première étudiante en thèse de Sciences (thèse de médecine, thèse de Sciences, ça commence à faire ...). Merci pour ta disponibilité permanente, pour tes explications médicales ou scientifiques passionnantes. J'admire le médecin que tu es et le Professeur que tu es devenu. Nos chemins se recroiseront sûrement dans un congrès (à Barcelone ?) ou pour un projet scientifique commun (autour d'un carpaccio d'ananas ?).

Remerciements à l'équipe d'accueil :

Je remercie l'équipe 8 du C3M qui m'a accueillie pendant mon Master 2 et ma thèse de Sciences.

Merci à Stéphanie et Déborah pour tout ce que vous m'avez appris sur la paillasse, le cocooning, les pauses goûter, les Baiocchi. Vous êtes toujours disponibles pour répondre à mes « petites questions » !!

Merci à mes co-thésards Pierre et Déborah pour leur soutien et à mon co-M2 : Arnaud. Merci aux étudiants en Sciences que j'ai croisés : Cynthia, Elodie et Marina.

Merci aux chercheurs de notre équipe : Carmelo et Béatrice pour leurs gentillesse.

Remerciements au C3M :

Je remercie l'équipe de l'animalerie et le dr V. Corcelle pour le soin apporté à nos souris.

Je remercie Grégory pour sa gentillesse, sa disponibilité et ses astuces en informatique.

Remerciements aux services médicaux :

Je remercie l'ensemble de l'équipe de gastroentérologie du CH de Cannes avec laquelle j'ai passé 18 mois géniaux. Merci à monsieur Amoros pour sa disponibilité, ses connaissances et la confiance dont il m'a témoignée. Merci à Clément, Inès, Julie et Maude mes internes, pour tous les bons moments qu'on a partagés (notamment en endoscopie et les mercredis de la gastronomie) et de m'avoir fait confiance comme chef (notamment les relectures de thèse, de mémoires de DES, de RSCA et de présentation).

Je remercie l'équipe Angevine (Jérôme, Adrien, Frédéric, Isabelle, Floraine et Mr Calès) pour leur accueil bienveillant.

Remerciements personnels :

* A mes parents qui m'ont toujours soutenue pendant ces années difficiles. J'ai failli plus d'une fois baisser les bras, mais c'était sans compter sur la motivation permanente de ma maman. Je vous aime fort.

* A ma mamie, qui m'a régalée de ces bons petits plats tous les lundis soir.

* A Phil, Caro, Maxence, Samuel et Alix : <3

* A Julie qui m'a soutenue, encouragée... et qui m'a aussi interdit de prendre de quoi travailler pendant nos vacances en Grèce !!!

* A Florence, Jérémy, Clément et Héloïse, qui prennent soin de moi, même à 1000 km de distance.

Je dédie cette thèse à mon grand-père, Jean, avec lequel j'aurais aimé discuter de Sciences et de médecine.

*Les folies sont les seules choses
qu'on ne regrette jamais*

Oscar Wilde, artiste (1854-1900)

TABLE des MATIERES

RESUMES et MOTS-CLES	5
REMERCIEMENTS.....	9
TABLE des MATIERES.....	13
ABBREVIATIONS.....	17
1^{ère} PARTIE : INTRODUCTION.....	21
Partie 1 : La « Nonalcoholic fatty liver disease » ou NAFLD	23
1. Définition.....	23
2. Épidémiologie.....	24
2.1. Prévalence de la NAFLD dans le monde.....	24
2.2. Prévalence de la NAFLD en France	25
3. Histoire naturelle de la NAFLD	25
4. Les facteurs de risque cliniques de NAFLD.....	28
4.1. L'obésité et les déterminants de l'obésité.....	30
4.1.1. Facteurs environnementaux	30
4.1.1.1. Excès calorique – sédentarité – manque d'activité physique	30
4.1.1.2. Troubles du comportement alimentaire.....	31
4.1.2. Génétique.....	31
4.2. L'insulino-résistance	32
4.3. Le diabète de type 2.....	33
4.4. Les autres paramètres du syndrome métabolique : HTA, dyslipidémie	34
4.5. La vitamine D	34
4.6. Les autres facteurs de risque	37
4.6.1. Le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK).....	37
4.6.2. Le syndrome d'apnée-hypopnée obstructif du sommeil (SAOS).....	37
5. Physiopathologie de la NAFLD.....	37
5.1. Facteurs favorisants	37
5.1.1. La génétique	37
5.1.2. L'épigénétique.....	39
5.1.3. Le microbiome intestinal	49
5.2. Développement de la stéatose	51
5.2.1. Une maladie du tissu adipeux et du muscle.....	53
5.2.2. La lipogenèse hépatique	54
5.3. De la stéatose à la NASH	56
5.3.1. La lipotoxicité.....	58
5.3.2. La glucotoxicité.....	59
5.3.3. Altération de l'autophagie	60
5.3.4. La souffrance ou mort hépatocytaire	61
5.3.5. Les autres cellules impliquées dans le développement de la NASH	62
5.4. Développement de la fibrose hépatique	64
6. Les modèles précliniques de NAFLD	66
6.1. Les modèles génétiques de NAFLD	66
6.2. Les modèles d'intervention diététique de NAFLD	66

6.2.1.	Le régime riche en gras (HFD).....	67
6.2.2.	Le régime « western diet ».....	67
6.2.3.	Le régime déficient en méthionine et choline (MCDD).....	68
6.3.	Les modèles induits chimiquement/toxiques.....	69
7.	Les traitements en cours de développement dans la NAFLD.....	69
7.1.	Les molécules agissant sur les voies métaboliques.....	71
7.2.	Les molécules agissant sur la mort cellulaire.....	73
7.3.	Les molécules agissant sur l'inflammation.....	73
7.4.	Les molécules agissant sur la fibrose.....	73
7.5.	Molécules agissant sur l'axe foie-intestin.....	74

Partie 2 : La protéine Fibronectine type 3 domain containing 5 (FNDC5) et l'Irisine. 75

1.	Les myokines.....	75
2.	La « Fibronectin type III domain family ».....	76
3.	La protéine FNDC5.....	78
3.1.	Découverte de l'irisine et rôle initial de FNDC5.....	78
3.2.	2013-2015 : la controverse sur FNDC5.....	80
3.3.	Les grandes fonctions de FNDC5 et de l'irisine.....	81
3.3.1.	FNDC5/Irisine et exercice physique.....	82
3.3.2.	FNDC5/Irisine et tissu adipeux.....	84
3.3.2.1.	FNDC5/Irisine favorise la brunisation du tissu adipeux blanc.....	84
3.3.2.2.	FNDC5/Irisine favorise le métabolisme glucidique du tissu adipeux.....	85
3.3.3.	FNDC5/Irisine et muscle.....	86
3.3.4.	FNDC5/Irisine et les autres organes.....	86
3.3.4.1.	FNDC5/Irisine et pancréas.....	87
3.3.4.2.	FNDC5/Irisine et fonctions cognitives.....	87
3.3.4.3.	FNDC5/Irisine et cœur.....	88
3.4.	FNDC5/Irisine dans le foie.....	88
3.4.1.	FNDC5/irisine et métabolisme lipidique.....	89
3.4.2.	FNDC5/Irisine et métabolisme glucidique.....	91
3.4.3.	FNDC5/Irisine et fibrose.....	91
3.4.4.	FNDC5/irisine et carcinome hépatocellulaire.....	91
3.5.	FNDC5/irisine et risque métabolique.....	92
3.5.1.	Les régulateurs de FNDC5/irisine dans le syndrome métabolique.....	92
3.5.2.	FNDC5/irisine et insulino-résistance/diabète.....	93
3.5.2.1.	Insulino-résistance/diabète dans les modèles murins.....	93
3.5.2.2.	Insulino-résistance/diabète chez l'humain.....	94
3.5.2.3.	Polymorphismes de FNDC5 dans l'insulino-résistance/diabète.....	96
3.5.3.	FNDC5/Irisine et NAFLD.....	97
3.5.3.1.	Irisine circulante et NAFLD.....	97
3.5.3.2.	Le polymorphisme de FNDC5 et NAFLD.....	98

2^{ème} PARTIE : LES ARTICLES..... 101

Article 1 : les troubles du comportement alimentaire ne sont pas associés aux lésions histologiques dans la NAFLD..... 103

1.	Présentation de l'étude.....	103
2.	Objectifs de l'étude.....	104
3.	Publication : "No association between binge eating disorder and severity of NAFLD in severely obese patients".....	105
4.	Conclusions/perspectives.....	107

Article 2 : la vitamine D n'est pas associée aux lésions hépatiques chez les patients obèses morbides.....	109
1. Présentation de l'étude.....	109
2. Objectifs de l'étude.....	110
3. Publication : "severe vitamin D deficiency is not associated with liver damage in morbidly obese patients".....	111
4. Conclusions/perspectives.....	119
Article 3 : FNDC5/irisine est une hepatokine protectrice de la stéatose.....	123
1. Présentation de l'étude.....	123
2. Objectifs de l'étude.....	124
3. Publication : "Hepatic FNDC5/irisin is a local protective factor against Non-Alcoholic Fatty Liver".....	125
4. Conclusions/perspectives.....	127
Conclusion générale.....	133
<i>BIBLIOGRAPHIE.....</i>	<i>135</i>
<i>TRAVAUX SUPPLEMENTAIRES.....</i>	<i>157</i>
Annexe 1.....	159
Annexe 2.....	163
Annexe 3.....	181
Annexe 4.....	193
Annexe 5.....	203
Annexe 6.....	215

ABBREVIATIONS

ACC : acétyl-CoA carboxylase
AG : acides gras
AGNE : acides gras non estérifié
AGS8 : activator of G signaling 8
ALAT : alanine aminotransférase
APOB : apolipoprotéine B
ASAT : aspartate aminotransférase
BDNF : brain-derived neurotrophic factor
CAR : constitutive androgen receptor
CCL : C-C motif chemokine ligand
CD : cluster of differentiation
CDD : régime déficient en choline
CHC : carcinome hépato-cellulaire
ChREBP : carbohydrate-responsive element-binding protein
CIDEB : cell death-inducing DFF45 like effector B
DAMPs : danger-associated molecular patterns
DGAT : diacylglycérol O-acyltransférase
DT2 : diabète de type 2
ER : récepteur des œstrogènes
ERK : extracellular-signal regulated kinase
FAS : fatty acid synthase
FGF : fibroblast growth factor
FNDC : fibronectin type III domain containing
gamma GT : gamma glutamyl transférase
GLP-1 : glucagon-like peptide 1
HbA1c : hémoglobine glycosylée
HDL-C : high-density lipoprotein cholesterol
HFD : high fat diet
HTA : hypertension artérielle
IC : intervalle de confiance
IFN : interféron
IL : interleukine

IMC : indice de masse corporelle
JNK : c-Jun N-terminal kinase
KC : cellules de Küpffer
KO : know-out
LDL-C : low-density lipoprotein cholesterol
LPS : lipopolysaccharide
LSECs : liver sinusoidal endothelial cells
LXR : liver X receptor
MAIT : mucosal-associated invariant T
MAPK : mitogen-activated protein kinase
MBOAT7 : membrane bound O-acyltransferase domain-containing 7
MCDD : régime déficient en méthionine et choline
miR : micro-ARN
mTOP : mammalian target of rapamycin
MTTP : microsomal triglyceride transfer protein
NAFL : nonalcoholic fatty liver
NAFLD : nonalcoholic fatty liver disease = maladies du foie gras non alcooliques
NASH : nonalcoholic steatohepatitis = stéatohépatite non alcoolique
NK : cellules natural killer
NLRP3 : NOD-like receptor family pyrin domain containing 3
OR : odds ratio
PAMPs : pathogen-associated molecular patterns
PDGF : platelet derived growth factor
PGC1 : peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1
PNPLA3 : patatin like phospholipase domain containing 3
PPAR : peroxisome proliferator activated receptor
PRMT3 : protein-arginine methyltransferase-3
PUMA : p53 upregulated modulator of apoptosis
RE : réticulum endoplasmique
ROS : espèces réactives à l'oxygène
SAOS : syndrome d'apnée-hypopnée obstructif du sommeil
SCD : stearyl-coA desaturase-1
SNP : single nucleotide polymorphism
SOPK : syndrome des ovaires polykystiques

SREBP-1c : sterol regulatory element binding protein-1c

STZ : streptozotocine

TAA : thioacétamide

TG : triglycérides

TGF β : transforming growth factor β

TLR : toll like receptor

TM6SF2 : transmembrane 6 superfamily member 2

TNF α : tumor necrosis factor α

TRAIL : TNF-like apoptosis-inducing ligand

UCP1 : uncoupled protein 1

VLDL : very low-density lipoprotein

WD : western diet

1^{ère} PARTIE :
INTRODUCTION

Partie 1 : La « Nonalcoholic fatty liver disease » ou NAFLD

1. Définition

Le terme NAFLD regroupe un continuum d'anomalies hépatiques allant de la stéatose (en anglais Nonalcoholic Fatty Liver (NAFL)), à la stéato-hépatite non alcoolique (en anglais Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH)) et ses complications : fibrose hépatique, cirrhose et carcinome hépatocellulaire (CHC) (Friedman et al. 2018; Bedossa et al. 2017).

La stéatose est définie par la présence de vacuoles lipidiques, généralement macrovésiculaires, au sein des hépatocytes. Elle est significative lorsqu'elle est supérieure à 5 % et débute typiquement en région péri-centrolobulaire (figure 1a).

La NASH est définie par l'association d'une stéatose et d'une activité inflammatoire qui comprend une infiltration de cellules inflammatoires (dont des macrophages, des lymphocytes voire des cellules polynucléaires neutrophiles) et une souffrance cellulaire caractérisée par une ballonnisation hépatocytaire (figure 1b). La NASH peut être associée à des lésions de fibrose de sévérité variable. La fibrose au cours de la NASH se développe selon une localisation particulière, d'abord périsinusoïdale en région péri-centrolobulaire (zone 3), puis une fibrose sinusoïdale dense peut apparaître, éventuellement associée à une fibrose en pont voire à une cirrhose (figure 1c). D'autres lésions élémentaires peuvent être présentes (corps de Mallory, corps apoptotiques, réaction ductulaire...). Différents scores histologiques sont utiles en routine clinique et en recherche (Bedossa and Patel 2016).

La caractérisation précise d'une NAFLD nécessite une analyse histologique par une biopsie du foie qui du fait de ses complications potentielles ne peut pas être proposée à l'ensemble des sujets à risque de NAFLD. Le développement d'outils non invasifs, fiables, faciles d'accès et si possible peu onéreux pour le diagnostic différentiel entre stéatose/NASH et/ou définissant la présence d'une fibrose est un enjeu majeur (EASL, EASD, EASO guidelines 2016).

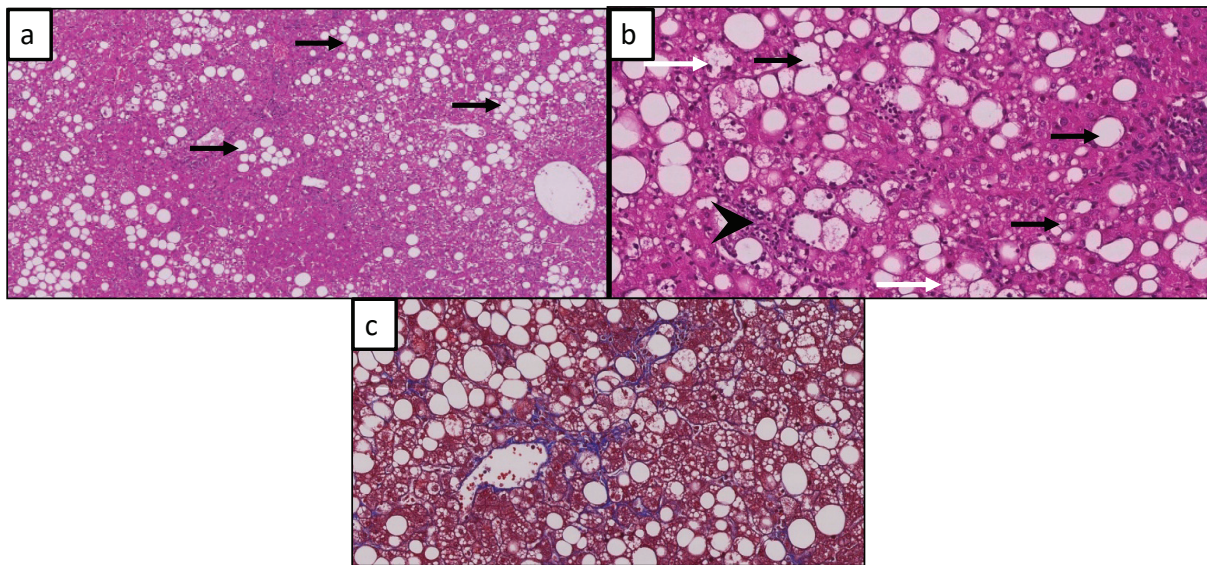


Figure 1 : Les différentes étapes de la NAFLD

a - la stéatose : présence de vacuoles lipidiques macrovésiculaires dans les hépatocytes (flèche noire)

b - la NASH : présence d'une stéatose (flèche noire) associée à une infiltration de cellules inflammatoires (tête de flèche) et d'une ballonisation hépatocytaire (flèche blanche)

c - fibrose F1 péri-centolobulaire, coloration au trichrome de Masson

2. Épidémiologie

2.1. Prévalence de la NAFLD dans le monde

La NAFLD constitue un problème de Santé publique de par la grande fréquence de ces lésions à travers le monde. Les estimations épidémiologiques les plus fiables sont basées sur la présence d'une stéatose en imagerie. Les études prenant en considération une élévation isolée des transaminases ou de la gamma glutamyl transférase (GT) dans un contexte de surpoids ou d'obésité sous-estiment l'ampleur de la NAFLD, compte tenu de la fréquence de la normalité du bilan hépatique dans ce contexte. Ces outils étant imparfaits, il y a une imprécision dans la prévalence exacte de la NAFLD et de la NASH. L'estimation de la NASH repose sur des approximations à partir de séries de patients biopsiés. Globalement, la prévalence NAFLD serait de 25 % de la population adulte mondiale répartie telle que 24 % en Amérique du Nord, 30,5 % en Amérique du Sud, 24 % en Europe, 13,5 % en Afrique, 32 % au Moyen-

Orient, 27 % en Asie (figure 2). La NASH serait présente chez 1,5 à 6,5 % de la population générale américaine (Younossi et al. 2019).

2.2. Prévalence de la NAFLD en France

L'évaluation de l'épidémiologie de la NAFLD en France est connue depuis quelques mois seulement. En effet, la cohorte CONSTANCES est un échantillon de 118 664 individus représentatifs de la population française. La prévalence de la NAFLD, calculée à l'aide du Fatty Liver Index, est de 16,7 % dans la population générale dont 24,6 % pour les hommes et 10,1 % pour les femmes. Parmi les patients avec NAFLD, 2,6 % présentent une fibrose sévère diagnostiquée à l'aide du Forns Index.

La prévalence de la NAFLD augmente avec l'âge, passant de 5,2 % chez les 18-28 ans à 26,8 % chez les 68-78 ans. Les patients les plus à risque de NAFLD sont les diabétiques et les obèses avec une prévalence de 63 % et 79,7 % respectivement (Nabi 2018).

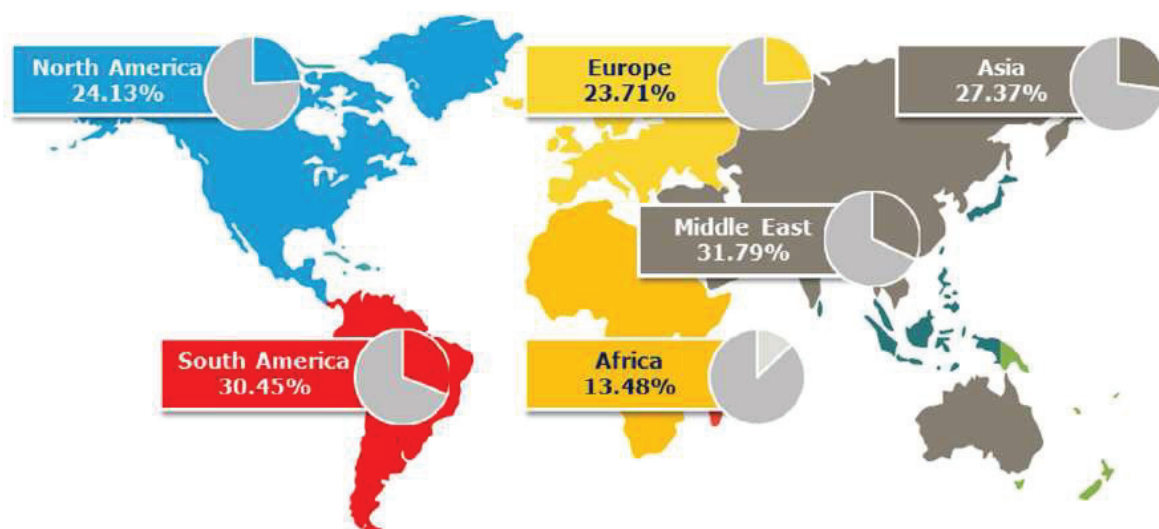


Figure 2 : La prévalence globale de la NAFLD d'après Younossi et al. Hepatology 2019

3. Histoire naturelle de la NAFLD

Plusieurs cohortes, avec des biopsies hépatiques répétées dans le temps, ont éclairé l'histoire naturelle de la maladie.

Classiquement, la stéatose, présente chez environ 80 % des patients avec une NAFLD, est associée à un bon pronostic hépatique. Au contraire, la NASH, présente

chez environ 20 % des patients avec une NAFLD, est associée au risque d'évolution vers une fibrose voire une cirrhose (figure 3). En effet, il a été montré dans une méta-analyse de 2015 que la progression d'un stade de fibrose chez des patients présentant une stéatose pure-F0 mettait 14 ans, alors qu'elle mettait 7 ans chez des patients présentant une NASH-F0. Sur une estimation sur 15 ans, 1% des patients stéatose-F0 contre 11 % de patients NASH-F0 étaient devenus cirrhotiques (Singh et al. 2015; Rinella 2015). La NASH est donc la forme évolutive de la maladie.

Parmi les patients non NASH, ceux qui présentent une stéatose et une inflammation (sans ballonisation) peuvent développer une NASH et/ou une fibrose hépatique, quelques années plus tard. L'impact de la présence d'une stéatose avec des lésions de ballonisation (sans inflammation) sur la progression de la fibrose, n'a pas été clairement étudié (McPherson et al. 2015; Singh et al. 2015).

La fibrose hépatique est le principal facteur pronostique de la mortalité hépatique et globale chez les patients (Angulo et al. 2015). Ce facteur pronostique majeur amène à distinguer des patients avec une NASH précoce (« Early NASH ») qui ont une fibrose absente ou minime (F0-F1 selon la classification NASH CRN) ; des patients avec une NASH fibrosante (« Fibrotic NASH ») qui ont une fibrose significative (F2 selon la classification NASH CRN), ou une fibrose en pont ou sévère (F3 selon la classification NASH CRN) ; et enfin les patients avec une cirrhose NASH (« Cirrhotic NASH ») (EASL, EASD, EASO, guidelines 2016). Ces lésions constitueraient un véritable continuum de lésions qui peuvent s'aggraver ou régresser au cours du temps selon l'augmentation ou l'amélioration des facteurs étiologiques (Bedossa et al. 2017).

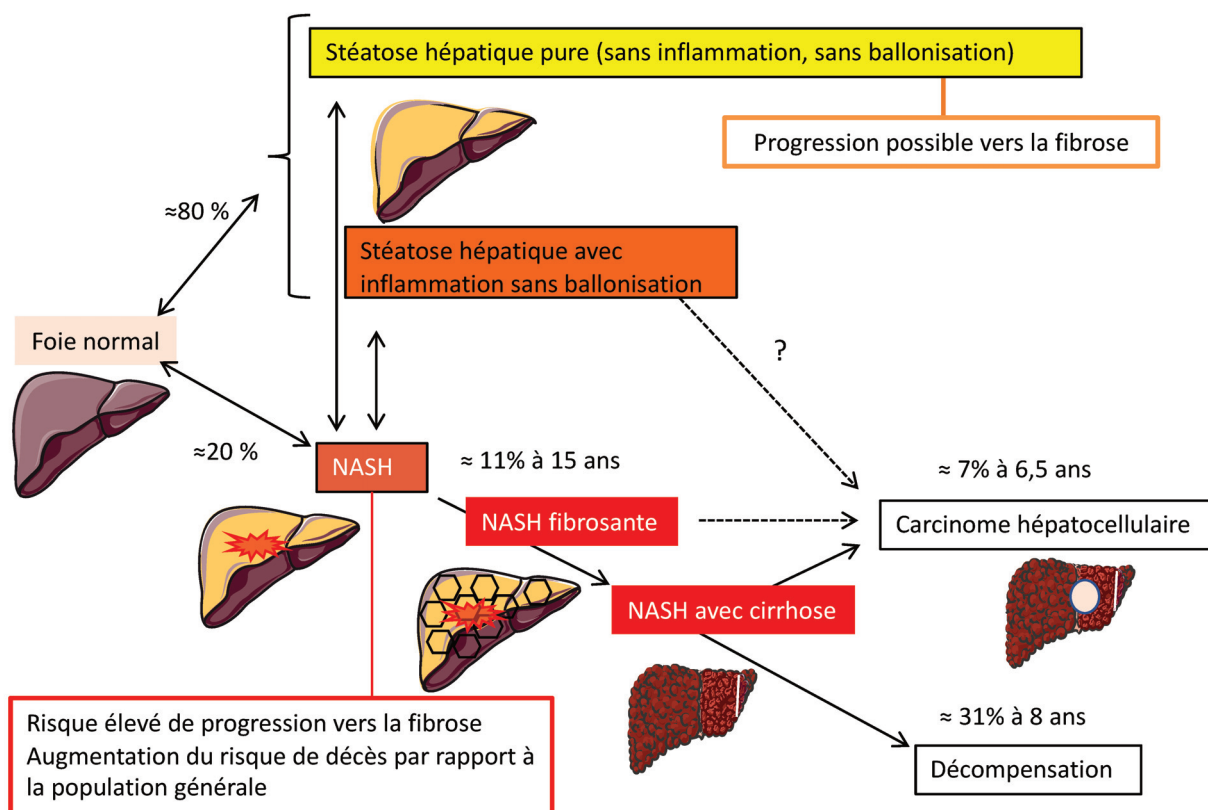


Figure 3 : Représentation schématique de l'histoire naturelle de la NAFLD d'après Anty et al. Hépatogastro 2017

Classiquement, la stéatose, présente chez environ 80 % des patients avec une NAFLD, est associée à un bon pronostic hépatique. Au contraire, la NASH, présente chez environ 20 % des patients avec une NAFLD, est associée à un risque d'évolution vers une fibrose voire une cirrhose. Cependant, une stéatose associée à une inflammation présente un risque d'évolution vers une NASH et/ou une fibrose hépatique, en quelques années. De plus, certains patients avec une « stéatose pure » (sans inflammation, ni ballonnisation hépatocytaire) ont aussi un risque évolutif hépatique. La fibrose hépatique est le principal facteur pronostique de la mortalité hépatique et globale. Les lésions de stéatose, de NASH et de fibrose (au moins dans les stades initiaux) sont réversibles.

Au cours de la NAFLD, un carcinome hépatocellulaire (CHC) peut compliquer une cirrhose. Cependant, 30 % des CHC apparaissent hors cirrhose, voire hors NASH (sur stéatose).

Le taux annuel moyen de progression de la fibrose chez les patients NASH était de 0,09 (IC 95 % : 0,06-0,12) et le taux d'incidence pour 1000 personnes-années de progression de la fibrose était de 40,8 % (IC 95 % : 34,7-47,1) (Younossi et al. 2016). Cependant, la réversibilité des lésions de stéatose, de NASH et de la fibrose (au moins dans les stades initiaux) a également été mise en évidence dans différentes circonstances : évolution spontanée, perte de poids \geq 8-10 % du poids initial, effets de

certains médicaments, chirurgie bariatrique (Vilar-Gomez et al. 2015; Lassailly et al. 2015).

L'apparition d'un carcinome hépatocellulaire (CHC) est l'une des craintes chez un patient ayant une NAFLD. L'incidence annuelle du CHC chez les patients NAFLD était de 0,44 (IC 95 % 0,29-0,66) pour 1000 personnes-années contre 5,29 (IC 95 % 0,75-37,56) pour 1000 personnes-années chez les patients NASH (Younossi et al. 2016). Le CHC au cours de la NAFLD survient dans 70 % des cas chez des patients cirrhotiques mais aussi, dans 30 % des cas, à des stades plus précoces de la maladie (NASH voire stéatose pure). Cela soulève le problème du dépistage du CHC chez ces patients qui sont actuellement très nombreux. Le développement d'outils non invasifs afin d'identifier les patients les plus à risque de développer cette complication et devant donc être dépistés est l'un des enjeux des années futures (Anstee et al. 2019).

La mortalité des patients ayant une NAFLD surtout dans le groupe NASH est augmentée par rapport à la population générale. Les causes de mortalité sont en premier lieu d'origine cardio-vasculaires, puis vient la mortalité par cancers extra-hépatiques et en 3^{ème} place la mortalité d'origine hépatique (Angulo et al. 2015; Söderberg et al. 2010). Les taux incidence de la mortalité hépatique et de la mortalité globale chez les patients NAFLD seraient de 0,77 (IC 95 % : 0,33 -1,77) pour 1000 personnes-années et 15,44 (IC 95 % : 11,72 – 20,34) pour 1000 personnes-années respectivement. Les taux d'incidence de la mortalité hépatique et de la mortalité globale chez les patients NASH seraient de 11,77 (IC 95 % : 7,10 -19,53) pour 1000 personnes-années et 25,56 (IC 95 % : 6,29 – 103,8) pour 1000 personnes-années respectivement (Younossi et al. 2016). La NASH et ses complications sont actuellement la deuxième cause de transplantation hépatique aux USA. Elle est annoncée comme future première cause d'ici 2025 (Younossi et al. 2019; Wong et al. 2015).

4. Les facteurs de risque cliniques de NAFLD

La NAFLD est une pathologie complexe qui implique l'interaction de nombreux paramètres environnementaux, génétiques et épigénétiques (figure 4). Ces paramètres sont éminemment variables d'un sujet à un autre et expliquent l'hétérogénéité de la maladie. Cette hétérogénéité se traduit par des mécanismes, des expressions phénotypiques et des complications divers d'un sujet à un autre, voire d'une population (groupe ethno-géographique) à une autre.

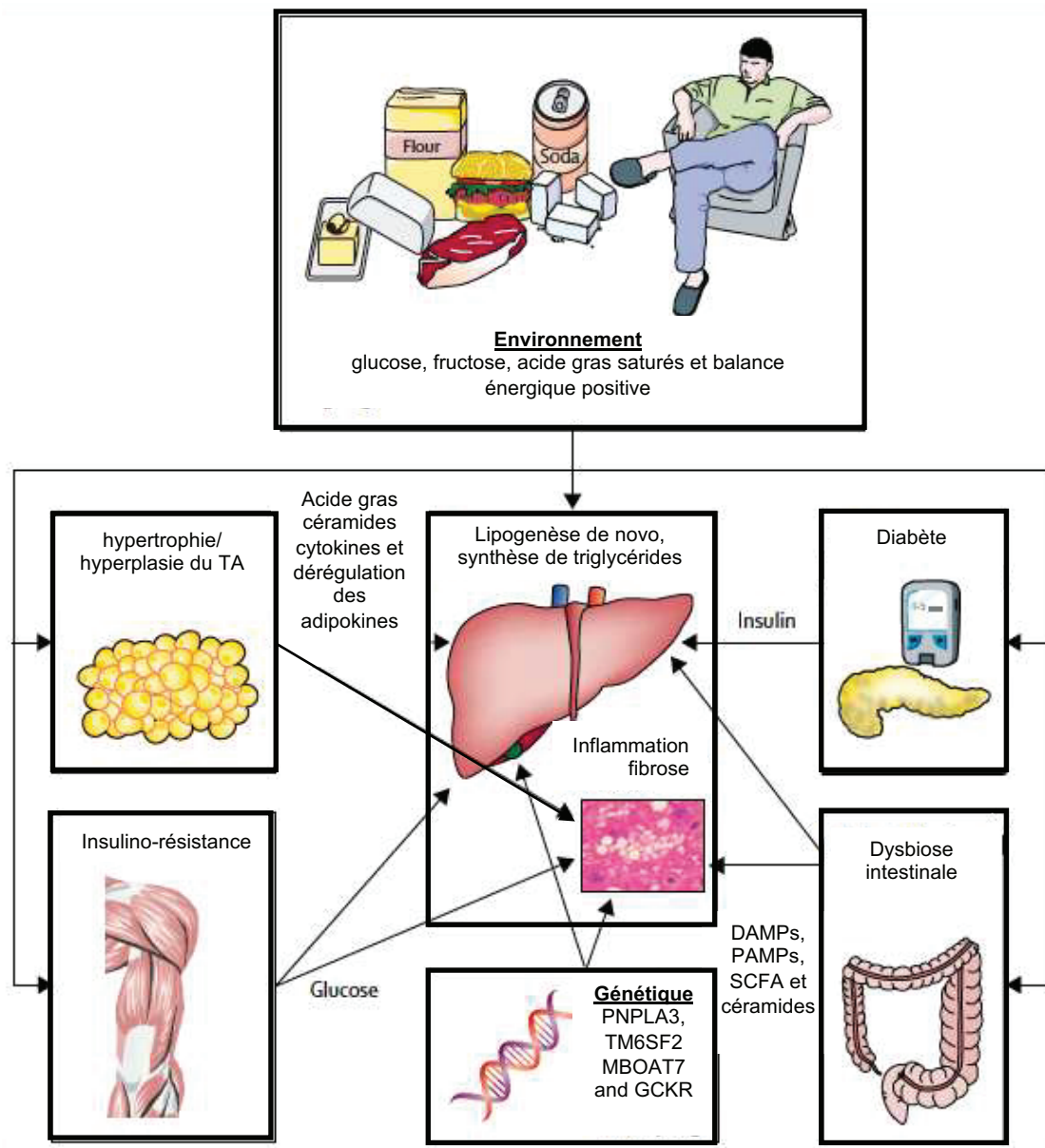


Figure 4 : Les facteurs de risque de la NAFLD d'après Stefan *et al.* Lancet diabetes endocrinol 2019

La NAFLD est souvent décrite comme la complication hépatique du syndrome métabolique et est associée à l'insulino-résistance. La définition du syndrome métabolique est la présence de 3 critères parmi les 5 suivants (Alberti *et al.* 2009) :

- une obésité centrale définie, en Europe, par un tour de taille ≥ 94 cm chez l'homme ou ≥ 80 cm chez la femme
- une élévation des triglycérides $\geq 1,7$ mmol/l (1,5 g/l) ou un traitement spécifique

- une baisse du high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) < 1,03 mmol/l (0,4 g/l) chez l'homme ou < 1,29 mmol/l (0,5 g/l) chez la femme
- une élévation de la pression artérielle avec pression artérielle systolique \geq 130 mmHg ou diastolique \geq 85 mmHg ou un traitement spécifique
- une élévation de glycémie à jeun \geq 5,6 mmol/l (1,0 g/l) ou diabète de type 2 connu

Cependant, tous les patients avec une NAFLD n'ont pas de syndrome métabolique et tous les patients avec un syndrome métabolique n'ont pas de NAFLD. En effet, Il est frappant de constater que certaines prises de poids relativement faibles (de l'ordre d'une dizaine de kilos) peuvent s'associer à des NASH fibrosante \pm accompagnées d'un diabète de type 2, alors qu'à l'opposé 6 à 10 % des patients obèses morbides (Indice de Masse Corporelle (IMC) \geq 40 kg/m²) ont un foie histologiquement normal. La NASH nécessite souvent des facteurs « complémentaires » pour apparaître et inversement l'amélioration isolée (par voie médicamenteuse) de l'insulino-résistance n'est pas toujours suffisante pour traiter une NASH (Friedman et al. 2018).

4.1. L'obésité et les déterminants de l'obésité

L'obésité est un problème de santé publique majeur en France. On estime, d'après le rapport OBEPI de 2012, que 34 % des français sont en surpoids (IMC compris entre 25 et 30 kg/m²) et 15 % sont obèses (IMC \geq 30 kg/m²) dont 1,2 % sont obèses morbides (IMC \geq 40 kg/m²). Ce fléau est en augmentation constante puisque l'obésité était évaluée à 8,5 % en 1997, ce qui fait une augmentation relative de 76 % en 15 ans (Rapport Obepi 1997 et 2012).

4.1.1. Facteurs environnementaux

4.1.1.1. Excès calorique – sédentarité – manque d'activité physique

Un apport alimentaire inadapté de façon chronique, associant un excès calorique (typiquement trop de hydrates de carbone et/ou trop de lipides) et des déséquilibres nutritionnels, est à la base de la prise de poids. Les excès en acides gras saturés, en acides gras polyinsaturés oméga 6 et en fructose industriel (issus du sirop de maïs) sont au premier plan. Très fréquemment, un manque chronique d'activité physique et un excès de sédentarité (temps éveillé passé assis ou allongé) participent à une balance énergétique entrée/sortie excédentaire pour les apports caloriques avec en

conséquence une augmentation du stockage du surplus d'énergie sous forme de triglycérides, dans le tissu adipeux essentiellement sous-cutané (Heymsfield and Wadden 2017).

4.1.1.2. Troubles du comportement alimentaire

Les troubles du comportements alimentaires les plus étudiés chez les patients obèses sont la boulimie et les troubles compulsifs alimentaires (« binge eating disorder » en anglais). Ces troubles sont caractérisés par des épisodes récurrents (au moins 1 fois par semaine pendant 3 mois) de prises alimentaires compulsives. La prévalence de ces troubles du comportements alimentaires est plus élevée dans la population obèse avec une prévalence de 16-52 % dans une étude latino-américaine. Aux États-Unis, une étude portant sur un échantillon représentatif de l'ensemble du pays, constitué de 9282 personnes évaluées en 2001-2003, a révélé que 42 % des personnes ayant souffert de troubles compulsifs alimentaires à un stade de leur vie souffraient d'obésité au moment de l'enquête (Hudson et al. 2007). Les études montrent une association entre obésité et troubles de l'alimentation et vont dans le sens de l'hypothèse selon laquelle ces affections peuvent potentiellement contribuer l'une à l'autre et/ou s'exacerber mutuellement. Une étude pilote a évalué les troubles du comportement alimentaire chez 95 patients présentant une NAFLD (diagnostiquée par imagerie, biopsie ou test non invasifs). Les résultats suggèrent une augmentation des troubles compulsifs alimentaires chez les patients avec NAFLD mais d'autres études sont nécessaires (Zhang et al. 2017).

Les personnes souffrant d'obésité et de troubles compulsifs alimentaires concomitants courent un risque élevé de développer plusieurs complications médicales et psychosociales. Une étude menée auprès de 152 personnes obèses a révélé que les personnes souffrant d'hyperphagie boulimique avaient des IMC plus élevés, des niveaux de dépression plus graves et des troubles obsessionnels compulsifs ainsi que des sentiments plus forts d'insuffisance et d'infériorité que ceux qui n'en avaient pas (da Luz et al. 2018).

4.1.2. Génétique

Des études sur les jumeaux ont estimé que l'héritabilité de l'obésité se situait entre 40 % et 75 %. Les formes génétiques de l'obésité présentent un continuum de caractéristiques cliniques mais ont été historiquement subdivisées en trois sous-types

différents : obésité syndromique mendélienne (monogénique), obésité mendélienne non syndromique et obésité polygénique. Les formes mendéliennes de l'obésité résultent d'anomalies chromosomiques et de variants pathogènes rares dans des gènes qui codent pour des protéines essentielles dans la régulation du bilan énergétique. Les syndromes de Prader-Willi et de Bardet-Biedl comptent parmi les syndromes d'obésité les plus connus (Farooqi and O'Rahilly 2005). Les formes non syndromiques de l'obésité mendélienne connues à ce jour sont principalement caractérisées par des défauts génétiques dans la voie de la leptine / mélanocortine conduisant à l'obésité hyperphagique. Les formes polygéniques de l'obésité sont déterminées par l'effet cumulé de multiples variants génétiques communs, chacun avec des effets modestes. Plus de 70 gènes ont été associés à l'obésité, leur répartition varie selon les ethnies. La majorité des polymorphismes (SNP) se situent dans des régions non codantes des gènes (Stryjecki et al. 2018). Seuls 24,1 % des syndromes d'obésité ont été complètement élucidés et 13,9 % ont été partiellement élucidés (Kaur et al. 2017). Pour les 62 % restant, aucun gène de maladie n'a encore été identifié, ce qui indique un besoin d'efforts accrus pour élucider la base génétique des syndromes d'obésité (Dong et al. 2018).

4.2. L'insulino-résistance

La molécule d'insuline est produite par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. L'insuline a un rôle d'hormone hypoglycémisante, et elle possède une activité anabolique majeure dans la mise en réserve des substrats glucidiques et lipidiques. Ces effets, lorsque l'insuline se lie à son récepteur membranaire spécifique, s'expriment en priorité sur ses trois tissus cibles : le foie, le muscle et le tissu adipeux. L'insulino-résistance se caractérise par une résistance des cellules de notre organisme à l'action de l'insuline, induisant une augmentation de l'insulinémie, et conduisant ainsi directement ou indirectement aux différentes autres anomalies du syndrome métabolique. L'insulino-résistance s'accompagne d'une élévation de la glycémie, et peut engendrer un diabète de type II. Le métabolisme lipidique est également régulé en partie par l'insuline, particulièrement en période post prandiale.

Au début, la résistance est compensée par un hyperinsulinisme, ce qui permet de préserver la tolérance au glucose. La détérioration de la tolérance au glucose intervient quand la résistance à l'insuline augmente, ou que la réponse compensatoire de la sécrétion diminue, ou bien quand les deux phénomènes se produisent simultanément.

Le gold standard de l'évaluation de l'insulino-résistance se fait avec un clamp euglycémique-hyperinsulinémique. Le score HOMA-IR (insuline x glucose / 22,5) permet une évaluation approximative de l'insulino-résistance à l'échelle de cohortes de patients (Bugianesi et al. 2005; Patel and Goyal 2019).

Chez les patients présentant une NAFLD, la sensibilité à l'insuline est diminuée dès les stades précoces de la stéatose (1,5 %). En revanche, la sensibilité adipocytaire à l'insuline est corrélée à une aggravation continue des triglycérides intra-hépatiques traduisant l'association forte entre insulino-résistance adipocytaire (lipolyse) et stéatose (Bril et al. 2015; Rotman and Neuschwander-Tetri 2017).

L'insulino-résistance évolue ensuite vers une insulino-pénie responsable de l'apparition d'un diabète de type 2.

4.3. Le diabète de type 2

Le diabète de type 2 (DT2) est défini par la présence d'une glycémie à jeun $\geq 1,26$ g/l à 2 reprises ou une glycémie aléatoire ≥ 2 g/l. La principale méthode diagnostique de la NAFLD dans les différentes études de prévalence chez les patients diabétiques est la présence d'une stéatose à l'échographie hépatique. Plusieurs revues récentes ont évalué la prévalence de la NAFLD chez les patients diabétiques : une récente revue systématique d'études portant sur 49 000 personnes atteintes de diabète a montré que la prévalence globale de la NAFLD chez les personnes atteintes de diabète était de 55,48 %. Le taux le plus élevé a été enregistré en Europe (67,97 %) et le plus faible en Afrique (30,90 %) (Younossi et al. 2019). La prévalence globale de NASH chez les patients diabétiques pour lesquels des biopsies étaient disponibles était de 65,26 %. Cependant ce taux est probablement surestimé et la prévalence de la NASH serait plutôt autour de 37 % des patients diabétiques avec NAFLD (Younossi et al. 2019). De plus, la prévalence de la fibrose avancée (\geq F3) était de 15,05 % (Younossi et al. 2019). En France, la prévalence de la fibrose avancée (évaluée par le Forns Index) est de 7,6 % chez les patients DT2 versus 2,6 % dans la population générale (Nabi 2018). La prévalence de la NAFLD chez les diabétiques est plus élevée chez les patients obèses, les hommes et en cas d'hypertension artérielle (Dai et al. 2017). De plus, la NAFLD est associée à un risque accru de diabète (HR 2,22 ; IC 95 % 1,84–2,60) (Mantovani et al. 2018).

4.4. Les autres paramètres du syndrome métabolique : HTA, dyslipidémie

Comme vu ci-dessus, l'obésité abdominale et le diabète de type 2 sont associés à la NAFLD. Ces 2 éléments font partie du syndrome métabolique au même titre que l'hypertension artérielle (HTA) ou la dyslipidémie. On rappelle également que chez les patients présentant une NAFLD sans fibrose, la principale cause de mortalité est d'origine cardio-vasculaire (Younossi et al. 2019). En effet, sur une période de 5 ans, des événements cardiovasculaires sont survenus chez 5,2 % des sujets NAFLD et chez 1,0 % des individus non-NAFLD (Corey and Chalasani 2014).

Une étude longitudinale sur 5 ans montre que la prévalence de la NAFLD est de 24,7 % chez les patients qui ne développent pas d'HTA versus 39,5 % chez ceux qui développent une HTA. De plus, le développement de la NAFLD était associé à une augmentation de l'HTA même après ajustement en fonction des multiples facteurs de risque d'hypertension (OR = 1,60 (IC 95 % : 1,30-1,96) (Sung et al. 2014). Initialement l'HTA semblait avoir un effet moins important sur le risque de développement de la NAFLD que les autres composants du syndrome métabolique (Lonardo et al. 2018). Cependant, une méta-analyse de 11 études de cohorte portant sur des patients atteints de NAFLD qui ont eu des biopsies hépatiques séquentielles, a montré que l'HTA au départ augmentait de presque 2 fois le risque de progression de la fibrose (Singh et al. 2015). Pour cette raison, les recommandations européennes de 2016 sur la prise en charge de la NAFLD recommandent une surveillance plus étroite des patients atteints de NASH et d'HTA, en raison de leur risque accru de maladie hépatique progressive (EASL, EASD, EASO, guidelines 2016).

La NAFLD a été également associée indépendamment à une augmentation des niveaux en triglycérides (TG) et en low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), à une diminution de la taille des particules de LDL et à une diminution du niveau de high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) (Corey and Chalasani 2014; Speliotes, Massaro, et al. 2010). En plus chez les patients NASH, le taux de non HDL-C est augmenté. Ce profil lipidique, très athéromateux, est partiellement responsable du risque cardio-vasculaire accru chez ces patients (Katsiki et al. 2016).

4.5. La vitamine D

Parmi les différents facteurs de risque cliniques étudiés comme associés à la NAFLD, les données concernant la vitamine D sont hétérogènes et nécessitent des investigations supplémentaires. La vitamine D est une hormone stéroïde

principalement synthétisée dans les couches profondes de l'épiderme sous l'action des rayons ultra-violet (90 à 95 %). La source accessoire est l'alimentation qui apporte 5 à 10 % de la vitamine D sous la forme de cholécalciférol (vitamine D3 issue des apports animaux) ou d'ergocalciférol (vitamine D2, issue des apports végétaux et des champignons). Les formes circulantes sont la 25-OH Vitamine D (également appelée Calcidiol, produite par le foie à partir du cholécalciférol) et la forme active, la 1,25-OH Dihydroxyvitamine D (également appelée Calcitriol, qui résulte de l'hydroxylation de la 25-OH Vitamine D dans le rein). La 25-OH vitamine D est la forme qui représente le stock en vitamine D, c'est donc cette dernière qui doit être dosée. Sa concentration peut être normale (>30 ng/ml), insuffisante (20-30 ng/ml), déficitaire (10-20 ng/ml) ou sévèrement déficitaire (<10 ng/ml). Si l'on prend comme seuil 30 ng/ml, le nombre de personnes dans le monde souffrant d'une insuffisance en vitamine D s'élèverait à 1 milliard (Wacker and Holick 2013).

Très brièvement, la vitamine D a un rôle primordial « classique » dans la régulation phosphocalcique, dans le développement et le maintien de la minéralisation osseuse et dans la trophicité des muscles striés squelettiques. Chez l'adulte, son absence est responsable d'ostéomalacie. La carence de vitamine D conduit également à une hyper-parathyroïdie secondaire qui favorise la résorption osseuse et l'ostéoporose. La vitamine D intervient également comme régulateur physiologique de la prolifération-différenciation de nombreux types cellulaires et comme modulateur des défenses immunitaires de l'organisme (« actions non classiques »). Le récepteur de la vitamine D est présent à la surface de quasiment toutes les cellules immunitaires, et notamment, des lymphocytes CD4 et CD8, des neutrophiles, et des cellules présentatrices d'antigènes (macrophages et cellules dendritiques). Globalement la vitamine D favorise les défenses innées et module le système immunitaire spécifique vers une polarisation anti-inflammatoire. La vitamine D est également impliquée dans d'autres fonctions comme la régulation du système rénine-angiotensine (diminution de la production de rénine) et la modulation de l'apoptose. La vitamine D aurait un effet protecteur sur le système cardiovasculaire et un effet anti-tumoral. Enfin, la vitamine D est inversement corrélée à la présence d'une obésité (Wacker and Holick 2013).

Dans la NAFLD, les données concernant la Vitamine D sont hétérogènes. Dans des conditions expérimentales, il a été montré que la vitamine D jouait un rôle protecteur dans la fibrogénèse et l'inflammation hépatique (Borges et al. 2018). En effet, la vitamine D inhibait l'expression hépatique de certains marqueurs pro-fibrogène

tels que le platelet derived growth factor (PDGF) et le transforming growth factor β (TGF β), et supprimait l'expression de collagène (Beilfuss et al. 2015; Abramovitch et al. 2011). De plus la vitamine D améliorait, au niveau hépatique, la réponse à l'insuline à travers une modification de l'expression de son récepteur dans les différentes cellules du foie (Borges et al. 2018).

Chez l'humain, une méta-analyse en 2013 des différentes études observationnelles ayant évalué la 25-OH vitamine D chez les patients avec une NAFLD, a noté que ces patients avaient des concentrations sériques de 25-OH vitamine D plus bas que ceux des groupes contrôles. Ces patients avaient 1,26 fois plus de risque d'être déficients en vitamine D (OR 1,26, 95 % IC : 1,17-1,35). Parmi les 17 études retenues, les critères de jugement étaient variables (histologie (n = 4), échographie (n = 10), cytolysse (n = 3)). Deux études étaient négatives. Enfin, plusieurs de ces études n'ont été présentées qu'en congrès, et il n'y a pas eu de méta-analyse en données individuelles (Eliades et al. 2013). En revanche, la carence en vitamine D ne semblait pas associée à la NAFLD dans une étude de plus de 1800 patients. A noter que le diagnostic de NAFLD était fait à partir du « hepatic steatosis index » basé sur les ASAT, ALAT, l'IMC, le sexe et la présence d'un diabète (Ha et al. 2017). Au total, 29 études trouvaient une association négative entre la vitamine D et la NAFLD alors que 6 études ne trouvaient pas d'association (Pacifico et al. 2019). La 25-OH vitamine D n'était pas non plus associée à la sévérité de la fibrose hépatique dans une méta analyse récente (Jaruvongvanich et al. 2017). Dans des études chez le patient cirrhotique (cirrhose de toutes origines), la prévalence de la déficience en 25-OH vitamine D était plus élevée (Konstantakis et al. 2016) et le déficit en 25-OH vitamine D était associé aux infections de liquide d'ascite (Anty et al. 2014). Enfin, plusieurs essais contrôlés, ayant évalués la supplémentation en vitamine D pendant seulement 24 semaines chez des patients présentant une NAFLD, n'ont pas montré d'amélioration des lésions hépatiques ou des paramètres métaboliques (Barchetta et al. 2017; Barchetta et al. 2016; Kitson et al. 2016; Tabrizi et al. 2017). Dans d'autres maladies hépatiques, telles que la maladie liée à l'alcool, la 25-OH vitamine D était plus basse chez les patients cirrhotiques et était associé aux infections de liquide d'ascite. En conclusion, des études supplémentaires, sur le long terme, sont nécessaires pour évaluer l'implication de la vitamine D dans le développement ou l'aggravation de la NAFLD et l'intérêt d'une supplémentation orale.

4.6. Les autres facteurs de risque

De nombreux facteurs de risque ont été recherchés dans le développement de la NAFLD. Parmi eux, je ne développerai rapidement que le syndrome des ovaires polykystiques et le syndrome d'apnée-hypopnée obstructif du sommeil.

4.6.1. Le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK)

Le SOPK est une affection qui touche 5 à 10 % des femmes en âge de procréer. Il est défini par la présence d'ovaires polykystiques, d'un hyperandrogénisme et d'une oligo-ovulation (Bozdog et al. 2016). Le SOPK est associé à une insulino-résistance et au syndrome métabolique. L'incidence de la NAFLD chez les patientes présentant un SOPK était d'environ 41 % alors qu'elle était de 19 % chez les patients sans SOPK après appariement sur l'âge et le poids (Baranova et al. 2011). Une étude récente a montré que les patientes non obèses avaient une prévalence plus élevée de NAFLD (5,5 %) en cas de SOPK en comparaison à des patients non obèses sans SOPK (1,8 %, $p = 0.006$) et cela indépendamment du statut lipidique et glycémique (Kim et al. 2017).

4.6.2. Le syndrome d'apnée-hypopnée obstructif du sommeil (SAOS)

Le SAOS est défini par un trouble de la ventilation nocturne dû à la survenue anormalement fréquente de pauses respiratoires. Le SAOS est un facteur de risque de la NAFLD indépendamment de l'IMC (Tanné et al. 2005). Une méta-analyse a montré que le SAOS était significativement corrélé à la stéatose, l'inflammation lobulaire, la ballonisation et la fibrose et était associé à la progression de la NAFLD (Jin et al. 2018; Aron-Wisnewsky et al. 2016).

5. Physiopathologie de la NAFLD

La physiopathologie précise du développement de la NAFLD est très complexe et non encore complètement élucidée. La physiopathologie proposée ci-dessous est parfois simplifiée et pourra être modifiée dans le futur en fonction des avancées scientifiques.

5.1. Facteurs favorisants

5.1.1. La génétique

L'hérédité serait responsable de 40 % à 50 % de l'expression de la NAFLD en population générale. Une étude a montré que la prévalence de la NASH était

significativement plus élevée chez les apparentés au premier degré de patients avec une cirrhose NASH par rapport à un groupe contrôle (Caussy et al. 2017).

La génétique étudie l'hérédité et les gènes. Les modifications géniques associés au développement de la NAFLD sont les single nucleotides polymorphisms (SNP) qui sont définis par la modification d'un nucléotide par un autre.

Les 3 SNP les plus validés sont celui de la Patatin like phospholipase domain containing 3 (*PNPLA3*) ; son polymorphisme (I148M) a été associé à plus de stéatose, de NASH, de fibrose et de carcinome hépatocellulaire dans plusieurs cohortes (Speliotes et al. 2010; Sookoian and Pirola 2011; Romeo et al. 2008). Dans le foie, cette protéine transmembranaire est présente au niveau de la gouttelette lipidique et au niveau du réticulum endoplasmique dans les hépatocytes. Elle a pour rôle d'hydrolyser les triglycérides. Dans le cas du SNP I148M, le changement de l'acide aminé se fait à proximité du site catalytique de la protéine. Cela entraîne un changement de conformation et une diminution de l'accès au site catalytique pour le substrat. La protéine mutée a des capacités diminuées pour hydrolyser les triglycérides et qui va conduire à une augmentation de la taille des gouttelettes lipidiques et la majoration de la stéatose (Dongiovanni 2013). La protéine Transmembrane 6 superfamily member 2 (TM6SF2) est impliquée dans la physiologie de l'export des very low-density lipoprotein (VLDL) par l'hépatocyte. Son polymorphisme, qui diminue l'activité de la protéine, a été associé à plus de NAFLD, de NASH et de fibrose et était au contraire, protectrice de l'athérosclérose (Dongiovanni et al. 2015; Liu et al. 2014; Kozlitina et al. 2014).

La protéine Membrane bound O-acyltransferase domain-containing 7 (*MBOAT7*) est impliquée dans la production du phosphatidylinositol et de l'acide arachidonique. Le polymorphisme de *MBOAT7* est associé à plus de NAFLD, plus de NASH, plus de fibrose et plus de carcinome hépatocellulaire (Mancina et al. 2016; Luukkonen et al. 2016).

D'autres polymorphismes génétiques portant sur des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique ou mitochondrial, la voie de signalisation de l'insuline ou l'activation des cellules stellaires ont été impliqués (figure 5). De façon surprenante, certains de ces polymorphismes génétiques sont associés aux lésions hépatiques indépendamment et parfois en l'absence de syndrome métabolique voire d'insulino-résistance (Anstee et al. 2019).

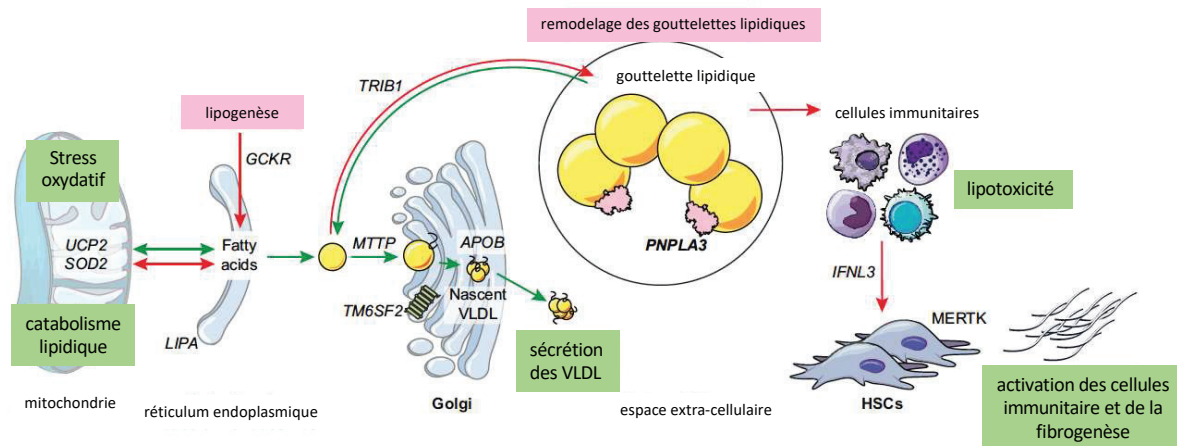


Figure 5 : Les principales voies impliquées dans la susceptibilité à la NAFLD et aux locus de gènes sont fortement associées au développement et à la progression de la maladie d'après Eslam et al. J hepatol 2018

APOB, apolipoprotein B; *IFNL3*, interferon lambda 3; *GSKR*, glucokinase regulatory gene; *HSC*, hepatic stellate cell; *LIPA*, lysosomal acid lipase; *MTTP*, microsomal triglyceride transfer protein; *PNPLA3*, patatin-like phospholipase domain-containing protein 3; *SOD2*, superoxide dismutase 2; *TM6SF2*, transmembrane 6 superfamily member 2; *TRIB1*, tribble-1; *UCP2*, Uncoupling protein 2; *VLDL*, very low-density lipoprotein.

5.1.2. L'épigénétique

L'épigénétique est l'étude des modifications dans l'expression d'un gène qui ne peuvent pas être expliquées par des altérations de la séquence des nucléotides. Les modifications épigénétiques peuvent être liées à des altérations de la méthylation de l'ADN et des histones et un remodelage de la chromatine, et des modifications des ARN non codants.

Une hyperméthylation notamment de Peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) gamma coactivator 1 alpha (PGC1 α), impliqué dans la biogenèse mitochondriale, et de l'ADN mitochondrial a été associée à l'insulino-résistance et à la NAFLD. Certains gènes seraient hyper (PPARs) et d'autres hypométhylés (transforming growth factor (TGF) β 1, platelet-derived growth factor α (PDGF- α)) mais de nombreux travaux restent à faire pour préciser cela et développer de potentielles nouvelles voies thérapeutiques.

Des études chez l'Homme montrent que la NASH est associée à une dérégulation de nombreux micro-ARN (miR). Les miR sont de petites molécules (19-23 nucléotides) d'ARN non codant qui régulent la dégradation et la traduction des ARN messagers

permettant de réguler l'expression de nombreux gènes. Au cours de la NASH, des miR d'intérêt ont été décrits dans le foie mais également dans la circulation systémique, ce qui pourraient en faire des marqueurs potentiels de la sévérité de l'atteinte hépatique. Les miR les plus étudiés sont miR-122 dont l'expression serait diminuée dans le foie, et miR-21 et miR-34a dont l'expression serait augmentée (tableau 1) (Eslam et al. 2018). MiR-122 est le miR le plus abondant du foie (70 %). Dans des modèles de souris, l'inactivation hépatique de miR-122 était associée au développement spontané de la NASH, en raison d'une lipogenèse accrue et d'une altération de la sécrétion de lipides, puis d'une progression vers le CHC (Hsu et al. 2012).

Tableau 1 : Association des miR spécifiques avec le développement et la progression de NAFLD chez l'homme. Seuls les résultats confirmés indépendamment dans différentes cohortes ou modèles animaux sont rapportés. D'après Eslam *et col.* J hepatol 2018.

Micro-ARN	Voie de signalisation impliquée	Niveau hépatique	Niveau sanguin
miR-122	Métabolisme des lipides, fibrogenèse, carcinogenèse	↓	↑
miR-21	Métabolisme des lipides	↑	↑
miR-34a	Métabolisme des lipides	↑	↑
miR-192	Progression de la maladie ?		↑
miR-182	FOXO3, fibrogenèse	↑	↑

Plus de détails sur les facteurs de risque génétiques et épigénétiques se trouvent dans la mini-revue ci jointe, publiée en 2017 dans Hépatogastro et Oncologie Digestive.

Mise-au-point

Genetic and epigenetic of
non-alcoholic fatty liver disease

Génétique et épigénétique dans la *non- alcoholic fatty liver disease*

Clémence M. Canivet⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾, Albert Tran⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾,
Philippe Gual⁽²⁾⁽³⁾, Rodolphe Anty⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾

¹ CHU de Nice, Hôpital de l'Archet, service d'hépatogastroentérologie et de cancérologie digestive, Nice, France

² INSERM, U1065, C3M, Equipe 8, « Complications hépatiques de l'obésité », Nice, France

³ Université Côte d'Azur, Nice, France

e-mail : <canivet.c@chu-nice.fr>

Résumé

La *non-alcoholic fatty liver disease* (NAFLD), qui regroupe la stéatose et la stéatohépatite (*non-alcoholic steatohepatitis* – NASH), est un problème de santé publique de par sa fréquence et les complications potentielles (fibrose, cirrhose, carcinome hépatocellulaire). À l'heure actuelle, la surveillance des patients ayant une stéatose ou une NASH n'est pas parfaitement codifiée et les traitements actuels ne sont pas très efficaces. La recherche sur la génétique et l'épigénétique de la NAFLD est en plein essor. La génétique étudie les modifications dans la séquence nucléotidique des gènes, tandis que l'épigénétique explique les dérégulations de l'expression d'un gène en l'absence d'altération dans sa séquence nucléotidique.

PNPLA3, *TM6SF2* et *MBOAT7* sont les 3 principaux gènes pour lesquels un single nucleotide polymorphism est associé à la stéatose, la NASH et la fibrose hépatique indépendamment de l'insulino-résistance et du syndrome métabolique.

Parmi les mécanismes épigénétiques, certains micro-ARN (miR), petits ARN non codants, qui régulent l'expression de certains gènes en s'hybridant aux ARN messagers sont modifiés dans la NAFLD. Par exemple, le miR 122 a une expression hépatique diminuée avec la NAFLD alors que son taux circulant augmente. Le miR 34a, quant à lui, a une expression hépatique augmentée avec la NAFLD. La méthylation de certains gènes spécifiques est aussi modifiée dans la NAFLD entraînant des modifications de l'expression de ceux-ci. C'est notamment le cas de *PPAR γ* , gène clé du métabolisme lipidique.

Il est probable que, dans le futur, de nombreux facteurs génétiques et épigénétiques puissent être évalués pour chaque individu, à partir d'une simple prise de sang, permettant une surveillance à la carte et un traitement personnalisé dans la NAFLD, comme dans d'autres maladies.

Pour citer cet article : Canivet CM, Tran A, Gual P, Anty R. Génétique et épigénétique dans la *non-alcoholic fatty liver disease*. *Hépatogastro* 2017 ; 24 : 719-726. doi : 10.1684/hpg.2017.1494

■ **Mots clés :** NAFLD, foie gras, stéatose, NASH, PNPLA3, TM6SF2, MBOAT7, micro-ARN

Abstract

Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) is a spectrum of liver diseases that encompass steatosis, Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH) and fibrosis. It is a major public health problem due to its frequency and potential complications (cirrhosis, hepatocellular carcinoma). At present, the monitoring of patients with steatosis or NASH is not fully coded and current treatments are not very effective. Research into the genetics and epigenetics of NAFLD is booming. While genetics studies modifications into the nucleotide sequence of genes, epigenetics studies modifications in the function of a gene that cannot be explained by alterations to the gene sequence. PNPLA3, TM6SF2 and MBOAT7-TMC4 are the 3 main genes for which single nucleotide polymorphisms are associated with steatosis, NASH and hepatic fibrosis, independently of insulin resistance and metabolic syndrome. MicroRNAs (miR), small non-coding RNAs inhibit messenger RNAs and thus regulate gene expression. The expression of some miRs in the liver is modified in NAFLD: miR 122 is decreased and miR 34a is increased. Some miRs are also found in the circulation: for example, miR 122 is increased in the case of NAFLD. Finally, the methylation of target genes is modified in NAFLD resulting in changes in their expression. This is particularly the case for PPAR, a key gene for lipid metabolism. In future, it is likely that substantial genetic and epigenetic data can be obtained for each individual from a simple blood sample allowing personalized monitoring and treatment for NAFLD, as for other diseases.

■ **Key words:** NAFLD, fatty liver, steatosis, NASH, PNPLA3, TM6SF2, MBOAT7, microRNAs

Introduction

La *non alcoholic fatty liver disease* (NAFLD) est étroitement associée au syndrome métabolique et à l'obésité. Du fait de l'augmentation de la pandémie d'obésité, la NAFLD est devenue, ces dernières années, la première cause de maladie hépatique dans les pays développés et la deuxième cause de transplantation hépatique aux États-Unis. Cependant, tous les patients obèses et/ou avec un syndrome métabolique ne vont pas développer une NAFLD [1]. La NAFLD, et donc les différentes entités qu'elle regroupe (stéatose, *non-alcoholic steatohepatitis* (NASH), fibrose, cirrhose ± carcinome hépatocellulaire), est une maladie complexe : elle possède un déterminisme génétique mais dont la transmission ne correspond à aucun des modes

mendéliens classiques de transmission, ni à un mode de transmission mitochondriale. Le déterminisme génétique est polygénique mais n'est pas suffisant pour expliquer totalement la survenue de la maladie. Le poids des gènes expliquerait 30 à 50 % du phénotype de la NAFLD. Cela a été mis en évidence car des agrégations familiales, des différences de susceptibilité selon l'ethnie, et des polymorphismes génétiques ont été découverts [2]. La prise en charge actuelle des patients avec une NAFLD présente des défis. La surveillance des patients sans cirrhose n'est pas codifiée alors que le risque de carcinome hépatocellulaire existe et l'arsenal thérapeutique médicamenteux est plutôt mince. Les mesures hygiéno-diététiques, avec pour objectif une stabilisation puis une perte de poids de 5-10 %, sont la pierre angulaire de la prise en charge [3]. Lorsque celles-ci sont bien

respectées, elles sont très efficaces mais seule une minorité de patients réussit cette modification du mode de vie [4]. De nombreuses équipes de recherche travaillent sur la physiopathologie de la NAFLD afin de découvrir des nouvelles voies thérapeutiques et des facteurs de progression de la maladie, pour identifier les patients nécessitant un suivi rapproché.

Nous détaillerons dans une première partie, l'état des connaissances actuelles sur l'impact de la génétique dans la NAFLD. Dans une deuxième partie, nous ferons une mise au point sur les modifications épigénétiques dans la NAFLD et leurs potentiels impacts sur la prise en charge future des patients.

Génétique et NAFLD

La génétique étudie l'hérédité et les gènes. Un gène est formé par un nombre variable de nucléotides. Les nucléotides contenus dans les introns ne sont pas transcrits en ARN messager et servent à réguler les gènes. Les nucléotides des exons sont transcrits en brin d'ARN messager. Ces ARN messagers vont, dans le cytoplasme, être traduits en protéines. A chaque triplet de nucléotides correspond un acide aminé propre. Les polymorphismes, à la base de la diversité des individus, sont de plusieurs types : les *single nucleotide polymorphisms* (SNP), les *copy number variations* (CNV) et les polymorphismes de répétition (tableau 1). Les SNP sont répartis dans tout le génome et sont très nombreux (10^7 par génome humain). Un SNP situé dans un exon entraînera la modification de l'un des nucléotides du triplet qui pourra entraîner la traduction d'un autre acide aminé ou générer un codon stop et donc donner une protéine tronquée. Un SNP situé dans un intron pourra entraîner une modification de la conformation de l'ADN, et participer à l'augmentation ou à la répression du gène.

À noter qu'il existe plusieurs populations dites « ancestrales » (européenne, africaine, hispanique, asiatique...) pour lesquelles la répartition de ces polymorphismes est différente.

Les techniques d'identification des SNP ont pour principe d'étudier l'association entre un allèle donné d'un SNP et le phénotype « malade » ou « non malade ». Deux approches différentes existent. La première est la technique du « gène-candidat ». Elle repose sur des hypothèses *a priori*, en étudiant un gène connu potentiellement impliqué dans le processus physiopathologique étudié. Le principal inconvénient de cette technique est le nombre limité de gènes étudiés. La deuxième technique est celle de l'analyse du « génome entier » (GWAS pour *Genome Wide Association Study*). Elle étudie l'ensemble des gènes du génome sans *a priori*, soit par puce à ADN soit par séquençage. C'est l'étude de choix pour étudier un grand nombre de SNP sur beaucoup de gènes à la fois. Les risques de cette technique sont de mettre en évidence des faux positifs. Dans les essais cliniques standard, le risque d'erreur communément admis est de 5 % (risque α). Dans les études GWAS, le nombre de gènes étudiés est trop important pour tolérer cette marge d'erreur. Le seuil de significativité varie selon le nombre de gènes étudiés ($p = 1/\text{nombre de gènes étudiés}$) : c'est la correction de Bonferroni. De plus, les résultats doivent être systématiquement validés sur une cohorte indépendante.

“ La détermination de single nucleotide polymorphisms d'intérêt se fait par des analyses du génome entier (GWAS) ”

La découverte de nouveaux SNP a-t-elle un intérêt en pratique clinique ? Il est possible que dans le futur, chaque individu puisse bénéficier d'un séquençage complet

Tableau 1. Définitions de termes de génétique.

Terme	Définition
Mutation	Variation de la séquence d'ADN d'un allèle d'un gène. Le terme de mutation ne présage pas de l'effet bénéfique ou délétère. Une mutation peut se situer en région codante ou non codante, sa longueur est variable.
Polymorphisme	Mutation non pathogène présente dans plus de 1 % de la population.
Single nucleotide polymorphism (SNP)	Polymorphisme de substitution au niveau d'un seul nucléotide. Il s'agit du remplacement d'un nucléotide par un autre. Les SNP sont très nombreux ($> 10^7$ chez l'Homme) et répartis sur tout le génome.
Copy number variations (CNV)	Polymorphisme consistant en une variation du nombre d'exemplaires contigus de grands segments génomiques.
Polymorphisme de répétition	Polymorphisme consistant en des séquences répétées en tandem de nombreuses fois, à partir de motifs de longueur variable.

de son génome. Les polymorphismes protecteurs ou aggravant seront connus et le patient pourrait avoir une prise en charge adaptée et accéder à une surveillance et un traitement à la carte. À l'heure actuelle, cela est au stade de recherche. Cette approche soulève des questions éthiques et médicales qui nourrissent de longs débats. La première étude GWAS dans la NAFLD a été publiée en 2008 par Romeo S *et al.* [5]. Les patients, d'origine africaine, hispanique ou européenne présentaient une NAFLD diagnostiquée par spectro-IRM. La modification d'une cytosine par une guanine, entraînant en position 148 le changement d'une isoleucine en méthionine (I148M) sur le gène de PNPLA3 (*Patatine like phospholipase domain-containing 3*) rs 738409, était associée de manière très significative avec la stéatose ($p = 5,9 \times 10^{-10}$). Ce polymorphisme était plus fréquent dans la population ancestrale hispanique (fréquence de l'allèle mineur (MAF) 0,49) que chez les Européens (MAF 0,23) et les Africains américains (MAF 0,17). Une méta-analyse en 2011 a montré que ce SNP était associé à la stéatohépatite avec un OR à 3,48 et à la fibrose avec un OR à 3,2 [6]. Cette méta-analyse avait inclus 2 124 sujets qui avaient eu une biopsie hépatique. De plus, ce SNP était associé à un risque de carcinome hépatocellulaire chez les patients avec une NAFLD prouvée histologiquement comme chez les patients avec une maladie alcoolique du foie [7]. De manière assez surprenante, ce SNP n'est associé ni à l'insulino-résistance, ni au diabète. Au niveau physiopathologique, PNPLA3, également appelée *adiponutrine*, est une protéine de 481 acides aminés. Son gène est situé sur le chromosome 21. Dans le foie, cette protéine transmembranaire est présente au niveau de la gouttelette lipidique et au niveau du réticulum endoplasmique dans les hépatocytes. Elle a pour rôle d'hydrolyser les triglycérides. Dans le cas du SNP I148M, le changement de l'acide aminé se fait à proximité du site catalytique de la protéine. Cela entraîne un changement de conformation et une diminution de l'accès au site

catalytique pour le substrat. La protéine mutée a des capacités diminuées pour hydrolyser les triglycérides, ce qui va conduire à une augmentation de la taille des gouttelettes lipidiques et la majoration de la stéatose (*tableau 2*) [2].

En 2014, un nouveau SNP important a été découvert dans la NAFLD. Il s'agit de TM6SF2 (*transmembrane 6 superfamily 2*) rs 58542926. Ce polymorphisme est caractérisé par le changement d'un acide aminé glutamine (E) par une lysine (K) en position 167. Ce polymorphisme est plus fréquent dans la population ancestrale européenne (7,2 %) que chez les Africains américains (3,4 %) et les Hispaniques (4,7 %). Kozlitina *et al.* ont été les premiers à décrire ce SNP comme associé à la stéatose dans une cohorte de patients dont la NAFLD était diagnostiquée par spectro-IRM [8]. Ces données ont été validées sur une cohorte de 1 074 patients européens ayant eu une biopsie hépatique [9]. TM6SF2 était associé au degré de stéatose ($\beta = 0,192 \pm 0,056$) [IC 95 % (0,082-0,301)] ainsi qu'à la fibrose. D'autres équipes ont validé son association avec la fibrose et ont aussi mis en évidence son association avec la stéatohépatite dans une cohorte de 1 200 patients avec une NAFLD prouvée histologiquement [10]. Au niveau physiopathologique, TM6SF2 est responsable d'un effet paradoxal, la présence du polymorphisme TT favoriserait l'accumulation de lipides intra-hépatiques mais protégerait les vaisseaux artériels de l'athérosclérose. Au contraire le polymorphisme CC largement majoritaire protégerait de la stéatose en favorisant l'export des VLDL mais augmenterait le risque de développer des maladies cardiovasculaires. Cet effet a été confirmé dans différentes études GWAS menées dans des populations de patients à risque cardio-vasculaire [2, 11]. Comme dans le cas du polymorphisme de PNPLA3, le SNP de TM6SF2 n'est associé ni à l'insulino-résistance, ni au diabète. Le polymorphisme TT de TM6SF2 serait associé à un risque de carcinome hépatocellulaire chez les patients ayant une maladie

Tableau 2. Récapitulatif du rôle des principaux single nucleotide polymorphisms identifiés dans la NAFLD.

	Stéatose	NASH	Fibrose	Carcinome hépatocellulaire	Mécanisme physiopathologique	Réf.
PNPLA3 Rs 738409	Oui	Oui	Oui	Oui	Hydrolyse les TG dans les hépatocytes	[5-7]
TM6SF2 Rs 58542926	Oui	Oui	Oui	Possible mais incertain	Export des VLDL dans la circulation sanguine	[8, 9, 24]
MBOAT7 Rs 641738	Oui	Oui	Oui	Non évalué	Remodelage de la chaîne des acyl phospholipides	[13, 14]

NAFLD = non-alcoholic fatty liver disease ; NASH = non-alcoholic steatohepatitis ; PNPLA3 = patatine like phospholipase domain-containing 3 ; TM6SF2 = transmembrane 6 superfamily 2 ; MBOAT7 = membrane bound O-acyltransferase domain containing 7 ; TG = triglycérides ; VLDL = very low density lipoprotein.

alcoolique du foie. Son effet potentiel pro-carcinomateux au cours de la NAFLD nécessite d'être confirmé [11]. Récemment un troisième SNP sur le gène MBOAT7-TMC4 (*membrane bound O-acyltransferase domain containing 7-transmembrane channel-like 4*) rs641738 a été identifié tout d'abord dans les maladies alcooliques puis dans la NAFLD [12]. Le SNP de MBOAT7-TMC4 est caractérisé par le changement d'un nucléotide C en T. Le polymorphisme TT est associé à un risque accru de stéatose, de NASH et de fibrose dans 2 études indépendantes dont la NAFLD était confirmée par biopsie hépatique ou spectro-IRM [13, 14]. Comme les 2 SNP précédents, MBOAT7 n'est pas associé à l'insulino-résistance. Au niveau physiopathologique, MBOAT7-TMC4 code pour une enzyme, la lysosphosphatidyl-inositol acyl-transferase 1, qui est impliquée dans le transfert d'un groupement acyl sur des phospholipides. En cas d'allèle T défavorable, cette enzyme serait présente à des taux plus faibles et entraînerait une modification de la composition en phospholipides de l'hépatocyte responsable de la stéatose. De plus, il y aurait une augmentation des acides gras libres polyinsaturés et de leurs métabolites inflammatoires favorisant la NASH [13]. PNPLA 3, TM6SF2 et beaucoup plus récemment MBOAT7-TMC4 constituent donc les SNP les mieux caractérisés à ce jour, avec une association aux différents stades de la NAFLD (stéatose, NASH et fibrose) et cela indépendamment de l'insulino-résistance ou du syndrome métabolique (tableau 2) [15]. Bien que d'autres SNP aient été publiés par des équipes isolées, ils n'ont généralement pas été validés sur des cohortes indépendantes (tableau 3 et figure 1) [11].

“ Les single nucleotide polymorphisms des gènes PNPLA 3, TM6SF2 et MBOAT7 sont les mieux caractérisés dans la non-alcoholic fatty liver disease ”

Épigénétique et NAFLD

L'épigénétique est l'étude des modifications dans l'expression d'un gène qui ne peuvent pas être expliquées par des altérations de la séquence nucléotidique. Dans le noyau cellulaire, l'ADN s'enroule en pelotes autour des histones pour former la chromatine. Celle-ci peut être plus ou moins compactée permettant l'accès ou non de la machinerie transcriptionnelle. L'ADN peu condensé va être transcrit en ARN messager (ARNm) qui, dans le cytoplasme, sera traduit en protéine. Certains ARNm ne vont pas être traduits en protéines mais vont réguler des processus intracellulaires, ce sont les ARN non codants. Les principaux mécanismes épigénétiques impliquent une

Tableau 3. Rôle des potentiels SNP identifiés dans la NAFLD. Les SNP soulignés sont ceux qui sont associés de manière certaine à la NAFLD [11].

Fonction des gènes identifiés	Gènes dont un polymorphisme a été associé à la NAFLD
Métabolisme des lipides	<u>PNPLA3</u> , <u>TM6SF2</u> , <u>MBOAT7</u> , <u>PEMT</u> , <u>FADS1</u> , NR1I2
Métabolisme glucidique	ENPP1, IRS1, <u>GCKR</u> , SLC2A1
Modulation du stress oxydatif	<u>SOD2</u> , UCP2
Réponse immune	TNF, IL6
Autres	<u>KLF6</u> , <u>CDKN1A</u>

NAFLD = non-alcoholic fatty liver disease ; PNPLA3 = patatine like phospholipase domain-containing 3 ; TM6SF2 = transmembrane 6 superfamily 2 ; MBOAT7 = membrane bound O-acyltransferase domain containing 7 ; PEMT = phosphatidylethanolamine-N-methyltransferase ; FADS1 = fatty acid desaturase 1 ; NR1I2 = nuclear receptor subfamily 1 group I member 2 ; ENPP1 = ecto nucleotide pyrophosphate phosphodiesterase 1 ; IRS1 = insulin-receptor substrate 1 ; GCKR = glucokinase regulatory protein ; SLC2A1 = solute carrier family 2 member 1 ; SOD2 = superoxide dismutase 2 ; UCP2 = uncoupling protein 2 ; TNF = tumor necrosis factor ; IL6 = interleukin 6 ; KLF6 = kruppel-like factor 6 ; CDKN1A = cyclin-dependent kinase inhibitor 1A.

modification de la compaction de l'ADN (méthylation de l'ADN, méthylation, acétylation et modification des histones) ou une répression de la transcription (micro-ARN) (tableaux 4 et 5). L'épigénétique constitue une voie future tant dans le domaine du diagnostic des maladies que dans celui de la thérapeutique.

L'amélioration des connaissances physiopathologiques dans la NAFLD a permis un essor de l'épigénétique dans ce domaine [16, 17]. Cependant les connaissances sont encore au stade de recherche et ne sont pas validées pour la pratique clinique. Nous donnerons ci-après succinctement les avancées chez l'homme qui pourraient modifier notre pratique dans les années à venir.

La méthylation de l'ADN consiste en l'ajout d'un groupe méthyl sur un groupement cytosine-guanine. Cela forme un complexe dit « site CpG ». Ces sites sont principalement situés au niveau des promoteurs de gènes. La méthylation induit en général une répression génique. En 2013, Murphy *et al.* ont montré pour la première fois, à partir de biopsies hépatiques de patients, que le degré de méthylation de certains gènes au niveau hépatique était corrélé à la fibrose hépatique [18]. Plus récemment, le degré de méthylation hépatique d'un seul gène, *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR γ), un récepteur nucléaire impliqué dans la régulation du

Dossier thématique

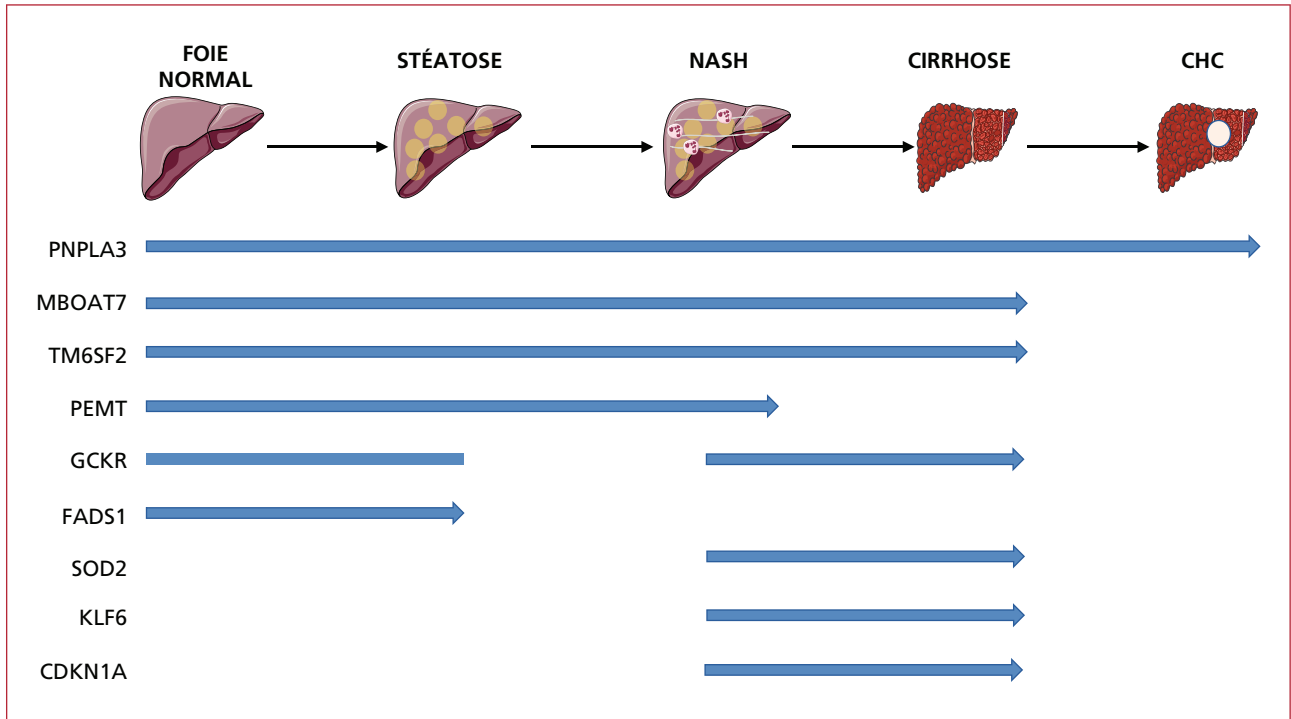


Figure 1. Les principaux SNP associés aux différents stades de la NAFLD. NAFLD = non-alcoholic fatty liver disease ; NASH = non-alcoholic steatohepatitis ; CHC = carcinome hépatocellulaire ; PNPLA3 = patatine like phospholipase domain-containing 3 ; MBOAT7 = membrane bound 0-acyltransferase domain containing 7 ; TM6SF2 = transmembrane 6 superfamily 2 ; PEMT = phosphatidylethanolamine-N-methyltransferase ; GCKR = glucokinase regulatory protein ; FADS1 = fatty acid desaturase 1 ; SOD2 = superoxide dismutase 2 ; KLF6 = kruppel-like factor 6 ; CDKN1A = cyclin-dependent kinase inhibitor 1A.

métabolisme des lipides, évalué sur les biopsies hépatiques de patients avec différents stades de NAFLD, a permis de stratifier la fibrose. La même équipe a également montré que l'étude plasmatique du degré de méthylation de PPAR γ était associée à la fibrose hépatique [16]. Le degré de méthylation de certains gènes trouvés dans le sang pourrait donc évaluer de manière fiable et non invasive la fibrose hépatique.

“ Le degré de méthylation de certains gènes au niveau hépatique est corrélé à la fibrose ”

Parmi les nombreux mécanismes épigénétiques, les micro-ARN (miR) sont en plein essor. Ce sont de petits ARN non codants d'environ 22 nucléotides qui vont se fixer à un ARN

Tableau 4. Définitions de termes d'épigénétique.

Terme	Définition
Chromatine	Complexe formé par l'ADN et les histones. La chromatine comprend différents niveaux de compaction
Méthylation de l'ADN	Groupement méthyl lié par covalence à une cytosine. Fréquemment associé à une extinction du gène
Histones	Protéine de structure autour de laquelle l'ADN est enroulé et qui permet la compaction de l'ADN
Micro-ARN (miR)	Petits ARN non codant (environ 22 nucléotides) qui régulent les processus cellulaires en contrôlant la transcription et la traduction des ARN messagers
ARN non codants	La majorité du génome est transcrit en ARN non codant, qui sont impliqués dans beaucoup de processus cellulaires
Nucléosome	Unité structurale de la chromatine permettant la compaction. Un nucléosome comprend 147 paires de bases organisées en double brin autour de 8 histones

Tableau 5. Principaux mécanismes épigénétiques et conséquences au niveau de l'expression du gène et de sa protéine.

	Activation de l'expression	Répression de l'expression
Méthylation de l'ADN		×
Acétylation des histones	×	
Méthylation des histones	×	×
Micro-ARN		×

lors de l'amélioration des lésions histologiques dans une étude de 36 patients japonais avec NAFLD qui ont bénéficié de 2 biopsies pour un suivi médian de 4,6 ans [22]. Cette approche permettrait un diagnostic non invasif de maladies hépatiques mais il existe des controverses notamment car les miR ne sont pas spécifiques d'organes [23]. Leur usage associé à d'autres marqueurs clinico-biologiques pourrait être intéressant. La liste des principaux miR hépatiques impliqués dans les différents stades de NAFLD est détaillé dans la figure 2.

“ Le miR-122 est diminué au niveau hépatique dans la non-alcoholic fatty liver disease ”

messenger et entraîner une inhibition de sa traduction. Ces mécanismes sont complexes car un miR peut moduler plusieurs ARNm et un ARNm peut être régulé par différents miR. Les miR sont situés au sein des tissus ou dans le plasma. Une des premières observations des miR dans le domaine de la NAFLD a montré que parmi 474 miR intrahépatiques, 46 étaient exprimés différemment chez les sujets présentant une NASH par rapport à des sujets sains. Parmi ces miR, le miR-122, le miR le plus abondant dans le foie (70 % de l'expression des miR), était significativement diminué [19, 20]. Le miR-34a hépatique, impliqué dans le métabolisme lipidique, est corrélé positivement avec la sévérité de la NASH. Le miR-34a a pour cible la Sirtuin 1 (SIRT 1) qui a un rôle clé dans l'homéostasie énergétique. Un blocage de ce miR dans le foie serait une cible thérapeutique potentielle dans le traitement de la NAFLD comme l'est le miR-122 dans l'éradication du virus de l'hépatite C. Mais les miR sont aussi détectables dans les fluides (sang ou salive) ; par exemple, le miR-34a sérique est corrélé à la stéatose et à la NASH [21]. Le miR-122 sérique est augmenté en cas de NASH et se normalise

Conclusion

La génétique et l'épigénétique sont des domaines de connaissance très prometteurs dans la NAFLD. L'étude génétique avec la découverte de certains SNP (PNPLA3, TM6SF2 et MBOAT7-TMC4) a notamment pour objectif de chercher des facteurs de progression de la fibrose pour identifier les patients nécessitant un suivi rapproché. Il est possible que dans le futur chacun puisse bénéficier d'un séquençage de son génome permettant notamment une surveillance personnalisée « à la carte » des risques hépatiques et extra-hépatiques liés à la NAFLD. L'épigénétique, à travers notamment la connaissance des miR et la méthylation de l'ADN, apporte des éléments éclairant dans la compréhension et le diagnostic (marqueurs circulants) de la NAFLD. Dans le futur, l'épigénétique hépatique sera peut-être source de nouveaux procédés thérapeutiques innovants et personnalisés

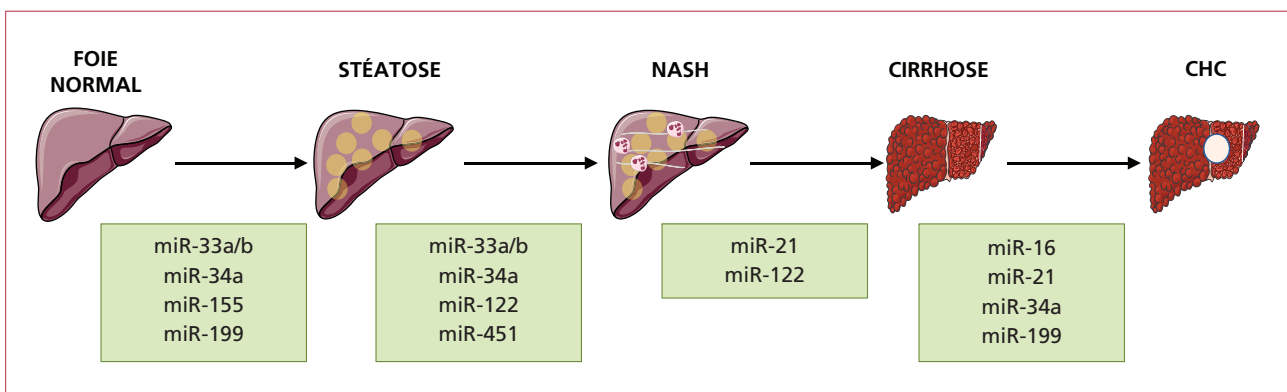


Figure 2. Les principaux micro-ARN hépatiques impliqués dans les différents stades de la NAFLD [23, 25]. NAFLD = non-alcoholic fatty liver disease ; NASH = non-alcoholic steatohepatitis ; CHC = carcinome hépatocellulaire ; miR = micro-ARN.

Take home messages

- *PNPLA3*, *TM6SF2* et *MBOAT7-TMC4* sont des gènes dont un *single nucleotide polymorphisms* est impliqué dans le développement de la *non-alcoholic fatty liver disease*.
- Le mir-122, miR le plus abondant du foie, est diminué en cas de *non-alcoholic steatohepatitis*.
- L'hyperméthylation de certains gènes cibles hépatiques est associée à la progression de la fibrose.
- Les retombées de l'étude de la génétique et de l'épigénétique de la *non-alcoholic fatty liver disease* permettraient dans le futur un diagnostic, un traitement et une surveillance personnalisés.

(médicaments bloquant les miR ou modifiant le degré de méthylation de certains gènes).

Remerciements : les auteurs remercient le fond documentaire Servier qui a servi à composer les figures 1 et 2.
Financement : ce travail a été soutenu par un financement de l'INSERM (France), l'Université Côte d'Azur, le Programme Hospitalier de Recherche Clinique (Centre Hospitalier Universitaire de Nice), et des dons (Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF), Société Francophone du Diabète (SFD)/Roche Pharma à PG, bourse FARE SNFGE). Ce travail a aussi été financé par le gouvernement français (Agence Nationale de la recherche, ANR) (#ANR-15-CE14-0016-01).

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt en rapport avec cet article. ■

Références

Les références importantes apparaissent en gras.

1. Anstee QM, Targher G, Day CP. Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013 ; 10 : 330-44.
2. Anstee QM, Day CP. The Genetics of Nonalcoholic Fatty Liver Disease : Spotlight on *PNPLA3* and *TM6SF2*. *Semin Liver Dis* 2015 ; 35 : 270-90.
3. Vilar-Gomez E, Martinez-Perez Y, Calzadilla-Bertot L, et al. Weight Loss Through Lifestyle Modification Significantly Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* 2015 ; 149 : 367-378-15.
4. Scherer A, Dufour J-F. Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Dig Dis Basel Switz* 2016 ; 34 (Suppl. 1) : 27-31.
5. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, et al. Genetic variation in *PNPLA3* confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet* 2008 ; 40 : 1461-5.

6. Sookoian S, Pirola CJ. Meta-analysis of the influence of I148M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (*PNPLA3*) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2011 ; 53 : 1883-94.
7. Liu Y-L, Patman GL, Leathart JBS, et al. Carriage of the *PNPLA3* rs738409 C> G polymorphism confers an increased risk of non-alcoholic fatty liver disease associated hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2014 ; 61 : 75-81.
8. Kozlitina J, Smagris E, Stender S, et al. Exome-wide association study identifies a *TM6SF2* variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet* 2014 ; 46 : 352-6.
9. Liu Y-L, Reeves HL, Burt AD, et al. *TM6SF2 rs58542926* influences hepatic fibrosis progression in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nat Commun* 2014 ; 5.
10. Dongiovanni P. *PNPLA3* I148M polymorphism and progressive liver disease. *World J Gastroenterol* 2013 ; 19 : 6969.
11. Anstee QM, Seth D, Day CP. Genetic Factors That Affect Risk of Alcoholic and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 2016 ; 150 : 1728-44.
12. Buch S, Stickel F, Trépo E, et al. A genome-wide association study confirms *PNPLA3* and identifies *TM6SF2* and *MBOAT7* as risk loci for alcohol-related cirrhosis. *Nat Genet* 2015 ; 47 : 1443-8.
13. Mancina RM, Dongiovanni P, Petta S, et al. The *MBOAT7-TMC4* Variant rs641738 Increases Risk of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Individuals of European Descent. *Gastroenterology* 2016 ; 150 : 1219-30.
14. Luukkonen PK, Zhou Y, Hyötyläinen T, et al. The *MBOAT7* variant rs641738 alters hepatic phosphatidylinositols and increases severity of non-alcoholic fatty liver disease in humans. *J Hepatol* 2016 ; 65 : 1263-5.
15. Krawczyk M, Rau M, Schattenberg JM, et al. Combined effects of the *PNPLA3* rs738409, *TM6SF2* rs58542926, and *MBOAT7* rs641738 variants on NAFLD severity : a multicenter biopsy-based study. *J Lipid Res* 2017 ; 58 : 247-55.
16. Hardy T, Mann DA. Epigenetics in liver disease : from biology to therapeutics. *Gut* 2016. doi: 10.1136/gutjnl-2015-311292.
17. Lee JH, Friso S, Choi S-W. Epigenetic mechanisms underlying the link between non-alcoholic fatty liver diseases and nutrition. *Nutrients* 2014 ; 6 : 3303-25.
18. Murphy SK, Yang H, Moylan CA, et al. Relationship between methylome and transcriptome in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2013 ; 145 : 1076-87.
19. Cheung O, Puri P, Eicken C, et al. Nonalcoholic steatohepatitis is associated with altered hepatic MicroRNA expression. *Hepatology* 2008 ; 48 : 1810-20.
20. Pirola CJ, Fernández Gianotti T, Castaño GO, et al. Circulating microRNA signature in non-alcoholic fatty liver disease : from serum non-coding RNAs to liver histology and disease pathogenesis. *Gut* 2015 ; 64 : 800-12.
21. Liu X-L, Pan Q, Zhang R-N, et al. Disease-specific miR-34a as diagnostic marker of non-alcoholic steatohepatitis in a Chinese population. *World J Gastroenterol* 2016 ; 22 : 9844-52.
22. Akuta N, Kawamura Y, Suzuki F, et al. Analysis of association between circulating miR-122 and histopathological features of nonalcoholic fatty liver disease in patients free of hepatocellular carcinoma. *BMC Gastroenterol* 2016 ; 16 : 141.
23. Baffy G. MicroRNAs in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Clin Med* 2015 ; 4 : 1977-88.
24. Dongiovanni P, Petta S, Maglio C, et al. Transmembrane 6 superfamily member 2 gene variant disentangles nonalcoholic steatohepatitis from cardiovascular disease. *Hepatology* 2015 ; 61 : 506-14.
25. Lee J, Kim Y, Friso S, Choi S-W. Epigenetics in non-alcoholic fatty liver disease. *Mol Aspects Med* 2017 ; 54 : 78-88.

5.1.3. Le microbiome intestinal

Le microbiote intestinal contient environ 10^{12} à 10^{14} microorganismes (représentant 3,3 millions de gènes qui constituent « notre autre génome »), principalement des bactéries, avec lesquels nous vivons en symbiose. Le microbiote intestinal nous fournit de nombreux avantages tels qu'une assimilation de substances non digérées autrement, la production de métabolites trophiques pour les cellules intestinales, une modulation du cycle entéro-hépatique des acides biliaires, une protection par rapport à la colonisation/infection par des bactéries pathogènes. Le terme « microbiote » désigne une communauté de microorganismes, alors que le terme microbiome désigne à la fois le microbiote et l'ensemble des gènes et des substances issues de l'expression génique d'un microbiote vivant dans ou sur un organisme (Jayakumar and Loomba 2019).

Chez l'adulte sain, les phylas les plus représentés dans le microbiote sont Firmicutes et Bacteroidetes, suivis par Actinobacteria. Le phylum des protéobactéries ne représente qu'une faible proportion des bactéries (Hollister et al. 2014).

La perte de la diversité et la modification durable du microbiote intestinal (dysbiose intestinale) ont été bien documentées comme élément central de l'apparition de nombreuses maladies systémiques notamment l'obésité et la NAFLD grâce à l'arrivée de nouvelles technologies (métagénomique) dans des modèles expérimentaux murins et chez l'Homme.

Chez l'Homme, une diminution quantitative et qualitative de la richesse des populations bactériennes est associée à une augmentation de l'adiposité, de l'insulino-résistance, d'une dyslipidémie, et d'une inflammation systémique de bas grade (Aron-Wisnewsky et al. 2013; Le Chatelier et al. 2013). En France, Les individus obèses possédaient significativement plus de Protéobactéries et de bactéroïdes et avaient une richesse et une biodiversité inférieures par rapport à des individus avec un poids normal (Yasir et al. 2015). Certaines de ces anomalies sont partiellement corrigées après une perte de poids liée à un régime hypocalorique mené pendant 6 semaines (ANR MicroObes consortium et al. 2013).

Chez les sujets présentant une NASH, la proportion de Proteobacteria, Enterobacteria et Escherichia, ou Bactéroïdes étaient plus élevées par rapport à des individus en bonne santé appariés (Boursier et al. 2016; Zhu et al. 2013; Safari and Gérard 2019; Kolodziejczyk et al. 2019). De plus, une augmentation des protéobactéries et une diminution du nombre de Firmicutes ont été observées au cours de la progression de

la NAFLD. Quelques études suggèrent que le ratio Firmicutes/ Bacteroidetes peut être utilisé pour déterminer la prédisposition à l'obésité et au syndrome métabolique. Cependant, ce ratio varie de manière significative entre les individus en bonne santé. Son utilisation reste donc controversée et ses implications pour la santé humaine ne sont pas claires (Hollister et al. 2014). Plus récemment, une signature métagénomique du microbiote fécal a proposé un modèle incluant 37 espèces bactériennes pour le diagnostic de fibrose avancée avec une AUROC à 0,94 (Loomba et al. 2017). Ces résultats encourageants et innovants n'ont pas été confirmés dans d'autres cohortes. Récemment, l'ADN bactérien a été étudié au niveau sanguin. Les phylas bactériens prédominants dans le sang sont les proteobactéries (87,9 %) suivies par les actinobactéries (7,3 %), les firmicutes (3,7 %) et les bactériodetes (1,1 %) ce qui diffère totalement de ce qui est retrouvé dans le microbiote fécal. Chez les patients présentant une fibrose (>F0), les actinobactéries étaient diminuées tandis que les proteobactéries étaient augmentées par rapport aux patients sans fibrose (Lelouvier et al. 2016). Cette découverte du « microbiote sanguin », dont la composition est très différente du microbiote fécal, complexifie les données sur le rôle du microbiote dans le développement de la NAFLD mais offrirait la possibilité de nouveaux marqueurs de NASH.

Les modèles murins sont en faveur d'une augmentation de la perméabilité intestinale au cours de la NAFLD et de la NASH, avec une augmentation dans la circulation portale et systémique de débris bactériens, les pathogen-associated molecular patterns (PAMPS), dont le Lipopolysaccharide (LPS). Ces éléments participeraient à l'activation des cellules immunitaires dont les macrophages hépatiques *via* une activation de différents récepteurs membranaires spécifiques (Toll Like Receptor (TLR) 4, 2, 9). Cette activation des macrophages jouerait un rôle clef dans l'apparition de la NASH. Au niveau intestinal, une augmentation d'éthanol endogène, de la triméthylamine et d'acides aminés ramifiés, associée à une diminution de la production d'acides gras à chaîne courte (butyrate, propionate, acétate...) et de la disponibilité de la choline, et une modulation du fasting-induced adipose factor favoriseraient la stéatose et la progression vers la NASH. Une altération de la composition en acides biliaires pourrait participer à l'altération des jonctions serrées via la voie de signalisation de l'epidermal growth factor (Jayakumar and Loomba 2019). La dysbiose intestinale est aussi associée à des anomalies de l'immunité de la paroi intestinale médiée par différentes cellules. Les lymphocytes Th17, au niveau intestinal, confère

une protection contre les pathogènes bactériens et fongiques. Dans des modèles murins d'obésité et de stéatose (HFD), les niveaux de lymphocytes Th17 étaient diminués, dus à une diminution de la capacité des cellules présentatrices d'antigènes intestinales à induire la différenciation des lymphocytes T. Cette baisse de Th17 entraîne une augmentation de la perméabilité intestinale (Garidou et al. 2015). La modulation de molécules complexes intra-cellulaires (inflammasome) qui jouent un rôle clef dans la réponse inflammatoire a été mise en évidence lors de la manipulation du microbiote intestinal et *vice versa* (Leung et al. 2016). Ces différents mécanismes expliqueraient le lien entre dysbiose intestinale, anomalies du métabolisme des lipides et des glucides et la NASH.

La modification des phylas bactériens, l'augmentation de la perméabilité intestinale, le relargage des débris bactériens dans le système porte (les PAMPs dont le LPS principalement) et l'activation de l'inflammasome participent donc au développement de la NAFLD. Dans cette optique, plusieurs études pré-cliniques ou cliniques ont évalué des thérapeutiques ciblées sur le microbiome. Les bactéries de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Streptococcus* sont les probiotiques les plus fréquemment testés pour inhiber l'expansion des bactéries pathogènes à Gram négatif (Woodhouse et al. 2018). Le prébiotique le plus testé est le lactulose. D'autres approches comme la rifaximine (antibiotique) ou les herbes médicinales (Berberine) ont été essayées. La transplantation fécale a également été étudiée chez des patients obèses. La sensibilité à l'insuline était améliorée après transplantation fécale de donneurs minces mais ces effets étaient transitoires (Kootte et al. 2017). Actuellement, un essai thérapeutique est en cours aux Pays-Bas pour évaluer l'effet de la transplantation fécale de donneurs sans NAFLD chez des patients présentant une NASH (www.trialregister.nl/trial/4189). Enfin, des données très préliminaires sur la modulation de l'inflammasome ou du LPS semblent prometteuses (Ma et al. 2017).

5.2. Développement de la stéatose

La stéatose hépatique est médiée par des anomalies du tissu adipeux, de l'intestin et du muscle. Chez l'Homme au cours de la NAFLD, elle résulte d'un excès d'apport de lipides au foie et d'un défaut d'utilisation et d'export des lipides. Ainsi, il a été démontré, chez des patients avec NAFLD, que la majorité (60 %) des acides gras hépatiques est issue du flux d'acides gras venant d'un relargage du tissu adipeux sous-cutané (lipolyse). Le tissu adipeux viscéral joue également un rôle mais paradoxalement dans

une moindre mesure. Les autres apports de lipides viendraient de l'alimentation sous forme de chylomicrons (15 %) et de la lipogénèse *de novo* (25 %) (figure 6). Le tissu adipeux est donc un contributeur majeur au développement de la stéatose chez l'Homme (Donnelly et al. 2005).

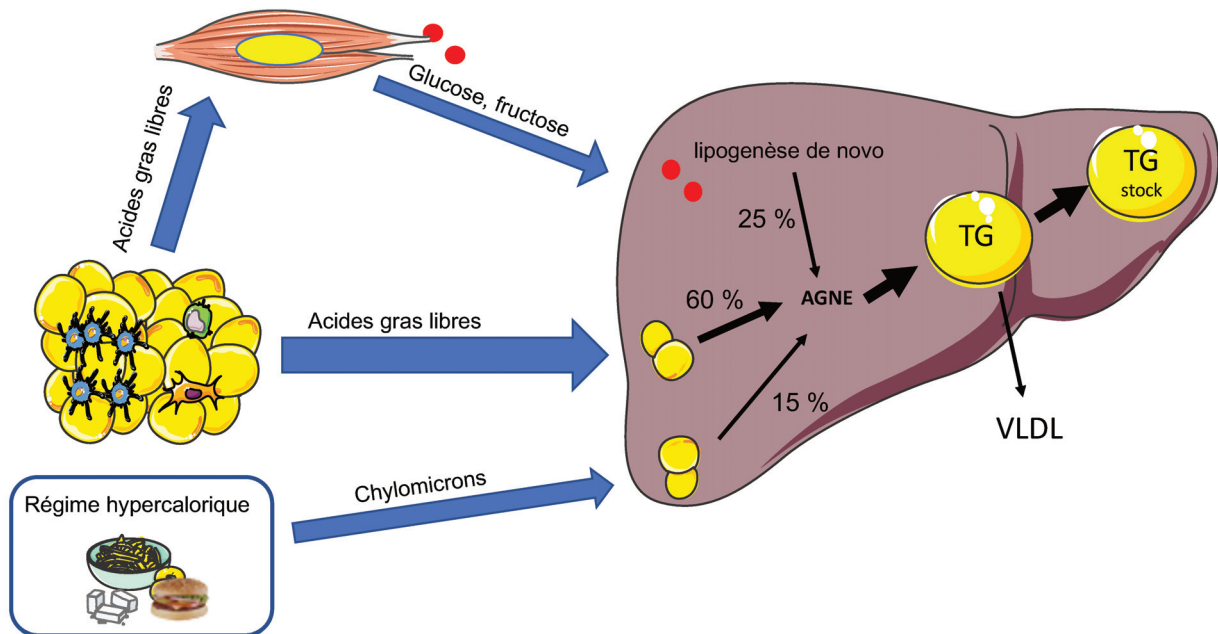


Figure 6 : Les mécanismes conduisant au développement de la stéatose au cours de la NAFLD

La majorité (60 %) des lipides hépatiques est issue du flux d'acides gras venant d'un relargage du tissu adipeux sous-cutané avec une méta-inflammation et une lipolyse. Les autres lipides viendraient de l'apport alimentaire sous forme de chylomicrons (15 %) et de la lipogénèse *de novo* (25 %) qui est alimentée par l'excès de glucose circulant (●) provenant du muscle qui devient insulino-résistant. Dans le foie les acides gras non estérifiés (AGNE) sont stockés sous forme de triglycérides (TG) qui va être relargué dans la circulation sanguine sous forme de Very Low Density Lipoprotein (VLDL) ou être responsable de la stéatose hépatique.

La présence d'une stéatose pure est, le plus souvent, associée à un bon pronostic hépatique. Cela vient du fait que le stockage des acides gras libres sous forme de triglycérides inerte est peu associé à des lésions hépatocytaires. Dans ce cas, la stéatose isolée serait un facteur protecteur pour le foie. Des modèles murins, chez lesquels l'export des VLDL était impossible (par absence de microsomal triglyceride transfer protein (MTTP) dans le foie), présentaient une stéatose augmentée sans retentissement sur la sensibilité à l'insuline ou la glycémie (Minehira et al. 2008). D'autres part, en cas de stéatose, on note une augmentation de la respiration

mitochondriale de près de 4,3 à 5 fois par rapport à des sujets sans NAFLD, permettant une augmentation du flux d'O₂ et limitant le stress oxydatif (Koliaki et al. 2015).

Dans le tissu adipeux, PPAR γ , qui est un membre de la famille des PPARs activés par les acides gras, régule principalement la différenciation adipocytaire en rétablissant des adipocytes fonctionnels, ce qui contribue à augmenter la sensibilité à l'insuline et donc à diminuer la stéatose et la NAFLD (Siersbaek et al. 2010).

5.2.1. Une maladie du tissu adipeux et du muscle

L'augmentation du tissu adipeux associé à l'obésité et au syndrome métabolique participe à l'apparition et à l'aggravation de la NAFLD. En effet, il semblerait qu'au-delà d'une certaine quantité (variable d'un sujet à l'autre, selon la théorie de l'expendabilité du tissu adipeux : hyperplasie et hypertrophie des adipocytes) l'augmentation du tissu adipeux sous-cutané s'accompagne de différentes anomalies qui caractérisent le surpoids ou l'obésité « pathologique », dont l'augmentation du tissu adipeux viscéral serait le reflet (Bosy-Westphal et al. 2019).

Parmi ces anomalies, on note premièrement l'apparition d'une inflammation locale du tissu adipeux caractérisée par l'enrichissement de cellules inflammatoires (dont des macrophages, des lymphocytes et des cellules dendritiques), une modification de leur polarisation/activation et une inflammation de bas grade (appelée également inflammation métabolique ou métaflammation) (Bessone et al. 2019; Bertola et al. 2012; 2009). Cette inflammation locale s'accompagne d'une discrète élévation sérique des protéines de la phase aiguë de l'inflammation (dont la C-Reactive Protein) et de cytokines proinflammatoires (Interleukine (IL) 6, IL1 β , ostéopontine...) produites en partie, par le tissu adipeux (Anty et al. 2006). En effet, la modification de facteurs produits et sécrétés par le tissu adipeux est la 2^{ème} anomalie présente. Ces substances - les adipokines - sont plus d'une centaine et ont des actions autocrines, paracrines et endocrines. Certaines, qui favorisent notamment l'inflammation, l'insulino-résistance ou le tonus vasculaire, sont augmentées (leptine, IL6, Plasminogen activator inhibitor-1, résistine...), d'autres comme l'adiponectine, qui est insulino-sensibilisante et anti-fibrosante, sont diminuées.

Une 3^{ème} anomalie est l'apparition d'une insulino-résistance du tissu adipeux, médiée en partie par cette inflammation chronique locale, qui est associée à une élévation relative de la lipolyse. Celle-ci cause un relargage massif d'acides gras libres dans la circulation veineuse systémique (acides gras en provenance du tissu adipeux sous-

cutané) et dans la circulation portale (acides gras en provenance du tissu adipeux viscéral) (Bugianesi et al. 2005; Nielsen et al. 2004; Khan et al. 2019).

Ces acides gras inondent le foie et participent largement à l'afflux de lipides qui entraîne l'apparition de la stéatose (stockage ectopique) (figure 6). Ces acides gras vont également inonder le système musculaire squelettique et participent à l'apparition d'une insulino-résistance de ce dernier. Cela entraîne un défaut de captation du glucose sérique par le système musculaire. Cet excès de glucose circulant est capté par le foie et participe à la formation de la lipogenèse *de novo* (figure 6) (Machado and Diehl 2016; Khan et al. 2019).

Certaines molécules vont cependant favoriser les voies de métabolisation pour limiter le développement de la stéatose. C'est le cas de PPAR α , qui est activé par une variété d'acides gras et de dérivés d'acides gras modulant son activité transcriptionnelle. Il est impliqué dans toutes les voies métaboliques de réponse au jeûne. Il agit de façon directe sur la β -oxydation, la cétogenèse, la néoglucogenèse et l'utilisation des acides aminés. Son expression est diminuée au cours des NAFLD (Kersten and Stienstra 2017). Par ailleurs, PPAR α régule l'expression de Fibroblast growth factor 21 (FGF21), une hépatokine agissant au niveau systémique, en particulier sur les tissus adipeux blanc et brun et le cerveau durant le jeûne (Smati et al. 2019; Staiger et al. 2017). Même si FGF21 est une cible de PPAR α , son expression est également induite par d'autres facteurs de transcription tels que carbohydrate-responsive element-binding protein (ChREBP) (Abdul-Wahed et al. 2017) ou Farnesoid X Receptor (FXR) (Adorini, et al. 2012; Staiger et al. 2017). Des agonistes de PPAR α et de FGF21 sont d'ailleurs testés comme molécule anti-NASH, actuellement en essai de phase 3 (cf chapitre sur les traitements de la NAFLD) (Kersten and Stienstra 2017).

5.2.2. La lipogenèse hépatique

Lors du développement de la stéatose hépatique, les lipides qui s'accumulent dans le foie sont majoritairement des TG. En raison de l'état de résistance à l'insuline caractéristique du patient obèse pré-diabétique, la lipolyse au niveau du tissu adipeux n'est plus efficacement inhibée par l'insuline et des concentrations importantes d'acides gras non estérifiés (AGNE) sont libérées dans la circulation sanguine. Ces acides gras (AG) sont captés par le foie. En parallèle, et de manière paradoxale, la synthèse *de novo* d'AG par la voie de la lipogenèse est stimulée par l'hyperglycémie, l'hyperinsulinémie et ChREBP. En effet, ChREBP est un facteur de transcription qui

va activer les enzymes clés de lipogenèse en réponse aux métabolites issus du glucose. D'ailleurs l'inhibition de ChREBP chez les souris ob/ob résistantes à l'insuline entraînait une réversion de la stéatose hépatique (Dentin et al. 2006). ChREBP peut donc être considéré comme un senseur du glucose et un réhaustat de la lipogenèse (http://www.youtube.com/watch?v=k_7b61U8NZ0 ; Abdul-Wahed et al. 2017; Ortega-Prieto and Postic 2019).

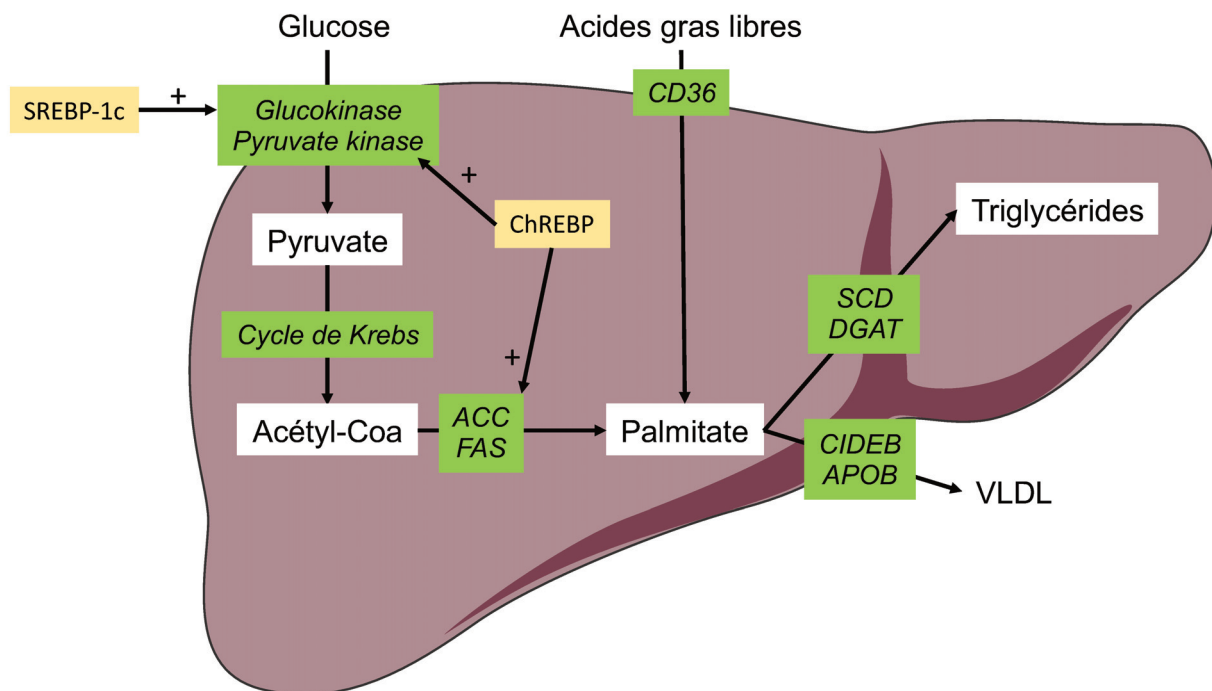


Figure 7 : Les molécules clés du développement intra hépatique de la stéatose

La synthèse de novo d'acide gras (AG) nécessite le métabolisme du glucose en pyruvate par la voie de la glycolyse comprenant la glucokinase et la pyruvate kinase. La glucokinase est activée par le facteur de transcription sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) tandis que la pyruvate kinase est activée par ChREBP. Le pyruvate est ensuite transformé en Acétyl-Coa dans le cycle de Krebs. -

Les acides gras libres sont absorbés dans le foie par le transporteur cluster de différenciation 36 (CD36). Les enzymes clés de la formation des triglycérides sont l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), la fatty acid synthase (FAS) pour la lipogenèse, la Stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD) pour l'élongation des AG et la Diacylglycérol O-acyltransférase (DGAT) pour l'estérification des AG en triglycérides. Les gènes principaux de la synthèse et de l'export des VLDL sont la cell death-inducing DFF45 like effector B (CIDEB) et l'apolipoprotéine B (APOB).

La lipogenèse nécessite le métabolisme du glucose en pyruvate par la voie de la glycolyse permettant ainsi de fournir les carbones nécessaires à la synthèse des AG. Les enzymes impliquées dans cette voie incluent la glucokinase et la pyruvate kinase.

A noter que la glucokinase est induite par le facteur de transcription sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) et que la pyruvate kinase est activée par ChREBP (figure 7). Le récepteur nucléaire LXR régule également la lipogenèse puisqu'il est nécessaire au contrôle transcriptionnel de SREBP-1c par l'insuline (Chen et al. 2004).

La combinaison de l'augmentation de la glycolyse, avec des apports caloriques (riches en fructose) excessifs et une lipolyse entraînent l'augmentation d'AGNE dans le foie. Ces acides gras sont absorbés dans l'hépatocyte par des transporteurs et notamment le cluster de différenciation (CD) 36. Ces acides gras vont ensuite être estérifiés et stockés dans des gouttelettes lipidiques sous forme de TG ou sécrétés dans le sang sous forme de lipoprotéines de très faibles densité (VLDL). Les enzymes clés de la formation des triglycérides sont l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), la fatty acid synthase (FAS), la Stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD) et la Diacylglycérol O-acyltransférase (DGAT). Par ailleurs, les gènes principaux de la synthèse et de l'export des VLDL sont la cell death-inducing DFF45 like effector B (CIDEB) et l'apolipoprotéine B (APOB) (figure 7).

Chez les femmes, la présence d'œstrogènes est protecteur de la stéatose et des complications métaboliques (Gourdy et al. 2018). En effet des modèles de souris femelles déficientes en récepteur des œstrogènes (ER) développaient une adiposité viscérale, une insulino-résistance et une altération de la tolérance au glucose (Heine et al. 2000). Dans le foie, l'invalidation hépatique de ER α (par adénovirus ciblant ER α hépatocyte spécifique) augmentait la stéatose dans des modèles de souris avec régime riche en gras et au contraire, la surexpression de ER α réduisait la stéatose dans des modèles génétiques femelles d'obésité ob/ob (Wang et al. 2015). Par ailleurs, le traitement chronique par le 17 β estradiol (E2), qui est l'œstrogène qui va se lier à ER α et l'activer, montrait une réduction de l'insulino-résistance et une amélioration de la stéatose (Riant et al. 2009; Guillaume et al. 2019).

5.3. De la stéatose à la NASH

Comme vu en début de manuscrit, la NASH se caractérise, en plus de l'accumulation de lipides dans les hépatocytes, par une nécro-inflammation relayée par une infiltration des cellules immunitaires (figure 8).

L'évolution de la stéatose vers la NASH est un processus complexe mêlant différentes voies et cellules dans le foie. Actuellement, la physiopathologie n'est pas encore

complètement élucidée. On ignore également pourquoi certains patients atteints de stéatose hépatique développent une NASH alors que d'autres garderont une stéatose pure toute leur vie.

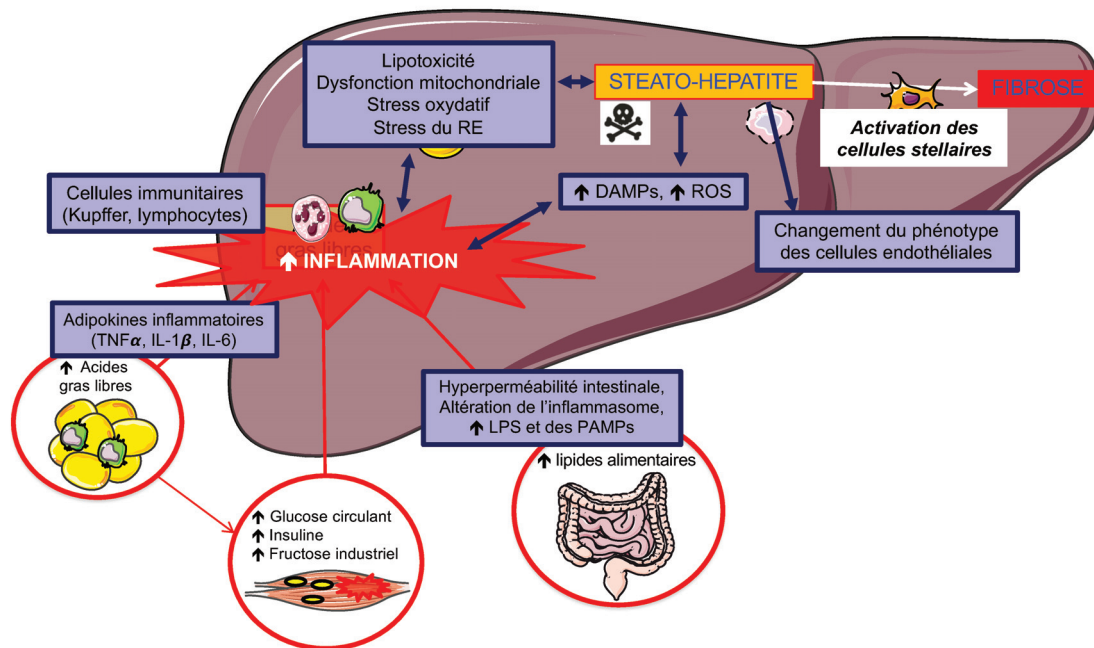


Figure 8 : Représentation schématique de l'apparition de la NASH

Au cours de la NASH, les cytokines pro-inflammatoires provenant du tissu adipeux, les Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) et le LPS issus de la dysbiose intestinale sont drainés vers le foie, entraînant une activation des cellules de Kupffer ainsi que l'infiltration et l'activation des cellules immunitaires circulantes. L'inflammation et la stéatose vont entraîner une lipotoxicité, une dysfonction mitochondriale, et une augmentation du stress oxydatif et de celui du réticulum endoplasmique. Cela conduit à une souffrance hépatocytaire. La souffrance ou la mort hépatocytaire libère des danger-associated molecular patterns (DAMPs) et des espèces réactives à l'oxygène (ROS) qui favorisent l'inflammation et les lésions cellulaires. Ces signaux cellulaires vont activer les cellules stellaires en myofibroblastes et déclencher la fibrogenèse.

Initialement, la NASH apparaissait en « deux hits » selon la théorie de Day et James : la première étape était caractérisée par la présence d'une stéatose et la deuxième étape était due à la production d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) par l'hépatocytes entraînant un stress oxydatif important participant à la nécro-inflammation des hépatocytes, à une forte inflammation médiée par l'activation des cellules de Kupffer et à l'infiltration de cellules immunitaires (Day and James 1998). Depuis, la théorie s'est étoffée même si tous les éléments déclencheurs sont encore mal connus (Diehl and Day 2017). Il est maintenant établi que des lipides toxiques

(acides gras libres, notamment acides gras saturés, cholestérol libre, céramides...) plutôt que les triglycérides eux-mêmes sont les principaux acteurs de la progression de la stéatose vers la NASH. En agissant à la fois au niveau des hépatocytes et au niveau des cellules immunitaires, ces espèces lipidiques nocives entraînent des stress cellulaires ainsi que l'activation d'une importante inflammation.

5.3.1. La lipotoxicité

La lipotoxicité est définie comme une dysrégulation de l'environnement lipidique et/ou de la composition lipidique intracellulaire, conduisant à une accumulation de lipides toxiques et pouvant être associée à un dysfonctionnement des organelles (stress du réticulum endoplasmique (RE) et altération de la chaîne respiratoire mitochondriale), à des lésions cellulaires ou à la mort. Il est important de noter que la lipotoxicité est intimement liée à l'inflammation chronique (inflammation déclenchée par le métabolisme ou méta-inflammation) (Marra and Svegliati-Baroni 2018).

Alors que dans la stéatose, les acides gras sont stockés sous forme de triglycérides, inertes et non toxiques, dans la NASH, des quantités plus élevées d'acides gras libres, et d'autres espèces lipidiques hautement toxiques sont retrouvés.

La composition lipidique des membranes cellulaires et notamment celle du RE est modifiée conduisant à un changement dans la fluidité des membranes. Dans le foie de souris obèses, cela conduit à une augmentation de l'homéostasie calcique et donc à un stress du RE. Celui-ci a pour conséquence d'activer la lipogénèse conduisant à une synthèse d'acide gras libres en particulier d'acide gras saturés tels que l'acide palmitique, qui est hautement toxique. L'augmentation des concentrations d'autres espèces lipotoxiques, notamment les céramides et la lysophosphatidylcholine, va participer aux dommages cellulaires en induisant un stress oxydatif, et l'activation des voies de l'apoptose (Marra and Svegliati-Baroni 2018). Un cercle vicieux va ainsi perpétuer l'accumulation de lipides toxiques dans les hépatocytes (Baiceanu et al. 2016). De plus, la lipotoxicité peut aussi générer l'activation de l'inflammasome NOD-like receptor family pyrin domain containing 3 (NLRP3) (Lebeaupin et al. 2015) et l'induction des signaux de mort cellulaire (apoptose, nécrose, pyroptose) et amener à la production d'IL1 β qui est une puissante cytokine pro-inflammatoire (Lebeaupin et al. 2018). L'inflammation, elle-même, aggrave cette souffrance hépatocytaire (Tumor Necrosis Factor α (TNF α), FAS...) (figure 8).

Les acides gras qui s'accumulent dans l'hépatocyte entraînent aussi une augmentation de la production de ROS. Ceux-ci affectent principalement l'activité mitochondriale en diminuant la capacité respiratoire. Les mitochondries dysfonctionnelles oxydent moins les acides gras et produisent plus de ROS. Alors que chez les patients présentant une simple stéatose, l'activité mitochondriale est augmentée pour s'adapter aux besoins de l'hépatocyte, chez les patients NASH, le stress oxydatif est augmenté et les capacités de défense anti-oxydantes de l'hépatocytes sont diminuées. Cela entraîne une diminution de l'activité des mitochondries et une fuite de protons à l'origine du stress oxydatif (Wei et al. 2008; Koliaki et al. 2015). Le stress oxydatif va entraîner l'activation de PKC ϵ et des sérine-thréonine kinases, qui vont phosphoryler notamment le récepteur de l'insuline ce qui va aggraver l'insulino-résistance. Les mitochondries dysfonctionnelles vont activer c-Jun N-terminal kinase (JNK). JNK appartient à la famille des kinases protéiques activées par les mitogènes. C'est un médiateur essentiel de l'insulino-résistance et de la lipotoxicité. Dans l'hépatocyte, JNK intervient dans la mort cellulaire en activant la protéine p53 upregulated modulator of apoptosis (PUMA) qui va favoriser l'apoptose (Marra and Svegliati-Baroni 2018).

Des métabolites des acides gras (céramides, diacyl-glycérol) participent également à l'activation de l'ensemble des sérine-thréonine kinases et JNK.

Une revue a récemment exploré le concept de lésion lipotoxique hépatocellulaire sublétales qui peut être défini comme le stress et la dysfonction hépatocytaires induits par les lipides qui est insuffisant pour causer la mort cellulaire mais suffisant pour activer des cascades de signalisation pro-inflammatoires aberrantes (Ibrahim et al. 2018). Ce concept de dommage hépatocytaires sublétales est à la base de la souffrance hépatocytaires (voir chapitre 5.3.3).

5.3.2. *La glucotoxicité*

La glucotoxicité fait référence aux effets toxiques de l'hyperglycémie et de l'absorption excessive de glucides sur les cellules et les tissus. La glucotoxicité est intrinsèquement liée à l'insulino-résistance. L'hyperglycémie chronique affecte à la fois la sécrétion et l'action de l'insuline ce qui a comme conséquence la génération de ROS, l'activation du stress oxydatif. Les régimes riches en glucides activent plusieurs enzymes lipogènes, telles que ACC, FAS ou SCD, induisant une lipogénèse et une stéatose. (Mota et al. 2016).

Parmi les différents sucres, le fructose est très efficace dans la promotion de la stéatose, en augmentant l'expression de CD36 et en induisant des voies lipogéniques, notamment en régulant positivement la protéine ChREBP (Abdul-Wahed et al. 2017). Ces changements sont associés à une réduction de l'insulino-sensibilité et vont contribuer à la pathogenèse de la NASH.

5.3.3. Altération de l'autophagie

L'autophagie est une voie d'auto-digestion cellulaire responsable de la dégradation des composants cellulaires endommagés (organites, protéines et métabolites) dans les lysosomes. Trois types d'autophagie ont été identifiés : la macro-autophagie, l'autophagie médiée par les chaperonnes et la micro-autophagie. La macro-autophagie implique la formation d'un petit sac vésiculaire appelé membrane d'isolation ou phagophore. Le phagophore renferme une partie du cytosol entraînant la formation d'une structure à double membrane appelée autophagosome. L'autophagosome fusionne alors avec un lysosome conduisant à la dégradation des constituants cellulaires séquestrés dans l'autophagosome. Les acides aminés et autres composés générés par la dégradation autophagique de macromolécules sont libérés dans le cytoplasme pour être recyclés ou pour produire de l'énergie. La formation du phagophore et des autophagosomes nécessite 18 protéines Atg différentes (AuTophagyrelated) (Lavallard et al. 2012). LC3-II est utilisée comme marqueur des autophagosomes.

L'autophagie est une source d'énergie. Dans le foie, l'autophagie est protectrice de la stéatose car elle a la capacité de dégrader les gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes, c'est la lipophagie (Singh et al. 2009). En cas d'obésité ou de stéatose, l'autophagie diminue. Dans une cohorte humaine de patients obèses, il a été rapporté que le rapport LC3-II/LC3-I et les concentrations en p62 hépatiques augmentaient avec la stéatose et la progression vers la NASH et la fibrose, suggérant une diminution du flux autophagique dans la NAFLD (Gonzales-Rodriguez et al. 2015). Le mécanisme de modification du flux est partiellement connu. Par exemple, une modification de la composition des membranes avec des répartitions modifiées du cholestérol et des autres lipides, entraîne une diminution de la mobilité des vésicules d'autophagie. La diminution du flux autophagique va augmenter le stress du RE (ERphagie), le stress oxydatif (mitophagie), la souffrance hépatocytaire et la polarisation pro-inflammatoire des macrophages (Gual et al. 2017; Lavallard and Gual 2014).

5.3.4. *La souffrance ou mort hépatocytaire*

Sous l'influence principalement de la lipotoxicité et de glucotoxicité, la souffrance hépatocytaire va apparaître (figure 8). Elle est très complexe, associant diverses voies de signalisation et impliquant de nombreuses cellules.

La ballonnisation hépatocytaire est un marqueur de NASH important, et traduit la souffrance hépatocytaire. Il s'agit d'une dégénérescence de l'hépatocyte caractérisé par un gonflement cellulaire, une désorganisation de la polarité cellulaire, la perte des cytokératines 8 et 18 et la présence de corps de Mallory. La souffrance hépatocytaire est suivie par la mort des hépatocytes et le recrutement des cellules immunitaires qui activent les cascades pro-inflammatoires. Le dialogue entre les hépatocytes et le système immunitaire est à la base du développement de la NASH.

La mort cellulaire peut survenir à la suite d'un processus programmé avec membrane plasmatique intacte (apoptose) ou d'un processus accidentel avec lyse de la membrane cellulaire (nécrose). Dans le contexte de la lipotoxicité, ce processus a également été spécifiquement appelé lipoapoptose. L'apoptose est étroitement régulée et suit les voies extrinsèques ou intrinsèques. La voie extrinsèque est médiée par les récepteurs de mort cellulaires, tels que les récepteurs FAS, le récepteur de TNF 1 (TNF-R1) et TNF-like apoptosis-inducing ligand (TRAIL). La voie intrinsèque est médiée par l'activation des mécanismes de stress du RE et des mitochondries (Malhi and Gores 2008). Les acides gras peuvent aussi réguler positivement les récepteurs de mort cellulaire, et d'ailleurs ces récepteurs sont davantage exprimés chez les patients NASH que chez les patients atteints de stéatose (Arab et al. 2018). Comme l'apoptose est une caractéristique essentielle de la NASH, les marqueurs de l'activité apoptotique, tels que les fragments de cytokératine-18 clivés, ont été mis en corrélation avec l'activité et la gravité de la maladie et pourraient être utilisés comme marqueurs non invasifs pour la NASH (Anty et al. 2010). En plus de l'apoptose et de la nécrose, il existe d'autres formes de mort cellulaire qui jouent un rôle dans la NASH notamment la nécroptose et la pyroptose. La nécroptose désigne la mort cellulaire programmée par induite par les TNF. La signalisation nécroptotique est transduite par le nécrosome, un complexe de protéines qui est régulé positivement dans NASH. La pyroptose est une mort cellulaire programmée dépendante de la Caspase-1 et médiée par l'inflammasome NLRP3 (Arab et al. 2018).

La mort hépatocytaire va déclencher la libération de signaux de danger sous forme de molécules intracellulaires désormais appelées danger-associated molecular patterns

(DAMPs) (Caligiuri et al. 2016). Les DAMPs sont reconnus par les patterns recognition receptors dont les mieux caractérisés sont les toll-like receptors (TLR). Par exemple, le TLR-4 est exprimé sur les hépatocytes, les cellules de Küpffer, les cellules endothéliales sinusoidales et les cellules stellaires. La voie de signalisation de TLR-4 active la voie inflammatoire de NF- κ B et la production de cytokines inflammatoires (Ibrahim et al. 2018).

En réponse au stress, l'hépatocytes va également relarguer des vésicules extracellulaires : les exosomes, les vésicules et les corps apoptiques. Ces vésicules permettent la communication intercellulaire et régulent les fonctions des cellules cibles dans la NAFLD. Elles contiennent des messagers très variés qui vont participer à la progression de la NASH : des facteurs de néo-vascularisation, des céramides (qui vont déclencher des cascades inflammatoires), des miR (comme miR128-3p impliqué dans l'activation des cellules stellaires et de la fibrose), de l'ADN mitochondrial (qui va favoriser la réponse inflammatoire). Ces vésicules sont d'ailleurs étudiées comme biomarqueurs de NASH (Ibrahim et al. 2018)

L'hépatocyte en souffrance est également impliqué dans la progression de la maladie notamment en générant le ligand Sonic Hedgehog qui est quiescent chez les sujets sains mais est activé en réponse à des lésions hépatiques. Sonic Hedgehog est indispensable à la réparation et à la régénération cellulaire mais s'il persiste dans sa forme active, il induit la fibrose hépatique en activant directement les cellules stellaires hépatiques (Friedman et al. 2018). D'ailleurs, plusieurs inhibitions pharmacologiques de la voie Hedgehog diminuent les lésions hépatiques, l'inflammation et la fibrose dans des modèles murins de NAFLD (Kwon et al. 2016).

5.3.5. Les autres cellules impliquées dans le développement de la NASH

Les cellules de Küpffer (KC), macrophages résidents du foie, sont les cellules immunitaires les plus abondantes du foie (figures 8 et 9). Elles sont activées par les DAMPs et les Pathogen associated molecular patterns (PAMPs) notamment le lipopolysaccharides (LPS). La principale origine de ces PAMPs est la dysbiose intestinale caractérisée par une modification de la flore intestinale et une perméabilité de la barrière intestinale due à une alimentation riche en graisse (Bashiardes et al. 2016). Dans la NASH, les KC se polarisent vers un phénotype pro-inflammatoire avec la production de différentes cytokines et chémokines pro-inflammatoires (C-C motif chemokine ligand (CCL) 2, TNF α , IL1, IL6...). Ces cellules vont également activer la

voie du TLR-4/NF- κ B (Cai et al. 2019; Kazankov et al. 2019). Notre équipe a récemment montré que l'intégrine membranaire CD44 exprimée sur les cellules immunitaires activées était impliquée dans le recrutement et l'activation des macrophages intra-hépatiques (en réponse aux DAMPS, au LPS et aux acides gras saturés). Cette voie participerait aux lésions hépatiques inflammatoires et fibrosantes et serait une cible thérapeutique potentielle (Patouraux et al. 2017).

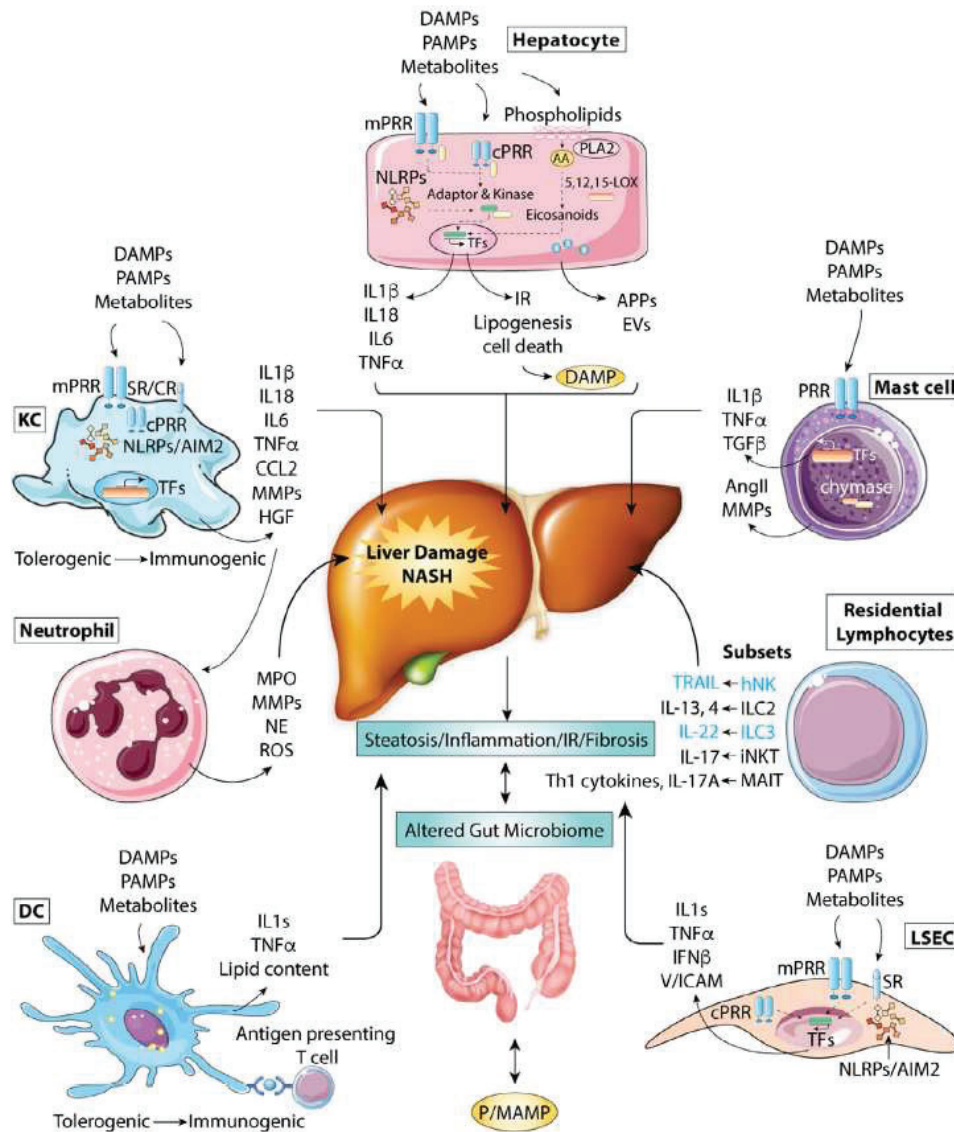


Figure 9 : Les différentes cellules immunitaires innées impliquées dans la progression NAFLD d'après Cai *et al.* Hepatology 2019

Sans le détailler, ce schéma montre la complexité des cellules immunitaires et les différentes voies impliquées dans le développement de la NASH et de la fibrose hépatique.

D'autres molécules de l'immunité vont également participer à la cascade inflammatoire, telles que les monocytes et les lymphocytes T dont les natural killer et les Mucosal-associated invariant T (MAIT) (figure 9). Ce sous-type de lymphocyte T améliore les propriétés pro-inflammatoires des macrophages dérivés des monocytes et promeut les fonctions mitogéniques et pro-inflammatoires des cellules fibrogènes, via des mécanismes distincts (Hegde et al. 2018).

A côté des cellules immunitaires, les cellules endothéliales sinusoidales (LSECs) participent également au développement de la NAFLD (figure 9). Dans des conditions physiologiques, les LSECs fenestrées sont l'interface entre les cellules hépatiques d'un côté et le sang provenant de l'intestin et du tissu adipeux de l'autre. Elles présentent des propriétés anti-inflammatoires et anti-fibrogéniques. La première modification est la capillarisation ou la défenestration des LSECs, apparaissant très tôt dans la progression de la NAFLD. Cette défenestration limite l'export des VLDL et favorise le développement de la stéatose. De plus, les LSECs sont sensibles au stress oxydatif et génèrent des ROS impliqués dans la souffrance hépatocytaire. Dans des stades plus avancés de la maladie (NASH), les LSECs changent en phénotype pro-inflammatoire. Les LSECs expriment des molécules d'adhésion et produisent des médiateurs pro-inflammatoires (tels que IL6, IL1 et TNF α). Elles dysfonctionnent et ne sont plus capables de maintenir les KC à l'état quiescent, et au contraire activent et recrutent des cellules immunitaires. Enfin, une néoangiogenèse pathologique se met en place et aggrave l'inflammation du foie, comme le montre l'effet anti-inflammatoire des thérapies anti-angiogéniques (Hammoutene and Rautou 2019).

Ce contexte hépatique chronique contribue à la formation de zones de nécrose et de zones inflammatoires propices à une réorganisation du tissu vers un dépôt excessif de matrice extra-cellulaire. C'est l'évolution de la NASH vers la fibrose hépatique.

5.4. Développement de la fibrose hépatique

Comme dans les autres maladies chroniques du foie, la fibrose dépend du résultat net entre la fibrogenèse (production de fibrose) et la fibolyse (dégradation de la fibrose). La cellule stellaire est l'élément clé de la fibrogenèse. Physiologiquement quiescente, la cellule stellaire devient rapidement transdifférenciée en myofibroblaste proliférante, contractile et fibrogène sous l'influence des différents dommages hépatiques. En effet,

les corps apoptotiques, les peroxydes lipidiques et les ROS relargués par l'hépatocyte en souffrance sont de puissants signaux d'initiation de l'activation des cellules stellaires. De plus, le relargage des médiateurs pro-inflammatoires (TNF α , IL1 β , PDGF) par les cellules de Küpffer, les plaquettes, les neutrophiles et les cellules endothéliales sinusoidales induisent également l'activation et la prolifération des cellules stellaires (Gandhi 2017).

L'initiation de l'activation des cellules stellaires se chevauche et se poursuit avec la phase de perpétuation impliquant des signaux de survie, de migration, de prolifération et de fibrogenèse. Les cellules stellaires activées produisent et déposent des quantités croissantes de collagène et de fibronectine de types I et III dans la matrice extracellulaire, un processus aggravé par un déséquilibre des métalloprotéinases matricielles (produites par les macrophages) et de l'inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases (produit par les cellules stellaires) (Schuppan et al. 2018).

La cytokine fibrogène la plus puissante, TGF β 1, produite par plusieurs cellules, y compris les cellules stellaires activées, est lib r e sous une forme inactive et activée par protéolyse par la fibronectine et les intégrines (Seki and Schwabe 2015). De nombreux facteurs, parmi lesquels le TNF α , l'IL-1 β et le LPS, favorisent la survie des cellules stellaires activées en stimulant le NF- κ B et en régulant négativement les gènes pro-apoptotiques. Les cellules stellaires activées produisent elles-mêmes de nombreuses cytokines, chimiokines et médiateurs de croissance. En plus d'exercer des effets autocrines, les cytokines/chimiokines recrutent et activent les cellules immunes et inflammatoires et réagissent aux médiateurs libérés par celles-ci, perpétuant la fibrogenèse (Gandhi 2017). D'autres cellules, comme les cellules lympho ides innées ou les MAIT participent à la fibrogenèse (Luci et al. 2019). De manière plus spécifique dans la NAFLD, les adipokines, le cholestérol libre et les marqueurs inflammatoires relargués par la dysbiose intestinale (LPS par exemple) jouent également un rôle pro-fibrinogène (Arab et al. 2018).

A contrario, les cellules natural killer (NK) exercent un effet anti-fibrotique à travers l'interferon (IFN) γ et en détruisant les cellules de stellaires activées par l'intermédiaire de TRAIL et fas-ligand (apoptose) (Seki and Schwabe 2015).

De toute évidence, la fibrose hépatique est un phénomène complexe orchestré par une multitude de cellules, de médiateurs et de voies de signalisation convergeant tous sur l'activation, la prolifération, la migration et le dépôt de la matrice extracellulaire. Le

ciblage des voies clés sera essentiel pour développer des traitements efficaces pour la fibrose.

6. Les modèles précliniques de NAFLD

De nombreux modèles précliniques, chez les rongeurs notamment, ont été proposés pour étudier les mécanismes moléculaires du développement de la stéatose, de la NASH et de la fibrose hépatique. Trois grandes familles de modèles de NAFLD existent : les modèles génétiques (spontanés ou souris transgéniques), les modèles nutritionnels et les modèles induits chimiquement/toxiques (injection d'une molécule toxique). Ces modèles peuvent être exclusifs ou s'associer. Certains modèles seront développés dans le manuscrit.

6.1. Les modèles génétiques de NAFLD

Des modèles génétiques spontanés ou modifiés de souris, responsables d'une obésité et d'une insulino-résistance, ont été développés. Ils ont permis de comprendre les mécanismes et les acteurs moléculaires à l'origine du développement de la stéatose et de la NASH. Par exemple, les souris *ob/ob* sont déficientes en leptine. Cette adipokine, produite par le tissu adipeux blanc, induit une inhibition de la prise alimentaire et une augmentation de la dépense énergétique. Les souris *ob/ob* sont donc hyperphages, moins actives, obèses, insulino-résistantes et diabétiques. Elles développent spontanément une stéatose hépatique.

Les différents modèles génétiques ne seront pas développés (Febbraio et al. 2019).

6.2. Les modèles d'intervention diététique de NAFLD

Nous avons déjà rappelé que la NAFLD est associée à l'obésité. De plus, on sait que l'obésité est très associée à un régime riche en fructose et à un apport calorique excessif. Des modèles nutritionnels murins ont donc été développés pour reproduire les effets des régimes délétères chez l'Homme (tableau 2).

Tableau 2 : Résumé des modèles d'intervention diététique murins de stéatose et de NASH d'après Febbraio *et col.* Cell metab 2019.

	Obésité	Insulino résistance	Stéatose	Inflammation/ stress du RE	NASH	Fibrose
HFD	++	++	++	+	+	-
WD	++	++	++	+	-	-
MCDD	-	-	++	+	++	++
CDD	-	-	++	+	++	++
HFD/Fructose	++	++	++	++	++	++
CDD HFD	++	++	++	++	++	+

++ = *expression marquée* ; + = *expression modérée* ; RE = *réticulum endoplasmique* ; HFD = *high fat diet* ; WD = *western diet* ; MCDD = *régime déficient en méthionine et choline* ; CDD = *régime déficient en choline*.

6.2.1. Le régime riche en gras (HFD)

Le régime riche en gras ou high fat diet (HFD) en anglais a été introduit dans les années 1940. Le principe de ce régime expérimental est qu'une majorité (45 à 75 %) de la ration calorique totale provient des graisses saturées. Chez les rongeurs, les deux régimes HFD les plus courants sont ceux contenant 60 % et 45 % de calories sous forme de graisses saturées pendant 15-30 semaines. C'est un régime entraînant une insulino-résistance : augmentation des acides gras libres circulants issus de la lipolyse adipocytaire ou directement de l'alimentation. Lorsque des souris sont nourries avec le régime HFD, elles vont développer une obésité avec une augmentation de leur poids corporel, une hyperglycémie, une hyperinsulinémie, une hypercholestérolémie, une résistance à l'insuline ou encore un diabète de type 2. Au niveau hépatique, elles vont développer une accumulation de triglycérides, une inflammation chronique et une NASH mais peu de fibrose. Il s'agit du modèle de choix pour étudier la stéatose (Ito et al. 2007; Jacobs et al. 2016; Hansen et al. 2017; Lieber et al. 2004).

6.2.2. Le régime « western diet »

Le régime « western diet » est supplémenté en fructose et sucrose mimant la composition alimentaire style fast-food des pays riches. Par exemple, plusieurs équipes ont montré qu'en nourrissant des souris C57BL/6, avec une alimentation riche

en graisses et en glucides (enrichie en eau avec 55 % de fructose et 45 % de saccharose) pendant 15 à 25 semaines, celles-ci étaient devenues obèses, résistantes à l'insuline et développaient une NASH avec une fibrose significative (Kohli et al. 2010; Jacobs et al. 2016; Hansen et al. 2017).

6.2.3. Le régime déficient en méthionine et choline (MCDD)

Le régime alimentaire déficient en méthionine et en choline (MCDD) est l'un des modèles nutritionnels les plus fréquemment utilisés pour induire une stéatohépatite. Le régime MCDD contient à la fois du saccharose (40 %) et de faibles quantités de graisse (10 %), mais deux facteurs essentiels de nutrition animale manquent, à savoir la méthionine et la choline, et constitue donc un modèle diététique pauvre en nutriments (Fan and Qiao 2009). Ces amino-acides jouent un rôle crucial dans la bêta-oxydation des AG et la production de VLDL. En conséquence, les souris nourries avec un régime MCDD développent généralement des lésions hépatiques similaires à celles de la NASH humaine, y compris une inflammation et une fibrose hépatique, en plus de la stéatose (Anstee and Goldin 2006). Un des bénéfices de ce régime est le développement précoce de la stéatose en 1 à 2 semaines et de la fibrose hépatique en 1 à 2 mois. Le développement et la gravité de la NASH induite par le régime MCDD chez les souris peuvent dépendre du sexe, de la souche et des espèces utilisées, reflétant l'hétérogénéité de la NASH humaine. Parmi les différents groupes étudiés, les mâles C57BL/6 développent l'inflammation et la nécrose hépatiques les plus prononcées, qui correspondent le mieux aux caractéristiques histologiques observées dans la NASH (Santhekadur et al. 2018). Bien que le modèle MCDD soit le plus validé pour étudier les éléments inflammatoires et fibrotiques du spectre de la NAFLD, et bien qu'il soit facilement disponible pour tous les laboratoires de recherche, il présente plusieurs inconvénients. Premièrement, les animaux nourris au régime MCDD perdent du poids et ont des concentrations plasmatiques en triglycérides plus basses que ce que l'on observe chez l'homme (Anstee and Goldin 2006). En outre, ils ne développent pas de résistance à l'insuline périphérique et ont une baisse de la glycémie plasmatique à jeun après 4 semaines de traitement. En résumé, alors que les caractéristiques histologiques de la NASH sont présentes dans l'alimentation des souris avec un régime MCDD, les caractéristiques systémiques de la NASH sont absentes (Jacobs et al. 2016; Hansen et al. 2017; Febbraio et al. 2019).

6.3. Les modèles induits chimiquement/toxiques

Les lésions hépatiques parenchymateuses et la fibrose induites chimiquement sont spécifiquement utilisées pour étudier les mécanismes de progression et de régression de la fibrose hépatique. La fibrose dans ces modèles évolue vers une cirrhose du foie et un CHC avec une incidence très élevée (Hansen et al. 2017).

Les chimiotoxines ciblées sur le foie sont le tétrachlorure de carbone (CCl₄) et le thioacétamide (TAA). Les mécanismes hépatotoxiques du CCl₄ et du TAA ne sont pas bien compris, mais impliquent l'absorption d'hépatocytes et la conversion de CCl₄ et de TAA en métabolites réactifs provoquant une nécro-inflammation oxydative, une activation et une prolifération excessive des cellules stellaires produisant du collagène (Kim et al. 2017). La streptozotocine (STZ) est utilisée pour induire un diabète car elle est particulièrement toxique pour les cellules β du pancréas, entraînant une perte progressive de la production d'insuline, mais elle peut également avoir des effets hépatotoxiques directs et indépendants de l'hyperglycémie. La période d'induction de la fibrose varie selon les modèles de chimiotoxines mais est courte (1 à 8 semaines), en fonction du schéma posologique pertinent et de la gravité de la fibrose dans le cadre expérimental. Le modèle STAM correspond à l'injection de STZ dès la naissance associée à un régime HFD à partir de la semaine 4. Ces souris développent une NASH manifeste à 8 semaines, qui évolue en fibrose à 12 semaines, puis développent un CHC à un taux proche de 100 % chez les mâles (Hansen et al. 2017; Febbraio et al. 2019).

7. Les traitements en cours de développement dans la NAFLD

A l'heure actuelle, aucun traitement médicamenteux n'a l'autorisation de mise sur le marché dans la prise en charge des différents stades de la NAFLD. La pierre angulaire de la prise en charge repose sur les mesures hygiéno-diététiques. Celles-ci comportent d'une part une augmentation de l'activité physique et une diminution de la sédentarité et d'autre part une modification des habitudes alimentaires (Romero-Gómez et al. 2017).

L'objectif des mesures hygiéno-diététiques est une diminution du poids d'environ 5 à 10 % du poids corporel total. Une perte de poids supérieure à 10 % permet une résolution de la NASH dans 90 % des cas et une régression de la fibrose dans 45 % des cas après un suivi d'un an (Vilar-Gomez et al. 2015). Chez les patients obèses morbides ou les patients obèses sévères (IMC ≥ 35 kg/m²), la chirurgie bariatrique est

une option efficace qui permet une perte de poids avec disparition de la stéatose, une réduction de la mort hépatocytaire et amélioration de la fibrose à 1 an (Schneck et al. 2016; Lassailly et al. 2015). Ces résultats se maintiennent à 5 ans (Lassailly et al. 2015).

Les mesures hygiéniques préconisent une diminution de la sédentarité. En effet, le temps passé devant un écran est associé au développement du syndrome métabolique et de l'obésité. De plus, au moins 30 minutes d'activité physique quotidienne sont préconisées (Chalasanani et al. 2018; Romero-Gómez et al. 2017).

La principale mesure diététique est de réduire la ration calorique quotidienne (de 500 à 1000 kCal/jour) et de limiter les apports en graisses saturées. Différents régimes ont été proposés (appauvris en lipides et/ou en glucides). Parmi ces régimes, le régime méditerranéen présente l'avantage d'une meilleure adhérence au long cours. Il peut réduire la stéatose même sans perte de poids et constitue donc le régime alimentaire le plus recommandé pour la NAFLD (Gepner et al. 2019). Le régime méditerranéen est caractérisé par une diminution de l'apport en glucides, en particulier des sucres et des glucides raffinés, ainsi qu'une augmentation de l'apport en acides gras mono-insaturés et oméga-3. D'autres conseils alimentaires sont donnés aux patients comme l'augmentation de la consommation en fibres (5 fruits et légumes par jour), la consommation d'au moins 3 tasses de café et la réduction du fructose industriel (Anty et al. 2012; Romero-Gómez et al. 2017).

Malheureusement, les mesures hygiéno-diététiques sont difficilement respectées par les patients. C'est pourquoi, il est nécessaire de développer des thérapeutiques médicamenteuses. La recherche foisonne de travaux basés sur la physiopathologie des NAFLD et de nombreux essais thérapeutiques pré-cliniques et cliniques sont en cours. Ces molécules ont des champs d'action très variés, car la NAFLD est une maladie multi-systémique avec atteinte du tube digestive, du tissu adipeux et du foie (figure 10). Les principales molécules sont détaillées ci-dessous en fonction de leur voie d'action principale.

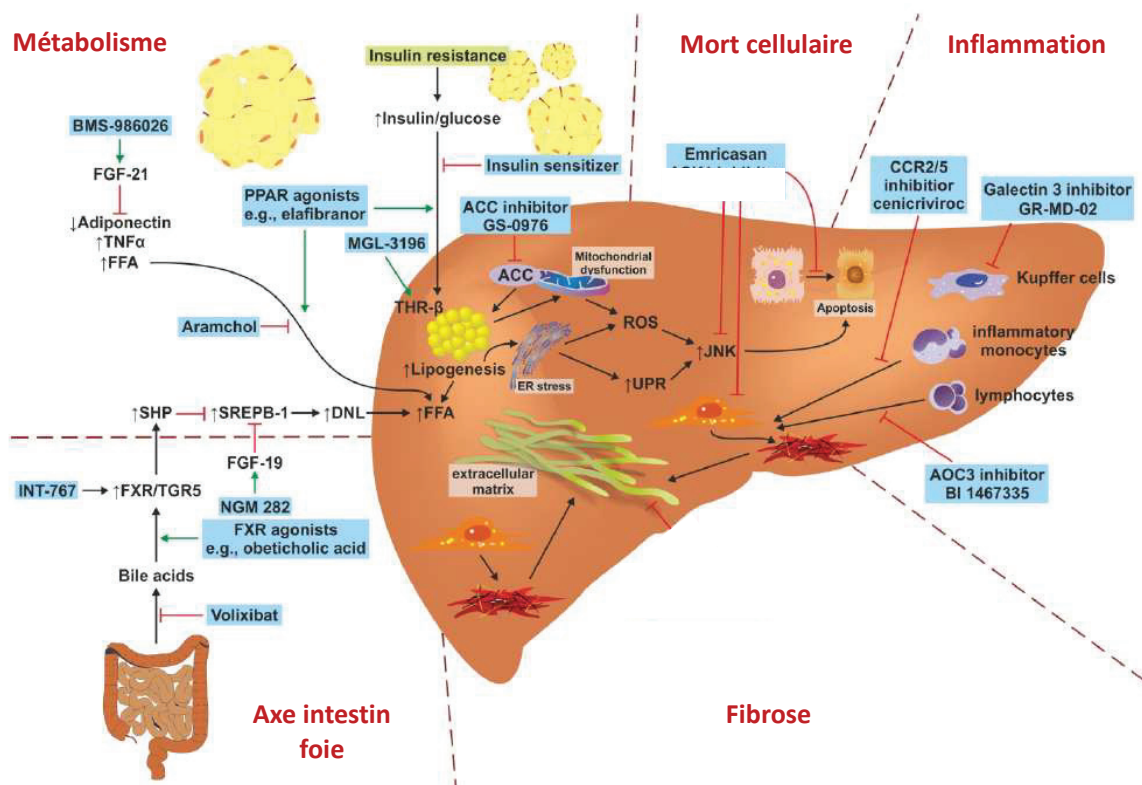


Figure 10 : Cibles thérapeutiques anti-fibrotiques d'après Tacke and Weiskirchen Exp rev gastroenterol hepatol 2018

Le schéma résume les principales voies de la mort cellulaire, du métabolisme, de l'axe intestin-foie, de l'inflammation et de la fibrose qui sont pharmacologiquement ciblées par des antifibrotiques potentiels et sur des composés en cours de développement pour la stéatohépatite et la fibrose hépatique non alcooliques.

Abbreviations: ACC, acetyl-coA carboxylase; AOC, amine oxidase, copper containing; ASK, apoptosis signal-regulating kinase; CCR, C-C motif chemokine receptor; DNL, de novo lipogenesis; ER, endoplasmic reticulum; FGF, fibroblast growth factor; FFA, free fatty acids; FXR, farnesoid X receptor; JNK, Jun N-terminal kinase; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; ROS, reactive oxygen species; SHP, small heterodimer partner; SREBP, Sterol regulatory element binding proteins; THR, thyroid hormone receptor; TLR, toll like receptor; TNF, tumor necrosis factor; UPR, unfolded protein response.

7.1. Les molécules agissant sur les voies métaboliques

Les principales cibles thérapeutiques des voies métaboliques sont l'insulino-résistance avec la lipolyse, la formation des acides gras libres et la lipotoxicité ; l'accumulation excessive des triglycérides dans les hépatocytes et la dysfonction mitochondriale ; et l'excès d'acide gras avec le stress oxydatif et le stress du réticulum endoplasmique (Tacke and Weiskirchen 2018).

Parmi les éléments clés de ces voies métaboliques, on trouve les récepteurs des acides biliaires, particulièrement le récepteur nucléaire des acides biliaires farnésoid X receptor (FXR). FXR a un rôle central dans le métabolisme glucidique et lipidique en régulant de manière négative SREPB-1c, en induisant FGF19 et en réduisant la production d'acides biliaires endogènes. L'acide obéticholique (OCA, INT-747, Intercept) est un puissant agoniste FXR. L'essai de phase 2, FLINT, a été interrompu prématurément du fait des effets positifs de l'OCA sur la fibrose et la NASH ($p = 0.004$) (Neuschwander-Tetri et al. 2015). Deux essais de phase 3, REGENERATE et REVERSE, sont en cours pour évaluer l'OCA chez des patients ayant une NASH fibrosante ou une cirrhose NASH. D'autres agonistes du FXR (non stéroïdes) sont en cours d'évaluation tels que tropifexor (LJN-452, Novartis), GS-9674 (Gilead), AKN 083 (Allergan) et LMB763 (Novartis).

Une autre famille de récepteur nucléaire ciblée par les traitements sont les PPARs. Ces récepteurs agissent comme un senseur des lipides dans plusieurs tissus (foie, tissu adipeux, cellule immunitaire et muscle). Les agonistes PPAR γ ont montré leur efficacité dans l'insulino-résistance, le diabète de type 2 mais aussi la NAFLD. Cependant, en France, cette famille de médicaments (les glitazones) a été retiré du marché. L'Elafibranor, double agoniste PPAR α/β , a montré un bénéfice sur la NASH sans amélioration de la fibrose dans un essai de phase 2 de 276 patients (GOLDEN-505) (Ratziu et al. 2016). Un essai de phase 3 est en cours (RESOLVE-IT, Genfit). D'autres molécules agonistes panPPAR sont en cours d'évaluation.

Le fibroblast-growth factor (FGF-21) (BMS 986036, BMS) est une hormone qui régule l'activation et l'oxydation des acides gras. Un essai de phase 2a a montré une amélioration de la stéatose chez des patients présentant une NASH (Sanyal et al. 2019).

Les agonistes des glucagon-like peptide 1 (GLP-1), comme le liraglutide, ont montré une amélioration du poids, de l'insulino-résistance et de la NASH dans un essai de phase 2 (Armstrong et al. 2016). Un essai de phase 2 avec un autre agoniste des récepteurs du GLP-1, le sémaglutide, a été réalisé et une phase 3 est en cours de préparation.

La voie des analogues récepteurs des hormones thyroïdiennes bêta (MGL-3196, Madrigal) et les inhibiteurs de certaines enzymes de la lipogenèse de novo comme l'acétyl-Coa carboxylase sont d'autres voies de recherche clinique en cours d'investigation (Tacke and Weiskirchen 2018).

7.2. Les molécules agissant sur la mort cellulaire

Le traitement anti-*ifibrosant* idéal modulant la mort cellulaire devrait probablement fonctionner de manière spécifique en fonction du type cellulaire et bien sûr être efficace sur les hépatocytes mais également les cellules stellaires.

Emricasan (IDN-6556, PF-03491390), inhibiteur pan-caspases a montré des effets bénéfiques sur la NASH et la fibrose dans des modèles murins mais des résultats mitigés chez l'homme (Barreyro et al. 2015). VX-166 (Vertex) et GS-9450 (Gilead), d'autres inhibiteurs de caspase, ont été étudiés mais ont eu des résultats décevants. Enfin, l'inhibiteur de Apoptosis Signal regulating Kinase 1 (ASK 1), le selonsertib, qui était une molécule prometteuse en régulant la mort cellulaire mais également les voies de signalisation de l'inflammation (Loomba et al. 2018), n'a pas montré d'efficacité ni sur la NASH, ni sur la fibrose en phase 3. Son développement a été arrêté récemment.

7.3. Les molécules agissant sur l'inflammation

Les approches directes sur l'inflammation ont pour objectif de bloquer le recrutement des cellules inflammatoires. Ce mécanisme est principalement régulé par les chémokines, relarguées par les cellules de Küpffer, les hépatocytes stressés, les cellules sinusoïdales et les cellules stellaires. L'un des facteurs clés de la fibrose est le recrutement de monocytes inflammatoires via le récepteur des chémokines CCR2. Le cenicriviroc (Allergan), un double inhibiteur CCR2/CCR5 a montré une amélioration de la fibrose après un an de traitement chez 289 patients avec NASH (Friedman, Ratziu, et al. 2018) dans une étude de phase 2 et est actuellement en phase 3.

Une voie de l'inflammation des macrophages repose sur la Galectin-3. Des modèles murins ont montré une réduction de la fibrose avec des inhibiteurs de Galectin-3 (Traber and Zomer 2013). Un essai de phase 3 est actuellement cours (GR-MD-02, Galectins therapeutics).

7.4. Les molécules agissant sur la fibrose

Le simtuzumab (Gilead) est un anticorps monoclonal dirigé contre LOXL2 (lysyl oxidase-like 2), une enzyme de la matrice responsable de la réticulation des chaînes de collagène, présente en grande quantité dans les régions avec fibrose du foie. Malgré ces effets prometteurs dans des modèles pré-cliniques, la molécule n'a pas montré son efficacité chez des patients présentant une fibrose et une cirrhose. Deux

essais ont été arrêtés prématurément devant l'absence d'efficacité (Harrison, Abdelmalek, et al. 2018).

7.5. Molécules agissant sur l'axe foie-intestin

L'axe foie-intestin est une entité fonctionnelle importante. Les nutriments absorbés au niveau digestif sont directement relargués dans le système porte et le foie, et au contraire les acides biliaires hépatiques sont relargués dans l'intestin. En cas de maladie hépatique, on retrouve une modification du microbiote intestinal, une augmentation de la perméabilité capillaire et de la translocation bactérienne. A l'heure actuelle, la transplantation fécale, les antibiotiques et les probiotiques n'ont pas fait assez de preuves dans le traitement de la NAFLD (Tacke and Weiskirchen 2018). Une molécule intéressante est un analogue du fibroblast growth factor (FGF) 19 (NGM282, NGMBio). FGF15/19 est activé par FXR. Cette hormone a une action hépatique directe en diminuant la lipogenèse, la néoglucogenèse et la synthèse d'acide biliaire et en augmentant l'oxydation des acides gras, la synthèse de glycogène et la synthèse protéique. FGF15/19 joue également un rôle dans le tissu adipeux en augmentant l'absorption du glucose, et dans le cerveau dans le contrôle de l'appétit (Babaknejad et al. 2018; Arab et al. 2017; Cicione et al. 2012). Un essai de phase 2 de 12 semaines a montré sur 82 patients présentant une NASH et une fibrose F1-F3, une amélioration significative de la stéatose (Harrison et al. 2018). Une étude exploratoire chez 19 patients a également montré, après 12 semaines de traitement, une amélioration de la fibrose. Un essai de phase 2b est en cours.

Au vu de toutes ces molécules en cours de développement, la prise en charge de la NAFLD pourrait évoluer dans les années futures. A l'heure actuelle, les molécules les plus prometteuses sont l'acide obéticholique (agoniste FXR), l'élafibranor (double agoniste PPAR) et le cenicriviroc (inhibiteur CCR2/CCR5) et le NGM282 (analogue du FGF19).

Partie 2 : La protéine Fibronectine type 3 domain containing 5 (FNDC5) et l'Irisine

1. Les myokines

Les muscles squelettiques représentent environ 40 % du poids corporel chez les hommes et les femmes minces et constituent donc le plus grand organe chez les humains non obèses. L'idée que les cellules musculaires pourraient produire et libérer un facteur humoral remonte à de nombreuses années. Pendant près d'un demi-siècle, les chercheurs ont émis l'hypothèse que les cellules des muscles squelettiques possédaient un facteur « humoral » libéré en réponse à une demande accrue de glucose au cours de la contraction. En 2003, Pedersen *et col.* ont suggéré que les cytokines ou autres peptides produits, exprimés et libérés par les fibres musculaires et exerçant des effets endocriniens soient classés dans la catégorie des myokines (Pedersen et al. 2003). L'identification du muscle squelettique en tant qu'organe de sécrétion a créé un nouveau paradigme : les muscles produisent et libèrent des myokines, qui fonctionnent comme des hormones et exercent des effets spécifiques sur des organes distants. D'autres protéines produites par le muscle squelettique qui ne sont pas libérées dans la circulation pourraient fonctionner par des mécanismes autocrines ou paracrines, exerçant ainsi leurs effets sur les voies de signalisation à l'intérieur du muscle lui-même (Pedersen and Febbraio 2012).

La première myokine découverte est la Myostatine, qui fait partie de la super famille des tumor growth factor (TGF) β . L'inactivation de son gène (par knock-out (KO)) entraîne une hypertrophie étendue du muscle squelettique (Rodgers and Garikipati 2008). Cette myokine est également impliquée dans le maintien de l'homéostasie métabolique et dans la modulation de la fonction et de la masse du tissu adipeux (McPherron and Lee 2002). Une autre myokine, l'interleukine (IL) 6, est la première qui a été montrée comme étant sécrétée dans le sang en réponse à des contractions musculaires (Pedersen and Febbraio 2008). Cette myokine est la plus étudiée. Au niveau du métabolisme glucido-lipidique, IL6 favorise la lipolyse du tissu adipeux viscéral et la glycogénolyse dans le foie pour maintenir une glycémie suffisante et des apports en sucre nécessaires au muscle en activité (Febbraio and Pedersen 2002; Wedell-Neergaard et al. 2019).

Beaucoup de myokines identifiées exercent des effets autocrines ou paracrines dans le muscle même. Ainsi, la myostatine, l'IL-4, l'IL-6, l'IL-7 et l'IL-15 sont impliquées dans la régulation de l'hypertrophie musculaire et de la myogenèse. De plus, les myokines sont également des médiateurs d'effets systémiques, y compris des effets sur le foie, les tissus adipeux, le cerveau, l'intestin et le système immunitaire (Rai and Demontis 2016). Par exemple, le BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) traverse la barrière hémato-encéphalique et favorise la gliogenèse et la neurogenèse dans plusieurs régions du cerveau, y compris l'hippocampe (Klein et al. 2011). Il augmente également l'apprentissage et la mémoire en facilitant la potentialisation à long terme et la plasticité synaptique (Rai and Demontis 2016).

Au total, la contraction musculaire et, par conséquent, l'activité physique est un important régulateur de la sécrétion de myokines, mais l'activité physique et l'entraînement physique font partie d'un mode de vie sain et la dissection précise de l'action d'une myokine à partir d'autres événements de signalisation est très difficile. Les myokines agissent très probablement de manière intégrée avec les métabolites, les exosomes et d'autres signaux. Cependant, il est important d'étudier les signatures individuelles de myokines afin d'explorer plus avant la valeur thérapeutique potentielle de certaines d'entre elles.

2. La « Fibronectin type III domain family »

La fibronectine intervient dans une grande variété d'interactions cellulaires avec la matrice extracellulaire et joue un rôle important dans l'adhésion, la migration, la croissance et la différenciation cellulaires. Elle est largement exprimée dans plusieurs types de cellules et est d'une importance cruciale dans le développement des vertébrés, comme le montre la létalité embryonnaire précoce de souris avec l'inactivation ciblée de son gène.

La fibronectine se présente habituellement sous forme de dimère composé de deux sous-unités d'environ 250 kDa presque identiques, liées de manière covalente par une paire de liaisons disulfures. Chaque monomère est constitué de trois types d'unités répétitives : type I, type II et type III. La fibronectine contient 12 répétitions de type I, 2 répétitions de type II et 15 à 17 répétitions de type III. Cette dernière catégorie représente environ 90 % de la fibronectine (Pankov and Yamada 2002). Sa longueur est d'environ 90 résidus sans aucune liaison disulfure. Les domaines de la fibronectine sont présents dans une grande variété de protéines extracellulaires. Elles sont

largement répandues chez les espèces animales, mais se rencontrent aussi sporadiquement dans les protéines de levures, de plantes et de bactéries (Pankov and Yamada 2002).

La protéine FNDC5 (fibronectin type III domain containing 5) est la plus étudiée des protéines de la famille des fibronectin type III domain containing mais d'autres protéines ont été décrites dans la littérature. Leurs fonctions sont très hétérogènes et ces différentes protéines n'ont été que peu étudiées.

FNDC4 est la protéine de la famille qui a le plus d'homologie avec FNDC5 (57 % d'acides aminés communs). Une seule étude a montré que FNDC4, mais pas FNDC5, était fortement régulée avec l'état inflammatoire. Elle était exprimée dans les cellules épithéliales et les cellules immunitaires de l'intestin et son expression était augmentée en cas d'inflammation. L'administration exogène de FNDC4 entraînait une réduction de l'inflammation et de la gravité de la maladie dans un modèle murin de maladie inflammatoire chronique de l'intestin. Fait intéressant, FNDC4 modifiait l'état d'activation des macrophages, ce qui entraînait des conséquences importantes sur leurs fonctions (Bosma et al. 2016).

FNDC1 ou AGS8 (activator of G signaling 8) est un membre représentatif d'un sous-groupe de protéines AGS qui interagissent directement avec les protéines G. Le traitement du signal via les protéines G est l'un des systèmes les plus utilisés pour le transfert d'informations à travers la membrane cellulaire. Une seule équipe, menée par Motohiko Sato, s'est intéressée à la protéine AGS8 ou FNDC1. AGS8, inductible par l'hypoxie, participait à l'adaptation de cardiomyocytes à un « défi » ischémique (Sato et al. 2006). Des modèles *in vitro* de cardiomyocytes de rats dans lesquels AGS8 était surexprimée (transfection pcDNA::AGS8) ou invalidée (AGS8 siRNA) ont montré que l'apoptose des cardiomyocytes induite par l'hypoxie était prévenue par l'invalidation d'AGS8, alors que la surexpression de AGS8 augmentait l'apoptose (Sato et al. 2009; 2014). AGS8 formait des complexes avec les protéines G et la connexine 43 (CX43), connexine qui régule la perméabilité de petites molécules sous stress hypoxique. AGS8 bloquerait l'internalisation de CX43 en période de stress hypoxique ce qui diminuerait le flux à travers le canal et favoriserait l'apoptose des cardiomyocytes (Sato et al. 2009).

FNDC3 jouerait un rôle dans la ramification et la croissance synaptique. Une étude portant sur la formation et la fonction de la jonction neuromusculaire larvaire (JNM) de

la drosophile a montré que le développement de la JNM chez la drosophile nécessitait le gène de *Fndc3* (Syed et al. 2019).

Enfin, une étude a évalué les fonctions cellulaires et moléculaires de PPAR γ dans la différenciation des muscles squelettiques. La surexpression de PPAR γ pouvait inhiber la différenciation myogénique dans les cellules musculaires squelettiques C2C12. Dans cette étude, 2 gènes, *Car12* et *Fndc9*, étaient significativement surexprimés dans les cellules sauvages (WT) mais sous-exprimés dans les cellules surexprimant PPAR γ . Cette étude a montré que la formation de myotubes ainsi que l'expression de gènes myogéniques spécifiques au muscle pourraient être inhibées par la surexpression de PPAR γ . Plusieurs gènes et voies ont été significativement impliqués dans ce processus, dont *Fndc9* (He et al. 2017).

A noter que FNDC2 et FNDC8 ne sont pas référencés sur *Pubmed*.

3. La protéine FNDC5

3.1. Découverte de l'irisine et rôle initial de FNDC5

L'irisine, du nom de la déesse messagère grecque « Iris », a été découverte en recherchant des facteurs sécrétés par le muscle en réponse à l'activation du PPAR γ coactivator-1 α (PGC1 α).

En effet, PGC1 α est un co-activateur de transcription qui intervient dans de nombreux programmes biologiques liés au métabolisme énergétique. Initialement décrit comme un co-activateur de PPAR γ qui modulait l'expression de la protéine de découplage 1 (UCP1) et de la thermogénèse dans le tissu adipeux brun, il a également été démontré qu'il contrôlait la biogénèse mitochondriale et le métabolisme oxydatif dans de nombreux types de cellules. PGC1 α est induit dans le muscle par l'exercice et stimule bon nombre des effets bénéfiques les plus connus de l'exercice sur le muscle comme la biogénèse mitochondriale ou l'angiogénèse (Handschin and Spiegelman 2008). Boström *et col.* ont d'abord montré une augmentation de la brunisation du tissu adipeux blanc sous cutané, associé à une augmentation d'UCP1 dans des modèles murins transgéniques avec surexpression de PGC1 α . La culture d'adipocytes primaires sous cutanés avec surexpression de PGC1 α sécrétait des molécules pouvant induire la thermogénèse. La molécule principalement responsable était FNDC5. En effet, dans des adipocytes primaires sous cutanés blancs, FNDC5

induisait 7 fois l'ARNm d'UCP1 à une concentration de 20 nM avec un effet dose entre 1 et 15 nM (Boström et al. 2012).

FNDC5 est une protéine transmembranaire de 212 acides aminés qui comprend un peptide signal, 2 domaines fibronectine, un domaine hydrophobe qui est inséré dans la membrane, et une partie C terminale cytosolique (figure 11). Après clivage protéolytique, glycosylation et dimérisation, une nouvelle protéine, l'irisine, comprenant la plus grande partie des domaines fibronectines, est libérée (figure 11). L'irisine est remarquablement conservée entre les espèces avec 100 % d'homologie entre la souris et l'Homme (Boström et al. 2012).

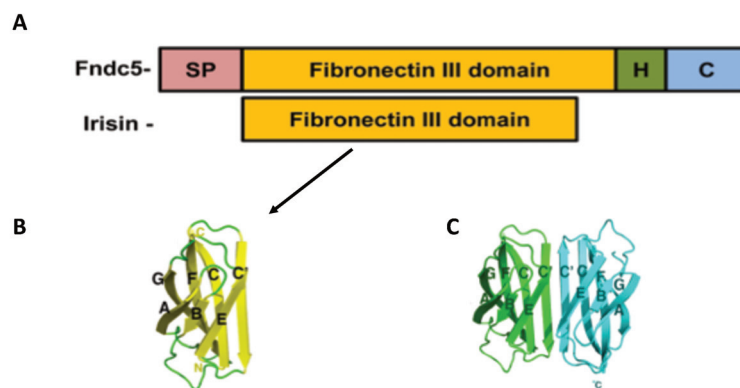


Figure 11 : Schémas représentatifs de la structure de Fibronectin type III domain containing 5 et de l'irisine

A - La protéine FNDC5 comprend un peptide signal (SP), 2 domaines fibronectine III, un domaine hydrophobe (H) et un domaine C terminal (C). L'irisine comprend 112 acides aminés et provient du clivage de FNDC5.

B - Superpositions de huit sous-unités dans l'unité asymétrique cristallographique montrant les régions de flexibilité se trouvant sur la même face et pouvant être candidates à des sites d'interaction protéine-protéine.

C - Structure du dimère d'irisine.

L'étude princeps a également montré que l'irisine était détectée dans le plasma sanguin et humain et était augmentée en cas d'activité physique. L'augmentation de la concentration sanguine est proportionnelle à l'augmentation observée dans le muscle. Après injection de FNDC5 (par un adénovirus vecteur) chez des souris sous régime HFD, une perte de poids, une amélioration de la tolérance au glucose et une augmentation d'UCP1 étaient observées. Ces effets étaient inverses en cas

d'inhibition de FNDC5 traduisant que l'irisine est requise pour une part substantielle des effets de l'exercice sur la brunisation du tissu adipeux (Boström et al. 2012).

Depuis, des informations supplémentaires sur la structure de FNDC5 et l'irisine ont été publiées. FNDC5 est N-glycosylée au niveau des acides aminés Asn³⁶ et Asn⁸¹ et cette double glycosylation contribue à la stabilisation de FNDC5. Lorsque FNDC5 n'est pas glycosylée, elle se situe dans le réticulum endoplasmique plutôt que dans la membrane cellulaire. Bien que le mécanisme de clivage de FNDC5 soit inconnu, il a été montré que la glycosylation de FNDC5 était nécessaire pour la sécrétion de l'irisine (Nie and Liu 2017).

La structure de l'irisine par cristallographie aux rayons X jusqu'à une résolution de 2,28 Å révèle que l'irisine, protéine de 112 acides aminés, consiste en un domaine de type fibronectine III (FNIII) N-terminal attaché à une queue C-terminale flexible. Une découverte inattendue et remarquable de la structure d'irisine est que, contrairement à tout domaine FNIII précédemment caractérisé, elle forme un dimère serré dans lequel les brins C des feuilles à quatre brins se combinent pour créer une feuille antiparallèle continue à huit brins (figure 11). Les données biochimiques confirment que l'irisine est un dimère et que la glycosylation n'est pas affectée par la dimérisation (Schumacher et al. 2013).

Très récemment, un récepteur de l'irisine, l'intégrine $\alpha V/\beta 5$, a été identifié dans l'ostéocyte. C'est la première fois qu'un récepteur de l'irisine est identifié et des études supplémentaires sont nécessaires pour rechercher ce récepteur dans d'autres tissus et notamment le foie (Kim et al. 2018; Greenhill 2019; Anastasilakis et al. 2019). En revanche, le mécanisme de clivage de l'irisine est toujours inconnu.

L'irisine, sécrétée par FNDC5, a été initialement assimilée à la myokine de l'activité physique et comme traitement prometteur pour l'obésité et le DT2.

3.2. 2013-2015 : la controverse sur FNDC5

Après la publication princeps en 2012, faisant de l'irisine l'hormone de l'activité physique (Boström et al. 2012), des incohérences entre les résultats des valeurs de circulation de l'irisine ont été retrouvées dans plusieurs études de suivi. En effet, les niveaux d'irisine circulante dans ces études différaient de façon frappante (de 24 pg/ml à 2 µg/ml). De manière plus intrigante et illogique, plusieurs auteurs ont rapporté que l'entraînement physique n'exerçait aucune influence sur l'irisine circulante chez l'Homme (Pekkala et al. 2013; Norheim et al. 2014).

De plus Raschke *et col.* ont montré chez l'homme, que le codon d'initiation du gène FNDC5 était muté et n'était pas activé par la contraction, que le codon d'initiation ATA du gène FNDC5 n'était essentiellement pas traduit et que FNDC5 et l'irisine n'avaient aucun effet sur la différenciation brute des préadipocytes. En conséquence, ils ont suggéré que les humains ne produisaient pas la protéine FNDC5 et ne pouvaient donc pas avoir d'irisine plasmatique (Raschke et al. 2013).

En 2015, Albrecht *et col.* ont étudié la sensibilité et la spécificité des anticorps utilisés pour détecter l'irisine. Ils ont trouvé une réactivité croisée avec d'autres protéines (telles que l'apolipoprotéine A1) et ont conclu que la détection de l'irisine par les anticorps inclus dans les kits ELISA disponibles dans le commerce présentait des inconvénients importants (Albrecht et al. 2015).

Tous ces auteurs « anti-irisine » ont été jusqu'à dire que l'irisine était un mythe grec plutôt qu'un messenger grec ! (Timmons et al. 2012; Elsen et al. 2014; Sanchis-Gomar et al. 2014).

Pour clore la controverse, Jedrychowski *et col.* ont identifié et quantifié l'irisine humaine dans le plasma en utilisant la spectrométrie de masse avec des peptides de contrôle enrichis en isotopes stables lourds en tant qu'étalons internes. Cette méthode de pointe précise que l'irisine humaine était principalement traduite à partir de son codon de départ non canonique. Les niveaux d'irisine étaient présents à 3,6 ng/ml chez les individus sédentaires et étaient significativement augmentés à 4,3 ng/ml chez les individus subissant un entraînement en aérobic (Jedrychowski et al. 2015).

3.3. Les grandes fonctions de FNDC5 et de l'irisine

FNDC5 est principalement exprimée dans le muscle squelettique mais également dans d'autres organes tels que le tissu adipeux, le cœur ou le rein. Son expression est très faible dans le foie et le pancréas. Chez l'humain, l'expression de FNDC5 dans le muscle est 100 à 200 fois supérieure à celle du tissu adipeux (Moreno-Navarrete et al. 2013). Cependant le tissu adipeux sous cutané est la deuxième source d'irisine. On estime chez la souris que 70 % de la fraction circulante de l'irisine provient du muscle (Roca-Rivada et al. 2013).

FNDC5/irisine a été initialement décrit comme associé à la thermogénèse et à l'activité physique. D'autres études ont montré son rôle dans le DT2 et ses complications (obésité, insulino-résistance, dyslipidémie), la NAFLD et l'hypertrophie cardiaque. FNDC5/irisine a été étudié dans le muscle, le tissu adipeux et le sang bien sûr mais

aussi dans le cœur, le foie, le pancréas, le cerveau (figure 12). Enfin l'étude génique de *FNDC5* et notamment l'étude de ses polymorphismes a fait l'objet de plusieurs publications.

Plusieurs équipes ont produits des modèles de souris KO *Fndc5*. Les souris KO étaient viables, fertiles, présentaient un poids normal. En revanche, sous l'influence de régimes (régime HFD par exemple), les anomalies métaboliques étaient exacerbées (Liu et al. 2016; Xiong et al. 2019; Li et al. 2018). L'ensemble de ces données sont détaillées dans la suite du manuscrit.

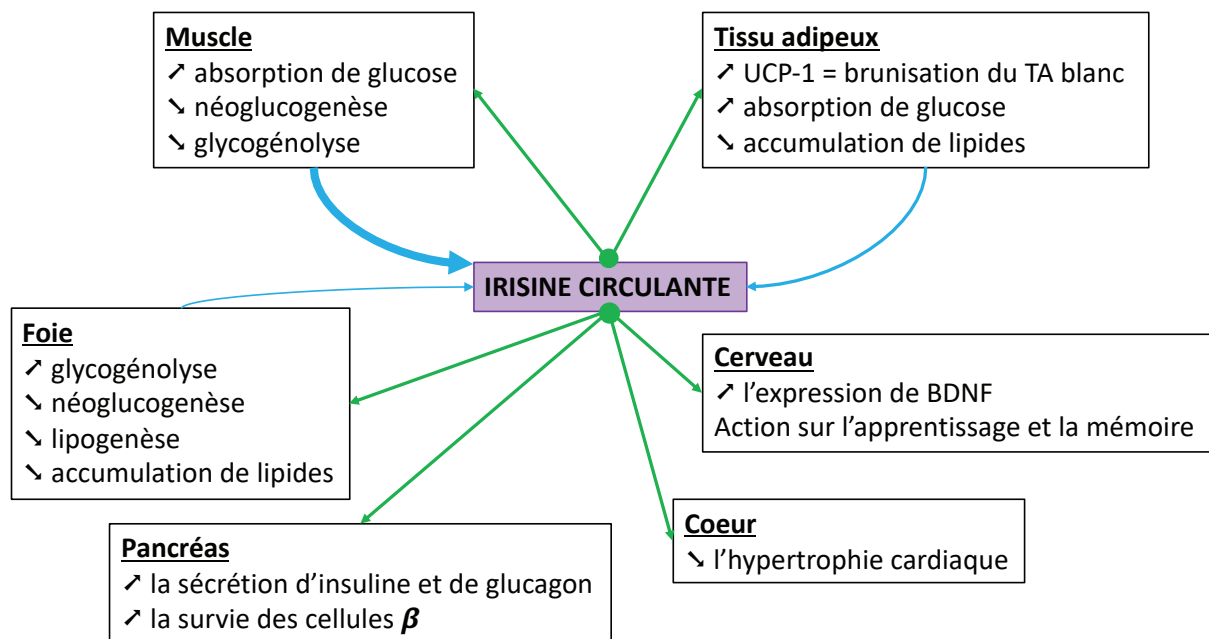


Figure 12 : Effets probables de l'irisine sur le métabolisme lipido-glucidique

L'irisine est principalement sécrétée par le muscle mais également par le tissu adipeux et le foie (flèches bleues). L'irisine exerce une action sur différents organes via la circulation dans le sang. L'effet le plus validé de l'irisine est celui de la brunisation du tissu adipeux blanc via l'activation de l'UCP1.

Abbréviations : UCP-1 = uncoupling protéine 1 ; TA = tissu adipeux ; BDNF = Brain-Derived Neurotrophic Factor

3.3.1. FNDC5/Irisine et exercice physique

Dans la description première de l'irisine, les souris transgéniques surexprimant *Pgc1 α* dans le muscle avaient une augmentation de l'expression de FNDC5 et du relargage de l'irisine (Boström et al. 2012). Étant donné que l'un des éléments déclencheurs de PGC1 α est l'exercice physique, plusieurs études ont montré l'effet de l'exercice sur la

sécrétion d'irisine et ont reporté des résultats contradictoires. Plusieurs études n'ont pas retrouvé d'association entre les niveaux de PGC1 α , de FNDC5, d'irisine et l'activité physique (Raschke et al. 2013; Kurdiova et al. 2014). Par exemple, l'expression de FNDC5 dans le muscle (étudié sur 9 biopsies humaines) était non modifiée après 8 semaines d'un programme d'entraînement physique d'endurance (Besse-Patin et al. 2014). De plus, ni l'exercice aigu (exercice en aérobic intense pendant 1h), ni l'exercice chronique (21 semaines d'activité physique en endurance) ne modifiait l'expression de PGC1 α ou de FNDC5 dans le muscle ou le niveau d'irisine circulant. Seul l'exercice contre résistance montrait une augmentation par 2 à 4 de PGC1 α et une augmentation de 1,4 fois de niveau circulant d'irisine (Pekkala et al. 2013). Enfin, les niveaux d'ARNm de *PGC1 α* et de *FNDC5* dans le muscle squelettique étaient significativement augmentés chez 26 individus après 12 semaines d'exercice physique mais au contraire, le niveau circulant d'irisine était diminué (Norheim et al. 2014).

A contrario, d'autres études ont montré une augmentation de l'irisine circulante après exercice physique (Löffler et al. 2015; Joo Young Huh et al. 2015; Shirvani and Rahmati-Ahmadabad 2019). Chez la souris, le niveau d'irisine était 2 fois supérieur dans le muscle et 1,5 fois supérieur dans le sérum immédiatement après un exercice physique sur tapis roulant, mais le niveau d'ARNm de *Fndc5* n'était pas modifié (Brenmoehl et al. 2014). Chez l'humain, la durée de l'exercice physique semble être important dans la modification de la concentration sérique d'irisine. Certains auteurs ont reporté que le pic d'irisine était maximum 30 à 60 minutes après un exercice et retournait à l'état basal 6h plus tard, et que l'activité chronique ne modifiait pas la concentration sérique d'irisine (Pekkala et al. 2013; Nygaard et al. 2015).

Lorsque l'on interprète tous ces résultats d'étude basés sur l'exercice physique, il est important de rappeler l'hétérogénéité qui existe entre les études que ce soit sur le design, le type d'activité physique (aérobic, résistance), la durée (aigüe ou chronique). De plus, la plupart des études chez l'humain porte sur un petit nombre de participants. Enfin, la détection de l'irisine ou de FNDC5 se base sur des anticorps commercialisés dont la fiabilité est questionnable (Perakakis et al. 2017).

En conclusion, il semble y avoir une augmentation de l'irisine circulante lors d'une activité physique aigüe et non chronique, ce qui implique un « timing » dans la modification de l'expression de FNDC5 et le relargage de l'irisine par le muscle (Perakakis et al. 2017).

3.3.2. FNDC5/Irisine et tissu adipeux

3.3.2.1. FNDC5/Irisine favorise la brunisation du tissu adipeux blanc

Chez les mammifères vivant dans les pays froids ou hibernant, l'énergie est transformée en chaleur pour lutter contre les températures extrêmes et maintenir la température corporelle. Le mécanisme physiologique est celui de la production de chaleur par le tissu adipeux brun. Cette production de chaleur permet également la protection contre l'obésité en éliminant les triglycérides et en atténuant la résistance à l'insuline car elle consomme beaucoup d'énergie. En effet les adipocytes du tissu adipeux brun présentent plus de mitochondries et moins de gouttelettes de triglycérides que les adipocytes du tissu adipeux blanc (Jeremic et al. 2017). L'expression du facteur découplant 1 (UCP1), composant principal des mitochondries, est le reflet de la production de chaleur dans le tissu adipeux brun (Seale and Lazar 2009). Chez l'humain, ce tissu adipeux est quasi inexistant mais il a été montré qu'en cas d'exposition d'un individu à des températures très basses, le tissu adipeux blanc est capable de se « transformer » en tissu adipeux brun et produire de la chaleur : c'est le concept de brunisation du tissu adipeux blanc (van Marken Lichtenbelt et al. 2009).

Après avoir été sécrétée par le muscle, l'irisine stimule l'expression d'UCP1 dans les adipocytes entraînant la brunisation du tissu adipeux blanc. Chez l'humain, l'irisine semblait induire la brunisation de certains tissus adipeux blancs spécifiques comme celui de la nuque (Lee et al. 2014; Elsen et al. 2014). Dans une étude où des humains étaient exposés à des températures basses, l'irisine circulante était augmentée (tout comme FGF21 qui est l'adipokine du tissu adipeux brun) et était corrélée avec l'intensité des frissons (Lee et al. 2014).

En 2013, Roca-Rivada *et col.* ont montré dans des modèles murins d'obésité et à partir de biopsies humaines de tissu adipeux blanc sous cutané et viscéral que FNDC5 était également exprimé dans les adipocytes et que l'irisine était relarguée à partir des adipocytes montrant qu'il ne s'agissait pas seulement d'une myokine mais également d'une adipokine. FNDC5 était plus exprimée dans le tissu adipeux sous cutané que le tissu adipeux viscéral et son expression adipocytaire augmentait après une activité physique (Roca-Rivada et al. 2013). Chez les sujets obèses, l'expression de FNDC5/irisine dans le tissu adipeux était augmentée (Pérez-Sotelo et al. 2017). La surexpression de FNDC5 dans des adipocytes humains montraient une augmentation d'UCP1 et de la production de chaleur traduisant une brunisation du tissu adipeux (Lee

et al. 2014). Les adipocytes traités avec de l'irisine exogène étaient plus petits et accumulaient moins de lipides que les adipocytes contrôles. D'ailleurs, l'irisine régulaient certains gènes impliqués dans la lipolyse comme par exemple *patatin-like phospholipase domain-containing protein 2* et *hormone-sensitive lipase* (Huh et al. 2015). Des modèles murins obèses (HFD) traités avec FNDC5 recombinant avaient une diminution du diamètre des adipocytes et une réduction du cholestérol, des triglycérides et des acides gras circulants (Xiong et al. 2015). Au contraire, l'inactivation de FNDC5 dans les adipocytes montrait une réduction de l'expression d'UCP1 et des adipocytes plus gros (Pérez-Sotelo et al. 2017; Zhang et al. 2016). Ces résultats ont été confirmés chez des souris *Fndc5^{-/-}* qui, après une activité physique, présentaient une diminution de la brunisation du tissu adipeux basée sur une diminution de *Ucp1* (Xiong et al. 2019). Étant donné que chez les patients obèses, l'irisine est augmentée, Pérez-Sotelo *et col.* proposent le concept « de résistance à l'irisine » des adipocytes matures en cas d'obésité empêchant ses effets bénéfiques. Cette résistance serait responsable de la sécrétion excessive d'irisine par des adipocytes matures dans le but de contre-balancer le statut métabolique altéré (Pérez-Sotelo et al. 2017).

Au niveau mécanistique, la brunisation du tissu adipeux est médiée par la voie de signalisation de la p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) et extracellular-signal regulated kinase (ERK). L'irisine va phosphoryler p38-MAPK et l'activer. L'inhibition de p38-MAPK ou de ERK abolit l'effet positif de l'irisine sur UCP1 (Sanchis-Gomar and Perez-Quilis 2014; Zhang et al. 2014; Zhang et al. 2016).

3.3.2.2. FNDC5/Irisine favorise le métabolisme glucidique du tissu adipeux

Le deuxième rôle de l'irisine dans le tissu adipeux est son action sur le métabolisme glucidique (Perakakis et al. 2017; Chen et al. 2016). Chez l'humain, l'absorption du glucose, dans le tissu adipeux brun, induite par l'insuline après une exposition au froid est dix fois supérieure à celle du tissu adipeux blanc ou du tissu adipeux viscéral (Orava et al. 2011). Cette augmentation de l'absorption du glucose résultait de l'augmentation d'expression du transporteur de glucose *GLUT4*, sans modification significative de l'expression de *GLUT1* ou de gènes codant pour les récepteurs de l'insuline. L'irisine semblait induire l'expression de *GLUT4* dans les adipocytes matures humains et sa translocation à la membrane cellulaire (Huh et al. 2014).

3.3.3. FNDC5/Irisine et muscle

Comme déjà dit plus haut, la principale source d'irisine est d'origine musculaire. L'irisine, produite au niveau du muscle, va jouer un rôle autocrine et paracrine sur les cellules musculaires mais va également agir à distance. Dans ce chapitre, ne sera détaillé que les effets de FNDC5/Irisine sur le tissu musculaire.

Le traitement des cellules musculaires primaires humaines avec de l'irisine recombinante pendant 1h augmentait l'absorption de glucose et d'acides gras (ce qui était similaire à l'absorption observée après l'exposition à l'insuline). Après 6h de traitement, l'expression des gènes impliqués dans le transport du glucose (*GLUT4*) et le métabolisme des lipides (*PPAR α*) étaient augmentés tandis que les gènes impliqués dans la glycogénolyse (*glycogen phosphorylase*) étaient diminués (Huh et al. 2015). Des résultats similaires avec des injections d'irisine étaient retrouvés dans des études sur des cellules musculaires L6 et C2C12 et dans des modèles murins d'obésité-diabétique (Lee et al. 2015; Xin et al. 2016). L'irisine, dans la cellule musculaire, entraînait une diminution du niveau d'ATP et une augmentation des ROS qui aboutissaient à la phosphorylation de l'AMPK, à son activation sur les voies métaboliques (Lee et al. 2015; Huh et al. 2015). De plus, elle stimulait la translocation des récepteurs GLUT4 via la voie p38-MAPK sur la membrane cellulaire (comme dans le tissu adipeux) (Lee et al. 2015).

Chez les individus obèses, la synthèse de FNDC5 et la sécrétion d'irisine étaient augmentées dans le muscle probablement dans l'objectif de maximiser l'absorption du glucose dans le muscle et prévenir l'hyperglycémie, puisque celle-ci était diminuée chez les patient obèses diabétiques (Kurdiova et al. 2014; Moreno-Navarrete et al. 2013).

Tous ces éléments font que le glucose est probablement un important régulateur de l'irisine dans le muscle.

3.3.4. FNDC5/Irisine et les autres organes

FNDC5/irisine a été étudié dans de nombreux organes tels que le pancréas, le cœur, le cerveau ou le rein. Les données de la littérature sont cependant faibles et les résultats trouvés sont rarement confirmés par plusieurs équipes.

3.3.4.1. FNDC5/Irisine et pancréas

Les principales études sur le pancréas se sont intéressées à l'étude de l'irisine circulante chez des patients diabétiques. Ces données seront détaillées dans le chapitre FNDC5/irisine et diabète.

Deux études, sur des cellules pancréatiques β de rat avec incubation d'irisine ont montré que l'irisine avait un effet positif sur la prolifération des cellules β en stimulant la voie p38-MAPK-ERK, voie déjà étudiée dans le tissu adipeux et le muscle (Liu et al. 2017; Zhang et al. 2018). De plus, l'irisine diminuait l'apoptose dans ces cellules (Liu et al. 2017; Zhang et al. 2018). Dans des modèles *in vitro* de gluco-lipototoxicité, les cellules pancréatiques incubées avec de l'irisine avaient une réversion de l'accumulation de lipides avec une diminution de l'expression de *Fas* et *Acc* et une diminution de l'inflammation cellulaire (Zhang et al. 2018). Ces données sont en faveur d'une probable action endocrine de l'irisine sur le pancréas.

3.3.4.2. FNDC5/Irisine et fonctions cognitives

L'exercice, en particulier l'endurance, a des effets bénéfiques sur le cerveau et les fonctions cognitives. L'exercice améliore les résultats dans la prise en charge de maladies neurologiques telles que la dépression, l'épilepsie, les accidents vasculaires cérébraux, la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson. L'induction de neurotrophines/facteurs de croissance, notamment le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF), est un important médiateur moléculaire responsable de ces réactions bénéfiques dans le cerveau. Le BDNF favorise de nombreux aspects du développement du cerveau, comme la survie des cellules neuronales, la différenciation, la migration, l'arborisation dendritique, la synaptogenèse, la plasticité synaptique et l'apprentissage (Nagahara and Tuszynski 2011). L'hippocampe est une région centrale du cerveau impliquée dans l'apprentissage et la mémoire. Il a été montré que FNDC5 stimulait l'expression du BDNF dans l'hippocampe après une activité physique d'endurance (Wrann et al. 2013; S. H. Choi et al. 2018). En effet, l'exercice entraînait une augmentation de la transcription de *PGC1 α* qui induit l'expression de *FNDC5* (Wrann et al. 2013; S. H. Choi et al. 2018). Le BDNF peut également avoir un rétrocontrôle négatif sur l'expression de FNDC5 (Wrann et al. 2013). Dans des modèles murins de maladie d'Alzheimer, les niveaux de FNDC5/Irisine étaient diminués dans l'hippocampe. La surexpression périphérique de FNDC5 améliorait les troubles de la mémoire, alors que son blocage atténuait les

actions neuro-protectrices de l'exercice physique sur la plasticité synaptique et la mémoire (Lourenco et al. 2019). L'irisine semble donc avoir un effet thérapeutique potentiellement intéressant dans la maladie d'Alzheimer (Pedersen 2019).

3.3.4.3. FNDC5/Irisine et cœur

Il est établi que la graisse épicaudique est considérée comme un tissu adipeux viscérale et est associée à un haut risque cardiovasculaire (Mazurek et al. 2003). Par ailleurs, la cardiopathie hypertensive est caractérisée par la présence d'une hypertrophie cardiaque pathologique. L'étude de FNDC5/irisine dans le cœur est récente. Chez des patients opérés du cœur, l'irisine circulante était corrélée négativement à la surface de graisse épicaudique après ajustement sur l'âge, le sexe et l'IMC mais n'était associée à aucun autre marqueur cardiovasculaire (Kaneda et al. 2018). Des modèles murins d'hypertrophie cardiaque avec invalidation ou surexpression endogène de *Fndc5* ont montré une modification de l'expression de l'ARNm de *Fndc5* myocardique. Les souris déficientes en *Fndc5*^{-/-} avaient plus d'hypertrophie cardiaque, de fibrose et de lésions traumatiques que les souris surexprimant *Fndc5*. L'irisine protégerait de l'hypertrophie cardiaque et de l'insuffisance cardiaque induites par une surcharge via l'induction et l'amélioration du flux d'autophagie (Li et al. 2018). L'irisine protège donc du risque cardiovasculaire.

3.4. FNDC5/Irisine dans le foie

Le foie est un organe clé dans le métabolisme lipidique et glucidique. FNDC5/Irisine semble un élément protecteur de la stéatose et de la NASH. Liu *et col.* ont montré que FNDC5 était produit par le foie et que l'irisine était une hépatokine (Liu et al. 2016). Cependant, l'irisine semble avoir surtout une action autocrine et paracrine (figure 13) (Mo et al. 2016). En effet, le pourcentage d'irisine sanguine provenant du foie est très faible (moins de 5 %) et les effets hépatiques de l'irisine ne sont pas corrélés à sa concentration circulante. La première étude spécifique de FNDC5 dans les hépatocytes date de 2015 (Park et al. 2015). Il faut quand même noter que presque toutes les études dans le foie se sont attachées à étudier le rôle de l'irisine après injection/surexpression d'irisine.

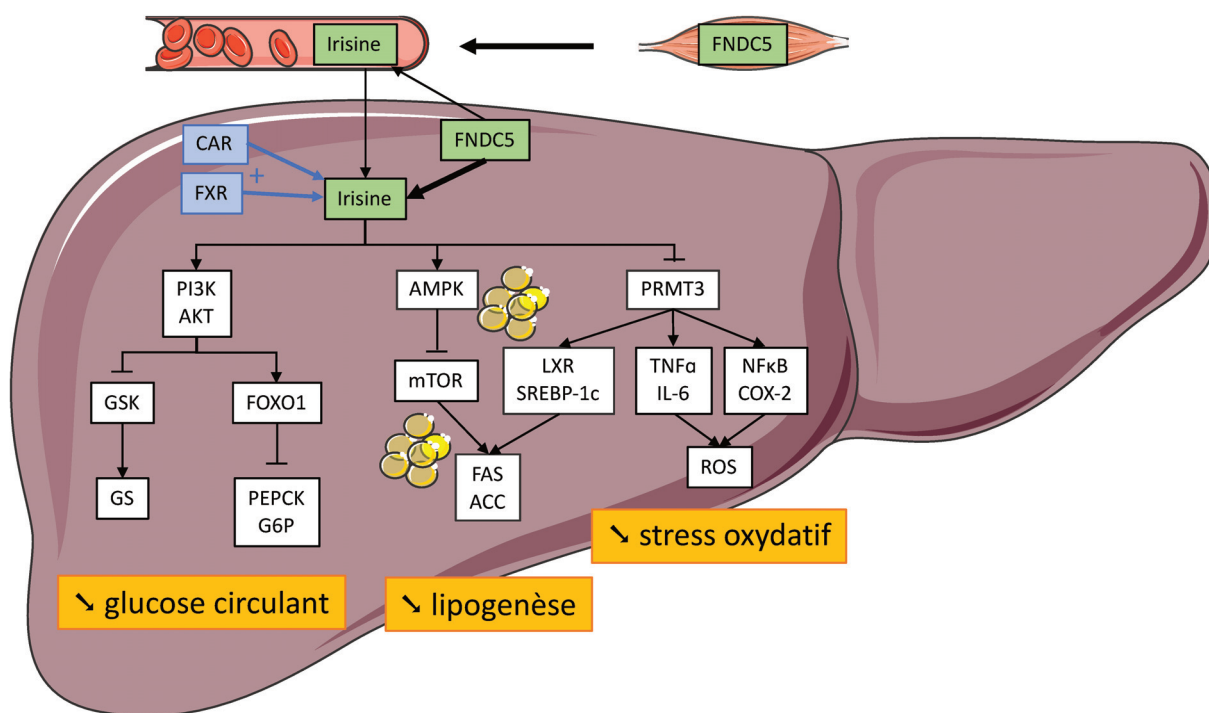


Figure 13 : Rôle de FNDC5/irisine dans le foie

L'irisine sanguine provient majoritairement du muscle mais le foie est également capable de produire FNDC5. FNDC5 hépatique relargue l'irisine qui a principalement un effet autocrine ou paracrine sur les hépatocytes, mais qui peut être sécrété dans la circulation sanguine. Dans le foie, l'irisine est activée par CAR et FXR. L'irisine va activer la voie PI3K/AKT qui va entraîner une diminution de la néoglucogenèse et une augmentation de la synthèse de glycogène, responsables d'une diminution du glucose circulant. L'irisine va activer l'AMPK qui va bloquer mTOR. De plus, l'irisine va inhiber PRMT3 qui active LXR et SREBP-1c. Ces voies vont diminuer la lipogenèse. Enfin, PRMT3 régulé à la baisse ne va pas activer les voies du TNFα et de NFκB permettant une diminution du stress oxydatif et de l'inflammation cellulaire. Abbréviations : CAR: constitutive androstane receptor ; FXR: farnesoid-X receptor ; PI3K: phosphoinositide 3-kinase ; GSK: glycogen synthase kinase-3 ; GS: glycogene synthase ; PEPCK: phosphoenolpyruvate carboxykinase ; G6P: glucose-6-phosphatase ; FOXO1: fork-head box transcription factor O1 ; mTOR: mammalian target of rapamycin ; FAS: fatty acid synthase ; ACC: acetylcoa carboxylase ; LXR: liver X receptor ; SREBP: Sterol regulatory element-binding proteins ; PRMT: protein arginine methyltransferases ; TNF: tumor necrosis factor ; IL-6: interleukine 6 ; NFκB: nuclear factor-kappa B ; COX-2: cyclooxygenase-2 ; ROS: reactiv oxygen species

3.4.1. FNDC5/irisine et métabolisme lipidique

Le premier travail qui a étudié l'irisine dans les hépatocytes a été publié en 2015. Tout d'abord les auteurs ont montré dans des lignées d'hépatocytes (AML12) et dans des hépatocytes primaires de souris, que l'irisine était présente dans les hépatocytes. En effet, ils ont retrouvé un pic fluorescent correspondant à l'irisine dans le cytosol des

hépatocytes. Dans des modèles *in vitro* d'insulino-résistance et de lipogenèse (traitement avec palmitate), le traitement par irisine recombinante diminuait l'accumulation de triglycérides et réduisait l'expression des gènes de la lipogenèse (*Fas*, *Acc*) en inhibant la voie protéin-arginine méthyltransferase-3 (PRMT3) - liver X receptor α (LXR α) - *SREBP-1c*. De plus, le traitement par irisine recombinante dans l'hépatocyte réduisait l'inflammation médiée par les cytokines (*Tnfa*, *Il-6*) et la production de ROS (Park et al. 2015).

En 2016, Tang *et col.* ont étudié des souris soumises à un régime riche en graisse (HFD) qui ont été traitées par de l'irisine recombinante pendant 2 semaines. Ces souris amélioraient leur adiposité avec une augmentation du HDL- cholestérol, une réduction du LDL-cholestérol et des triglycérides intra-hépatiques. L'étude génique hépatique montrait d'ailleurs une diminution des gènes de la synthèse de cholestérol et une augmentation des gènes de l'excrétion de cholestérol. Cet effet serait médié par l'activation de l'AMPK entraînant l'inhibition de SREBP2 (Tang et al. 2016). Ces résultats ont été confirmés de manière indépendante (Mo et al. 2016).

Pour aller plus loin, Liu *et col.* ont publié en 2016 le premier modèle de souris *Fndc5*^{-/-}. A l'état basal, les souris déficientes présentaient une accumulation de lipides intra-hépatiques (Liu et al. 2016; Zhou et al. 2018). La déficience en *Fndc5* entraînait une accumulation de lipides par diminution de l'autophagie et de la bêta-oxydation des acides gras et l'augmentation de la lipogenèse. Ces effets étaient médiés par la voie commune AMPK / mammalian target of rapamycin (mTOR). Ces résultats ont été confirmés sur des souris traitées avec de l'irisine recombinante et qui avaient eu un régime riche en gras (Liu et al. 2016).

Au contraire de tous ces effets positifs de l'irisine sur le métabolisme lipidique, une étude a trouvé que l'ajout d'irisine dans des cellules HepG2 à l'état basal ou après incubation de glucose (30 nM) ne modifiait pas les gènes impliqués dans la bêta-oxydation ou la synthèse des acides gras (Wang et al. 2015). De plus, une autre étude faite sur des HepG2, traitées avec de l'acide oléique et de l'acide palmitique en présence de l'irisine recombinante, n'avait pas vu d'effet positif de l'irisine sur la quantification de la stéatose et le métabolisme lipidique. De plus, l'expression d'irisine n'était pas augmentée chez les souris soumises à un régime riche en gras (HFD) (Petta et al. 2017).

3.4.2. FNDC5/Irisine et métabolisme glucidique

Dans des lignées d'HepG2 et dans des hépatocytes primaires de souris avec insulino-résistance (milieu enrichi en palmitate ou glucosamine), l'ajout d'irisine réduisait la néoglucogénèse, mise en évidence par une diminution de l'activité de Phospho-enol pyruvate carboxykinase et Glucose-6-Phosphatase, via la voie de signalisation de phosphoinositide-3-kinase (PI3K)-AKT-FOXO1 et la voie de l'AMPK (Xin et al. 2016; Mo et al. 2016) et stimulait la glycogénèse par l'activation de la glycogène synthase via la voie de signalisation PI3K-AKT-glycogène synthase kinase 3 (figure 13) (Liu et al. 2015). Ces résultats étaient retrouvés chez des souris diabétiques (STZ + HFD) traitées avec de l'irisine (Liu et al. 2015; Xin et al. 2016).

Les effets de l'irisine sur la glycémie sont détaillés dans le chapitre « FNDC/Irisine et insulino-résistance/diabète ».

3.4.3. FNDC5/Irisine et fibrose

Deux publications contradictoires ont étudié le lien entre FNDC5/irisine et fibrose. La première étude, qui ne montrait déjà pas d'effet de l'irisine sur le métabolisme lipidique, a trouvé que l'irisine était exprimée dans les cellules stellaires humaines et qu'en plus, l'irisine était augmentée en parallèle avec l'activation de la cellule stellaire. L'ajout d'irisine dans les cellules stellaires activées augmentait l'expression des marqueurs de fibrose (TIMP-1 et MCP-1) et du collagène $\alpha 1$. Ces résultats sont en faveur d'un effet délétère de l'irisine sur la fibrose (Petta et al. 2017). Au contraire, chez des souris *Fndc5*^{-/-}, le régime HFD aggravait l'activation des cellules stellaires et le dépôt de collagène par rapport à des souris WT. Dans des cellules stellaires primaires de souris traitées avec de l'oxidized low density lipoprotein, qui est un modèle d'activation de ces cellules, l'ajout de FNDC5 atténuait la fibrose via l'inhibition de l'activation des cellules stellaires induite par la phosphorylation de l'AMPK. Cette étude montrait donc au contraire un effet protecteur de FNDC5/irisine sur la fibrose (Zhou et al. 2018). Des études supplémentaires sont nécessaires pour clarifier le rôle de FNDC5/irisine dans la fibrose hépatique.

3.4.4. FNDC5/irisine et carcinome hépatocellulaire

Deux études ont montré que l'expression de l'ARNm de *FNDC5* était plus élevée dans le foie de patients avec un CHC que dans le foie de donneurs sains alors que la concentration sérique d'irisine n'était pas différente (Gaggini et al. 2017; Shi et al.

2017). Les cellules HepG2 ou SMCC7721 (2 lignées de CHC humain) traitées avec de l'irisine avaient une prolifération cellulaire accrue par rapport aux contrôles. De plus, les cellules HepG2 traitées présentaient une augmentation accrue de la migration et de l'envahissement via l'activation de la voie PI3K/AKT (Shi et al. 2017). Ces résultats sont en faveur d'un rôle délétère de l'irisine dans le développement du carcinome hépatocellulaire. Cela est très curieux quand on sait l'action bénéfique de l'activité physique en prophylaxie primaire et secondaire des cancers. D'ailleurs une étude récente a montré l'effet bénéfique de l'activité physique sur les cancers hépato-biliaires (Baumeister et al. 2019). Des études complémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre le rôle de l'irisine dans le CHC.

3.5. FNDC5/irisine et risque métabolique

Après avoir détaillé le rôle de FNDC5/irisine dans les différents organes, nous allons maintenant détailler son rôle dans l'insulino-résistance, le diabète et dans la NAFLD. Il est crucial de comprendre les mécanismes de régulation en amont et en aval de *FNDC5* dans le métabolisme et les troubles associés pour révéler les cibles moléculaires (Cao et al. 2019).

3.5.1. Les régulateurs de FNDC5/irisine dans le syndrome métabolique

L'étude princeps montrait que FNDC5 était régulée par PGC1 α dans le muscle et que l'irisine avait une action positive sur UCP1 dans le tissu adipeux blanc (Boström et al. 2012). Ces résultats ont été confirmés dans d'autres organes depuis (Matsuo et al. 2015; Wrann et al. 2013). Néanmoins, la manière dont FNDC5 est régulée dans les activités métaboliques n'est pas claire. Des études expérimentales *in vitro* et *in vivo* ont montré que la myostatine, une myokine, régulait négativement la phosphorylation de l'AMPK, qui, par la suite, réduisait l'activation de PGC1 α et FNDC5 (Shan et al. 2013). Un traitement par myostatine chez la souris inhibait l'expression de FNDC5 et réduisait la brunisation des adipocytes blancs. Une étude détaillée a permis de mettre en évidence que l'inhibition de FNDC5 par la myostatine était médiée par le miR-34a qui se liait à une région non traduite dans la zone 3'UTR de *Fndc5*. Le rôle de miR-34a dans la régulation de FNDC5 a ensuite été confirmé sur des myoblastes surexprimant ou inhibant miR-34a (Ge et al. 2016). Une autre voie de la régulation épigénétique de l'ARNm de *FNDC5* était médiée par la modification du complexe CpG

(CpG island) par l'histone H3 dans le promoteur du gène. Le récepteur de glucocorticoïde α se liait à ce complexe CpG et semblait jouer un rôle dans la régulation de *FNDC5* (Kim et al. 2017).

Plus spécifiquement dans le foie, le récepteur constitutif d'androstane (CAR) semble impliqué dans l'expression de *FNDC5*. CAR se liait spécifiquement à une répétition directe, séparée par cinq nucléotides, d'un élément de réponse au récepteur nucléaire du promoteur *FNDC5* dans des cellules HepG2, stimulant l'expression de *FNDC5* (Mo et al. 2016). Plus récemment, une étude sur des cellules HepG2, des hépatocytes primaires humains et des macaques a montré que *FNDC5* était une cible directe de FXR (Li et al. 2019).

Les effets bénéfiques du premier agoniste de FXR, l'OCA, pourrait être médié en partie par *FNDC5*. Néanmoins, le mode d'activation de *FNDC5* est toujours inconnu (Cao et al. 2019).

3.5.2. *FNDC5*/irisine et insulino-résistance/diabète

3.5.2.1. Insulino-résistance/diabète dans les modèles murins

Dans l'étude princeps sur *FNDC5*/Irisine, après 20 semaines de régime HFD, des souris WT BALB/c avaient une injection intra péritonéale de particules d'adénovirus exprimant *FNDC5*. Après 10 jours, ces souris avaient un poids similaire aux souris contrôles mais avaient un niveau de glucose plus bas (après injection intrapéritonéale de glucose) ainsi qu'une concentration sanguine d'insuline plus basse suggérant que l'irisine pouvait réduire l'insulino-résistance (Boström et al. 2012). Ces résultats ont été confirmés dans une deuxième étude avec des souris C56BL/6 après 10 semaines de régime HFD. En effet, après injection intra péritonéale de glucose, les niveaux sanguins de glucose et l'insuline étaient plus bas (-35 % et -50 % à 60 min, respectivement), et les souris avaient une réduction de leur poids dans le groupe traité pendant 14 jours avec de l'irisine humaine recombinante (Zhang et al. 2014). Des souris diabétiques-HFD traitées avec de l'irisine avait une amélioration de la tolérance au glucose (Xin et al. 2016; Liu et al. 2015), une diminution du cholestérol total et des triglycérides sanguins (Xin et al. 2016) et une augmentation de la stéatose hépatique (Liu et al. 2015) en comparaison à des souris contrôles. Le mécanisme de ces améliorations était une augmentation de l'absorption du glucose combinée à une réduction de la néoglucogenèse (Xin et al. 2016). De manière similaire, la

surexpression de *Fndc5* chez des souris obèses réduisait l'hyperglycémie, l'hyperinsulinémie, l'hyperlipidémie et la pression artérielle et améliorait la dépense énergétique et la lipolyse (Xiong et al. 2015). Une étude récente a montré que des souris HFD avaient des niveaux de FNDC5 plus élevés dans le muscle et le tissu adipeux comparées à des souris contrôles (Guilford et al. 2017). Des expériences similaires chez des rats diabétiques obèses avec injection intra péritonéale d'irisine avaient retrouvé un poids plus faible, une meilleure tolérance au glucose et une augmentation de l'insuline circulante par rapport à un groupe de rats contrôles sans injection d'irisine (Liu et al. 2017; Pang et al. 2017). La voie de l'irisine pourrait passer par le β -arrestin-2 qui régulerait la p38-MAKP (Pang et al. 2017). Tout récemment, une étude sur des souris *ApoE^{-/-}* a montré, sous régime western Diet, une diminution des triglycérides et une amélioration du cholestérol (baisse du LDL et hausse du HDL-cholestérol) après traitement par irisine. L'irisine favorisait le transport du cholestérol dans le foie (via les transporteurs du cholestérol dans la bile *Abcg5* et *Abcg8*) et améliorait l'athérosclérose (H. Li et al. 2019).

Toutes ces données indiquent que, dans des modèles murins, l'irisine peut affecter positivement l'homéostasie du glucose, le profil lipidique et d'autres paramètres métaboliques liés à l'obésité.

3.5.2.2. Insulino-résistance/diabète chez l'humain

Plus de 50 études ont étudié l'association chez l'Homme entre l'irisine et l'obésité, l'insulino-résistance, le diabète et le syndrome métabolique (Perakakis et al. 2017). Cette association a été observée dans différentes sous-populations, comme par exemple les patients souffrant d'anorexie mentale et présentant des concentrations sériques d'irisine significativement plus faibles (environ 15 %) que les personnes de poids normal ou les personnes obèses. De même, les femmes atteintes de surpoids ou d'obésité, ou atteintes du syndrome des ovaires polykystiques avaient des concentrations élevées d'irisine (environ 15 à 20 %) par rapport aux individus de poids normal (Stengel et al. 2013). La perte de poids ($-6,31 \pm 0,195$ %) après des changements alimentaires entraînait une diminution significative de l'irisine circulante (15 %), tandis que la reprise du poids ramène les niveaux d'irisine à leur valeur initiale (Crujeiras et al. 2014). La plupart de ces études ont également montré une corrélation positive entre les niveaux circulants d'irisine et la masse totale du corps, la masse grasse et, parfois, le rapport taille/hanches. Chez les individus en bonne santé, la

majeure partie de l'irisine dans le sang provenait des cellules musculaires, mais, dans l'obésité, la quantité d'irisine sécrétée par le tissu adipeux était probablement plus élevée que dans les états maigres, en raison de l'augmentation de la masse grasse totale (Crujeiras et al. 2014; Crujeiras et al. 2015). Une explication de l'association entre l'irisine, l'IMC et la masse grasse pourrait être l'apparition d'une « résistance à l'irisine ». L'obésité augmente la sécrétion d'irisine par les muscles, probablement pour maximiser l'utilisation de l'énergie et l'homéostasie du glucose pour atteindre l'équilibre métabolique. L'hyperirisinémie observée dans l'obésité pourrait donc être un mécanisme permettant de compenser la résistance observée à l'irisine et de maximiser les effets anti-obésité et hypoglycémisants de l'hormone (Pérez-Sotelo et al. 2017; Perakakis et al. 2017). Les résultats de la plupart des études s'accordent aussi pour dire que l'irisine est associée positivement aux marqueurs de la résistance à l'insuline, tels que HOMA ou HOMA2 (Chen et al. 2016; Huth et al. 2015). Cela a été confirmé dans une méta-analyse de 2016 dans laquelle les auteurs ont montré que les niveaux circulants d'irisine étaient associés de manière directe et positive, bien que faible, à la résistance à l'insuline chez les adultes non atteints de DT2 (Qiu et al. 2016). Comme l'irisine est associée à l'IMC et à la résistance à l'insuline, sa diminution pourrait favoriser la mise en place du diabète. D'ailleurs, la plupart des études cliniques, y compris une méta-analyse, ont montré des niveaux plus faibles d'irisine chez les patients atteints de prédiabète ou de DT2 par rapport aux groupes témoins (Liu et al. 2013; 2014; Hu et al. 2016; Wang et al. 2015; Zhang et al. 2016). Cette découverte pourrait s'expliquer par la réduction de la synthèse de FNDC5 et, par conséquent, par la diminution de la sécrétion d'irisine observée dans les tissus musculaires de patients obèses et atteints de DT2 (Kurdiova et al. 2014). Le facteur responsable du passage de la sécrétion élevée d'irisine dans l'obésité à une faible sécrétion dans le DT2 n'a pas encore été identifié, bien que des études *ex vivo* et *in vitro* suggèrent qu'une hyperglycémie chronique et une hyperlipidémie soient des déclencheurs possibles (Kurdiova et al. 2014; Moreno-Navarrete et al. 2013). L'ethnie jouerait possiblement un rôle puisque les niveaux d'irisine sont associés positivement au risque de syndrome métabolique chez les individus caucasiens et Africains (Moreno et al. 2015; Park et al. 2013) et négativement chez les Asiatiques (Hwang et al. 2016; Yan et al. 2014).

Dans l'ensemble, il n'existe pas de consensus sur l'association de l'irisine et du syndrome métabolique ou du DT2 chez l'Homme et des études prospectives plus larges sont donc nécessaires pour clarifier la question.

3.5.2.3. Polymorphismes de FNDC5 dans l'insulino-résistance/diabète

Pour compléter l'étude de FNDC5/Irisine dans le métabolisme, plusieurs auteurs se sont intéressés aux polymorphismes de *FNDC5*. La première étude a porté sur 1976 allemands à risque de DT2. Basé sur la HapMap, 4 polymorphismes, localisés dans des zones non codantes du gène, ont été sélectionnés : rs3480 G/A, rs16835198 G/T, rs1746661 G/T et rs726344 G/A. Le SNP rs16835198 était associé à des concentrations élevées d'insuline à jeun, tandis que le SNP rs726344 était associé à l'augmentation de l'HOMA-IR. Aucun des autres SNPs testés n'avaient d'association avec l'insulino-sensibilité et/ou la glycémie (Staiger et al. 2017). L'étude suivante a comparé les polymorphismes rs3480 A/G et rs16835198 G/T chez des sujets sains avec et sans activité physique. Chez les patients avec un faible niveau d'activité physique, les niveaux d'insuline et d'HOMA-IR étaient plus élevés avec le SNP rs3480 AG et GG par rapport au SNP rs3480 AA. De plus, le SNP rs16835198 GG était associé à une augmentation de l'HbA1c et de la glycémie à jeun dans le groupe faible activité physique uniquement. Ces résultats traduisaient, selon les auteurs, que ces 2 SNPs étaient associés avec quelques paramètres métaboliques (Tanisawa et al. 2014). La troisième étude a porté sur l'étude de 3 SNPs (rs3480 A/G, rs16835198 G/T et rs1570569 G/T) chez 6822 chinois. Aucun SNP n'était associé au DT2. Dans le sous-groupe de patients minces ($IMC < 25 \text{ kg/m}^2$), l'allèle majeur G du SNP rs16835198 était associé significativement à une insuliniémie à jeun plus élevée ($p = 0,046$) et avait tendance à être associé au score HOMA-IR ($p = 0,057$) et au LDL-cholestérol ($p = 0,083$). En revanche, l'association inverse était retrouvée dans le groupe de patients en surpoids ($IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$) avec une association de l'allèle G avec une diminution de l'insuliniémie à jeun ($p = 0,057$) et du score HOMA-IR ($p = 0,091$). A noter que les différences sont des tendances mais ne sont pas significatives (Tang et al. 2014). Une autre étude sur 1006 diabétiques et 434 non diabétiques n'a pas trouvé de différence sur les SNPs rs3480 A/G et rs1746661 G/T en fonction du statut diabétique ou pas. Après ajustement sur l'âge, les femmes avec l'allèle G du SNP rs3480 avaient une HbA1c plus élevée que les femmes avec l'allèle A. L'allèle T du SNP rs1746661 était associé à une pression artérielle, un cholestérol total et un

LDL-cholestérol plus élevés et au contraire un HDL-cholestérol plus bas chez les femmes avec diabète (Brondani et al. 2015). Dans une population Saoudienne, aucun SNP n'était associé au DT2. Le SNP rs3480 GG était protecteur de l'obésité tandis que rs3480 AA était associé à une élévation du HDL-Cholestérol. Le SNP rs1746661 GG était associé à une élévation des triglycérides. Dans cette même étude, la concentration sérique d'irisine était plus élevée chez les patients diabétiques, alors que la majorité des publications sur ce sujet trouvait un niveau plus bas (Al-Daghri et al. 2016). La dernière étude portait sur des Égyptiens diabétiques. Les concentrations sériques d'irisine étaient plus basses chez les diabétiques par rapport aux contrôles. L'allèle G du SNP rs16835198 G/T était plus fréquent chez les patients diabétiques et était associé à une résistance à l'insuline élevée et à une dyslipidémie (Khidr et al. 2017).

Au total ces études montrent des effets modérés des différents polymorphismes de *FNDC5*. Bien que ces résultats soient parfois contradictoires, il semble y avoir un lien entre métabolisme glucidique, paramètres du syndrome métabolique et polymorphisme de *FNDC5*. Des études supplémentaires à grande échelle sont nécessaires pour éclaircir ces données.

3.5.3. *FNDC5*/Irisine et NAFLD

3.5.3.1. Irisine circulante et NAFLD

Etant donné que l'irisine joue un rôle dans l'homéostasie glucidique et l'obésité, celle-ci a été étudiée chez des patients présentant une NAFLD.

La première étude, publiée en 2013, a montré que l'irisine était inversement corrélée aux niveaux d'ASAT et d'ALAT et que sa concentration sérique était inversement associée à la teneur en triglycérides dans le foie chez des patients obèses chinois. La teneur en triglycéride était définie par spectroscopie par résonance magnétique (spectro-IRM) (Zhang et al. 2013). Cependant, des études ultérieures ont montré des résultats contradictoires. Par exemple, des concentrations sériques plus élevées d'irisine ont été rapportés chez des patients avec une NAFLD indépendamment du diabète. Dans cette étude, les concentrations d'irisine étaient similaires chez les patients obèses ou non (Choi et al. 2014). Chez des patients avec syndrome métabolique et des niveaux élevés d'enzymes hépatiques, l'irisine circulante étaient augmentée (Rizk et al. 2016). Une autre étude a montré que les niveaux d'irisine chez des patients obèses, sans NAFLD, avec NAFLD ou avec NASH étaient plus bas que

chez les témoins maigres, mais il n'y avait pas de différence entre les trois groupes de patients. Fait intéressant, dans cette étude, l'irisine était également associée de manière indépendante à l'inflammation portale (Polyzos et al. 2014). Ensuite, une étude a comparé des patients avec NAFLD à un groupe contrôle et n'a pas montré de différence dans les concentrations sanguines d'irisine (Polyzos et al. 2015). Plus récemment, Shanaki *et col.* ont trouvé que les patients avec une NAFLD, un diabète ou une NAFLD + un diabète avaient une concentration d'irisine plus basse qu'un groupe de contrôles sains. En revanche, il n'y avait pas de différence entre les 3 groupes de patients (Shanaki et al. 2017). Au total, les données sur l'irisine circulante dans la NAFLD et la NASH sont contradictoires et nécessitent des investigations supplémentaires (Perakakis et al. 2017; Polyzos et al. 2018).

3.5.3.2. Le polymorphisme de *FNDC5* et NAFLD

Pour compléter le rôle de *FNDC5* dans la NAFLD, des études géniques ont étudié son polymorphisme. Petta *et col.* ont étudié les variants rs3480 de *FNDC5* dans une cohorte de 593 patients qui ont eu une biopsie hépatique pour suspicion de NAFLD et l'ont comparé à 192 contrôles : 43 patients qui ont eu une biopsie hépatique normale au cours d'une chirurgie bariatrique (< 5 % de stéatose) et 149 cas référés par des médecins généralistes pour lesquels l'évaluation de la stéatose était faite par échographie et l'évaluation de la fibrose par fibroscan (< 6 kPa). La prévalence des génotypes rs3480 AA, AG et GG était de 38,7 %, 42,2 % et 19,1 % respectivement dans la cohorte entière. L'allèle rs3480 G était associé à la sévérité de la stéatose en analyse univariée mais pas en analyse multivariée. La prévalence de la NASH n'était pas différente selon le statut rs3480. En revanche, le génotype rs3480 GG était associé à la fibrose significative (F2-F4) et cela indépendamment des facteurs classiques de fibrose, de *PNPLA3* et de *TM6SF2* (Petta et al. 2017). L'année dernière, une deuxième étude a caractérisé le polymorphisme rs3480 de *FNDC5* chez 987 caucasiens du monde entier avec une NAFLD prouvée par biopsie. La répartition de l'allèle rs3480 GG n'était pas différente entre les Italiens, les Espagnols et les Australiens. Le polymorphisme rs3480 G était associé à un risque accru de stéatose S2-S3 (OR 1,29 IC 95 % [1,08-1,55]) et s'additionnait avec les variants connus de *PNPLA3* et *TM6SF2*. En revanche, rs3480 n'était pas associé à l'inflammation lobulaire ou à la fibrose. La suite de l'article étudiait les mécanismes de ce polymorphisme. Le polymorphisme rs3480 *FNDC5* est situé dans la région 3'UTR non

codante du gène et altérerait la structure de l'ARNm. Parmi les différents miR régulant cette région de *FNDC5*, l'inhibition de miR-135a-5p entraînait une différence d'expression des allèles de *FNDC5* traduisant sa spécificité pour cette région. D'ailleurs les patients avec NAFLD avaient des niveaux de miR-135a-5p plus élevés que les contrôles. De plus, il existait une corrélation entre ce miR et *FNDC5* dans le foie, corrélation positive ($r^2 = 0,80$) chez les individus sains et négative ($r^2 = -0,36$) chez les patients NAFLD (Metwally et al. 2019).

Ces études dont les résultats sont discordants montrent un intérêt du polymorphisme rs3480 de *FNDC5* chez l'Homme dans la NAFLD. D'autres études sont nécessaires pour clarifier l'association entre ce polymorphisme et les différentes caractéristiques histologiques dans la NAFLD.

2^{ème} PARTIE : LES **ARTICLES**

Article 1 : les troubles du comportement alimentaire ne sont pas associés aux lésions histologiques dans la NAFLD

1. Présentation de l'étude

Comme vu dans l'introduction, la NAFLD est un fléau mondial avec une prévalence de l'ordre de 25 % dans la population mondiale (Younossi et al. 2019). La NAFLD est très associée à l'obésité et au syndrome métabolique. Parmi les facteurs associés à l'obésité, outre certaines anomalies génétiques, c'est principalement une alimentation trop calorique, un défaut d'activité physique et un excès de sédentarité qui amènent le patient à devenir obèse. Dans nos pays développés, le développement d'une alimentation de type fast-food avec des aliments gras, salés ou sucrés est en plein essor. D'ailleurs la prévalence de l'obésité en France est de 23,9 % dont 1 % d'obèse morbide (Rapport Obépi 2012; Marques et al. 2018).

Par ailleurs, l'évaluation des troubles psychiatriques dans la DSM (the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders), qui est le manuel de classement de tous les troubles psychiatriques, reconnaît les troubles du comportement alimentaire (« binge eating disorder » en anglais) comme maladie à part entière. Parmi les différents troubles du comportement, on note la boulimie (Regier et al. 2013). La boulimie est caractérisée par des ingestions excessives d'aliments à haute teneur énergétique, de façon répétitive et durable. La boulimie est souvent associée à l'obésité. Le diagnostic de boulimie repose soit sur une évaluation par un psychiatre, soit sur des questionnaires de dépistage. Le Bulimia-Test est un questionnaire bien validé de dépistage de la boulimie (Thelen et al. 1996).

Une seule étude pilote s'est intéressée au lien entre NAFLD et boulimie et a mis en évidence que la prévalence des troubles du comportement alimentaire était plus élevée chez les patients avec une NAFLD (Zhang et al. 2017). La NAFLD n'était pas évaluée par biopsie et aucune corrélation avec la sévérité de la maladie hépatique n'était faite.

D'autres troubles psychiatriques tels que la dépression ou l'anxiété ont été associés aux troubles du comportement alimentaire chez des patients obèses (Hudson et al. 2010; Mather et al. 2009) mais l'association avec la NAFLD a été peu étudiée.

L'hypothèse de notre travail était que les troubles du comportement alimentaires, caractérisés par des apports alimentaires hautement caloriques en une période de temps courte de façon répétée et durable, aggravaient les lésions de NAFLD.

2. Objectifs de l'étude

Nous avons souhaité étudier les traits de boulimie chez des patients bien caractérisés au niveau hépatique. Pour cela, nous avons utilisé notre cohorte de patients obèses morbides qui ont tous eu une biopsie hépatique au cours d'une chirurgie bariatrique. Dans le mois précédent l'opération, les patients ont tous rempli un questionnaire d'évaluation de la boulimie. Un sous-groupe de patients a également rempli des questionnaires de dépression, anxiété et fatigue.

Les objectifs du travail étaient 1) d'évaluer la prévalence des troubles du comportement alimentaire chez des patients présentant une NAFLD, 2) de corrélérer les troubles du comportement alimentaire avec la sévérité des lésions hépatiques, 3) d'étudier la prévalence de la dépression, de l'anxiété et de la fatigue dans notre population et 4) de corrélérer ces troubles psychiatriques avec les lésions histologiques de NAFLD.

3. Publication : “No association between binge eating disorder and severity of NAFLD in severely obese patients”

CANIVET Clémence M., PERNEY Pascal, CHERICK Faredj, ORLOWSKI Magalie, PATOURAUX Stéphanie, BAILLY-MAITRE Béatrice, TRAN Albert, IANNELLI Antonio, GUAL Philippe \$, ANTY Rodolphe \$

Soumis pour publication dans *Journal of Gastroenterology and Hepatology Open*

No association between binge eating disorder and severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in severely obese patients

CANIVET Clémence M (MD) (1), PERNEY Pascal (MD, PhD) (2), CHERICK Faredj (MD) (3), ORLOWSKI Magalie (MD) (3), PATOURAUX Stéphanie (MD, PhD) (1), BAILLY-MAITRE Béatrice (PhD) (4), TRAN Albert (MD, PhD) (1), IANNELLI Antonio (MD, PhD) (1), GUAL Philippe \$ (PhD) (4), ANTY Rodolphe \$ (MD, PhD) (1)

¹ Université Côte d'Azur, CHU de Nice, INSERM, U1065, C3M, Nice, France

² Addiction Medicine, Hospital Grau-du-Roi, Nîmes, France

³ Université Côte d'Azur, CHU de Nice, Nice, France

⁴ Université Côte d'Azur, INSERM, C3M, Nice, France

This work was conducted at the Digestive Center of the “Centre Hospitalier Universitaire” in Nice, France.

Diffusion non autorisée

4. Conclusions/perspectives

Dans cette étude, nous avons étudié les traits de boulimie de 388 patients obèses morbides bien caractérisés. La prévalence des troubles du comportement alimentaires était de 38 % alors que celle de la boulimie n'était que de 4 %. En effet, tous les patients qui avaient un diagnostic clinique de boulimie avant la chirurgie étaient contre indiqués pour l'opération par les psychiatres et n'étaient donc pas inclus dans l'étude.

Notre hypothèse de départ est infirmée puisque nous ne retrouvons pas d'association entre les troubles du comportement alimentaire et la stéatose, la NASH ou la fibrose. De même, il n'y a pas de corrélation entre l'importance des troubles du comportement alimentaire et le grade de stéatose, le stade de fibrose ou le score NAS.

Dans un sous-groupe de 183 patients, nous avons également évalué la dépression, l'anxiété et la fatigue. En effet, chez les patients obèses morbides, la prévalence des troubles psychiatriques (dépression, anxiété) est augmentée par rapport à la population générale (Dawes et al. 2016). La chirurgie bariatrique, permettant une perte de poids importante, a montré un effet positif sur ces troubles psychiatriques (Susmallian et al. 2019; Gill et al. 2019). L'intérêt de ce sous-groupe était double : d'une part améliorer les connaissances sur la dépression, l'anxiété et la fatigue chez des patients obèses morbides avec des caractéristiques hépatiques précises et d'autre part, de démasquer un biais associatif entre les troubles du comportement alimentaire, et la dépression, l'anxiété ou la fatigue. En effet, il est établi que les troubles du comportement alimentaires sont associés à d'autres troubles psychiatriques tels que la dépression, l'anxiété ou la fatigue, résultats que nous retrouvons dans notre étude.

Notre étude est originale puisque c'est la première publication qui s'intéresse à l'association entre troubles du comportement alimentaire et caractéristiques histologiques de NAFLD. Plusieurs explications sont possibles quant à l'absence d'association entre ces 2 paramètres : tout d'abord nos patients ne sont possiblement pas « assez graves » au niveau psychiatrique puisque les patients avec une boulimie clinique étaient contre-indiqués à la chirurgie et donc non inclus. Deuxièmement, notre population n'était pas représentative de la population habituelle de patients avec une NAFLD puisqu'il s'agissait de patients obèses morbides. Enfin, il est possible qu'aucun

lien n'existe entre ces 2 troubles. Notre étude porte sur plus de 350 patients bien caractérisés et le test de dépistage de la boulimie (BULIMIA revised test) est un test bien validé.

Pour aller plus loin, il serait intéressant de faire une étude prospective de dépistage des troubles du comportement alimentaire chez tous les patients biopsiés pour suspicion de NAFLD, en incluant des patients avec une boulimie clinique.

La NAFLD est une pathologie complexe, d'origine en partie génétique (30-50 %) mais également environnementale. De nombreuses interrogations persistent sur l'évolution, variable d'un individu à l'autre, de cette pathologie et l'évaluation qualitative ou quantitative des apports caloriques ainsi que le mode de prise sont une piste à creuser.

Article 2 : la vitamine D n'est pas associée aux lésions hépatiques chez les patients obèses morbides

1. Présentation de l'étude

La carence en vitamine D est très fréquente puisqu'on estime qu'environ 1 milliard de personnes sur notre planète ont des niveaux insuffisants. En plus de son rôle dans la minéralisation osseuse, la vitamine D participe à la modulation des défenses immunitaires. Globalement la vitamine D favorise les défenses innées et module le système immunitaire spécifique vers une polarisation anti-inflammatoire. Dans le foie, certaines données expérimentales ont montré que le récepteur de la vitamine D était impliqué dans l'activation des cellules stellaires (Ding et al. 2013). Cela est d'autant plus intéressant que la supplémentation orale par vitamine D est un traitement efficace, peu cher et très disponible.

Des études chez les animaux montrent, effectivement, un effet délétère de la carence en vitamine D sur le développement de la NAFLD. Par exemple, des souris diabétiques sans apport oral de vitamine D avaient une altération de l'homéostasie lipidique avec une hypercholestérolémie, une augmentation de la stéatose et une hyper-insulinémie en comparaison à des souris diabétiques avec un niveau normal de 25-OH vitamine D (Borges et al. 2018). En revanche les données chez l'Homme sont contradictoires. Certaines études n'ont retrouvé aucune association entre des concentrations basses de 25-OH vitamine D (forme habituellement reconnue comme celle permettant d'évaluer les réserves de vitamine D) et l'insulino-résistance ou la sévérité de la NASH (Bril et al. 2015), tandis que d'autres équipes ont montré que les concentrations de 25-OH vitamine D étaient plus basses chez les patients avec une NAFLD en comparaison à un groupe de contrôle sains. De plus, les patients avec NASH avaient des concentrations plasmatiques plus basses que les patients avec une simple stéatose (Dasarathy et al. 2014).

Des travaux supplémentaires étaient donc nécessaires pour évaluer l'impact d'une carence en vitamine D sur le développement et la sévérité de la NAFLD,

principalement le développement de la NASH qui fait intervenir des cellules inflammatoires.

L'hypothèse de notre travail était donc qu'une diminution de 25-OH vitamine D favoriserait le développement des NAFLD et qu'une faible concentration sérique de 25-OH vitamine D pourrait être associée à des lésions histologiques plus sévères de stéatose, de NASH et de fibrose.

2. Objectifs de l'étude

Nous avons souhaité étudier les concentrations sanguines de 25-OH vitamine D dans une population bien caractérisée de patients obèses morbides ayant tous eu une biopsie hépatique au cours d'une chirurgie bariatrique. Le dosage de la 25-OH vitamine D était centralisé au laboratoire de biochimie du CHU de Nice et réalisé par la même méthode pour tous les patients. Le dosage était réalisé dans le mois précédent la chirurgie. L'évaluation histologique de la NAFLD était faite par une seule anatomopathologiste experte en lésions hépatiques.

Les objectifs de ce travail étaient : 1) d'évaluer la prévalence du déficit en 25-OH vitamine D dans notre cohorte de patients présentant une NAFLD, 2) de rechercher une association entre déficit en 25-OH vitamine D et stéatose ou NASH ou fibrose significative, et 3) de corrélérer les niveaux de 25-OH vitamine D avec la sévérité de la stéatose, de la fibrose et le score NAS.

3. Publication : “severe vitamin D deficiency is not associated with liver damage in morbidly obese patients”

ANTY Rodolphe, HASTIER Audrey, **CANIVET Clémence M**, PATOURAUX Stéphanie, SCHNECK Anne-Sophie, FERRARI-PANAIA Patricia, BEN-AMOR Imed, SAINT-PAUL Marie Christine, GUGENHEIM Jean, GUAL Philippe, IANNELLI Antonio, TRAN Albert

Article publié dans *Obesity Surgery*

Edition en ligne du 19 janvier 2016

DOI : 10.1007/s11695-016-2070-y



Severe Vitamin D Deficiency Is Not Associated with Liver Damage in Morbidly Obese Patients

Rodolphe Anty^{1,2,3} · Audrey Hastier² · Clémence M. Canivet^{1,2,3} ·
Stéphanie Patouraux^{1,3,4} · Anne-Sophie Schneck^{1,2,3} · Patricia Ferrari-Panaia⁴ ·
Imed Ben-Amor² · Marie Christine Saint-Paul⁴ · Jean Gugenheim^{1,2,3} ·
Philippe Gual^{1,3} · Antonio Iannelli^{1,2,3} · Albert Tran^{1,2,3}

© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract

Background and Aims A deficiency in vitamin D could be deleterious during chronic liver diseases. However, contradictory data have been published in patients with non-alcoholic fatty liver disease. The aim of the study was to compare the blood level of 25 hydroxy vitamin D (25-OH vitamin D) with the severity of liver lesions, in a large cohort of morbidly obese patients.

Patients and Method Three hundred ninety-eight morbidly obese patients had a liver biopsy. The non-alcoholic steatohepatitis (NASH) Clinical Research Network Scoring System Definition and Scores were used. 25-OH vitamin D was evaluated with a Diasorin[®]Elisa Kit. Logistic regression

analyses were performed to obtain predictive factors of the severity of liver histology.

Results 20.6 % of patients had NASH. The stage of fibrosis was F0 12.9 %, F1 57.36 %, F2 25.32 %, F3 (bridging fibrosis) 3.88 %, and F4 (cirrhosis) 0.52 %. The 25-OH vitamin D level inversely correlated to the NAS ($r=0.12$ and $p=0.01$) and to steatosis ($r=0.14$ and $p=0.007$); however, it was not associated with the presence of NASH. The level of vitamin D was significantly lower in patients with significant fibrosis compared to those without (15.9 (11.1–23.5) vs 19.6 (13.7–24.7) ng/ml, $p=0.02$). There was an inverse correlation between the severity of fibrosis and the values of 25-OH vitamin D ($r=0.12$ and $p=0.01$).

In a logistic regression analysis, no parameters were independently associated with the severity of fibrosis except the presence of steatohepatitis (1.94 (1.13–3.35) $p=0.017$).

Conclusion Low levels of 25-OH vitamin D were not independently associated with liver damage in morbidly obese patients with non-alcoholic fatty liver diseases (NAFLD).

This work was done in the Digestive centre of the “Centre hospitalier universitaire” of Nice France.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11695-016-2070-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Rodolphe Anty
rodolphe.anty@laposte.net

Keywords Morbidly obesity · Non-alcoholic steatohepatitis · 25 hydroxy vitamin D · Fibrosis · Non-alcoholic fatty liver disease

- ¹ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U1065, Team 8, “Hepatic Complications in Obesity”, Nice F-06204, Cedex 3, France
- ² Pôle Référence Hépatite C, Hôpital de l’Archet 2, Centre Hospitalier Universitaire of Nice, 151, Route Saint-Antoine de Ginestière, BP 3079, F-06202 Nice, Cedex 3, France
- ³ Faculty of Medicine, University of Nice-Sophia-Antipolis, Nice F-06107, Cedex 2, France
- ⁴ Biological Centre, Centre Hospitalier Universitaire of Nice, Nice F-06107, Cedex 2, France

Abbreviations

25-OH vitamin D	25 hydroxy vitamin D
BMI	Body mass index
AST	Aspartate amino-transferase
ALT	Alanine amino-transferase
γGT	Gamma glutamyl-transferase
HDL cholesterol	High-density-lipoprotein cholesterol
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NAS	NAFLD activity score
NASH	Non-alcoholic steatohepatitis

W	Women
M	Men
NS	Not significant

Introduction

An insufficiency in vitamin D is very common, as a billion people are estimated to be deficient [1]. Recently, vitamin D deficiency was suggested to promote liver damage [2, 3]. Among the liver diseases, non-alcoholic fatty liver diseases (NAFLD) are major health problems in Europe [4]. Obesity has been previously associated with a decrease in 25 hydroxy vitamin D (25-OH vitamin D) [5, 6]. Central obesity and metabolic syndrome pave the road to NAFLD [7]. In NAFLD, a low 25-OH vitamin D level could be associated with liver damage (steatosis, inflammation and fibrosis) in overweight adults and in overweight and obese children [8–11]. However, contradictory results have also been published [12]. To date, it is too preliminary to conclude on any causal relationship between the deficit in 25-OH vitamin D and the increased prevalence of liver damage. However, in vitro and in vivo models suggested that the active form of vitamin D could decrease the activation of stellate cells [13]. So the lack of vitamin D could enhance progression to liver fibrosis. Vitamin D has also been demonstrated to modulate the activation of lymphocytes toward a Th2 anti-inflammatory profile [14]. This could explain why a deficit in vitamin D may increase inflammation of the liver in non-alcoholic or alcoholic steatohepatitis [15, 16].

The aim of this study was to assess the level of 25-OH vitamin D with respect to the liver histology in patients with obesity. For this purpose, we performed a transversal analysis in a prospectively collected cohort of morbidly obese patients having a large spectrum of liver damage as determined by liver biopsies.

Patients and Methods

Study Population

Morbidly Obese Patients Three hundred ninety-eight consecutive severely and morbidly obese patients, referred for bariatric surgery, were included in the study between January 2006 and July 2012. The study protocol was performed according to the French legislation regarding Ethics and Human Research and was approved by the local Ethics Committee (Huriet-Serusclet law, DGS 2003/0395). Written informed consent was obtained from all patients. All patients met the 1991 NIH Consensus Conference guidelines for gastrointestinal surgery for obesity [17]. All patients were negative for hepatitis B and C viral markers, for autoantibodies indicative of autoimmune hepatitis, and had negligible alcohol consumption (<20 g/day in women and <30 g/day in men). Alcohol abuse was also excluded by

interviewing the patients' relatives. Patients with a history of inflammatory disease (including rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and inflammatory bowel disease), current infections, recent history of cancer (<5 years) and severe pulmonary or cardiac disease were not enrolled in the study. All patients underwent bariatric surgery, and a surgical liver biopsy was obtained during the operation.

Preoperative Assessment Clinico-biological preoperative assessment was done 2 or 3 weeks before surgery and is detailed in the [supplementary materials](#). A systematic review of all the prescribed treatments in the least 6 months was done. Patients included in this study did not receive vitamin D supplementation before having bariatric surgery.

Pathological Liver Assessment Hepatic wedges were obtained during bariatric surgery by surgeons specialized in liver surgery and transplantation (AI and JG). Hepatic wedges were at least 10-mm long. Surgical liver biopsies were reviewed by one liver pathologist (MC-SP) without the knowledge of the clinical or biological characteristics of the patients. Routine haematoxylin-eosin-safran and Sirius red staining was performed on all biopsies. The diagnosis was retained according to the modified Brunt criteria for the diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) [18]. All biopsies were also graded according to the NAFLD activity score (NAS) [19]. Liver fibrosis was assessed by Sirius red staining and was classified into seven stages according to the NASH Clinical Research Network Scoring System Definition and Scores as follows: F0: no fibrosis, F1a: mild zone 3 sinusoidal fibrosis, F1b: moderated zone 3 sinusoidal fibrosis, F1c: peri-portal sinusoidal fibrosis, F2: zone 3 sinusoidal fibrosis and peri-portal sinusoidal fibrosis, F3: bridging fibrosis and F4: cirrhosis [19]. In this study, "significant" fibrosis in morbidly obese patients was considered if fibrosis was \geq F2.

25-OH Vitamin D Assessment 25-OH vitamin D was measured on admission. Blood was collected in gel separator tubes, and cells were separated from serum by centrifugation. The assay was performed within 24 h of sample collection. The Liaison 25-OH vitamin D assay (Diasorin, Inc, Stillwater, USA) was used. The Liaison 25-OH vitamin D assay is a direct competitive chemiluminescence immunoassay for quantitative determination of total 25-OH vitamin D2 and 25-OH vitamin D3 in human serum. The laboratory is a member of the Vitamin D External Quality Assessment Scheme (DEQAS). Two hundred and fifty microliters of serum is necessary for the test. The Liaison 25-OH vitamin D assay measures between 4 and 150 ng/ml. The lowest value was 4 ng/ml, which is based on an inter-assay precision that approximates 20 % below (functional sensitivity). The observed reference ranged, for the 2.5th to the 97.5th percentile, from 4.8 to 52.8 ng/ml. The following ranges for the classification of the

25-OH vitamin D status were as follows: severe deficiency, <10 ng/ml; deficiency, 10–20 ng/ml, insufficiency, 20–29 ng/ml; sufficiency, 30–100 ng/ml; and toxicity, >100 ng/ml. (To convert results into SI units: ng/ml \times 2.5 = nmol/l.) The date of the collection of blood samples was noted to take seasonality into account. The same 25-OH vitamin assessment was used for both cohorts.

Statistics Quantitative variables are presented as the median and 25th–75th interquartile range. Quantitative values were compared between patients with and without significant hepatic fibrosis and in patients with and without liver inflammation using the Mann-Whitney test or the Student *t* test as required. The chi-square test was used to compare qualitative values. Logistic regression analyses were performed to determine the independent parameters associated with liver inflammation or associated with fibrosis \geq F2 in morbidly obese patients. The parameters included in the logistic regression analysis included significant and relevant ones avoiding redundancies. All calculations were made using NCSS 2007 (Saugus MA 01906, USA).

Results

General Characteristics

The cohort of 398 morbidly obese patients was mainly composed of women (334 W/64 M), with a median age of 40 (31–50) years and a median BMI of 42.2 (39.5–45.4) kg/m² (Table 1). The median of the 25-OH vitamin D level was 18.8 (12.9–24.2) ng/ml. Median levels of 25-OH vitamin D were similar between men and women (19.2 [13.3–26.7] vs 18.6 [12.7–24.2] ng/ml, $p=0.7$). Eighty-eight percent of morbidly obese patients had an insufficient level (<30 ng/ml), 54.5 % were deficient (<20 ng/ml) and 15.3 % were severely deficient (<10 ng/ml) in vitamin D. 25-OH vitamin D

Table 1 Characteristics of the population

	Morbidly obese patients
Gender (% of men)	16.1
Age (years)	40 [31–50]
BMI (kg/m ²)	42.2 [39.5–45.4]
25-OH vitamin D (ng/ml)	18.8 [12.9–24.2]
Severe deficiency in 25-OH vitamin D (%)	15.3
Seasonality (winter to autumn, %)	43.2
Metabolic syndrome (%)	54.8
Steatohepatitis (%)	20.6
Bridging fibrosis (%)	4.3

BMI body mass index

inversely correlated with the BMI ($r=-0.11$, $p=0.026$) and to the fat mass ($r=-0.11$, $p=0.04$). No difference in 25-OH vitamin D was noted between patients with ($n=218$) and without ($n=180$) metabolic syndrome (18.4 vs 19.6 ng/ml, p =not significant (NS)). No correlation was found between the number of elements constitutive of the metabolic syndrome and the levels of 25-OH vitamin D. No correlations between 25-OH vitamin D and the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) or between 25-OH vitamin D and the Adipo-IRi were noted.

Seasonality was not found in these patients, as the patients in the summer/autumn seasons ($n=172$) had similar values to those ($n=226$) included in winter/spring seasons (20.0 [12.5–23.6] vs 18.2 [13.4–26.1] ng/ml, p =NS).

25-OH Vitamin D Is Not Independently Associated with Liver Damage in Morbidly Obese Patients

Levels of 25-OH vitamin D inversely correlated with the NAS ($r=-0.12$, $p=0.01$) and to steatosis ($r=-0.14$, $p=0.007$). However, the 25-OH vitamin D levels did not correlate with the severity of ballooning or inflammation as assessed as an isolated component of NAS. Similarly, levels of 25-OH vitamin D were not significantly different between patients with and without NASH (17.2 vs 19.5 ng/ml, $p=0.08$). 25-OH vitamin D levels did not correlate with alanine aminotransferase (ALT) or aspartate amino-transferase (AST) levels.

The patients were compared according to the severity of the stage of fibrosis. Patients with a stage of fibrosis equal or higher than F2, according to the NASH Clinical Research Network Scoring System Definition and Scores (significant fibrosis), had a higher waist circumference and metabolic parameters such as low high-density-lipoprotein (HDL) cholesterol, a high triglyceride level, a high blood glucose level and a higher frequency of metabolic syndrome (Table 2). The level of vitamin D was significantly lower in patients with significant fibrosis than in those without (15.9 [11.1–23.5] vs 19.6 [13.7–24.7] ng/ml, $p=0.02$). There was an inverse correlation between the severity of fibrosis and the values of 25-OH vitamin D ($r=-0.12$, $p=0.01$). However, in a logistic regression analysis, no parameters were independently associated with the severity of fibrosis except the presence of steatohepatitis (Table 3).

A severe deficiency in 25-OH vitamin D was observed in 15.3 % of non-alcoholic morbidly obese patients. No significant difference in the proportion of patients with NASH was noted between patients with and without a severe deficiency in 25-OH vitamin D (16.4 vs 21.4 %, p =NS). Similarly, no significant difference in the proportion of patients with significant fibrosis was noted between patients with and without a severe deficiency in 25-OH vitamin D (36.1 vs 27.6 %, p =NS).

Table 2 Comparison of morbidly obese patients according to the severity of liver fibrosis

	Fibrosis \geq F2 (n = 115)	Fibrosis <F2 (n = 283)	p
Gender	89 W/26 M	245 W/38 M	0.02
Age (years)	42 [32–48]	40 [31–50]	NS
BMI (kg/m ²)	42.5 [39.5–45.6]	42.0 [39.5–45.0]	NS
Fat mass (kg)	56.4 [49.9–65.9]	55.7 [50.0–63.2]	NS
Fat-free mass (kg)	55.4 [50.8–65.9]	55.3 [50.1–63.0]	NS
γ GT (IU/l)	32 [21.5–66.5]	28 [19–40]	0.005
AST (IU/l)	29 [23–38.5]	25 [21–31]	0.002
ALT (IU/l)	33 [22–51.5]	26.5 [19–40]	0.001
Blood insulin level (mIU/l)	22 [16–34]	19 [14–27]	0.006
Adipo-IRi	15.4 [9.2–23.3]	11.4 [7.4–16.7]	0.0006
HOMA IR	5.3 [3.3–9.0]	4.1 [3.0–5.9]	0.001
High waist circumference (%)	100	100	NS
High blood pressure (%)	53.9	48.1	NS
Low HDL cholesterol (%)	53.9	41.0	0.02
High triglyceride (%)	51.3	38.5	0.02
High blood glucose (%)	35.6	24.7	0.03
Presence of a metabolic syndrome (%)	64.0	51.0	0.01
Patients with NASH (%)	30.0	16.0	0.002
25-OH vitamin D (ng/ml)	15.9 [11.1–23.5]	19.6 [13.7–24.7]	0.02

Fibrosis in morbidly obese patients was assessed according to the NASH Clinical Research Network Scoring System Definition and Scores. In this classification, F2 means the association of zone 3 sinusoidal fibrosis and peri-portal sinusoidal fibrosis

ALT alanine amino-transferase, AST aspartate amino-transferase, BMI body mass index, HDL high density lipoprotein, HOMA-IR homeostasis model assessment of insulin resistance, γ GT gamma glutamyl-transferase, NS not significant

Discussion

In a cohort of 398 mainly morbidly obese women, the 25-OH vitamin D deficiency was not associated with NASH. In this cohort with a low prevalence of bridging fibrosis, the level of 25-OH vitamin D inversely correlated with severe fibrosis; however, this association was not maintained in the logistic regression analysis. To our knowledge, this is the first time that the level of 25-OH vitamin D has been assessed together

with the liver histology of a large cohort of morbidly obese patients.

Vitamin D deficiency is usually associated with increased inflammatory damage and/or fibrosis of the liver, as has been suggested for hepatitis C [20] and alcoholic liver disease [16]. Severe vitamin D deficiency may be associated with infectious complications and mortality in cirrhotic patients [21, 22].

Several reports about a potential association between 25-OH vitamin D and NAFLD have been published. However, most of the studies only correlated the level of 25-OH vitamin D with the presence of steatosis as assessed by ultrasound examination of the liver or by the presence of increased liver enzymes [23]. Few studies have reported a correlation between the severity of liver histology and the low level of 25-OH vitamin D. Targher et al. reported this in a cohort of 60 patients of normal weight or of mild overweight (40 men/20 women) with a mean BMI of 26.3 ± 2 kg/m². The study of Manco et al. was conducted on 64 (46 M/18 F) overweight and obese children aged 12.6 ± 2.7 years, with a BMI z score = 1.94 ± 0.34 kg/m², and that of Barchetta et al. was conducted on 25 obese patients (13 men/12 women) with a mean BMI of 30.5 ± 5.5 kg/m² [8, 10, 24, 25]. Recently, a study performed on 148 patients (28 % males, median BMI 35.7

Table 3 Logistic regression analysis for morbidly obese patients in predicting the presence of fibrosis \geq F2 according to the NASH Clinical Research Network Scoring System Definition and Scores (model $R^2 = 0.05$)

	OR	95 % CI	p
25-OH vitamin D	0.97	0.95–1.004	NS
γ GT	1.00	0.99–1.001	NS
Presence of NASH	1.94	1.13–3.35	0.017
Gender	0.60	0.36–1.22	NS
Presence of a metabolic syndrome	1.35	0.84–2.18	NS

γ GT gamma glutamyl-transferase, NS not significant

$\pm 7 \text{ kg/m}^2$) suggested that a low plasma vitamin D concentration was an independent predictor of the severity of NAFLD [11]. On the contrary, another study conducted in 239 patients (85 % males, median BMI $34.6 \pm 0.4 \text{ kg/m}^2$) showed that plasma vitamin D levels were not associated with insulin resistance, the amount of liver fat accumulation or the severity of NASH [12].

In accordance with the paper of Bril et al., a low level of vitamin D in our 398 morbidly obese patients was not associated with NASH. Moreover, patients with a higher level of fibrosis had a lower level of 25-OH vitamin D, which was not independently observed in the logistic regression analysis. The only independent factor for the occurrence of fibrosis was the presence of NASH.

The reasons for the discordance between our study and the study by Dasarathy et al. could be due to the high number of patients, ethnic differences or methodology for measure of vitamin D. Our patients were included consecutively to have a bariatric surgery; as a consequence, their liver histology reflected those found in a population of morbidly obese patients. On the contrary, in Dasarathy's study, the recruitment was made by hepatologists in order to characterize liver abnormalities in patients with a non-alcoholic fatty liver disease [11]. Moreover, we assume that these North American patients were exposed to specific genetic and environmental factors. These factors could be associated with NAFLD and significant liver damage. Dietary habits, low sun exposure and/or the increased amount of adipose tissue (which could sequester vitamin D) could participate in the decrease in the levels of circulating 25-OH vitamin D [26]. Similarly, our cohort was quite different compared to that reported by Targher et al. which was mainly composed of mildly overweight Italian men with 68.3 % of patients with NASH and 12 % with bridging fibrosis [8]. Moreover, the levels of 25-OH vitamin D were lower in the cohort of Targher et al. compared to ours. For example, 25-OH vitamin D levels were $18.3 \pm 9.6 \text{ ng/ml}$ in our 98 patients with significant fibrosis compared to around $9.8 \pm 10 \text{ ng/ml}$ for nine patients with stage 2 fibrosis in the Italian cohort. 25-OH vitamin D levels were $17.9 \pm 7.5 \text{ ng/ml}$ in our 82 patients with NASH compared to around 15.2 ± 8.4 and $9.3 \pm 10 \text{ ng/ml}$ in the Italian patients with grade 2 ($n=16$) and grade 3 ($n=22$) necroinflammation, respectively.

The proportion of our patients with an insufficiency, a deficit or a severe deficit was similar to those found in other cohorts of morbidly obese patients [6, 27].

Morbidly obese patients are known to be at a risk of an insufficient or a deficient level of 25-OH vitamin D, compared to the general population [8, 27]. Seasonality was not found in our morbidly obese patients. This has already been found in some cohorts of morbidly obese patients before or after bariatric surgery [27, 28]. The reasons are not known; however,

the possibility that the adipose tissue not only passively stores vitamin D but also dynamically changes its capacity for activation and deactivation of vitamin D in obesity has been proposed by Wamberg et al. [29]. The adipose tissue possesses all the enzymes involved in the production of 25-OH vitamin D (CYP2R1, CYP27A1, CYP2J2) or 1,25-OH vitamin D (CYP27B1) and the enzyme for degradation (CYP24A1) [29]. The potential release into the general circulation of 25-OH vitamin D locally produced by the adipose tissue has not been demonstrated. If confirmed, it could explain the lack of seasonality observed in some patients. Indeed, the adipose tissue has been shown to produce hundreds of adipokines and proteins such as adiponectin, leptin, interleukin 6 but also C reactive protein, hepcidin and osteopontin [30–33].

The strength of our study lies in the high number of histologically well-characterized morbidly obese patients studied. One pathologist blinded to the clinical data reviewed all the liver biopsies. No patients had decompensated liver cirrhosis or severe cholestasis, avoiding the risk of the alteration of the hepatic 25-hydroxylation or of the pool of 25-OH vitamin D due to malabsorption. Finally, the quantification of 25-OH vitamin D was done in our central laboratory using a robust and a certificated technique.

In conclusion, in morbidly obese patients, a low prevalence of a severe deficit in vitamin D was noted. No association between the level of 25-OH vitamin D and the presence of NASH was found. 25-OH vitamin D was inversely associated with the degree of fibrosis but this association was not maintained in a multivariate analysis. The discrepancy between the liver histology and the level of 25-OH vitamin D in patients with NASH as recently published requires more study.

Acknowledgments We thank Ms. C. Brahimi-Horn for the medical editing of the paper and Ms. A. Fafin for her work and her unfailing support. This study is in memory of Jean Gabriel Bernard-Cuisinier and Prof Pierre-Michel Huet.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no competing interests.

Financial Support This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) (France), the University of Nice and the Programme Hospitalier de Recherche Clinique (Centre Hospitalier Universitaire of Nice). This work was funded by the French Government (National Research Agency, ANR) through the "Investments for the Future" LABEX SIGNALIFE: program reference no. ANR-11-LABX-0028-01.

Statement of Informed Consent Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Statement of Human Rights All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

References

- Wacker M, Holick MF. Vitamin D—effects on skeletal and extraskelatal health and the need for supplementation. *Nutr*. 2013;5:111–48.
- Rahman AH, Branch AD. Vitamin D for your patients with chronic hepatitis C? *J Hepatol*. 2013;58:184–9.
- Kwok RM, Torres DM, Harrison SA. Vitamin D and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): is it more than just an association? *Hepatol Baltim Md*. 2013;58:1166–74.
- Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, et al. The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *J Hepatol*. 2013;58:593–608.
- Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, et al. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr*. 2000;72:690–3.
- Stein EM, Strain G, Sinha N, et al. Vitamin D insufficiency prior to bariatric surgery: risk factors and a pilot treatment study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009;71:176–83.
- Rinella ME. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. *JAMA*. 2015;313:2263–73.
- Targher G, Bertolini L, Scala L, et al. Associations between serum 25-hydroxyvitamin D3 concentrations and liver histology in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis NMCD*. 2007;17:517–24.
- Nobili V, Giorgio V, Liccardo D, et al. Vitamin D levels and liver histological alterations in children with nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Endocrinol Eur Fed Endocr Soc*. 2014;170:547–53.
- Manco M, Ciampalini P, Nobili V. Low levels of 25-hydroxyvitamin D(3) in children with biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Baltim Md*. 2010;51:2229. author reply 2230.
- Dasarathy J, Periyalwar P, Allampati S, et al. Hypovitaminosis D is associated with increased whole body fat mass and greater severity of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int*. 2014;34:e118–27.
- Bril F, Maximos M, Portillo-Sanchez P, et al. Relationship of vitamin D with insulin resistance and disease severity in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*. 2015;62:405–11.
- Ding N, Yu RT, Subramaniam N, et al. A vitamin D receptor/SMAD genomic circuit gates hepatic fibrotic response. *Cell*. 2013;153:601–13.
- Baeke F, Takiishi T, Korf H, et al. Vitamin D: modulator of the immune system. *Curr Opin Pharmacol*. 2010;10:482–96.
- Dey A, Cederbaum AI. Alcohol and oxidative liver injury. *Hepatol Baltim Md*. 2006;43:S63–74.
- Anty R, Canivet CM, Patouraux S, et al. Severe vitamin D deficiency may be an additional cofactor for the occurrence of alcoholic steatohepatitis. *Alcohol Clin Exp Res*. 2015;39:1027–33.
- NIH conference. Gastrointestinal surgery for severe obesity—consensus development conference panel. *Ann Intern Med*. 1991;115:956–61.
- Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol*. 1999;94:2467–74.
- Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Baltim Md*. 2005;41:1313–21.
- Kitson MT, Dore GJ, George J, et al. Vitamin D status does not predict sustained virologic response or fibrosis stage in chronic hepatitis C genotype 1 infection. *J Hepatol*. 2013;58:467–72.
- Anty R, Tonhouan M, Ferrari-Panaia P, et al. Low levels of 25-hydroxy vitamin D are independently associated with the risk of bacterial infection in cirrhotic patients. *Clin Transl Gastroenterol*. 2014;5, e56.
- Trépo E, Ouziel R, Pradat P, et al. Marked 25-hydroxyvitamin D deficiency is associated with poor prognosis in patients with alcoholic liver disease. *J Hepatol*. 2013;59:344–50.
- Eliades M, Spyrou E, Agrawal N, et al. Meta-analysis: vitamin D and non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013;38:246–54.
- Barchetta I, Carotti S, Labbadia G, et al. Liver vitamin D receptor, CYP2R1, and CYP27A1 expression: relationship with liver histology and vitamin D3 levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis or hepatitis C virus. *Hepatol Baltim Md*. 2012;56:2180–7.
- Barchetta I, Angelico F, Del Ben M, et al. Strong association between non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and low 25(OH) vitamin D levels in an adult population with normal serum liver enzymes. *BMC Med*. 2011;9:85.
- Earthman CP, Beckman LM, Masodkar K, et al. The link between obesity and low circulating 25-hydroxyvitamin D concentrations: considerations and implications. *Int J Obes*. 2005;36:387–96. 2012.
- Coupaye M, Breuil MC, Rivière P, et al. Serum vitamin D increases with weight loss in obese subjects 6 months after Roux-en-Y gastric bypass. *Obes Surg*. 2013;23:486–93.
- Beckman LM, Earthman CP, Thomas W, et al. Serum 25(OH) vitamin D concentration changes after Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Obes Silver Spring Md*. 2013;21:E599–606.
- Wamberg L, Christiansen T, Paulsen SK, et al. Expression of vitamin D-metabolizing enzymes in human adipose tissue—the effect of obesity and diet-induced weight loss. *Int J Obes*. 2005;37:651–7. 2013.
- Makki K, Froguel P, Wolowczuk I. Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. *ISRN Inflamm*. 2013;2013:139239.
- Bekri S, Gual P, Anty R, et al. Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH. *Gastroenterology*. 2006;131:788–96.
- Bertola A, Deveaux V, Bonnafous S, et al. Elevated expression of osteopontin may be related to adipose tissue macrophage accumulation and liver steatosis in morbid obesity. *Diabetes*. 2009;58:125–33.
- Anty R, Bekri S, Luciani N, et al. The inflammatory C-reactive protein is increased in both liver and adipose tissue in severely obese patients independently from metabolic syndrome, Type 2 diabetes, and NASH. *Am J Gastroenterol*. 2006;101:1824–33.

Supplementary Material:

Preoperative assessment of morbidly obese patients: Preoperative assessment was done 2 or 3 weeks before surgery and included: history and physical examination; blood pressure determination; anthropometric investigations (weight, height, waist circumference); psychiatric and nutritional evaluation; blood samples, obtained after overnight fasting for the determination of plasma levels of ALAT, ASAT, Gamma GT, glucose, insulin, C-peptide, glycosylated hemoglobin, triglycerides, HDL cholesterol, LDL-c, free fatty acids and 25-OH vitamin D. ALAT and ASAT levels were determined using the Roche® assay with pyridoxal phosphate on a Hitachi Modular® according to the International Federation of Clinical Chemistry and the “Société Française de Biologie Clinique” recommendations. The upper limit of normal ALAT (N), in our center, was 31 IU/l for women and 41 IU/l for men. Glycosylated hemoglobin was determined with the Dual kit A1cBiorad® on a Variant 2 Biorad® (Biorad, USA). All patients also had a chest X-ray, electrocardiogram, abdominal ultrasound and upper gastrointestinal endoscopy. Insulin resistance was assessed by homeostasis model assessment of insulin resistance $HOMA-IR = ((\text{fasting plasma insulin concentration (mIU/l)}) \times (\text{glucose concentration (mmol/l)}) / 22.5$ [1]. Insulin resistance of adipose tissue was assessed by the determination of the Adipo-IRi $(\text{Insulin (mmol/l)}) \times (\text{Free fatty acid (Insulin } (\mu\text{mol/l)})$ [2]. Metabolic syndrome was diagnosed according to the presence of any of 3 parameters as follows: central obesity defined by an increased waist circumference (≥ 80 cm in women and ≥ 94 cm in men) and any two of the following criteria: (i) triglycerides ≥ 1.7 mmol/l or treatment for hypertriglyceridemia; (ii) HDL-cholesterol < 1.29 mmol/l in women and < 1.03 mmol/l in men; (iii) systolic blood pressure (BP) ≥ 130 mm Hg or diastolic BP ≥ 85 mmHg or treatment for hypertension; and (iv) fasting plasma glucose ≥ 5.6 mmol/l or previously diagnosed type-2 diabetes [3]. All the morbidly obese patients of this study had an increased waist circumference. Type-2 diabetes was defined by two elevated measurements for fasting plasma glucose ≥ 7 mmol/l.

References:

- [1] Wallace TM, Matthews DR. The assessment of insulin resistance in man. *Diabet Med* 2002;19:527–34.
- [2] Lomonaco R, Ortiz-Lopez C, Orsak B, Webb A, Hardies J, Darland C, et al. Effect of adipose tissue insulin resistance on metabolic parameters and liver histology in obese patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2012;55:1389–97.
- [3] Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. 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;120:1640–5

4. Conclusions/perspectives

Dans cette étude, nous avons étudié les concentrations sanguines de 25-OH vitamine D chez 398 patients obèses morbides. La concentration médiane de 25-OH vitamine D était de 18,8 [12,9-24,2] ng/ml, 88 % des patients présentaient un déficit et 15 % une carence en vitamine D. Ces données confirment que le déficit en vitamine D est très fréquent. Il n'y avait pas de différence de concentration de 25-OH vitamine D en fonction de la présence d'un syndrome métabolique ou de l'insulino-résistance.

Notre hypothèse de départ n'a pas été vérifiée puisque les niveaux circulants de 25-OH vitamine D n'étaient pas différents entre les patients NASH et non NASH. Cependant, le niveau de 25-OH vitamine D était inversement corrélé au score NAS ($r = -0,12$; $p = 0,01$). En analyse univariée, les patients avec une fibrose significative (\geq F2 selon la NASH Clinical Research Network Scoring System Definition and Scores) avaient une concentration de 25-OH vitamine D plus basse que les patients sans fibrose significative ($<$ F2). Cependant, après régression logistique, ce paramètre n'était plus significatif. De plus, les patients qui présentaient une carence en vitamine D n'étaient pas différents histologiquement des autres patients (NASH ou fibrose significative).

Au moment de sa soumission, notre étude était celle qui avait inclus le plus grand nombre de patients. Plusieurs études sur des petits effectifs avaient été réalisées et une étude sur 239 patients n'avaient pas montré non plus d'association entre des concentrations basses de 25-OH vitamine D et un syndrome métabolique, une insulino-résistance ou une NASH (Bril et al. 2015).

Depuis la publication de notre étude, deux méta-analyses sur la sévérité des lésions hépatiques de NAFLD et la vitamine D ont été publiées en 2017 et en 2019. La première méta-analyse a repris les données de 6 études dont la nôtre. Les résultats confirment ce que nous avons trouvé, puisqu'aucune association n'était retrouvée entre les concentrations sanguines de 25 OH vitamine D et le score NAS ou le grade de fibrose (Jaruvongvanich et al. 2017). La deuxième méta-analyse a repris les données de 45 études transversales. Les études étaient très différentes, les seuils de

déficit en vitamine D n'était pas toujours semblables et les conclusions des études étaient très variables (Pacifico et al. 2019).

Par ailleurs, quatre essais cliniques en double aveugle contre placebo ont été réalisés afin d'évaluer une supplémentation vitaminique D chez des patients avec une NAFLD (Kitson et al. 2016; Barchetta et al. 2016; Dabbaghmanesh et al. 2018; Geier et al. 2018). L'étude pilote de Kitson *et col.* ayant inclus 10 patients avec NASH n'avait pas vu d'amélioration sur l'histologie après 24 semaines de traitement. L'étude de Geier *et col.* a évalué l'amélioration des lésions histologiques mais chez seulement 7 patients au total (3 patients traités par vitamine D et 4 patients sous placebo) ce qui n'a pas permis de faire des statistiques correctes.

Tableau 3 : Résumé des essais prospectifs sur la supplémentation vitaminique D dans la NAFLD.

	Kitson <i>et col.</i> 2015	Barchetta <i>et col.</i> 2016	Dabbaghmanesh <i>et col.</i> 2018		Geier <i>et col.</i> 2018
Nombre de patients (placebo/molécule)	0/12	36/29	36/35	36/35	10/10
Diagnostic de NAFLD	Biopsie (NASH)	IRM	Echographie		Biopsie
Supplémentation	25 000 UI de vitamine D3 par semaine	2100 UI de vitamine D3 par jour	50 000 UI de vitamine D3 par semaine	0,25 mg de calcitriol par jour	2100 UI de vitamine D3 par jour
Durée de la supplémentation	24 semaines	24 semaines	12 semaines		48 semaines
Effet sur les ALAT	Aucun	Aucun	Non évalué		↓
Effet sur les phosphatases alcalines	Aucun	Aucun	↓	↓	Aucun
Effet sur les gammaGT	Aucun	Aucun	↓	Aucun	Aucun
Autres résultats	Pas d'impact sur l'histologie	Pas d'effet sur la stéatose hépatique	-	-	↓ fragment cytokératine 18

Des essais cliniques supplémentaires à large échelle avec une évaluation histologique avant et après traitement sont nécessaires. La durée de la supplémentation doit aussi être allongée pour espérer trouver un effet sur la sévérité des lésions histologiques de NAFLD.

L'intérêt de la vitamine D porte aussi sur d'autres hépatopathies chroniques telles que les maladies du foie liées à l'alcool. D'ailleurs notre équipe a montré chez les patients alcooliques que le déficit en 25-OH vitamine D était associé à l'apparition d'une stéato-hépatite alcoolique (Anty et al. 2015). C'est d'autant plus intéressant que les patients présentent le plus souvent une NAFLD avec une consommation d'alcool régulière.

Enfin, à des stades plus graves de la maladie et notamment chez les patients cirrhotiques (quelle que soit la cause de la cirrhose), la carence en 25-OH vitamine D est associée à plus d'infection bactérienne (Anty et al. 2014; Ramadan et al. 2019).

Article 3 : FNDC5/irisine est une hepatokine protectrice de la stéatose

1. Présentation de l'étude

Cette partie de mon travail de thèse de Science porte sur des aspects plus fondamentaux de la NAFLD. Comme vu précédemment, la physiopathologie de la NAFLD est complexe (génétique, épigénétique, environnementale) et pas totalement élucidée. De plus, aucun traitement n'est validé pour traiter cette pathologie émergente. La recherche est donc nécessaire d'une part pour mieux comprendre la physiopathologie et d'autre part pour développer de nouvelles armes thérapeutiques.

FNDC5 est une protéine transmembranaire initialement découverte dans le muscle. Sa partie extracellulaire est clivée et l'irisine (qui correspond au fragment libre clivé) est relarguée dans la circulation sanguine. Le rôle de l'irisine a été montré dans la brunisation du tissu adipeux blanc et dans l'augmentation de la captation de glucose dans le muscle. Au niveau sanguin, 70 % de l'irisine provient du muscle, 25 % du tissu adipeux et 5 % des autres organes chez la souris (Roca-Rivada et al. 2013). Plusieurs études surexprimant l'irisine ont également montré son rôle positif sur l'insulino-résistance et le métabolisme glucidique (Xiong et al. 2015). Des souris avec une invalidation globale de *Fndc5* avaient plus de stéatose et étaient moins résistantes à l'insuline après des régimes riches en gras (Liu et al. 2016).

Au niveau hépatique, l'effet de l'irisine a été étudié *in vitro* sur des hépatocytes et *in vivo* dans des modèles murins après surexpression d'irisine ou de FNDC5. Les résultats montraient une amélioration des lésions de stéatose (Park et al. 2015). Ces résultats étaient en faveur du rôle endocrine de l'irisine, qui sécrétée par le muscle et le tissu adipeux, jouait un rôle à distance sur le foie. Cependant, le rôle de FNDC5 hépatique et l'action locale de l'irisine (autocrine et paracrine) au niveau du foie n'est pas élucidé. C'est la raison pour laquelle nous avons décidé d'étudier le rôle local de FNDC5/irisine dans le foie.

De plus, le gène de *FNDC5* a également été étudié. Plusieurs équipes se sont intéressées aux différents polymorphismes de ce gène dans la régulation du métabolisme glucido-lipidique. Parmi les différents polymorphismes étudiés, l'allèle G du SNP rs3480 a fait l'objet de plusieurs publications dans la NAFLD avec des résultats contradictoires. En effet, l'allèle G était associé à la stéatose et non à la fibrose dans une première étude, tandis qu'une deuxième étude retrouvait l'allèle G comme associé à la fibrose et non à la stéatose (Petta et al. 2017; Metwally et al. 2019). Au niveau mécanistique, le SNP rs3480, situé dans une région non codante du promoteur du gène, était associé au miR-135a-5p (Metwally et al. 2019).

L'hypothèse de notre travail est que *FNDC5*/irisine, en tant qu'hépatokine, jouerait un rôle local hépatique protecteur sur la stéatose.

2. Objectifs de l'étude

Nous avons souhaité étudier le rôle de *FNDC5*/irisine au niveau local dans le foie.

Le premier objectif de l'étude était de rechercher des modifications dans la concentration hépatique de *FNDC5* en fonction des différentes étapes de la NAFLD dans des modèles murins et sur des biopsies humaines de foie. Comme *FNDC5* hépatique était augmenté en cas de stéatose et de NASH, le deuxième objectif était d'étudier les différentes cellules hépatiques exprimant *FNDC5*. Nous avons montré que *FNDC5* était exprimé notamment dans les hépatocytes. Le troisième objectif de notre étude était d'approfondir le rôle de *FNDC5* dans l'hépatocyte. Enfin, nous avons également rechercher les variations du polymorphisme de *FNDC5* rs3480 en fonction des stades de NAFLD chez 304 patients obèses morbides ayant tous eu une biopsie hépatique au cours d'une chirurgie bariatrique et chez 309 patients ayant eu une biopsie hépatique pour une suspicion de NAFLD.

3. Publication : “Hepatic FNDC5/irisin is a local protective factor against Non-Alcoholic Fatty Liver”

CANIVET Clémence M, BONNAFOUS Stéphanie, ROUSSEAU Déborah, LECLERE Pierre S, PATOURAUX S, SANS Arnaud, LUCI Carmelo, BAILLY-MAITRE Béatrice, IANNELLI Antonio, TRAN Albert, ANTY Rodolphe \$*, GUAL Philippe \$*

Soumis pour publication dans *Molecular basis of Disease*.

Article en cours de révision

Hepatic FNDC5/irisin is a local protective factor against Non-Alcoholic Fatty Liver

Canivet CM (1,2), Bonnafous S (1,2), Rousseau D (1), Leclere PS (1), Patouraux S (1,2), Sans A (1), Luci C (1), Bailly-Maitre B (1), Iannelli A (1,2), Tran A (1,2), Anty R (1,2)^{§*}, Gual P (1)^{§*}

¹ Université Côte d'Azur, INSERM, U1065, C3M, Nice, France;

² Université Côte d'Azur, CHU, INSERM, U1065, C3M, Nice, France

§ Philippe Gual and Rodolphe Anty jointly supervised this work.

* *Corresponding Author:*

Philippe Gual, INSERM U1065, Bâtiment Universitaire ARCHIMED, Team 8 "Chronic liver diseases associated with obesity and alcohol", 151 route Saint Antoine de Ginestière, BP 2 3194, 06204 Nice Cedex 03, France, philippe.gual@inserm.fr, Phone: +33-4-89 06 42 95, Fax: +33-4-89 06 42 21

Rodolphe Anty, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Digestive Center, 151 route de Saint Antoine de Ginestière, 06202 Nice, France, anty.r@chu-nice.fr, Phone: +33-4-92 03 59 43; Fax: +33-4-92 03 92 39

Diffusion non autorisée

4. Conclusions/perspectives

Dans ce travail, nous avons montré que FNDC5/Irisine hépatique est régulé à la hausse sans impact sur la concentration sérique d'irisine dans différents modèles murins de NAFLD et sur des patients avec NAFLD. Pour cela, nous avons utilisé des souris C57BL/6 soumises à un régime HFD pendant 33 semaines entraînant une stéatose ou à un régime MCDD pendant 2 semaines entraînant une stéato-hépatite. Dans ces 2 modèles, l'expression hépatique de *Fndc5* était augmentée et corrélait avec la stéatose hépatique et les lésions hépatiques. Ces données étaient également confirmées sur des biopsies hépatiques de patients obèses morbides avec différentes sévérités de NAFLD. De plus, nous avons montré dans les modèles murins et chez les patients que l'irisine circulante n'était pas associée aux lésions hépatiques. Les données dans la littérature concernant l'irisine circulante et la NAFLD sont contradictoires comme vu dans l'introduction. En effet, certaines études montrent une diminution de l'irisine sanguine avec le développement de la NAFLD (Zhang et al. 2013), alors que d'autres montrent une augmentation de sa concentration (Rizk et al. 2016) ou l'absence de modification (Polyzos et al. 2015). Il est donc possible que l'effet de l'irisine dans le foie soit dû à un effet local et non à une contribution systémique.

Ensuite, nous avons montré que, dans le foie, FNDC5 est exprimé dans les hépatocytes et également dans la fraction non parenchymateuse. L'augmentation hépatique de FNDC5 est aussi associée une augmentation de son expression dans les deux fractions chez les souris soumises à un régime MCDD pendant 2 semaines. Pour la suite de notre travail, nous avons décidé de nous focaliser sur l'hépatocyte. Ces cellules avaient la « machinerie » nécessaire pour générer l'irisine soluble. Ces résultats confirmaient bien que l'irisine est une hépatokine. Nous avons ensuite recherché les mécanismes responsables de l'augmentation de l'expression hépatocytaire de FNDC5 et avons montré que le stress génotoxique hépatique et l'activation de la voie p53, qui sont exacerbés avec le développement de la NAFLD, étaient impliqués dans son augmentation hépatocytaire. C'est la première fois que cette voie de régulation de FNDC5 est décrite. Dans des modèles murins de NAFLD, il a été bien établi que l'expression et l'activité de p53 était augmentée dans le foie (Yahagi et al. 2004) et que l'inhibition de la voie p53 atténuait la stéatose et les lésions hépatiques (Derdak et al. 2013). D'autres régulateurs de FNDC5 ont été aussi décrits

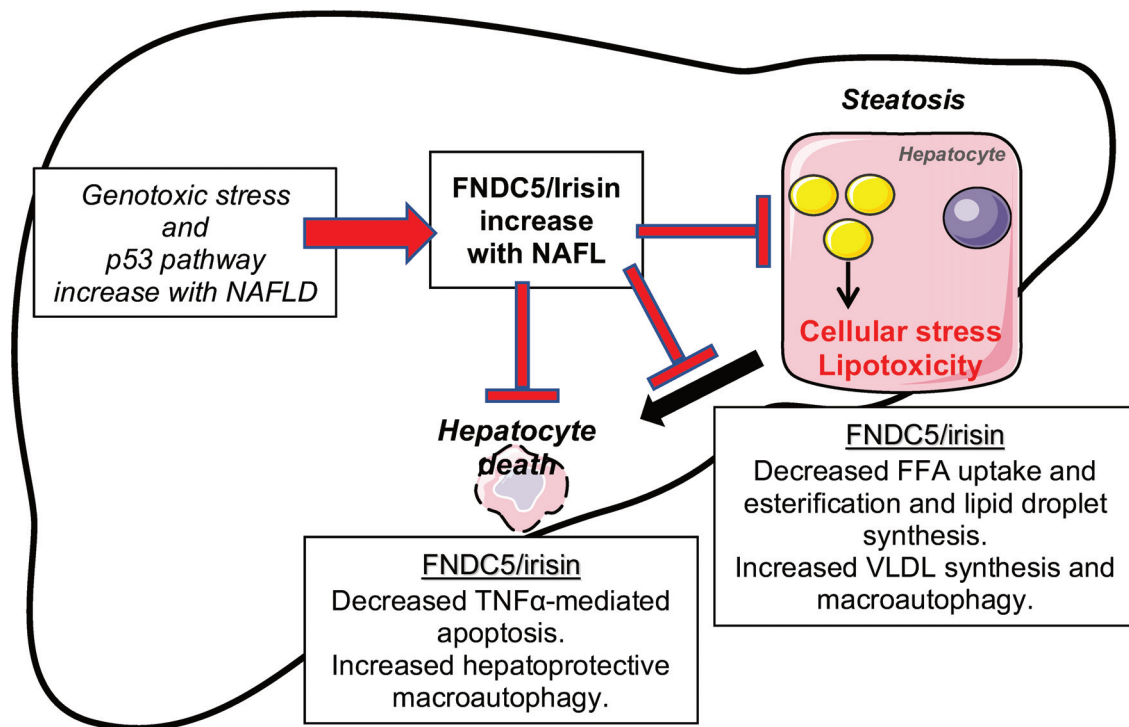
dans le foie comme le récepteur nucléaire CAR ou le FXR (Mo et al. 2016; Li et al. 2019).

Le troisième objectif était d'étudier le rôle de FNDC5 dans l'hépatocyte dans le développement de la NAFLD. Nous avons montré, dans des lignées d'hépatocytes (HepG2) incubés dans des milieux glucotoxiques (glucosamine) ou lipotoxiques (acide oléique), que la diminution de l'expression de FNDC5, par des approches de siRNA, favorisait le développement de la stéatose. En effet, nous avons trouvé une augmentation de l'expression des enzymes de la néoglucogénèse et de la lipogénèse dans les HepG2 et les hépatocytes primaires de souris. La diminution de l'expression de FNDC5 altérait aussi le flux autophagique, décrit comme hépatoprotecteur sur la stéatose et la souffrance hépatocellulaire (Gual et al. 2017a; 2017b). Nous avons aussi pu démontrer que la diminution de l'expression de FNDC5 aggravait la mort cellulaire par apoptose en réponse au TNF α dans des hépatocytes primaires de souris. FNDC5 dans les hépatocytes préviendrait donc la stéatose hépatique en régulant l'entrée et la sortie des acides gras libres dans le foie, la lipogénèse et la macro-autophagie. FNDC5 hépatique pourrait aussi freiner la progression de la NAFLD en diminuant l'apoptose des hépatocytes induite par les cytokines. Ces résultats ont été également retrouvés par Liu *et col.* qui ont étudié des modèles murins déficients en *Fndc5*. Ces souris soumises à un régime riche en gras développaient une stéatose sévère en diminuant le flux autophagique et en augmentant la lipogénèse. A contrario, la surexpression de FNDC5 améliorait partiellement la stéatose hépatique et l'hyperlipidémie chez des souris obèses. Ces effets bénéfiques étaient dus aux effets de FNDC5 dans le foie, mais pourraient également être une conséquence du ciblage de FNDC5 dans le tissu adipeux et le pancréas puisque le taux systémique d'irisine a été multiplié par deux (Liu et al. 2016). Nous avons montré, dans notre étude, que ces effets sont médiés par l'irisine hépatique et non systémique. La macroautophagie dans les hépatocytes est actuellement considérée comme une voie hépatoprotectrice et les souris présentant des délétions spécifiques d'Atg5 ou d'Atg7 sont plus sensibles aux lésions hépatiques induites par l'alcool et d'autres agents toxiques, un excès d'acides gras libres et une ischémie-reperfusion (Gual et al. 2017b; Lavallard and Gual 2014; Czaja et al. 2013). Indirectement, la diminution de l'accumulation de graisse dans les hépatocytes, induite par FNDC5, pourrait réduire la vulnérabilité des hépatocytes gras aux signaux de mort, ce qui permettrait d'éviter partiellement les lésions hépatiques.

Un schéma récapitulatif des effets locaux de FNDC5/irisine est proposé ci-dessous.

Figure 13 : FNDC5/irisine dans la NAFLD

FNDC5/irisine hépatique est régulée positivement dans la NAFLD sans affecter les niveaux systémiques d'irisine dans les études chez la souris et chez l'homme. Le stress génotoxique hépatique et l'activation de la voie p53, exacerbés par le développement de la NAFLD, ont été impliqués localement dans sa régulation à la hausse. FNDC5/irisine dans les hépatocytes pourrait protéger de la stéatose hépatique en régulant l'entrée et la sortie d'acides gras libres dans le foie, la lipogenèse et la macro-autophagie. De plus, FNDC5 hépatique pourrait freiner la progression de la NAFLD en diminuant l'apoptose des hépatocytes induite par les cytokines. Les effets bénéfiques de FNDC5/irisine sur le foie et ses fonctions dans le tissu adipeux et le muscle renforcent son potentiel pour des applications thérapeutiques.



Enfin, nous avons montré que le polymorphisme rs3480 G de *FNDC5* était protecteur de la stéatose et de la fibrose et ce indépendamment de l'âge, du sexe, de l'IMC et du polymorphisme de *PNPLA3* dans 2 cohortes très différentes de plus de 300 patients. Ces résultats vont à l'encontre de ce qui a déjà été publié puisque Petta *et col.* ont montré que le SNP rs3480 G était associé à la fibrose significative sans effet sur la stéatose. Il faut quand même noter, dans cette étude, que les résultats *in vitro*

sur des HepG2 incubés dans un milieu lipotoxique ne retrouvaient pas d'amélioration de la stéatose après administration exogène d'irisine alors que les données de la littérature sont plutôt concordantes sur l'effet protecteur de l'irisine sur la stéatose (Petta et al. 2017). L'autre étude sur le polymorphisme de *FNDC5* dans la NAFLD a retrouvé que le SNP rs3480 G de *FNDC5* était associé à la stéatose sévère sans effet sur la fibrose (Metwally et al. 2019).

Tous ces résultats doivent être pris avec précaution et une étude à large échelle devrait être réalisée pour valider le rôle du polymorphisme rs3480 de *FNDC5* dans la NAFLD.

Pour conclure : ce travail de thèse a permis de mettre en évidence une voie de régulation de la stéatose. Dans le foie et sous l'influence notamment de la voie de p53, *FNDC5* va sécréter l'irisine qui va agir par voie autocrine ou paracrine pour ralentir le développement de la stéatose. *FNDC5*/irisine va ralentir la lipogenèse, favoriser l'export des VLDL et activer le flux autophagique. Malheureusement, à des stades plus tardifs de la maladie (stéatose sévère), ce phénomène est dépassé et malgré des concentrations élevées d'irisine, la stéatose se développe. C'est le concept d'irisino-résistance décrit initialement par Perez-Sotelo *et col.* dans l'adipocyte, qui est finalement présent dans l'hépatocyte (Pérez-Sotelo et al. 2017). Ces données laissent à penser que l'irisine pourrait être une voie thérapeutique dans le développement des stades précoces de la NAFLD.

Cependant, encore beaucoup de données sont non comprises et nécessitent la poursuite des recherches sur cette molécule.

Au niveau systémique, des recherches portant sur le mécanisme de clivage de *FNDC5* pour donner l'irisine et le rôle spécifique de *FNDC5* par rapport à l'irisine sont à entreprendre.

Au niveau hépatique, la recherche du récepteur de l'irisine (probablement dans la famille des intégrines) est nécessaire. De manière intéressante, nous avons constaté que l'inactivation de *FNDC5* dans les hépatocytes primaires régula négativement l'expression des intégrines αV et $\beta 5$, récepteurs potentiels de l'irisine récemment identifiés dans les ostéocytes et les tissus adipeux (Kim et al. 2018).

De plus, l'étude de FNDC5/irisine dans les autres cellules hépatiques (cellules stellaires, macrophages, cellules endothéliales sinusoidales) pourrait affiner le rôle de l'irisine dans le foie et son association avec la fibrose.

Dans un autre champ hépatologique, l'étude de la voie FNDC5/irisine dans d'autres hépatopathies chroniques telles que les maladies du foie liées à l'alcool seraient intéressantes. Par exemple, nous avons pu mettre en évidence une augmentation de l'expression hépatique de FNDC5 dans un modèle murin de complications hépatiques associées à une consommation chronique puis accrue d'alcool (Chronic plus binge ethanol feeding)

Conclusion générale

Les maladies du foie gras non alcooliques (NAFLD) constituent un problème majeur de santé publique. L'enjeu scientifique de la NAFLD est d'une part de mieux comprendre la physiopathologie notamment pour développer des traitements pharmacologiques et d'autre part de mieux comprendre les facteurs favorisant le développement de cette maladie et expliquant l'hétérogénéité des manifestations clinique et de la sévérité de la maladie entre les individus.

Mon travail de thèse de Sciences a permis d'étudier des acteurs et des facteurs supposés associés à la progression de la NAFLD.

Tout d'abord, nous avons étudié les troubles du comportement alimentaire, à travers un auto-questionnaire de dépistage le Bulimia-revised test, en fonction de la sévérité des atteintes hépatiques. Nous n'avons pas mis en évidence d'association entre les troubles du comportement alimentaire et la NAFLD. Cependant, plusieurs explications sont possibles quant à l'absence d'association : il est possible que nos patients obèses morbides ne soient pas assez graves sur le versant psychiatrique (exclusion des patients présentant une boulimie clinique). De plus, l'auto-questionnaire utilisé, bien que validé, manque peut-être de sensibilité et de spécificité. Des études supplémentaires dans des populations de patients en surpoids ou obèses, à risque de troubles du comportement alimentaires, avec des outils de dépistage plus récents (comme le test « yale food addiction scale », validé en français et adapté au DSM-5 (Gearhardt et al. 2016; Brunault et al. 2017)) sont nécessaires avant de conclure à l'absence d'association entre NAFLD et addiction alimentaire.

Ensuite, nous avons étudié les acteurs de progression de la NAFLD.

Tout d'abord, nous avons montré que la concentration sérique de vitamine D n'était pas modifiée en fonction de la sévérité de la NAFLD. D'autres études dans la NAFLD ont retrouvé des résultats similaires aux nôtres. Cependant, plusieurs publications dans d'autres hépatopathies chroniques (alcool notamment), dont certaines de notre équipe, ont mis en évidence le lien entre un déficit en vitamine D et la fibrose hépatique chez des patients ayant des atteintes hépatiques sévères.

Ensuite, nous avons montré que FNDC5/irisine était un facteur protecteur local du développement de la NAFLD. FNDC5 jouerait un rôle positif sur la lipogenèse,

l'apoptose et le flux autophagique. Son action serait autocrine ou paracrine hépatique et non d'origine systémique comme en attestait l'absence d'association entre l'irisine circulante et la sévérité de la NAFLD. Cette molécule pourrait être une option thérapeutique dans le traitement de la stéatose hépatique.

En conclusion et d'un point de vue médical, la NAFLD est une pathologie difficile à prendre en charge. D'une part car nos outils diagnostiques sont insuffisants (seule la biopsie hépatique permet de différencier une NASH d'une stéatose) et d'autre part car aucun traitement pharmacologique n'est validé.

Des études supplémentaires sont nécessaires pour savoir si, en plus de la prise en charge actuelle validée [mesures hygiéno-diététiques (perte de poids, augmentation de l'activité physique, lutte contre la sédentarité) et prise en charge des facteurs de risque cardio-vasculaire], tous les patients avec une NAFLD devraient avoir un dosage de la vitamine D pour rechercher et corriger un déficit ; et si l'interrogatoire devrait rechercher des arguments pour une addiction alimentaire (et s'aider si besoin d'un auto-questionnaire de dépistage) et si une prise en charge addictologique spécifique pourrait être entreprise en cas de positivité.

Enfin, le développement de thérapeutiques efficaces est très attendu et de nombreuses molécules sont actuellement en cours de développement. Des agonistes de FNDC5/irisine pourraient être une voie de développement intéressante.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdul-Wahed, Aya, Sandra Guilmeau, and Catherine Postic. 2017. "Sweet Sixteenth for ChREBP: Established Roles and Future Goals." *Cell Metabolism* 26 (2): 324–41. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.07.004>.
- Abramovitch, Shirley, Liora Dahan-Bachar, Efrat Sharvit, Yosef Weisman, Amir Ben Tov, Eli Brazowski, and Shimon Reif. 2011. "Vitamin D Inhibits Proliferation and Profibrotic Marker Expression in Hepatic Stellate Cells and Decreases Thioacetamide-Induced Liver Fibrosis in Rats." *Gut* 60 (12): 1728–37. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.234666>.
- Adorini, Luciano, Mark Pruzanski, and David Shapiro. 2012. "Farnesoid X Receptor Targeting to Treat Nonalcoholic Steatohepatitis." *Drug Discovery Today* 17 (17–18): 988–97. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.05.012>.
- Alberti, K. G. M. M., Robert H. Eckel, Scott M. Grundy, Paul Z. Zimmet, James I. Cleeman, Karen A. Donato, Jean-Charles Fruchart, et al. 2009. "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* 120 (16): 1640–45. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644>.
- Albrecht, Elke, Frode Norheim, Bernd Thiede, Torgeir Holen, Tomoo Ohashi, Lisa Schering, Sindre Lee, et al. 2015. "Irisin - a Myth Rather than an Exercise-Inducible Myokine." *Scientific Reports* 5: 8889. <https://doi.org/10.1038/srep08889>.
- Al-Daghri, Nasser M., Abdul Khader Mohammed, Omar S. Al-Attas, Osama E. Amer, Mario Clerici, Amal Alenad, and Majed S. Alokail. 2016. "SNPs in FNDC5 (Irisin) Are Associated with Obesity and Modulation of Glucose and Lipid Metabolism in Saudi Subjects." *Lipids in Health and Disease* 15 (1). <https://doi.org/10.1186/s12944-016-0224-5>.
- Anastasilakis, Athanasios D., Stergios A. Polyzos, Polyzois Makras, Eleni Douni, and Christos S. Mantzoros. 2019. "Irisin: Good or Bad for the Bone? A New Path Forward after the Reported Discovery of Irisin Receptor?" *Metabolism* 93 (April): 100–102. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2019.01.013>.
- Angulo, Paul, David E. Kleiner, Sanne Dam-Larsen, Leon A. Adams, Einar S. Bjornsson, Phunchai Charatcharoenwitthaya, Peter R. Mills, et al. 2015. "Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Associates with Long-Term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Gastroenterology* 149 (2): 389-397.e10. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.04.043>.
- ANR MicroObes consortium, ANR MicroObes consortium members, Aurélie Cotillard, Sean P. Kennedy, Ling Chun Kong, Edi Prifti, Nicolas Pons, et al. 2013. "Dietary Intervention Impact on Gut Microbial Gene Richness." *Nature* 500 (7464): 585–88. <https://doi.org/10.1038/nature12480>.
- Anstee, Quentin M., and Robert D. Goldin. 2006. "Mouse Models in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Steatohepatitis Research." *International Journal of Experimental Pathology* 87 (1): 1–16. <https://doi.org/10.1111/j.0959-9673.2006.00465.x>.
- Anstee, Quentin M., Helen L. Reeves, Elena Kotsiliti, Olivier Govaere, and Mathias Heikenwalder. 2019. "From NASH to HCC: Current Concepts and Future Challenges." *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 16 (7): 411–28. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0145-7>.
- Anty, R., A. Iannelli, S. Patouraux, S. Bonnafous, V. J. Lavallard, M. Senni-Buratti, I. Ben Amor, et al. 2010. "A New Composite Model Including Metabolic Syndrome, Alanine Aminotransferase and Cytokeratin-18 for the Diagnosis of Non-Alcoholic Steatohepatitis in Morbidly Obese Patients." *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 32 (11–12): 1315–22. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2010.04480.x>.
- Anty, Rodolphe, Soumeiya Bekri, Nathalie Luciani, Marie-Christine Saint-Paul, Moncef Dahman, Antonio Iannelli, Imed Ben Amor, et al. 2006. "The Inflammatory C-Reactive

- Protein Is Increased in Both Liver and Adipose Tissue in Severely Obese Patients Independently from Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes, and NASH." *The American Journal of Gastroenterology* 101 (8): 1824–33. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.00724.x>.
- Anty, Rodolphe, Clémence M. Canivet, Stéphanie Patouraux, Patricia Ferrari-Panaia, Marie Christine Saint-Paul, Pierre-Michel Huet, Cynthia Lebeaupin, Antonio Iannelli, Philippe Gual, and Albert Tran. 2015. "Severe Vitamin D Deficiency May Be an Additional Cofactor for the Occurrence of Alcoholic Steatohepatitis." *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 39 (6): 1027–33. <https://doi.org/10.1111/acer.12728>.
- Anty, Rodolphe, Sophie Marjoux, Antonio Iannelli, Stéphanie Patouraux, Anne-Sophie Schneck, Stéphanie Bonnafous, Camille Gire, et al. 2012. "Regular Coffee but Not Espresso Drinking Is Protective against Fibrosis in a Cohort Mainly Composed of Morbidly Obese European Women with NAFLD Undergoing Bariatric Surgery." *Journal of Hepatology* 57 (5): 1090–96. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.07.014>.
- Anty, Rodolphe, M. Tonohouan, P. Ferrari-Panaia, T. Piche, A. Pariente, Q. M. Anstee, P. Gual, and A. Tran. 2014. "Low Levels of 25-Hydroxy Vitamin D Are Independently Associated with the Risk of Bacterial Infection in Cirrhotic Patients." *Clinical and Translational Gastroenterology* 5 (May): e56. <https://doi.org/10.1038/ctg.2014.6>.
- Arab, Juan P., Saul J. Karpen, Paul A. Dawson, Marco Arrese, and Michael Trauner. 2017. "Bile Acids and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Molecular Insights and Therapeutic Perspectives." *Hepatology* 65 (1): 350–62. <https://doi.org/10.1002/hep.28709>.
- Arab, Juan Pablo, Marco Arrese, and Michael Trauner. 2018. "Recent Insights into the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Annual Review of Pathology* 13: 321–50. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020117-043617>.
- Armstrong, Matthew James, Piers Gaunt, Guruprasad P. Aithal, Darren Barton, Diana Hull, Richard Parker, Jonathan M. Hazlehurst, et al. 2016. "Liraglutide Safety and Efficacy in Patients with Non-Alcoholic Steatohepatitis (LEAN): A Multicentre, Double-Blind, Randomised, Placebo-Controlled Phase 2 Study." *Lancet (London, England)* 387 (10019): 679–90. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00803-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00803-X).
- Aron-Wisnewsky, J., B. Gaborit, A. Dutour, and K. Clement. 2013. "Gut Microbiota and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: New Insights." *Clinical Microbiology and Infection* 19 (4): 338–48. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12140>.
- Aron-Wisnewsky, Judith, Karine Clement, and Jean-Louis Pépin. 2016. "Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Obstructive Sleep Apnea." *Metabolism* 65 (8): 1124–35. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2016.05.004>.
- Babaknejad, Nasim, Hashem Nayeri, Roohullah Hemmati, Somaye Bahrami, and Ahmad Esmailzadeh. 2018. "An Overview of FGF19 and FGF21: The Therapeutic Role in the Treatment of the Metabolic Disorders and Obesity." *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Metabolisme* 50 (6): 441–52. <https://doi.org/10.1055/a-0623-2909>.
- Baiceanu, Andrei, Pierre Mesdom, Marie Lagouge, and Fabienne Fougelle. 2016. "Endoplasmic Reticulum Proteostasis in Hepatic Steatosis." *Nature Reviews. Endocrinology* 12 (12): 710–22. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.124>.
- Baranova, A., T. P. Tran, A. Birerdinc, and Z. M. Younossi. 2011. "Systematic Review: Association of Polycystic Ovary Syndrome with Metabolic Syndrome and Non-alcoholic Fatty Liver Disease." *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. April 1, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2011.04579.x>.
- Barchetta, Ilaria, Flavia Agata Cimini, and Maria Gisella Cavallo. 2017. "Vitamin D Supplementation and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Present and Future." *Nutrients* 9 (9). <https://doi.org/10.3390/nu9091015>.
- Barchetta, Ilaria, Maria Del Ben, Francesco Angelico, Michele Di Martino, Antonio Fraioli, Giuseppe La Torre, Rosella Saulle, et al. 2016. "No Effects of Oral Vitamin D Supplementation on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Patients with Type 2 Diabetes: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial." *BMC Medicine* 14 (June). <https://doi.org/10.1186/s12916-016-0638-y>.

- Barreiro, Fernando J., Silvia Holod, Paola V. Finocchietto, Alejandra M. Camino, Jorge B. Aquino, Alejandra Avagnina, María C. Carreras, Juan J. Poderoso, and Gregory J. Gores. 2015. "The Pan-Caspase Inhibitor Emricasan (IDN-6556) Decreases Liver Injury and Fibrosis in a Murine Model of Non-Alcoholic Steatohepatitis." *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver* 35 (3): 953–66. <https://doi.org/10.1111/liv.12570>.
- Bashiardes, Stavros, Hagit Shapiro, Shachar Rozin, Oren Shibolet, and Eran Elinav. 2016. "Non-Alcoholic Fatty Liver and the Gut Microbiota." *Molecular Metabolism* 5 (9): 782–94. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2016.06.003>.
- Baumeister, Sebastian E., Sabrina Schlesinger, Krasimira Aleksandrova, Carmen Jochem, Mazda Jenab, Marc J. Gunter, Kim Overvad, et al. 2019. "Association between Physical Activity and Risk of Hepatobiliary Cancers: A Multinational Cohort Study." *Journal of Hepatology* 70 (5): 885–92. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.12.014>.
- Bedossa, Pierre, and Keyur Patel. 2016. "Biopsy and Noninvasive Methods to Assess Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Gastroenterology* 150 (8): 1811–1822.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.03.008>.
- Bedossa, Pierre, Joan Tordjman, Judith Aron-Wisnewsky, Christine Poitou, Jean-Michel Oppert, Adriana Torcivia, Jean-Luc Bouillot, Valerie Paradis, Vlad Ratziu, and Karine Clément. 2017. "Systematic Review of Bariatric Surgery Liver Biopsies Clarifies the Natural History of Liver Disease in Patients with Severe Obesity." *Gut* 66 (9): 1688–96. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312238>.
- Beilfuss, Anja, Jan-Peter Sowa, Svenja Sydor, Mechthild Beste, Lars P. Bechmann, Martin Schlattjan, Wing-Kin Syn, et al. 2015. "Vitamin D Counteracts Fibrogenic TGF- β Signalling in Human Hepatic Stellate Cells Both Receptor-Dependently and Independently." *Gut* 64 (5): 791–99. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307024>.
- Bertola, Adeline, Thomas Ciucci, Déborah Rousseau, Virginie Bourlier, Carine Duffaut, Stéphanie Bonnafous, Claudine Blin-Wakkach, et al. 2012. "Identification of Adipose Tissue Dendritic Cells Correlated with Obesity-Associated Insulin-Resistance and Inducing Th17 Responses in Mice and Patients." *Diabetes* 61 (9): 2238–47. <https://doi.org/10.2337/db11-1274>.
- Bertola, Adeline, Vanessa Deveaux, Stéphanie Bonnafous, Déborah Rousseau, Rodolphe Anty, Abdelilah Wakkach, Moncef Dahman, et al. 2009. "Elevated Expression of Osteopontin May Be Related to Adipose Tissue Macrophage Accumulation and Liver Steatosis in Morbid Obesity." *Diabetes* 58 (1): 125–33. <https://doi.org/10.2337/db08-0400>.
- Besse-Patin, A., E. Montastier, C. Vinel, I. Castan-Laurell, K. Louche, C. Dray, D. Daviaud, et al. 2014. "Effect of Endurance Training on Skeletal Muscle Myokine Expression in Obese Men: Identification of Apelin as a Novel Myokine." *International Journal of Obesity (2005)* 38 (5): 707–13. <https://doi.org/10.1038/ijo.2013.158>.
- Bessone, Fernando, María Valeria Razori, and Marcelo G. Roma. 2019. "Molecular Pathways of Nonalcoholic Fatty Liver Disease Development and Progression." *Cellular and Molecular Life Sciences* 76 (1): 99–128. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2947-0>.
- Borges, Celina Carvalho, Andreza Fernandes Salles, Isabele Bringhamti, Carlos Alberto Mandarim-DE-Lacerda, and Marcia Barbosa Aguila. 2018. "Vitamin D Deficiency Increases Lipogenesis and Reduces Beta-Oxidation in the Liver of Diet-Induced Obese Mice." *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 64 (2): 106–15. <https://doi.org/10.3177/jnsv.64.106>.
- Bosma, Madeleen, Marco Gerling, Jenny Pasto, Anastasia Georgiadi, Evan Graham, Olga Shilkova, Yasunori Iwata, et al. 2016. "FNDC4 Acts as an Anti-Inflammatory Factor on Macrophages and Improves Colitis in Mice." *Nature Communications* 7 (April): 11314. <https://doi.org/10.1038/ncomms11314>.
- Boström, Pontus, Jun Wu, Mark P. Jedrychowski, Anisha Korde, Li Ye, James C. Lo, Kyle A. Rasbach, et al. 2012. "A PGC1- α -Dependent Myokine That Drives Brown-Fat-like Development of White Fat and Thermogenesis." *Nature* 481 (7382): 463–68. <https://doi.org/10.1038/nature10777>.

- Bosy-Westphal, Anja, Wiebke Braun, Viktoria Albrecht, and Manfred J. Müller. 2019. "Determinants of Ectopic Liver Fat in Metabolic Disease." *European Journal of Clinical Nutrition* 73 (2): 209–14. <https://doi.org/10.1038/s41430-018-0323-7>.
- Boursier, Jérôme, Olaf Mueller, Matthieu Barret, Mariana Machado, Lionel Fizan, Felix Araujo-Perez, Cynthia D. Guy, et al. 2016. "The Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease Is Associated with Gut Dysbiosis and Shift in the Metabolic Function of the Gut Microbiota." *Hepatology* 63 (3): 764–75. <https://doi.org/10.1002/hep.28356>.
- Bozdag, Gurkan, Sezcan Mumusoglu, Dila Zengin, Erdem Karabulut, and Bulent Okan Yildiz. 2016. "The Prevalence and Phenotypic Features of Polycystic Ovary Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Human Reproduction (Oxford, England)* 31 (12): 2841–55. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew218>.
- Brenmoehl, Julia, Elke Albrecht, Katrin Komolka, Lisa Schering, Martina Langhammer, Andreas Hoeflich, and Steffen Maak. 2014. "Irisin Is Elevated in Skeletal Muscle and Serum of Mice Immediately after Acute Exercise." *International Journal of Biological Sciences* 10 (3): 338–49. <https://doi.org/10.7150/ijbs.7972>.
- Bril, Fernando, Maryann Maximos, Paola Portillo-Sanchez, Diane Biernacki, Romina Lomonaco, Sreevidya Subbarayan, Mark Correa, Margaret Lo, Amitabh Suman, and Kenneth Cusi. 2015. "Relationship of Vitamin D with Insulin Resistance and Disease Severity in Non-Alcoholic Steatohepatitis." *Journal of Hepatology* 62 (2): 405–11. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.08.040>.
- Brondani, Letícia A., Gabriela Boelter, Taís S. Assmann, Cristiane B. Leitão, Luís H. Canani, and Daisy Crispim. 2015. "Irisin-Encoding Gene (FNDC5) Variant Is Associated with Changes in Blood Pressure and Lipid Profile in Type 2 Diabetic Women but Not in Men." *Metabolism: Clinical and Experimental* 64 (9): 952–57. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.05.005>.
- Brunault, Paul, Robert Courtois, Ashley N. Gearhardt, Philippe Gaillard, Kevin Journiac, Sarah Cathelain, Christian Réveillère, and Nicolas Ballon. 2017. "Validation of the French Version of the DSM-5 Yale Food Addiction Scale in a Nonclinical Sample." *Canadian Journal of Psychiatry. Revue Canadienne De Psychiatrie* 62 (3): 199–210. <https://doi.org/10.1177/0706743716673320>.
- Bugianesi, Elisabetta, Arthur J. McCullough, and Giulio Marchesini. 2005. "Insulin Resistance: A Metabolic Pathway to Chronic Liver Disease." *Hepatology* 42 (5): 987–1000. <https://doi.org/10.1002/hep.20920>.
- Cai, Jingjing, Xiao-Jing Zhang, and Hongliang Li. 2019. "The Role of Innate Immune Cells in Nonalcoholic Steatohepatitis." *Hepatology* 70 (3): 1026–37. <https://doi.org/10.1002/hep.30506>.
- Caligiuri, Alessandra, Alessandra Gentilini, and Fabio Marra. 2016. "Molecular Pathogenesis of NASH." *International Journal of Molecular Sciences* 17 (9). <https://doi.org/10.3390/ijms17091575>.
- Cao, Richard Y., Hongchao Zheng, Damian Redfearn, and Jian Yang. 2019. "FNDC5: A Novel Player in Metabolism and Metabolic Syndrome." *Biochimie* 158 (March): 111–16. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.01.001>.
- Caussy, Cyrielle, Meera Soni, Jeffrey Cui, Ricki Bettencourt, Nicholas Schork, Chi-Hua Chen, Mahdi Al Ikhwan, et al. n.d. "Nonalcoholic Fatty Liver Disease with Cirrhosis Increases Familial Risk for Advanced Fibrosis." *The Journal of Clinical Investigation* 127 (7): 2697–2704. <https://doi.org/10.1172/JCI93465>.
- Chalasani, Naga, Zobair Younossi, Joel E. Lavine, Michael Charlton, Kenneth Cusi, Mary Rinella, Stephen A. Harrison, Elizabeth M. Brunt, and Arun J. Sanyal. 2018. "The Diagnosis and Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Practice Guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 67 (1): 328–57. <https://doi.org/10.1002/hep.29367>.
- Chen, Guoxun, Guosheng Liang, Jiafu Ou, Joseph L. Goldstein, and Michael S. Brown. 2004. "Central Role for Liver X Receptor in Insulin-Mediated Activation of Srebp-1c Transcription and Stimulation of Fatty Acid Synthesis in Liver." *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (31): 11245–50. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404297101>.
- Chen, J. Q., L. J. Fang, K. X. Song, X. C. Wang, Y. Y. Huang, S. Y. Chai, L. Bu, and S. Qu. 2016. "Serum Irisin Level Is Higher and Related with Insulin in Acanthosis Nigricans-Related Obesity." *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes: Official Journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* 124 (3): 203–7. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1565060>.
- Chen, Ning, Qingxue Li, Jun Liu, and Shaohui Jia. 2016. "Irisin, an Exercise-Induced Myokine as a Metabolic Regulator: An Updated Narrative Review: Irisin as a Metabolic Regulator." *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 32 (1): 51–59. <https://doi.org/10.1002/dmrr.2660>.
- Choi, Eun Sung, Mi Kyung Kim, Min Kyung Song, Jeong Min Kim, Eun Soo Kim, Woo Jin Chung, Kyung Sik Park, Kwang Bum Cho, Jae Seok Hwang, and Byoung Kuk Jang. 2014. "Association between Serum Irisin Levels and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Health Screen Examinees." *PLOS ONE* 9 (10): e110680. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110680>.
- Choi, Se Hoon, Enjana Bylykbashi, Zena K. Chatila, Star W. Lee, Benjamin Pulli, Gregory D. Clemenson, Eunhee Kim, et al. 2018. "Combined Adult Neurogenesis and BDNF Mimic Exercise Effects on Cognition in an Alzheimer's Mouse Model." *Science* 361 (6406): eaan8821. <https://doi.org/10.1126/science.aan8821>.
- Cicione, Claudia, Chiara Degirolamo, and Antonio Moschetta. 2012. "Emerging Role of Fibroblast Growth Factors 15/19 and 21 as Metabolic Integrators in the Liver." *Hepatology* 56 (6): 2404–11. <https://doi.org/10.1002/hep.25929>.
- Corey, Kathleen E., and Naga Chalasani. 2014. "Management of Dyslipidemia as a Cardiovascular Risk Factor in Individuals With Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 12 (7): 1077–84. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2013.08.014>.
- Crujeiras, A. B., M. Pardo, and F. F. Casanueva. 2015. "Irisin: 'Fat' or Artefact." *Clinical Endocrinology* 82 (4): 467–74. <https://doi.org/10.1111/cen.12627>.
- Crujeiras, Ana B., M. Angeles Zulet, Patricia Lopez-Legarrea, Rocío de la Iglesia, María Pardo, Marcos C. Carreira, J. Alfredo Martínez, and Felipe F. Casanueva. 2014. "Association between Circulating Irisin Levels and the Promotion of Insulin Resistance during the Weight Maintenance Period after a Dietary Weight-Lowering Program in Obese Patients." *Metabolism* 63 (4): 520–31. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2013.12.007>.
- Czaja, Mark J., Wen-Xing Ding, Terrence M. Donohue, Scott L. Friedman, Jae-Sung Kim, Masaaki Komatsu, John J. Lemasters, et al. 2013. "Functions of Autophagy in Normal and Diseased Liver." *Autophagy* 9 (8): 1131–58. <https://doi.org/10.4161/auto.25063>.
- Dabbaghmanesh, Mohammad Hossein, Farideh Danafar, Ahad Eshraghian, and Gholamhossein Ranjbar Omrani. 2018. "Vitamin D Supplementation for the Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Randomized Double Blind Placebo Controlled Trial." *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews* 12 (4): 513–17. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.03.006>.
- Dai, Wenjie, Ling Ye, Aizhong Liu, Shi Wu Wen, Jing Deng, Xin Wu, and Zhiwei Lai. 2017. "Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus." *Medicine* 96 (39). <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000008179>.
- Dasarathy, Jaividhya, Pranav Periyalwar, Sanath Allampati, Vikram Bhinder, Carol Hawkins, Patricia Brandt, Amer Khiyami, Arthur J. McCullough, and Srinivasan Dasarathy. 2014. "Hypovitaminosis D Is Associated with Increased Whole Body Fat Mass and Greater Severity of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver* 34 (6): e118-127. <https://doi.org/10.1111/liv.12312>.
- Dawes, Aaron J., Melinda Maggard-Gibbons, Alicia R. Maher, Marika J. Booth, Isomi Miake-Lye, Jessica M. Beroes, and Paul G. Shekelle. 2016. "Mental Health Conditions Among Patients Seeking and Undergoing Bariatric Surgery: A Meta-Analysis." *JAMA* 315 (2): 150–63. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.18118>.

- Day, C. P., and O. F. James. 1998. "Steatohepatitis: A Tale of Two 'Hits'?" *Gastroenterology* 114 (4): 842–45. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(98\)70599-2](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(98)70599-2).
- Dentin, Renaud, Fadila Benhamed, Isabelle Hainault, Véronique Fauveau, Fabienne Foufelle, Jason R. B. Dyck, Jean Girard, and Catherine Postic. 2006. "Liver-Specific Inhibition of ChREBP Improves Hepatic Steatosis and Insulin Resistance in Ob/Ob Mice." *Diabetes* 55 (8): 2159–70. <https://doi.org/10.2337/db06-0200>.
- Derdak, Zoltan, Kristine A. Villegas, Ragheb Harb, Annie M. Wu, Aryanna Sousa, and Jack R. Wands. 2013. "Inhibition of P53 Attenuates Steatosis and Liver Injury in a Mouse Model of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *Journal of Hepatology* 58 (4): 785–91. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.11.042>.
- Diehl, Anna M., and Christopher Day. 2017. "Cause, Pathogenesis, and Treatment of Nonalcoholic Steatohepatitis." Edited by Dan L. Longo. *New England Journal of Medicine* 377 (21): 2063–72. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1503519>.
- Ding, Ning, Ruth T. Yu, Nanthakumar Subramaniam, Mara H. Sherman, Caroline Wilson, Renuka Rao, Mathias Leblanc, et al. 2013. "A Vitamin D Receptor/SMAD Genomic Circuit Gates Hepatic Fibrotic Response." *Cell* 153 (3): 601–13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.028>.
- Dong, S.-S., Y.-J. Zhang, Y.-X. Chen, S. Yao, R.-H. Hao, Y. Rong, H.-M. Niu, J.-B. Chen, Y. Guo, and T.-L. Yang. 2018. "Comprehensive Review and Annotation of Susceptibility SNPs Associated with Obesity-Related Traits." *Obesity Reviews* 19 (7): 917–30. <https://doi.org/10.1111/obr.12677>.
- Dongiovanni, Paola. 2013. "PNPLA3 I148M Polymorphism and Progressive Liver Disease." *World Journal of Gastroenterology* 19 (41): 6969. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i41.6969>.
- Dongiovanni, Paola, Salvatore Petta, Cristina Maglio, Anna Ludovica Fracanzani, Rosaria Pipitone, Enrico Mozzi, Benedetta Maria Motta, et al. 2015. "Transmembrane 6 Superfamily Member 2 Gene Variant Disentangles Nonalcoholic Steatohepatitis from Cardiovascular Disease." *Hepatology* 61 (2): 506–14. <https://doi.org/10.1002/hep.27490>.
- Donnelly, Kerry L., Coleman I. Smith, Sarah J. Schwarzenberg, Jose Jessurun, Mark D. Boldt, and Elizabeth J. Parks. 2005. "Sources of Fatty Acids Stored in Liver and Secreted via Lipoproteins in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *The Journal of Clinical Investigation* 115 (5): 1343–51. <https://doi.org/10.1172/JCI23621>.
- Eliades, M., E. Spyrou, N. Agrawal, M. Lazo, F. L. Brancati, J. J. Potter, A. A. Koteish, J. M. Clark, E. Guallar, and R. Hernaez. 2013. "Meta-Analysis: Vitamin D and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 38 (3): 246–54. <https://doi.org/10.1111/apt.12377>.
- Elsen, Manuela, Silja Raschke, and Jürgen Eckel. 2014. "Browning of White Fat: Does Irisin Play a Role in Humans?" *The Journal of Endocrinology* 222 (1): R25-38. <https://doi.org/10.1530/JOE-14-0189>.
- Eslam, Mohammed, Luca Valenti, and Stefano Romeo. 2018. "Genetics and Epigenetics of NAFLD and NASH: Clinical Impact." *Journal of Hepatology* 68 (2): 268–79. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.09.003>.
- European Association for the Study of the Liver (EASL), European Association for the Study of Diabetes (EASD), and European Association for the Study of Obesity (EASO). 2016. "EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the Management of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *Journal of Hepatology* 64 (6): 1388–1402. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.11.004>.
- Fan, Jian-Gao, and Liang Qiao. 2009. "Commonly Used Animal Models of Non-Alcoholic Steatohepatitis." *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International: HBPD INT* 8 (3): 233–40.
- Farooqi, I. Sadaf, and Stephen O'Rahilly. 2005. "Monogenic Obesity in Humans." *Annual Review of Medicine* 56 (1): 443–58. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.56.062904.144924>.

- Febbraio, Mark A., and Bente Klarlund Pedersen. 2002. "Muscle-Derived Interleukin-6: Mechanisms for Activation and Possible Biological Roles." *The FASEB Journal* 16 (11): 1335–47. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0876rev>.
- Febbraio, Mark A., Saskia Reibe, Shabnam Shalapour, Geraldine J. Ooi, Matthew J. Watt, and Michael Karin. 2019. "Preclinical Models for Studying NASH-Driven HCC: How Useful Are They?" *Cell Metabolism* 29 (1): 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.10.012>.
- Friedman, Scott L., Brent A. Neuschwander-Tetri, Mary Rinella, and Arun J. Sanyal. 2018. "Mechanisms of NAFLD Development and Therapeutic Strategies." *Nature Medicine* 24 (7): 908–22. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0104-9>.
- Friedman, Scott L., Vlad Ratziu, Stephen A. Harrison, Manal F. Abdelmalek, Guruprasad P. Aithal, Juan Caballeria, Sven Francque, et al. 2018. "A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Cenicriviroc for Treatment of Nonalcoholic Steatohepatitis with Fibrosis." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 67 (5): 1754–67. <https://doi.org/10.1002/hep.29477>.
- Gaggini, Melania, Manuela Cabiati, Serena Del Turco, Teresa Navarra, Paolo De Simone, Franco Filippini, Silvia Del Ry, Amalia Gastaldelli, and Giuseppina Basta. 2017. "Increased FNDC5/Irisin Expression in Human Hepatocellular Carcinoma." *Peptides* 88: 62–66. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2016.12.014>.
- Gandhi, Chandrashekhar R. 2017. "Hepatic Stellate Cell Activation and Pro-Fibrogenic Signals." *Journal of Hepatology* 67 (5): 1104–5. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.06.001>.
- Garidou, Lucile, Céline Pomié, Pascale Klopp, Aurélie Waget, Julie Charpentier, Meryem Aloulou, Anaïs Giry, et al. 2015. "The Gut Microbiota Regulates Intestinal CD4 T Cells Expressing ROR γ t and Controls Metabolic Disease." *Cell Metabolism* 22 (1): 100–112. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.06.001>.
- Ge, X, D Sathiakumar, B J G Lua, H Kukreti, M Lee, and C McFarlane. 2016. "Myostatin Signals through MiR-34a to Regulate Fndc5 Expression and Browning of White Adipocytes." *International Journal of Obesity*, June. <https://doi.org/10.1038/ijo.2016.110>.
- Gearhardt, Ashley N., William R. Corbin, and Kelly D. Brownell. 2016. "Development of the Yale Food Addiction Scale Version 2.0." *Psychology of Addictive Behaviors: Journal of the Society of Psychologists in Addictive Behaviors* 30 (1): 113–21. <https://doi.org/10.1037/adb0000136>.
- Geier, Andreas, Mareile Eichinger, Guido Stirnimann, David Semela, Fabian Tay, Burkhardt Seifert, Oliver Tschopp, et al. 2018. "Treatment of Non-Alcoholic Steatohepatitis Patients with Vitamin D: A Double-Blinded, Randomized, Placebo-Controlled Pilot Study." *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 53 (9): 1114–20. <https://doi.org/10.1080/00365521.2018.1501091>.
- Gepner, Yftach, Ilan Shelef, Oded Komy, Noa Cohen, Dan Schwarzfuchs, Nitzan Bril, Michal Rein, et al. 2019. "The Beneficial Effects of Mediterranean Diet over Low-Fat Diet May Be Mediated by Decreasing Hepatic Fat Content." *Journal of Hepatology* 71 (2): 379–88. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.04.013>.
- Gill, Hartej, Simratdeep Kang, Yena Lee, Joshua D. Rosenblat, Elisa Brietzke, Hannah Zuckerman, and Roger S. McIntyre. 2019. "The Long-Term Effect of Bariatric Surgery on Depression and Anxiety." *Journal of Affective Disorders* 246: 886–94. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2018.12.113>.
- González-Rodríguez, A., R. Mayoral, N. Agra, M. P. Valdecantos, V. Pardo, M. E. Miquilena-Colina, J. Vargas-Castrillón, et al. 2014. "Impaired Autophagic Flux Is Associated with Increased Endoplasmic Reticulum Stress during the Development of NAFLD." *Cell Death & Disease* 5 (April): e1179. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.162>.
- Gourdy, Pierre, Maeva Guillaume, Coralie Fontaine, Marine Adlanmerini, Alexandra Montagner, Henrik Laurell, Françoise Lenfant, and Jean-François Arnal. 2018. "Estrogen Receptor Subcellular Localization and Cardiometabolism." *Molecular Metabolism* 15 (May): 56–69. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.05.009>.

- Greenhill, Claire. 2019. "Irisin Receptor in Osteocytes Identified." *Nature Reviews Endocrinology* 15 (2): 63–63. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0151-9>.
- Gual, Philippe, H el ene Gilgenkrantz, and Sophie Lotersztajn. 2017a. "Autophagy in chronic liver diseases: a friend rather than a foe?." *Medecine Sciences: M/S* 33 (3): 252–59. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173303011>.
- . 2017b. "Autophagy in Chronic Liver Diseases: The Two Faces of Janus." *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 312 (3): C263–73. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00295.2016>.
- Guilford, Brianne L., Jake C. Parson, Caleb W. Grote, Stephanie N. Vick, Janelle M. Ryals, and Douglas E. Wright. 2017. "Increased FNDC5 Is Associated with Insulin Resistance in High Fat-fed Mice." *Physiological Reports* 5 (13). <https://doi.org/10.14814/phy2.13319>.
- Guillaume, Maeva, Elodie Riant, Aur elie Fabre, Isabelle Raymond-Letron, Melissa Buscato, Morgane Davezac, Blandine Tramunt, et al. 2019. "Selective Liver Estrogen Receptor α Modulation Prevents Steatosis, Diabetes, and Obesity Through the Anorectic Growth Differentiation Factor 15 Hepatokine in Mice." *Hepatology Communications* 3 (7): 908–24. <https://doi.org/10.1002/hep4.1363>.
- Ha, Yeonjung, Seong Gyu Hwang, and Kyu Sung Rim. 2017. "The Association between Vitamin D Insufficiency and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Population-Based Study." *Nutrients* 9 (8). <https://doi.org/10.3390/nu9080806>.
- Hammoutene, Adel, and Pierre-Emmanuel Rautou. 2019. "Role of Liver Sinusoidal Endothelial Cells in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *Journal of Hepatology* 70 (6): 1278–91. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.02.012>.
- Handschin, Christoph, and Bruce M. Spiegelman. 2008. "The Role of Exercise and PGC1alpha in Inflammation and Chronic Disease." *Nature* 454 (7203): 463–69. <https://doi.org/10.1038/nature07206>.
- Hansen, Henrik H., Michael Feigh, Sanne S. Veidal, Kristoffer T. Rigbolt, Niels Vrang, and Keld Fosgerau. 2017. "Mouse Models of Nonalcoholic Steatohepatitis in Preclinical Drug Development." *Drug Discovery Today* 22 (11): 1707–18. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.06.007>.
- Harrison, Stephen A., Manal F. Abdelmalek, Stephen Caldwell, Mitchell L. Shiffman, Anna Mae Diehl, Reem Ghalib, Eric J. Lawitz, et al. 2018. "Simtuzumab Is Ineffective for Patients With Bridging Fibrosis or Compensated Cirrhosis Caused by Nonalcoholic Steatohepatitis." *Gastroenterology* 155 (4): 1140–53. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.07.006>.
- Harrison, Stephen A., Mary E. Rinella, Manal F. Abdelmalek, James F. Trotter, Angelo H. Paredes, Hays L. Arnold, Marcelo Kugelmas, et al. 2018. "NGM282 for Treatment of Non-Alcoholic Steatohepatitis: A Multicentre, Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 2 Trial." *Lancet (London, England)* 391 (10126): 1174–85. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30474-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30474-4).
- He, Kan, Guoying Wu, Wen-Xing Li, Daogang Guan, Wenwen Lv, Mengting Gong, Shoudong Ye, and Aiping Lu. 2017. "A Transcriptomic Study of Myogenic Differentiation under the Overexpression of PPAR γ by RNA-Seq." *Scientific Reports* 7 (November). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14275-2>.
- Hegde, Pushpa, Emmanuel Weiss, Val erie Paradis, Jinghong Wan, Morgane Mabire, Sukriti Sukriti, Pierre-Emmanuel Rautou, et al. 2018. "Mucosal-Associated Invariant T Cells Are a Profibrogenic Immune Cell Population in the Liver." *Nature Communications* 9 (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04450-y>.
- Heine, P. A., J. A. Taylor, G. A. Iwamoto, D. B. Lubahn, and P. S. Cooke. 2000. "Increased Adipose Tissue in Male and Female Estrogen Receptor-Alpha Knockout Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (23): 12729–34. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.23.12729>.
- Heymsfield, Steven B., and Thomas A. Wadden. 2017. "Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity." Edited by Dan L. Longo. *New England Journal of Medicine* 376 (3): 254–66. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1514009>.

- Hollister, Emily B., Chunxu Gao, and James Versalovic. 2014. "Compositional and Functional Features of the Gastrointestinal Microbiome and Their Effects on Human Health." *Gastroenterology* 146 (6): 1449–58. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.01.052>.
- Hsu, Shu-Hao, Bo Wang, Janaiah Kota, Jianhua Yu, Stefan Costinean, Huban Kutay, Lianbo Yu, et al. 2012. "Essential Metabolic, Anti-Inflammatory, and Anti-Tumorigenic Functions of MiR-122 in Liver." *The Journal of Clinical Investigation* 122 (8): 2871–83. <https://doi.org/10.1172/JCI63539>.
- Hu, Wenchao, Rui Wang, Jun Li, Jie Zhang, and Wenhui Wang. 2016. "Association of Irisin Concentrations with the Presence of Diabetic Nephropathy and Retinopathy." *Annals of Clinical Biochemistry* 53 (Pt 1): 67–74. <https://doi.org/10.1177/0004563215582072>.
- Hudson, James I., Eva Hiripi, Harrison G. Pope, and Ronald C. Kessler. 2007. "The Prevalence and Correlates of Eating Disorders in the National Comorbidity Survey Replication." *Biological Psychiatry* 61 (3): 348–58. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.03.040>.
- Hudson, James I., Justine K Lalonde, Caitlin E Coit, Ming T Tsuang, Susan L McElroy, Scott J Crow, Cynthia M Bulik, et al. 2010. "Longitudinal Study of the Diagnosis of Components of the Metabolic Syndrome in Individuals with Binge-Eating Disorder." *The American Journal of Clinical Nutrition* 91 (6): 1568–73. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2010.29203>.
- Huh, J. Y., F. Dincer, E. Mesfum, and C. S. Mantzoros. 2014. "Irisin Stimulates Muscle Growth-Related Genes and Regulates Adipocyte Differentiation and Metabolism in Humans." *International Journal of Obesity (2005)* 38 (12): 1538–44. <https://doi.org/10.1038/ijo.2014.42>.
- Huh, Joo Young, Aikaterina Siopi, Vassilis Mougios, Kyung Hee Park, and Christos S. Mantzoros. 2015. "Irisin in Response to Exercise in Humans with and without Metabolic Syndrome." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 100 (3): E453–457. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-2416>.
- Huth, Claire, Marie-Julie Dubois, André Marette, Angelo Tremblay, S. John Weisnagel, Michel Lacaille, Pascale Mauriège, and Denis R. Joanisse. 2015. "Irisin Is More Strongly Predicted by Muscle Oxidative Potential than Adiposity in Non-Diabetic Men." *Journal of Physiology and Biochemistry* 71 (3): 559–68. <https://doi.org/10.1007/s13105-015-0402-3>.
- Hwang, You-Cheol, Won Seon Jeon, Cheol-Young Park, and Byung-Soo Youn. 2016. "The Ratio of Skeletal Muscle Mass to Visceral Fat Area Is a Main Determinant Linking Circulating Irisin to Metabolic Phenotype." *Cardiovascular Diabetology* 15 (January). <https://doi.org/10.1186/s12933-015-0319-8>.
- Ibrahim, Samar H., Petra Hirsova, and Gregory J. Gores. 2018. "Non-Alcoholic Steatohepatitis Pathogenesis: Sublethal Hepatocyte Injury as a Driver of Liver Inflammation." *Gut* 67 (5): 963–72. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-315691>.
- Ito, Makoto, Jun Suzuki, Shigeharu Tsujioka, Minoru Sasaki, Akira Gomori, Takashi Shirakura, Hiroyasu Hirose, et al. 2007. "Longitudinal Analysis of Murine Steatohepatitis Model Induced by Chronic Exposure to High-Fat Diet." *Hepatology Research: The Official Journal of the Japan Society of Hepatology* 37 (1): 50–57. <https://doi.org/10.1111/j.1872-034X.2007.00008.x>.
- Jacobs, Ans, Anne-Sophie Warda, Jef Verbeek, David Cassiman, and Pieter Spincemaille. 2016. "An Overview of Mouse Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: From Past to Present." *Current Protocols in Mouse Biology* 6 (2): 185–200. <https://doi.org/10.1002/cpmo.3>.
- Jaruvongvanich, Veeravich, Wasin Ahuja, Anawin Sanguankeo, Karn Wijarnpreecha, and Sikarin Upala. 2017. "Vitamin D and Histologic Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Digestive and Liver Disease* 49 (6): 618–22. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2017.02.003>.
- Jayakumar, Saumya, and Rohit Loomba. 2019. "Review Article: Emerging Role of the Gut Microbiome in the Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Potential Therapeutic Implications." *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 50 (2): 144–58. <https://doi.org/10.1111/apt.15314>.

- Jedrychowski, Mark P., Christiane D. Wrann, Joao A. Paulo, Kaitlyn K. Gerber, John Szpyt, Matthew M. Robinson, K. Sreekumaran Nair, Steven P. Gygi, and Bruce M. Spiegelman. 2015. "Detection and Quantitation of Circulating Human Irisin by Tandem Mass Spectrometry." *Cell Metabolism* 22 (4): 734–40. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.08.001>.
- Jeremic, Nevena, Pankaj Chaturvedi, and Suresh C. Tyagi. 2017. "Browning of White Fat: Novel Insight Into Factors, Mechanisms, and Therapeutics." *Journal of Cellular Physiology* 232 (1): 61–68. <https://doi.org/10.1002/jcp.25450>.
- Jin, Shanshan, Suwen Jiang, and Airong Hu. 2018. "Association between Obstructive Sleep Apnea and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Sleep and Breathing* 22 (3): 841–51. <https://doi.org/10.1007/s11325-018-1625-7>.
- Kaneda, Hiroyuki, Toshiaki Nakajima, Akiko Haruyama, Ikuko Shibasaki, Takaaki Hasegawa, Tatsuya Sawaguchi, Toshiyuki Kuwata, et al. 2018. "Association of Serum Concentrations of Irisin and the Adipokines Adiponectin and Leptin with Epicardial Fat in Cardiovascular Surgery Patients." *PloS One* 13 (8): e0201499. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201499>.
- Katsiki, Niki, Dimitri P. Mikhailidis, and Christos S. Mantzoros. 2016. "Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Dyslipidemia: An Update." *Metabolism: Clinical and Experimental* 65 (8): 1109–23. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2016.05.003>.
- Kaur, Y., R. J. de Souza, W. T. Gibson, and D. Meyre. 2017. "A Systematic Review of Genetic Syndromes with Obesity." *Obesity Reviews* 18 (6): 603–34. <https://doi.org/10.1111/obr.12531>.
- Kazankov, Konstantin, Simon Mark Dahl Jørgensen, Karen Louise Thomsen, Holger Jon Møller, Hendrik Vilstrup, Jacob George, Detlef Schuppan, and Henning Grønbaek. 2019. "The Role of Macrophages in Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis." *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 16 (3): 145–59. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0082-x>.
- Kersten, Sander, and Rinke Stienstra. 2017. "The Role and Regulation of the Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha in Human Liver." *Biochimie* 136 (May): 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.12.019>.
- Khan, Reenam S., Fernando Bril, Kenneth Cusi, and Philip N. Newsome. 2019. "Modulation of Insulin Resistance in Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 70 (2): 711–24. <https://doi.org/10.1002/hep.30429>.
- Khidr, Emad Gamil, Shawkey Saddik Ali, Mostafa Mahmoud Elshafey, and Olfat Ahmed Fawzy. 2017. "Association of Irisin and FNDC5 Rs16835198 G > T Gene Polymorphism with Type 2 Diabetes Mellitus and Diabetic Nephropathy. An Egyptian Pilot Study." *Gene* 626 (August): 26–31. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.05.010>.
- Kim, Hyeonwoo, Christiane D. Wrann, Mark Jedrychowski, Sara Vidoni, Yukiko Kitase, Kenichi Nagano, Chenhe Zhou, et al. 2018. "Irisin Mediates Effects on Bone and Fat via AV Integrin Receptors." *Cell* 175 (7): 1756–1768.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.025>.
- Kim, Hyoung Kyu, Yu Jeong Jeong, In-Sung Song, Yeon Hee Noh, Kyo Won Seo, Min Kim, and Jin Han. 2017. "Glucocorticoid Receptor Positively Regulates Transcription of FNDC5 in the Liver." *Scientific Reports* 7: 43296. <https://doi.org/10.1038/srep43296>.
- Kim, J. J., D. Kim, J. Y. Yim, J. H. Kang, K. H. Han, S. M. Kim, K. R. Hwang, et al. 2017. "Polycystic Ovary Syndrome with Hyperandrogenism as a Risk Factor for Non-Obese Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 45 (11): 1403–12. <https://doi.org/10.1111/apt.14058>.
- Kim, Yong Ook, Yury Popov, and Detlef Schuppan. 2017. "Optimized Mouse Models for Liver Fibrosis." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1559: 279–96. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6786-5_19.
- Kitson, Matthew T., Alan Pham, Adam Gordon, William Kemp, and Stuart K. Roberts. 2016. "High-Dose Vitamin D Supplementation and Liver Histology in NASH." *Gut* 65 (4): 717–18. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310417>.

- Klein, Anders B., Rebecca Williamson, Martin A. Santini, Christoffer Clemmensen, Anders Ettrup, Maribel Rios, Gitte M. Knudsen, and Susana Aznar. 2011. "Blood BDNF Concentrations Reflect Brain-Tissue BDNF Levels across Species." *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 14 (3): 347–53. <https://doi.org/10.1017/S1461145710000738>.
- Kohli, Rohit, Michelle Kirby, Stavra A. Xanthakos, Samir Softic, Ariel E. Feldstein, Vijay Saxena, Peter H. Tang, et al. 2010. "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 (Baltimore, Md.)* 52 (3): 934–44. <https://doi.org/10.1002/hep.23797>.
- Koliaki, Chrysi, Julia Szendroedi, Kirti Kaul, Tomas Jelenik, Peter Nowotny, Frank Jankowiak, Christian Herder, et al. 2015. "Adaptation of Hepatic Mitochondrial Function in Humans with Non-Alcoholic Fatty Liver Is Lost in Steatohepatitis." *Cell Metabolism* 21 (5): 739–46. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.04.004>.
- Kolodziejczyk, Aleksandra A, Danping Zheng, Oren Shibolet, and Eran Elinav. 2019. "The Role of the Microbiome in NAFLD and NASH." *EMBO Molecular Medicine* 11 (2). <https://doi.org/10.15252/emmm.201809302>.
- Konstantakis, Christos, Paraskevi Tselekouni, Maria Kalafateli, and Christos Triantos. 2016. "Vitamin D Deficiency in Patients with Liver Cirrhosis." *Annals of Gastroenterology: Quarterly Publication of the Hellenic Society of Gastroenterology* 29 (3): 297–306. <https://doi.org/10.20524/aog.2016.0037>.
- Kootte, Ruud S., Evgeni Levin, Jarkko Salojärvi, Loek P. Smits, Annick V. Hartstra, Shanti D. Udayappan, Gerben Hermes, et al. 2017. "Improvement of Insulin Sensitivity after Lean Donor Feces in Metabolic Syndrome Is Driven by Baseline Intestinal Microbiota Composition." *Cell Metabolism* 26 (4): 611-619.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.09.008>.
- Kozlitina, Julia, Eriks Smagris, Stefan Stender, Børge G. Nordestgaard, Heather H. Zhou, Anne Tybjærg-Hansen, Thomas F. Vogt, Helen H. Hobbs, and Jonathan C. Cohen. 2014. "Exome-Wide Association Study Identifies a TM6SF2 Variant That Confers Susceptibility to Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Nature Genetics* 46 (4): 352–56. <https://doi.org/10.1038/ng.2901>.
- Kurdiova, Timea, Miroslav Balaz, Alexander Mayer, Denisa Maderova, Vitazoslav Belan, Christian Wolfrum, Jozef Ukropec, and Barbara Ukropcova. 2014. "Exercise-Mimicking Treatment Fails to Increase Fndc5 mRNA & Irisin Secretion in Primary Human Myotubes." *Peptides* 56 (June): 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.03.003>.
- Kurdiova, Timea, Miroslav Balaz, Marek Vician, Denisa Maderova, Miroslav Vlcek, Ladislav Valkovic, Miroslav Srbecky, et al. 2014. "Effects of Obesity, Diabetes and Exercise on Fndc5 Gene Expression and Irisin Release in Human Skeletal Muscle and Adipose Tissue: In Vivo and in Vitro Studies: Human Fndc5 /Irisin in Prediabetes, Type 2 Diabetes and Exercise." *The Journal of Physiology* 592 (5): 1091–1107. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.264655>.
- Kwon, Hyunjoo, Kyoungsub Song, Chang Han, Weina Chen, Ying Wang, Srikanta Dash, Kyu Lim, and Tong Wu. 2016. "Inhibition of Hedgehog Signaling Ameliorates Hepatic Inflammation in Mice with Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 63 (4): 1155–69. <https://doi.org/10.1002/hep.28289>.
- Lassailly, Guillaume, Robert Caiazzo, David Buob, Marie Pigeyre, H el ene Verkindt, Julien Labreuche, Violeta Raverdy, et al. 2015. "Bariatric Surgery Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis in Morbidly Obese Patients." *Gastroenterology* 149 (2): 379–88; quiz e15-16. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.04.014>.
- Lavallard, Vanessa J., and Philippe Gual. 2014. "Autophagy and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *BioMed Research International* 2014: 1–13. <https://doi.org/10.1155/2014/120179>.
- Lavallard, Vanessa J., Alfred J. Meijer, Patrice Codogno, and Philippe Gual. 2012. "Autophagy, Signaling and Obesity." *Pharmacological Research, SI:Organ-specific autophagy*, 66 (6): 513–25. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.09.003>.

- Le Chatelier, Emmanuelle, Trine Nielsen, Junjie Qin, Edi Prifti, Falk Hildebrand, Gwen Falony, Mathieu Almeida, et al. 2013. "Richness of Human Gut Microbiome Correlates with Metabolic Markers." *Nature* 500 (7464): 541–46. <https://doi.org/10.1038/nature12506>.
- Lebeaupin, C., E. Proics, C. H. D. de Bieville, D. Rousseau, S. Bonnafous, S. Patouraux, G. Adam, et al. 2015. "ER Stress Induces NLRP3 Inflammasome Activation and Hepatocyte Death." *Cell Death & Disease* 6 (September): e1879. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.248>.
- Lebeaupin, Cynthia, Deborah Vallée, Younis Hazari, Claudio Hetz, Eric Chevet, and Béatrice Bailly-Maitre. 2018. "Endoplasmic Reticulum Stress Signalling and the Pathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *Journal of Hepatology* 69 (4): 927–47. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.06.008>.
- Lee, Hye Jeong, Jung Ok Lee, Nami Kim, Joong Kwan Kim, Hyung Ip Kim, Yong Woo Lee, Su Jin Kim, et al. 2015. "Irisin, a Novel Myokine, Regulates Glucose Uptake in Skeletal Muscle Cells via AMPK." *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 29 (6): 873–81. <https://doi.org/10.1210/me.2014-1353>.
- Lee, Paul, Joyce D. Linderman, Sheila Smith, Robert J. Brychta, Juan Wang, Christopher Idelson, Rachel M. Perron, et al. 2014. "Irisin and FGF21 Are Cold-Induced Endocrine Activators of Brown Fat Function in Humans." *Cell Metabolism* 19 (2): 302–9. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.12.017>.
- Lelouvier, Benjamin, Florence Servant, Sandrine Païssé, Anne-Claire Brunet, Salah Benyahya, Matteo Serino, Carine Valle, et al. 2016. "Changes in Blood Microbiota Profiles Associated with Liver Fibrosis in Obese Patients: A Pilot Analysis." *Hepatology* 64 (6): 2015–27. <https://doi.org/10.1002/hep.28829>.
- Leung, Christopher, Leni Rivera, John B. Furness, and Peter W. Angus. 2016. "The Role of the Gut Microbiota in NAFLD." *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 13 (7): 412–25. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.85>.
- Li, Hong, Jing Shen, Tong Wu, Jiangying Kuang, Qinhui Liu, Shihai Cheng, Shiyun Pu, et al. 2019. "Irisin Is Controlled by Farnesoid X Receptor and Regulates Cholesterol Homeostasis." *Frontiers in Pharmacology* 10 (May). <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00548>.
- Li, Ru-Li, Si-Si Wu, Yao Wu, Xiao-Xiao Wang, Hong-Ying Chen, Juan-Juan Xin, He Li, et al. 2018. "Irisin Alleviates Pressure Overload-Induced Cardiac Hypertrophy by Inducing Protective Autophagy via MTOR-Independent Activation of the AMPK-ULK1 Pathway." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 121: 242–55. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2018.07.250>.
- Lieber, Charles S., Maria A. Leo, Ki M. Mak, Youqing Xu, Qi Cao, Chaoling Ren, Anatoly Ponomarenko, and Leonore M. DeCarli. 2004. "Model of Nonalcoholic Steatohepatitis." *The American Journal of Clinical Nutrition* 79 (3): 502–9. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.3.502>.
- Liu, Jian-Jun, Sylvia Liu, Melvin D.S. Wong, Clara S.H. Tan, Subramaniam Tavintharan, Chee Fang Sum, and Su Chi Lim. 2014. "Relationship between Circulating Irisin, Renal Function and Body Composition in Type 2 Diabetes." *Journal of Diabetes and Its Complications* 28 (2): 208–13. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2013.09.011>.
- Liu, Jian-Jun, Melvin D. S. Wong, Wan Ching Toy, Clara S. H. Tan, Sylvia Liu, Xiao Wei Ng, Subramaniam Tavintharan, Chee Fang Sum, and Su Chi Lim. 2013. "Lower Circulating Irisin Is Associated with Type 2 Diabetes Mellitus." *Journal of Diabetes and Its Complications* 27 (4): 365–69. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2013.03.002>.
- Liu, Shiwei, Fang Du, Xin Li, Mingming Wang, Ruixue Duan, Jiabin Zhang, Yaru Wu, and Qi Zhang. 2017. "Effects and Underlying Mechanisms of Irisin on the Proliferation and Apoptosis of Pancreatic β Cells." *PloS One* 12 (4): e0175498. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175498>.
- Liu, Tong-Yan, Chang-Xiang Shi, Run Gao, Hai-Jian Sun, Xiao-Qing Xiong, Lei Ding, Qi Chen, et al. 2015. "Irisin Inhibits Hepatic Gluconeogenesis and Increases Glycogen Synthesis via the PI3K/Akt Pathway in Type 2 Diabetic Mice and Hepatocytes." *Clinical Science (London, England: 1979)* 129 (10): 839–50. <https://doi.org/10.1042/CS20150009>.

- Liu, Tong-Yan, Xiao-Qing Xiong, Xing-Sheng Ren, Ming-Xia Zhao, Chang-Xiang Shi, Jue-Jin Wang, Ye-Bo Zhou, et al. 2016. "FNDC5 Alleviates Hepatosteatosis by Restoring AMPK/MTOR-Mediated Autophagy, Fatty Acid Oxidation and Lipogenesis in Mice." *Diabetes*, db160356.
- Liu, Yang-Lin, Helen L. Reeves, Alastair D. Burt, Dina Tiniakos, Stuart McPherson, Julian B. S. Leathart, Michael E. D. Allison, et al. 2014. "TM6SF2 Rs58542926 Influences Hepatic Fibrosis Progression in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *Nature Communications* 5 (June): 4309. <https://doi.org/10.1038/ncomms5309>.
- Löffler, Dennis, Ulrike Müller, Kathrin Scheuermann, Daniela Friebe, Julia Gesing, Julia Bielitz, Sandra Erbs, et al. 2015. "Serum Irisin Levels Are Regulated by Acute Strenuous Exercise." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 100 (4): 1289–99. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-2932>.
- Lonardo, Amedeo, Fabio Nascimbeni, Alessandro Mantovani, and Giovanni Targher. 2018. "Hypertension, Diabetes, Atherosclerosis and NASH: Cause or Consequence?" *Journal of Hepatology* 68 (2): 335–52. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.09.021>.
- Loomba, Rohit, Eric Lawitz, Parvez S. Mantry, Saumya Jayakumar, Stephen H. Caldwell, Hays Arnold, Anna Mae Diehl, et al. 2018. "The ASK1 Inhibitor Selonsertib in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis: A Randomized, Phase 2 Trial." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 67 (2): 549–59. <https://doi.org/10.1002/hep.29514>.
- Loomba, Rohit, Victor Seguritan, Weizhong Li, Tao Long, Niels Klitgord, Archana Bhatt, Parambir Singh Dulai, et al. 2017. "Gut Microbiome-Based Metagenomic Signature for Non-Invasive Detection of Advanced Fibrosis in Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Cell Metabolism* 25 (5): 1054-1062.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.04.001>.
- Lourenco, Mychael V., Rudimar L. Frozza, Guilherme B. de Freitas, Hong Zhang, Grasielle C. Kincheski, Felipe C. Ribeiro, Rafaella A. Gonçalves, et al. 2019. "Exercise-Linked FNDC5/Irisin Rescues Synaptic Plasticity and Memory Defects in Alzheimer's Models." *Nature Medicine* 25 (1): 165–75. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0275-4>.
- Luci, Carmelo, Elodie Vieira, Thibaut Perchet, Philippe Gual, and Rachel Golub. 2019. "Natural Killer Cells and Type 1 Innate Lymphoid Cells Are New Actors in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *Frontiers in Immunology* 10 (May). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01192>.
- Luukkonen, Panu K., You Zhou, Tuulia Hyötyläinen, Marja Leivonen, Johanna Arola, Marju Orho-Melander, Matej Orešič, and Hannele Yki-Järvinen. 2016. "The MBOAT7 Variant Rs641738 Alters Hepatic Phosphatidylinositols and Increases Severity of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Humans." *Journal of Hepatology* 65 (6): 1263–65. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.07.045>.
- Luz, Felipe Q. da, Phillipa Hay, Stephen Touyz, and Amanda Sainsbury. 2018. "Obesity with Comorbid Eating Disorders: Associated Health Risks and Treatment Approaches." *Nutrients* 10 (7). <https://doi.org/10.3390/nu10070829>.
- Ma, Junli, Qihang Zhou, and Houkai Li. 2017. "Gut Microbiota and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Insights on Mechanisms and Therapy." *Nutrients* 9 (10). <https://doi.org/10.3390/nu9101124>.
- Machado, Mariana Verdelho, and Anna Mae Diehl. 2016. "Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis." *Gastroenterology* 150 (8): 1769–77. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.02.066>.
- Malhi, Harmeet, and Gregory J. Gores. 2008. "Cellular and Molecular Mechanisms of Liver Injury." *Gastroenterology* 134 (6): 1641–54. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.03.002>.
- Mancina, Rosellina Margherita, Paola Dongiovanni, Salvatore Petta, Piero Pingitore, Marica Meroni, Raffaella Rametta, Jan Borén, et al. 2016. "The MBOAT7-TMC4 Variant Rs641738 Increases Risk of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Individuals of European Descent." *Gastroenterology* 150 (5): 1219-1230.e6. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.01.032>.

- Mantovani, Alessandro, Christopher D. Byrne, Enzo Bonora, and Giovanni Targher. 2018. "Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Risk of Incident Type 2 Diabetes: A Meta-Analysis." *Diabetes Care* 41 (2): 372–82. <https://doi.org/10.2337/dc17-1902>.
- Marken Lichtenbelt, Wouter D. van, Joost W. Vanhommerig, Nanda M. Smulders, Jamie M. A. F. L. Drossaerts, Gerrit J. Kemerink, Nicole D. Bouvy, Patrick Schrauwen, and G. J. Jaap Teule. 2009. "Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men." *The New England Journal of Medicine* 360 (15): 1500–1508. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808718>.
- Marques, Adilson, Miguel Peralta, Ana Naia, Nuno Loureiro, and Margarida Gaspar de Matos. 2018. "Prevalence of Adult Overweight and Obesity in 20 European Countries, 2014." *European Journal of Public Health* 28 (2): 295–300. <https://doi.org/10.1093/eurpub/ckx143>.
- Marra, Fabio, and Gianluca Svegliati-Baroni. 2018. "Lipotoxicity and the Gut-Liver Axis in NASH Pathogenesis." *Journal of Hepatology* 68 (2): 280–95. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.11.014>.
- Mather, Amber A., Brian J. Cox, Murray W. Enns, and Jitender Sareen. 2009. "Associations of Obesity with Psychiatric Disorders and Suicidal Behaviors in a Nationally Representative Sample." *Journal of Psychosomatic Research* 66 (4): 277–85. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychores.2008.09.008>.
- Matsuo, Yae, Konstanze Gleitsmann, Norman Mangner, Sarah Werner, Tina Fischer, T Scott Bowen, Angela Kricke, et al. 2015. "Fibronectin Type III Domain Containing 5 Expression in Skeletal Muscle in Chronic Heart Failure—Relevance of Inflammatory Cytokines." *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 6 (1): 62–72. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12006>.
- Mazurek, Tomasz, LiFeng Zhang, Andrew Zalewski, John D. Mannion, James T. Diehl, Hwyda Arafat, Lea Sarov-Blat, et al. 2003. "Human Epicardial Adipose Tissue Is a Source of Inflammatory Mediators." *Circulation* 108 (20): 2460–66. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000099542.57313.C5>.
- McPherron, Alexandra C., and Se-Jin Lee. 2002. "Suppression of Body Fat Accumulation in Myostatin-Deficient Mice." *The Journal of Clinical Investigation* 109 (5): 595–601. <https://doi.org/10.1172/JCI13562>.
- McPherson, Stuart, Tim Hardy, Elsbeth Henderson, Alastair D. Burt, Christopher P. Day, and Quentin M. Anstee. 2015. "Evidence of NAFLD Progression from Steatosis to Fibrosing-Steatohepatitis Using Paired Biopsies: Implications for Prognosis and Clinical Management." *Journal of Hepatology* 62 (5): 1148–55. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.11.034>.
- Metwally, Mayada, Ali Bayoumi, Manuel Romero-Gomez, Khaled Thabet, Miya John, Leon A. Adams, Xiaoqi Huo, et al. 2019. "A Polymorphism in the Irisin-Encoding Gene (FNDC5) Associates with Hepatic Steatosis by Differential miRNA Binding to the 3'UTR." *Journal of Hepatology* 70 (3): 494–500. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.10.021>.
- Minehira, Kaori, Stephen G. Young, Claudio J. Villanueva, Laxman Yetukuri, Matej Oresic, Mark K. Hellerstein, Robert V. Farese, et al. 2008. "Blocking VLDL Secretion Causes Hepatic Steatosis but Does Not Affect Peripheral Lipid Stores or Insulin Sensitivity in Mice." *Journal of Lipid Research* 49 (9): 2038–44. <https://doi.org/10.1194/jlr.M800248-JLR200>.
- Mo, Li, Jing Shen, Qinhui Liu, Yuwei Zhang, Jiangying Kuang, Shiyun Pu, Shihai Cheng, et al. 2016. "Irisin Is Regulated by CAR in Liver and Is a Mediator of Hepatic Glucose and Lipid Metabolism." *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 30 (5): 533–42. <https://doi.org/10.1210/me.2015-1292>.
- Moreno, María, José María Moreno-Navarrete, Marta Serrano, Francisco Ortega, Elías Delgado, Cecilia Sanchez-Ragnarsson, Sergio Valdés, Patricia Botas, Wifredo Ricart, and José Manuel Fernández-Real. 2015. "Circulating Irisin Levels Are Positively Associated with Metabolic Risk Factors in Sedentary Subjects." *PloS One* 10 (4): e0124100. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124100>.

- Moreno-Navarrete, José María, Francisco Ortega, Marta Serrano, Ester Guerra, Gerard Pardo, Francisco Tinahones, Wifredo Ricart, and José Manuel Fernández-Real. 2013. "Irisin Is Expressed and Produced by Human Muscle and Adipose Tissue in Association With Obesity and Insulin Resistance." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 98 (4): E769–78. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-2749>.
- Mota, Manoela, Bubu A. Banini, Sophie C. Cazanave, and Arun J. Sanyal. 2016. "Molecular Mechanisms of Lipotoxicity and Glucotoxicity in Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Metabolism: Clinical and Experimental* 65 (8): 1049–61. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2016.02.014>.
- Nabi, Nabi. 2018. "Posters (Abstracts 301-2389)." *Hepatology* 68 (October): 184–1353. <https://doi.org/10.1002/hep.30257>.
- Nagahara, Alan H., and Mark H. Tuszynski. 2011. "Potential Therapeutic Uses of BDNF in Neurological and Psychiatric Disorders." *Nature Reviews Drug Discovery* 10 (3): 209–19. <https://doi.org/10.1038/nrd3366>.
- Neuschwander-Tetri, Brent A., Rohit Loomba, Arun J. Sanyal, Joel E. Lavine, Mark L. Van Natta, Manal F. Abdelmalek, Naga Chalasani, et al. 2015. "Farnesoid X Nuclear Receptor Ligand Obeticholic Acid for Non-Cirrhotic, Non-Alcoholic Steatohepatitis (FLINT): A Multicentre, Randomised, Placebo-Controlled Trial." *Lancet (London, England)* 385 (9972): 956–65. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61933-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61933-4).
- Nie, Yongwei, and Dongjun Liu. 2017. "N -Glycosylation Is Required for FDNC5 Stabilization and Irisin Secretion." *Biochemical Journal* 474 (18): 3167–77. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170241>.
- Nielsen, Soren, ZengKui Guo, C. Michael Johnson, Donald D. Hensrud, and Michael D. Jensen. 2004. "Splanchnic Lipolysis in Human Obesity." *The Journal of Clinical Investigation* 113 (11): 1582–88. <https://doi.org/10.1172/JCI21047>.
- Norheim, Frode, Torgrim Mikal Langleite, Marit Hjorth, Torgeir Holen, Anders Kielland, Hans Kristian Stadheim, Hanne Løvdal Gulseth, Kåre Inge Birkeland, Jørgen Jensen, and Christian A. Drevon. 2014. "The Effects of Acute and Chronic Exercise on PGC-1 α , Irisin and Browning of Subcutaneous Adipose Tissue in Humans." *The FEBS Journal* 281 (3): 739–49. <https://doi.org/10.1111/febs.12619>.
- Nygaard, Håvard, Gunnar Slettaløkken, Geir Vegge, Ivana Hollan, Jon Elling Whist, Tor Strand, Bent R. Rønnestad, and Stian Ellefsen. 2015. "Irisin in Blood Increases Transiently after Single Sessions of Intense Endurance Exercise and Heavy Strength Training." *PLOS ONE* 10 (3): e0121367. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121367>.
- Rapport Obepi 1997 - 2012 sur l'épidémiologie de l'obésité en France." Roche
- Orava, Janne, Pirjo Nuutila, Martin E. Lidell, Vesa Oikonen, Tommi Noponen, Tapio Viljanen, Mika Scheinin, et al. 2011. "Different Metabolic Responses of Human Brown Adipose Tissue to Activation by Cold and Insulin." *Cell Metabolism* 14 (2): 272–79. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.06.012>.
- Ortega-Prieto, Paula, and Catherine Postic. 2019. "Carbohydrate Sensing Through the Transcription Factor ChREBP." *Frontiers in Genetics* 10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00472>.
- Pacifico, Lucia, John F. Osborn, Enea Bonci, Pasquale Pierimarchi, and Claudio Chiesa. 2019. "Association between Vitamin D Levels and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Potential Confounding Variables." *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 19 (4): 310–32. <https://doi.org/10.2174/1389557518666181025153712>.
- Pang, Yaling, Haihui Zhu, Jianqin Xu, Lihua Yang, Lingjiao Liu, and Jing Li. 2017. "β-Arrestin-2 Is Involved in Irisin Induced Glucose Metabolism in Type 2 Diabetes via P38 MAPK Signaling." *Experimental Cell Research* 360 (2): 199–204. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.09.006>.
- Pankov, Roumen, and Kenneth M. Yamada. 2002. "Fibronectin at a Glance." *Journal of Cell Science* 115 (Pt 20): 3861–63. <https://doi.org/10.1242/jcs.00059>.
- Park, Kyung Hee, Lesya Zaichenko, Mary Brinkoetter, Bindiya Thakkar, Ayse Sahin-Efe, Kyoung Eun Jung, Michael A. Tsoukas, et al. 2013. "Circulating Irisin in Relation to

- Insulin Resistance and the Metabolic Syndrome." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 98 (12): 4899–4907. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-2373>.
- Park, Min-Jung, Dong-Il Kim, Joo-Hee Choi, Young-Ran Heo, and Soo-Hyun Park. 2015. "New Role of Irisin in Hepatocytes: The Protective Effect of Hepatic Steatosis in Vitro." *Cellular Signalling* 27 (9): 1831–39. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.04.010>.
- Patel, Bhoomika M., and Ramesh K. Goyal. 2019. "Liver and Insulin Resistance: New Wine in Old Bottle!!!" *European Journal of Pharmacology* 862 (November): 172657. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172657>.
- Patouraux, Stéphanie, Déborah Rousseau, Stéphanie Bonnafous, Cynthia Lebeau-pin, Carmelo Luci, Clémence M. Canivet, Anne-Sophie Schneck, et al. 2017. "CD44 Is a Key Player in Non-Alcoholic Steatohepatitis." *Journal of Hepatology* 67 (2): 328–38. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.03.003>.
- Pedersen, B. K., A. Steensberg, C. Fischer, C. Keller, P. Keller, P. Plomgaard, M. Febbraio, and B. Saltin. 2003. "Searching for the Exercise Factor: Is IL-6 a Candidate?" *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 24 (2–3): 113–19. <https://doi.org/10.1023/a:1026070911202>.
- Pedersen, Bente K., and Mark A. Febbraio. 2008. "Muscle as an Endocrine Organ: Focus on Muscle-Derived Interleukin-6." *Physiological Reviews* 88 (4): 1379–1406. <https://doi.org/10.1152/physrev.90100.2007>.
- . 2012. "Muscles, Exercise and Obesity: Skeletal Muscle as a Secretory Organ." *Nature Reviews. Endocrinology* 8 (8): 457–65. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2012.49>.
- Pedersen, Bente Klarlund. 2019. "Physical Activity and Muscle–Brain Crosstalk." *Nature Reviews Endocrinology* 15 (7): 383–92. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0174-x>.
- Pekkala, Satu, Petri K. Wiklund, Juha J. Hulmi, Juha P. Ahtiainen, Mia Horttanainen, Eija Pöllänen, Kari A. Mäkelä, et al. 2013. "Are Skeletal Muscle FNDC5 Gene Expression and Irisin Release Regulated by Exercise and Related to Health?" *The Journal of Physiology* 591 (21): 5393–5400. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.263707>.
- Perakakis, Nikolaos, Georgios A. Triantafyllou, José Manuel Fernández-Real, Joo Young Huh, Kyung Hee Park, Jochen Seufert, and Christos S. Mantzoros. 2017. "Physiology and Role of Irisin in Glucose Homeostasis." *Nature Reviews Endocrinology* 13 (6): 324–37. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.221>.
- Pérez-Sotelo, D., A. Roca-Rivada, I. Baamonde, J. Baltar, A. I. Castro, E. Domínguez, M. Collado, F. F. Casanueva, and M. Pardo. 2017. "Lack of Adipocyte-Fndc5/Irisin Expression and Secretion Reduces Thermogenesis and Enhances Adipogenesis." *Scientific Reports* 7 (1): 16289. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16602-z>.
- Petta, Salvatore, Luca Valenti, Gianluca Svegliati-Baroni, Massimiliano Ruscica, Rosaria Maria Pipitone, Paola Dongiovanni, Chiara Rychlicki, et al. 2017. "Fibronectin Type III Domain-Containing Protein 5 Rs3480 A>G Polymorphism, Irisin, and Liver Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 102 (8): 2660–69. <https://doi.org/10.1210/jc.2017-00056>.
- Polyzos, Stergios A., Athanasios D. Anastasilakis, Zoe A. Efstathiadou, Polyzois Makras, Nikolaos Perakakis, Jannis Kountouras, and Christos S. Mantzoros. 2018. "Irisin in Metabolic Diseases." *Endocrine* 59 (2): 260–74. <https://doi.org/10.1007/s12020-017-1476-1>.
- Polyzos, Stergios A., Jannis Kountouras, Athanasios D. Anastasilakis, Eleni V. Geladari, and Christos S. Mantzoros. 2014. "Irisin in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Metabolism: Clinical and Experimental* 63 (2): 207–17. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2013.09.013>.
- Polyzos, Stergios A., Jannis Kountouras, Athanasios D. Anastasilakis, Anastasia Margouta, and Christos S. Mantzoros. 2015. "Association between Circulating Irisin and Homocysteine in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Endocrine* 49 (2): 560–62. <https://doi.org/10.1007/s12020-014-0473-x>.
- Qiu, Shanhu, Xue Cai, Han Yin, Martina Zügel, Zilin Sun, Jürgen Michael Steinacker, and Uwe Schumann. 2016. "Association between Circulating Irisin and Insulin Resistance in

- Non-Diabetic Adults: A Meta-Analysis." *Metabolism: Clinical and Experimental* 65 (6): 825–34. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2016.02.006>.
- Rai, Mamta, and Fabio Demontis. 2016. "Systemic Nutrient and Stress Signaling via Myokines and Myometabolites." *Annual Review of Physiology* 78: 85–107. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105305>.
- Ramadan, Haidi K., Nahed A. Makhoulouf, Amal A. Mahmoud, Mohamed Abd Elrhman, and Muhammad Abbas El-Masry. 2019. "Role of Vitamin D Deficiency as a Risk Factor for Infections in Cirrhotic Patients." *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology* 43 (1): 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2018.09.001>.
- Raschke, Silja, Manuela Elsen, Hans Gassenhuber, Mark Sommerfeld, Uwe Schwahn, Barbara Brockmann, Raphael Jung, et al. 2013. "Evidence against a Beneficial Effect of Irisin in Humans." Edited by Guillermo López-Lluch. *PLoS ONE* 8 (9): e73680. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073680>.
- Ratziu, Vlad, Stephen A. Harrison, Sven Francque, Pierre Bedossa, Philippe Leher, Lawrence Serfaty, Manuel Romero-Gomez, et al. 2016. "Elafibranor, an Agonist of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α and - δ , Induces Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis Without Fibrosis Worsening." *Gastroenterology* 150 (5): 1147–1159.e5. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.01.038>.
- Regier, Darrel A., Emily A. Kuhl, and David J. Kupfer. 2013. "The DSM-5: Classification and Criteria Changes." *World Psychiatry: Official Journal of the World Psychiatric Association (WPA)* 12 (2): 92–98. <https://doi.org/10.1002/wps.20050>.
- Riant, Elodie, Aurélie Waget, Haude Cogo, Jean-François Arnal, Rémy Burcelin, and Pierre Gourdy. 2009. "Estrogens Protect against High-Fat Diet-Induced Insulin Resistance and Glucose Intolerance in Mice." *Endocrinology* 150 (5): 2109–17. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0971>.
- Rinella, Mary E. 2015. "Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review." *JAMA* 313 (22): 2263. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.5370>.
- Rizk, Fatma H., Samah A. Elshweikh, and Amira Y. Abd El-Naby. 2016. "Irisin Levels in Relation to Metabolic and Liver Functions in Egyptian Patients with Metabolic Syndrome." *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 94 (4): 359–62. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2015-0371>.
- Roca-Rivada, Arturo, Cecilia Castelao, Lucía L. Senin, María O. Landrove, Javier Baltar, Ana Belén Crujeiras, Luisa María Seoane, Felipe F. Casanueva, and María Pardo. 2013. "FNDC5/Irisin Is Not Only a Myokine but Also an Adipokine." *PLoS One* 8 (4): e60563. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060563>.
- Rodgers, Buel D., and Dilip K. Garikipati. 2008. "Clinical, Agricultural, and Evolutionary Biology of Myostatin: A Comparative Review." *Endocrine Reviews* 29 (5): 513–34. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0003>.
- Romeo, Stefano, Julia Kozlitina, Chao Xing, Alexander Pertsemlidis, David Cox, Len A. Pennacchio, Eric Boerwinkle, Jonathan C. Cohen, and Helen H. Hobbs. 2008. "Genetic Variation in PNPLA3 Confers Susceptibility to Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Nature Genetics* 40 (12): 1461–65. <https://doi.org/10.1038/ng.257>.
- Romero-Gómez, Manuel, Shira Zelber-Sagi, and Michael Trenell. 2017. "Treatment of NAFLD with Diet, Physical Activity and Exercise." *Journal of Hepatology* 67 (4): 829–46. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.05.016>.
- Rotman, Yaron, and Brent A. Neuschwander-Tetri. 2017. "Liver Fat Accumulation as a Barometer of Insulin Responsiveness Again Points to Adipose Tissue as the Culprit." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 65 (4): 1088–90. <https://doi.org/10.1002/hep.29094>.
- Safari, Zahra, and Philippe Gérard. 2019. "The Links between the Gut Microbiome and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)." *Cellular and Molecular Life Sciences* 76 (8): 1541–58. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03011-w>.
- Sanchis-Gomar, F., R. Alis, H. Pareja-Galeano, M. Romagnoli, and C. Perez-Quilis. 2014. "Inconsistency in Circulating Irisin Levels: What Is Really Happening?" *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Metabolisme* 46 (8): 591–96. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1363283>.

- Sanchis-Gomar, Fabian, and Carme Perez-Quilis. 2014. "The P38–PGC-1 α –Irisin–Betatrophin Axis: Exploring New Pathways in Insulin Resistance." *Adipocyte* 3 (1): 67–68. <https://doi.org/10.4161/adip.27370>.
- Santhekadur, Prasanna K., Divya P. Kumar, and Arun J. Sanyal. 2018. "Preclinical Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *Journal of Hepatology* 68 (2): 230–37. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.10.031>.
- Sanyal, Arun, Edgar D. Charles, Brent A. Neuschwander-Tetri, Rohit Loomba, Stephen A. Harrison, Manal F. Abdelmalek, Eric J. Lawitz, et al. 2019. "Pegbelfermin (BMS-986036), a PEGylated Fibroblast Growth Factor 21 Analogue, in Patients with Non-Alcoholic Steatohepatitis: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 2a Trial." *Lancet (London, England)* 392 (10165): 2705–17. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31785-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31785-9).
- Sato, Motohiko, Mary J. Cismowski, Eiji Toyota, Alan V. Smrcka, Pamela A. Lucchesi, William M. Chilian, and Stephen M. Lanier. 2006. "Identification of a Receptor-Independent Activator of G Protein Signaling (AGS8) in Ischemic Heart and Its Interaction with Gbetagamma." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (3): 797–802. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507467103>.
- Sato, Motohiko, Masahiro Hiraoka, Hiroko Suzuki, Miho Sakima, Abdullah Al Mamun, Yukiko Yamane, Takayuki Fujita, Utako Yokoyama, Satoshi Okumura, and Yoshihiro Ishikawa. 2014. "Protection of Cardiomyocytes from the Hypoxia-Mediated Injury by a Peptide Targeting the Activator of G-Protein Signaling 8." *PLOS ONE* 9 (3): e91980. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091980>.
- Sato, Motohiko, Qibin Jiao, Takashi Honda, Reiko Kurotani, Eiji Toyota, Satoshi Okumura, Tatsuo Takeya, Susumu Minamisawa, Stephen M. Lanier, and Yoshihiro Ishikawa. 2009. "Activator of G Protein Signaling 8 (AGS8) Is Required for Hypoxia-Induced Apoptosis of Cardiomyocytes: Role of G Betagamma and Connexin 43 (CX43)." *The Journal of Biological Chemistry* 284 (45): 31431–40. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.014068>.
- Schneck, Anne-Sophie, Rodolphe Anty, Stéphanie Patouraux, Stéphanie Bonnafous, Déborah Rousseau, Cynthia Lebeaupin, Beatrice Bailly-Maitre, et al. 2016. "Roux-En Y Gastric Bypass Results in Long-Term Remission of Hepatocyte Apoptosis and Hepatic Histological Features of Non-Alcoholic Steatohepatitis." *Frontiers in Physiology* 7: 344. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00344>.
- Schumacher, M. A., N. Chinnam, T. Ohashi, R. S. Shah, and H. P. Erickson. 2013. "The Structure of Irisin Reveals a Novel Intersubunit -Sheet Fibronectin Type III (FNIII) Dimer: IMPLICATIONS FOR RECEPTOR ACTIVATION." *Journal of Biological Chemistry* 288 (47): 33738–44. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.516641>.
- Schuppan, Detlef, Rambabu Surabattula, and Xiao Yu Wang. 2018. "Determinants of Fibrosis Progression and Regression in NASH." *Journal of Hepatology* 68 (2): 238–50. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.11.012>.
- Seale, Patrick, and Mitchell A. Lazar. 2009. "Brown Fat in Humans: Turning up the Heat on Obesity." *Diabetes* 58 (7): 1482–84. <https://doi.org/10.2337/db09-0622>.
- Seki, Ekihiro, and Robert F. Schwabe. 2015. "Hepatic Inflammation and Fibrosis: Functional Links and Key Pathways." *Hepatology* 61 (3): 1066–79. <https://doi.org/10.1002/hep.27332>.
- Shan, Tizhong, Xinrong Liang, Pengpeng Bi, and Shihuan Kuang. 2013. "Myostatin Knockout Drives Browning of White Adipose Tissue through Activating the AMPK-PGC1 α -Fndc5 Pathway in Muscle." *The FASEB Journal* 27 (5): 1981–89. <https://doi.org/10.1096/fj.12-225755>.
- Shanaki, Mehrnoosh, Nariman Moradi, Solaleh Emamgholipour, Reza Fadaei, and Hossein Poustchi. 2017. "Lower Circulating Irisin Is Associated with Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Type 2 Diabetes." *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, SI: Online Supplement - 1, 11 (November): S467–72. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2017.03.037>.

- Shi, Guangjun, Nan Tang, Jiantao Qiu, Deguo Zhang, Fei Huang, Yayu Cheng, Kun Ding, Weisheng Li, Ping Zhang, and Xueying Tan. 2017. "Irisin Stimulates Cell Proliferation and Invasion by Targeting the PI3K/AKT Pathway in Human Hepatocellular Carcinoma." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 493 (1): 585–91. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.08.148>.
- Shirvani, Hossein, and Saleh Rahmati-Ahmadabad. 2019. "Irisin Interaction with Adipose Tissue Secretions by Exercise Training and Flaxseed Oil Supplement." *Lipids in Health and Disease* 18 (1): 15. <https://doi.org/10.1186/s12944-019-0960-4>.
- Siersbaek, Rasmus, Ronni Nielsen, and Susanne Mandrup. 2010. "PPARgamma in Adipocyte Differentiation and Metabolism--Novel Insights from Genome-Wide Studies." *FEBS Letters* 584 (15): 3242–49. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.06.010>.
- Singh, Rajat, Susmita Kaushik, Yongjun Wang, Youqing Xiang, Inna Novak, Masaaki Komatsu, Keiji Tanaka, Ana Maria Cuervo, and Mark J. Czaja. 2009. "Autophagy Regulates Lipid Metabolism." *Nature* 458 (7242): 1131–35. <https://doi.org/10.1038/nature07976>.
- Singh, Siddharth, Alina M. Allen, Zhen Wang, Larry J. Prokop, Mohammad H. Murad, and Rohit Loomba. 2015. "Fibrosis Progression in Nonalcoholic Fatty Liver vs Nonalcoholic Steatohepatitis: A Systematic Review and Meta-Analysis of Paired-Biopsy Studies." *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 13 (4): 643-654.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2014.04.014>.
- Smati, S., M. Régnier, T. Fougeray, A. Polizzi, A. Fougerat, F. Lasserre, C. Lukowicz, et al. 2019. "Regulation of Hepatokine Gene Expression in Response to Fasting and Feeding: Influence of PPAR- α and Insulin-Dependent Signalling in Hepatocytes." *Diabetes & Metabolism*, June. <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2019.05.005>.
- Söderberg, Cecilia, Per Stål, Johan Askling, Hans Glaumann, Greger Lindberg, Joel Marmur, and Rolf Hultcrantz. 2010. "Decreased Survival of Subjects with Elevated Liver Function Tests during a 28-Year Follow-Up." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 51 (2): 595–602. <https://doi.org/10.1002/hep.23314>.
- Sookoian, Silvia, and Carlos J. Pirola. 2011. "Meta-Analysis of the Influence of I148M Variant of Patatin-like Phospholipase Domain Containing 3 Gene (PNPLA3) on the Susceptibility and Histological Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Hepatology* 53 (6): 1883–94. <https://doi.org/10.1002/hep.24283>.
- Speliotes, Elizabeth K., Johannah L. Butler, Cameron D. Palmer, Benjamin F. Voight, the GIANT Consortium the MIGen Consortium, the NASH CRN, and Joel N. Hirschhorn. 2010. "PNPLA3 Variants Specifically Confer Increased Risk for Histologic Nonalcoholic Fatty Liver Disease but Not Metabolic Disease." *Hepatology* 52 (3): 904–12. <https://doi.org/10.1002/hep.23768>.
- Speliotes, Elizabeth K., Joseph M. Massaro, Udo Hoffmann, Ramachandran S. Vasan, James B. Meigs, Dushyant V. Sahani, Joel N. Hirschhorn, Christopher J. O'Donnell, and Caroline S. Fox. 2010. "Fatty Liver Is Associated with Dyslipidemia and Dysglycemia Independent of Visceral Fat: The Framingham Heart Study." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 51 (6): 1979–87. <https://doi.org/10.1002/hep.23593>.
- Staiger, Harald, Michaela Keuper, Lucia Berti, Martin Hrabě de Angelis, and Hans-Ulrich Häring. 2017. "Fibroblast Growth Factor 21—Metabolic Role in Mice and Men." *Endocrine Reviews* 38 (5): 468–88. <https://doi.org/10.1210/er.2017-00016>.
- Stengel, Andreas, Tobias Hofmann, Miriam Goebel-Stengel, Ulf Elbelt, Peter Kobelt, and Burghard F. Klapp. 2013. "Circulating Levels of Irisin in Patients with Anorexia Nervosa and Different Stages of Obesity--Correlation with Body Mass Index." *Peptides* 39 (January): 125–30. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.11.014>.
- Stryjecki, C., A. Alyass, and D. Meyre. 2018. "Ethnic and Population Differences in the Genetic Predisposition to Human Obesity." *Obesity Reviews* 19 (1): 62–80. <https://doi.org/10.1111/obr.12604>.
- Sung, Ki-Chul, Sarah H. Wild, and Christopher D. Byrne. 2014. "Development of New Fatty Liver, or Resolution of Existing Fatty Liver, over Five Years of Follow-up, and Risk of

- Incident Hypertension.” *Journal of Hepatology* 60 (5): 1040–45. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.01.009>.
- Susmallian, Sergio, Ilana Nikiforova, Shir Azoulai, and Royi Barnea. 2019. “Outcomes of Bariatric Surgery in Patients with Depression Disorders.” *PloS One* 14 (8): e0221576. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221576>.
- Syed, Adeela, Tamás Lukacsovich, Miles Pomeroy, A. Jane Bardwell, Gentry Thomas Decker, Katrina G. Waymire, Judith Purcell, et al. 2019. “Miles to Go (Mtgo) Encodes FNDC3 Proteins That Interact with the Chaperonin Subunit CCT3 and Are Required for NMJ Branching and Growth in *Drosophila*.” *Developmental Biology* 445 (1): 37–53. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.10.016>.
- Tabrizi, Reza, Mahmood Moosazadeh, Kamran B. Lankarani, Maryam Akbari, Seyed Taghi Heydari, Fariba Kolahtooz, Mansooreh Samimi, and Zatollah Asemi. 2017. “The Effects of Vitamin D Supplementation on Metabolic Profiles and Liver Function in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials.” *Diabetes & Metabolic Syndrome* 11 Suppl 2 (December): S975–82. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2017.07.025>.
- Tacke, Frank, and Ralf Weiskirchen. 2018. “An Update on the Recent Advances in Antifibrotic Therapy.” *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* 12 (11): 1143–52. <https://doi.org/10.1080/17474124.2018.1530110>.
- Tang, Hong, Ruili Yu, Shiyang Liu, Bahetiyaer Huwatibieke, Ziru Li, and Weizhen Zhang. 2016. “Irisin Inhibits Hepatic Cholesterol Synthesis via AMPK-SREBP2 Signaling.” *EBioMedicine* 6 (February): 139–48. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.02.041>.
- Tang, Shanshan, Rong Zhang, Feng Jiang, Jie Wang, Miao Chen, Danfeng Peng, Jing Yan, Yuqian Bao, Cheng Hu, and Weiping Jia. 2014. “An Interaction between a FNDC5 Variant and Obesity Modulates Glucose Metabolism in a Chinese Han Population.” Edited by Yanqiao Zhang. *PLoS ONE* 9 (11): e109957. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109957>.
- Tanisawa, Kumpei, Hirokazu Taniguchi, Xiaomin Sun, Tomoko Ito, Zhen-Bo Cao, Shizuo Sakamoto, and Mitsuru Higuchi. 2014. “Common Single Nucleotide Polymorphisms in the FNDC5 Gene Are Associated with Glucose Metabolism but Do Not Affect Serum Irisin Levels in Japanese Men with Low Fitness Levels.” *Metabolism: Clinical and Experimental* 63 (4): 574–83. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.01.005>.
- Tanné, Florence, Frédéric Gagnadoux, Olivier Chazouillères, Bernard Fleury, Dominique Wendum, Elisabeth Lasnier, Bernard Lebeau, Raoul Poupon, and Lawrence Serfaty. 2005. “Chronic Liver Injury during Obstructive Sleep Apnea.” *Hepatology* 41 (6): 1290–96. <https://doi.org/10.1002/hep.20725>.
- Thelen, Mark H., Laurie B. Mintz, and Jillon S. Vander Wal. 1996. “The Bulimia Test—Revised: Validation with DSM-IV Criteria for Bulimia Nervosa.” *Psychological Assessment* 8 (2): 219–21. <https://doi.org/10.1037/1040-3590.8.2.219>.
- Timmons, James A., Keith Baar, Peter K. Davidsen, and Philip J. Atherton. 2012. “Is Irisin a Human Exercise Gene?” *Nature* 488 (7413): E9-10; discussion E10-11. <https://doi.org/10.1038/nature11364>.
- Traber, Peter G., and Eliezer Zomer. 2013. “Therapy of Experimental NASH and Fibrosis with Galectin Inhibitors.” *PloS One* 8 (12): e83481. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083481>.
- Vilar-Gomez, Eduardo, Yadina Martinez-Perez, Luis Calzadilla-Bertot, Ana Torres-Gonzalez, Bienvenido Gra-Oramas, Licet Gonzalez-Fabian, Scott L. Friedman, Moises Diago, and Manuel Romero-Gomez. 2015. “Weight Loss Through Lifestyle Modification Significantly Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis.” *Gastroenterology* 149 (2): 367-378.e5; quiz e14-15. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.04.005>.
- Wacker, Matthias, and Michael F. Holick. 2013. “Vitamin D—Effects on Skeletal and Extraskelatal Health and the Need for Supplementation.” *Nutrients* 5 (1): 111–48. <https://doi.org/10.3390/nu5010111>.
- Wang, Chuan, Lingshu Wang, Wenjuan Li, Fei Yan, Meng Tian, Chuanlong Wu, Lin Qi, et al. 2015. “Irisin Has No Effect on Lipolysis in 3T3-L1 Adipocytes or Fatty Acid Metabolism

- in HepG2 Hepatocytes." *Endocrine* 49 (1): 90–96. <https://doi.org/10.1007/s12020-014-0458-9>.
- Wang, Hao-hua, Xiu-wei Zhang, Wei-kun Chen, Qiu-xia Huang, and Qiao-qiong Chen. 2015. "Relationship between Serum Irisin Levels and Urinary Albumin Excretion in Patients with Type 2 Diabetes." *Journal of Diabetes and Its Complications* 29 (3): 384–89. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2015.01.001>.
- Wang, Xiaolin, Yan Lu, E. Wang, Zhijian Zhang, Xuelian Xiong, Huijie Zhang, Jieli Lu, et al. 2015. "Hepatic Estrogen Receptor α Improves Hepatosteatosis through Upregulation of Small Heterodimer Partner." *Journal of Hepatology* 63 (1): 183–90. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.02.029>.
- Wedell-Neergaard, Anne-Sophie, Louise Lang Lehrskov, Regitse Højgaard Christensen, Grit Elster Legaard, Emma Dorph, Monica Korsager Larsen, Natja Launbo, et al. 2019. "Exercise-Induced Changes in Visceral Adipose Tissue Mass Are Regulated by IL-6 Signaling: A Randomized Controlled Trial." *Cell Metabolism* 29 (4): 844-855.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.12.007>.
- Wei, Yongzhong, R. Scott Rector, John P. Thyfault, and Jamal A. Ibdah. 2008. "Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Mitochondrial Dysfunction." *World Journal of Gastroenterology* 14 (2): 193–99. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.193>.
- Wong, Robert J., Maria Aguilar, Ramsey Cheung, Ryan B. Perumpail, Stephen A. Harrison, Zobair M. Younossi, and Aijaz Ahmed. 2015. "Nonalcoholic Steatohepatitis Is the Second Leading Etiology of Liver Disease among Adults Awaiting Liver Transplantation in the United States." *Gastroenterology* 148 (3): 547–55. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.11.039>.
- Woodhouse, C. A., V. C. Patel, A. Singanayagam, and D. L. Shawcross. 2018. "Review Article: The Gut Microbiome as a Therapeutic Target in the Pathogenesis and Treatment of Chronic Liver Disease." *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 47 (2): 192–202. <https://doi.org/10.1111/apt.14397>.
- Wrann, Christiane D., James P. White, John Salogiannis, Dina Laznik-Bogoslavski, Jun Wu, Di Ma, Jiandie D. Lin, Michael E. Greenberg, and Bruce M. Spiegelman. 2013. "Exercise Induces Hippocampal BDNF through a PGC-1 α /FNDC5 Pathway." *Cell Metabolism* 18 (5): 649–59. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.09.008>.
- Xin, C, J Liu, J Zhang, D Zhu, H Wang, L Xiong, Y Lee, et al. 2016. "Irisin Improves Fatty Acid Oxidation and Glucose Utilization in Type 2 Diabetes by Regulating the AMPK Signaling Pathway." *International Journal of Obesity* 40 (3): 443–51. <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.199>.
- Xiong, Xiao-Qing, Dan Chen, Hai-Jian Sun, Lei Ding, Jue-Jin Wang, Qi Chen, Yue-Hua Li, et al. 2015. "FNDC5 Overexpression and Irisin Ameliorate Glucose/Lipid Metabolic Derangements and Enhance Lipolysis in Obesity." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1852 (9): 1867–75. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.06.017>.
- Xiong, Yan, Zihuan Wu, Bin Zhang, Chao Wang, Fengyi Mao, Xiao Liu, Keping Hu, Xiaobo Sun, Wen Jin, and Shihuan Kuang. 2019. "Fndc5 Loss-of-Function Attenuates Exercise-Induced Browning of White Adipose Tissue in Mice." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 33 (5): 5876–86. <https://doi.org/10.1096/fj.201801754RR>.
- Yahagi, Naoya, Hitoshi Shimano, Takashi Matsuzaka, Motohiro Sekiya, Yuho Najima, Sachiko Okazaki, Hiroaki Okazaki, et al. 2004. "P53 Involvement in the Pathogenesis of Fatty Liver Disease." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (20): 20571–75. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400884200>.
- Yan, Bing, Xiulin Shi, Huijie Zhang, Lingling Pan, Zhimin Ma, Suhuan Liu, Yongwen Liu, Xiaoying Li, Shuyu Yang, and Zhibin Li. 2014. "Association of Serum Irisin with Metabolic Syndrome in Obese Chinese Adults." *PloS One* 9 (4): e94235. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094235>.
- Yasir, M, E Angelakis, F Bibi, E I Azhar, D Bachar, J-C Lagier, B Gaborit, et al. 2015. "Comparison of the Gut Microbiota of People in France and Saudi Arabia." *Nutrition & Diabetes* 5 (4): e153. <https://doi.org/10.1038/nutd.2015.3>.

- Younossi, Zobair M., Pegah Golabi, Leyla de Avila, James Minhui Paik, Manirath Srishord, Natsu Fukui, Ying Qiu, Leah Burns, Arian Afendy, and Fatema Nader. 2019. "The Global Epidemiology of NAFLD and NASH in Patients with Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Journal of Hepatology*, July. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.06.021>.
- Younossi, Zobair M., Aaron B. Koenig, Dinan Abdelatif, Yousef Fazel, Linda Henry, and Mark Wymer. 2016. "Global Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease-Meta-Analytic Assessment of Prevalence, Incidence, and Outcomes: HEPATOLOGY, Vol. XX, No. X 2016." *Hepatology* 64 (1): 73–84. <https://doi.org/10.1002/hep.28431>.
- Younossi, Zobair M., Giulio Marchesini, Helena Pinto-Cortez, and Salvatore Petta. 2019. "Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis: Implications for Liver Transplantation." *Transplantation* 103 (1): 22–27. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000002484>.
- Younossi, Zobair, Frank Tacke, Marco Arrese, Barjesh Chander Sharma, Ibrahim Mostafa, Elisabetta Bugianesi, Vincent Wai-Sun Wong, et al. 2019. "Global Perspectives on Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis: Hepatology." *Hepatology* 69 (6): 2672–82. <https://doi.org/10.1002/hep.30251>.
- Zhang, Chun, Zhi Ding, Guoqiang Lv, Jianping Li, Ping Zhou, and Junfeng Zhang. 2016. "Lower Irisin Level in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Case-Control Study and Meta-Analysis." *Journal of Diabetes* 8 (1): 56–62. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.12256>.
- Zhang, Dan, Ting Xie, and Po Sing Leung. 2018. "Irisin Ameliorates Glucolipototoxicity-Associated β -Cell Dysfunction and Apoptosis via AMPK Signaling and Anti-Inflammatory Actions." *Cellular Physiology and Biochemistry* 51 (2): 924–37. <https://doi.org/10.1159/000495395>.
- Zhang, Hui-Jie, Xian-Feng Zhang, Zhi-Min Ma, Ling-Ling Pan, Zheng Chen, Hai-Wei Han, Cheng-Kun Han, et al. 2013. "Irisin Is Inversely Associated with Intrahepatic Triglyceride Contents in Obese Adults." *Journal of Hepatology* 59 (3): 557–62. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.04.030>.
- Zhang, Jinyu, Omair Abbasi, Lev Malevanchik, Neena Mohan, Richard Denicola, Nicholas Tarangelo, and Dina Halegoua-De Marzio. 2017. "Pilot Study of the Prevalence of Binge Eating Disorder in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Patients." *Annals of Gastroenterology* 30 (6): 664–69. <https://doi.org/10.20524/aog.2017.0200>.
- Zhang, Y., R. Li, Y. Meng, S. Li, W. Donelan, Y. Zhao, L. Qi, et al. 2014. "Irisin Stimulates Browning of White Adipocytes Through Mitogen-Activated Protein Kinase P38 MAP Kinase and ERK MAP Kinase Signaling." *Diabetes* 63 (2): 514–25. <https://doi.org/10.2337/db13-1106>.
- Zhang, Yuan, Chao Xie, Hai Wang, Robin M. Foss, Morgan Clare, Eva Vertes George, Shiwu Li, et al. 2016. "Irisin Exerts Dual Effects on Browning and Adipogenesis of Human White Adipocytes." *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 311 (2): E530-541. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00094.2016>.
- Zhou, Bing, Li Ling, Feng Zhang, Tong-Yan Liu, Hong Zhou, Xiao-Hong Qi, Qi Chen, Yue-Hua Li, Yu-Ming Kang, and Guo-Qing Zhu. 2018. "Fibronectin Type III Domain-Containing 5 Attenuates Liver Fibrosis Via Inhibition of Hepatic Stellate Cell Activation." *Cellular Physiology and Biochemistry* 48 (1): 227–36. <https://doi.org/10.1159/000491722>.
- Zhu, Lixin, Susan S. Baker, Chelsea Gill, Wensheng Liu, Razan Alkhouri, Robert D. Baker, and Steven R. Gill. 2013. "Characterization of Gut Microbiomes in Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) Patients: A Connection between Endogenous Alcohol and NASH." *Hepatology* 57 (2): 601–9. <https://doi.org/10.1002/hep.26093>.

TRAVAUX SUPPLEMENTAIRES

Annexe 1 : Anty R, **Canivet CM**. Diagnostic et traitement des stéatoses hépatiques non alcooliques. Journal de biologie médicale. Vol 6 N° 21. 2017 (R)

Annexe 2 : Anty R, **Canivet CM**, Gual P, Tran A. Stéatoses hépatiques métaboliques : histoire naturelle, physiopathologie et démarche diagnostique. Hepato Gastro 2017; 24: 702-718. doi: 10.1684/hpg.2017.1490 (R)

Annexe 3 : Patouraux S, Rousseau D, Bonnafous S, Lebeau-pin C, Luci C, **Canivet CM**, Schneck AS, Bertola A, Saint-Paul MC, Iannelli A, Gugenheim J, Anty R, Tran A, Bailly-Maitre B, Gual P. CD44 is a key player in non-alcoholic steatohepatitis. J Hepatol 2017; doi: 10.1016/j.jhep.2017.03.003 (AO)

Annexe 4 : Boursier J, Anty R, Vonghia L, Moal V, Van Wolleghem T, **Canivet CM**, Michalak S, Bonnafous S, Michielsen P, Oberti F, Iannelli A, Van Gaal L, Tran A, Rousselet MC, Verrijken A, Gual P, Bertrais S, Driessen A, Calès P, Francque S. Screening for therapeutic trials and treatment indication in clinical practice: MACK-3, a new blood test for the diagnosis of fibrotic NASH. *Aliment Pharmacol Ther* 2018 May;47(10):1387-1396. doi: 10.1111/apt.14621 (AO)

Annexe 5 : Sans A, Bonnafous D, Rousseau S, Patouraux S, **Canivet CM**, Leclère PS, Tran-Van-Nhieu J, Luci C, Bailly-Maitre B, Xu X, Lee AH, Minehira K, Anty R, Tran A, Iannelli A, Gual P. The differential expression of CIDE family members is associated with NAFLD progression from steatosis to steatohepatitis. *Sci Rep*. 2019 May 16;9(1):7501. doi: 10.1038/s41598-019-43928-7. (AO)

Annexe 6 : Anty R, Morvan M, Le Corvec M, **Canivet CM**, Patouraux S, Gugenheim J, Bonnafous S, Bailly-Maitre B, Sire S, Tariel H, Bernard J, Piche T, Loréal O, Aron-Wisnewsky J, Clément K, Tran A, Iannelli A, Gual P. The mid-infrared spectroscopy: a novel non-invasive diagnostic tool for NASH diagnosis in severe obesity. *JHEP Reports*. 2019 in press. doi: 10.1016/j.jhepr.2019.09.005 (AO)



Diagnostic et traitement des stéatoses hépatiques non alcooliques

R. Anty, CM. Canivet

CHU de Nice, pôle digestif. INSERM U1065, Equipe 8 Complications hépatiques de l'obésité.
Université Côte d'Azur, Faculté de médecine. Nice

Les stéatopathies hépatiques non alcooliques appelées en anglais *Non-Alcoholic Fatty liver Disease* (NAFLD), regroupent un spectre d'anomalies hépatiques. Elles vont de la stéatose simple à la stéatohépatite *Non-Alcoholic Steato-Hepatitis* (NASH) qui est associée au risque d'évolution vers la fibrose, la cirrhose voire le carcinome hépatocellulaire. La prévalence moyenne de la NAFLD dans la population mondiale serait de 25,2 %, de 13,5 % en Afrique noire et de 31,8 % au Moyen Orient [1]. Environ 15 à 20 % des patients avec une NAFLD auraient une NASH. La NAFLD est une pathologie complexe, multi-systémique favorisée par l'insulino-résistance qui nécessite une démarche et une prise en charge rigoureuse décrites ci-dessous [1].

Démarche diagnostique

Evoquer le diagnostic

Une NAFLD doit être recherchée (échographie abdominale + bilan hépatique) chez tout patient ayant une insulino-résistance, un surpoids, une obésité, un syndrome métabolique (Tableau I), un diabète de type 2, ou une anomalie inexplicée du bilan hépatique (élévation de l'activité de l'ALAT ± ASAT ± GGT) [3, 4]. Inversement, la découverte à l'imagerie d'une stéatose hépatique (quelque soit le bilan hépatique) doit faire rechercher les différents paramètres du syndrome métabolique [4].

Rechercher systématiquement une comorbidité hépatique associée

La recherche d'une prise d'alcool de type usage simple ou mésusage (principal diagnostic différentiel) est à rechercher de façon systématique. Compte tenu de la fréquence de la NAFLD/NASH dans la population générale, l'élimination des différentes causes "classiques" d'atteinte hépatique doit être faite : hépatite virale B ou C, atteinte médicamenteuse, hémochromatose, hépatite auto-immune, ... [4].

Tableau I : Définition du syndrome métabolique (2009) [3]

3 éléments parmi	
Obésité centrale	Tour de taille (variable selon l'ethnie) : Sujet européen : H ≥ 94 cm, F ≥ 80 cm Sujet américain : H ≥ 102 cm, F ≥ 88 cm Sujet asiatique : H ≥ 90 cm, F ≥ 80 cm
Elévation des triglycérides	≥ 1,5 g/l (1,7 mmol/l) ou traitement spécifique
Baisse du HDL-Cholestérol	H : < 0,4 g/l (1,03 mmol/l) ; F : < 0,5 g/l (1,29 mmol/l) ou traitement spécifique
Elévation de la pression artérielle	Systolique ≥ 130 mmHg ou diastolique ≥ 85 mmHg ou traitement spécifique
Elévation de la glycémie	≥ 1,0 g/l (5,6 mmol/l) ou diabète de type 2 connu

H : Homme ; F : Femme ; HDL : *High Density Lipoprotein*

Eliminer une NAFLD/NASH secondaire

Avant de retenir le diagnostic de NAFLD/NASH "primitive", on doit vérifier l'absence de causes rares de NAFLD/NASH secondaires notamment : la prise d'un médicament stéatogène (corticoïde, amiodarone, œstrogène, tamoxifène, inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase réverse), une maladie de Wilson, une pullulation microbienne intestinale, une nutrition parentérale, une dénutrition sévère, une a/hypo-bétalipoprotéïnémie, un hypopituitarisme ou une hypothyroïdie [4].

Evaluer l'état hépatique

L'évaluation de la fibrose hépatique est essentielle à la prise en charge des patients. Les recommandations 2016 de la société européenne d'étude du foie (EASL) préconisent la combinaison d'un test de biomarqueurs sériques et d'une mesure d'élastographie impulsionnelle hépatique (FibroScan®, sonde M ou sonde XL spécialement développée pour les patients obèses). Différents tests sériques gratuits (NAFLD *fibrosis score* : www.naflscore.com, Fib 4 : medicalcul.free.fr/fib4.html) ou commerciaux

(ELF®, Fibrotest®) sont disponibles. La détermination de seuils précis avec ces différents marqueurs non invasifs est toujours l'objet de recherches. Dans les cas où l'évaluation non invasive de la fibrose est inefficace ou discordante, une biopsie hépatique doit être proposée. Dans le cas où les méthodes non invasives sont en faveur de lésions de fibrose sévère ou de cirrhose, une biopsie hépatique de confirmation peut être réalisée. Actuellement, il n'y a pas de test non invasif validé pour différencier la stéatose simple de la NASH [4, 5].

Traitement de la NAFLD

Mesures générales

Lors de la découverte d'une stéatose à l'échographie hépatique, ou lors de la présence d'une stéatose hépatique caractérisée à la biopsie hépatique (stéatose simple, stéatohépatite ± fibrosante, cirrhose post-stéatohépatite non alcoolique), la recherche et la prise en charge des paramètres du syndrome métabolique est fondamentale. La recherche des autres facteurs de risque cardiovasculaires non inclus dans la définition du syndrome métabolique est importante, tel que l'âge, un antécédent familial de maladie coronaire précoce, un tabagisme, une élévation du *low density lipoprotein* (LDL) cholestérol (Tableaux II et III). Les cibles du LDL sont variables entre les recommandations françaises, européennes et américaines (cf note de cadrage : Hypercholestérolémie pure et hyperlipidémie mixte : prise en charge. HAS 2015. www.has-sante.fr). Il n'y a pas de sur-risque de toxicité hépatique à l'emploi d'une statine au cours de la NAFLD. L'équilibre d'un diabète de type 2 est important. L'utilisation de la metformine est possible chez les patients avec une NAFLD. Lorsque la molécule est disponible, l'usage du liraglutide (analogue du *Glucagon-like Peptide 1* (GLP1)) est logique chez les patients diabétiques avec une NAFLD, compte tenu des résultats préliminaires encourageants (diminution de la stéatose, de la stéatohépatite, et de la fibrose chez des patients avec NASH, avec ou sans diabète de type 2, étude LEAN) [6]. La recherche et la prise en charge des autres manifestations extra-hépatiques (syndrome d'apnée-obstructive du sommeil, ostéoporose, maladie rénale chronique, syndrome des ovaires polykystiques, hypothyroïdie) sont importantes [4]. Le surpoids et l'obésité sont également des facteurs de risque de cancer en général et de cancers digestifs en particulier. Compte tenu du fait que les décès par cancer sont la deuxième cause de mortalité des patients ayant une NAFLD, l'application des mesures de dépistage du cancer colo-rectal, du cancer de la prostate, du cancer du sein et l'arrêt du tabac sont particulièrement importants dans cette population.

Tableau II : Evaluation du risque cardiovasculaire en France (HAS 2015), par la détermination des facteurs de risque associés à une dyslipidémie

Facteurs de risque	Définitions
Age	Homme ≥ 50 ans, Femme ≥ 60 ans
Antécédents familiaux de maladie coronaire précoce	Infarctus ou mort subite < 55 ans chez le père ou apparenté du 1 ^{er} degré de sexe masculin Infarctus ou mort subite < 65 ans chez la mère ou apparentée du 1 ^{er} degré de sexe féminin
Tabagisme	Actuel ou arrêté depuis moins de 3 ans
Hypertension artérielle	Présente, traitée ou non
Diabète de type 2	Présent, traité ou non
HDL-cholestérol	< 0,4 g/l (1,0 mmol/l)
Facteur protecteur (si présent soustraire "un risque" au score de niveau de risque) :	
HDL-cholestérol	0,60 g/l (1,5 mmol/l)
Score de niveau de risque cardiovasculaire	Définitions
Risque faible	Aucun facteur associé à la dyslipidémie
Risque intermédiaire	≥ 1 facteur de risque associé à la dyslipidémie
Haut risque	Antécédents de maladie cardiovasculaire avérée (prévention secondaire) Diabète de type 2 + atteinte rénale OU ≥ 2 facteurs de risque Risque > 20 % de faire un événement coronarien dans les 10 ans

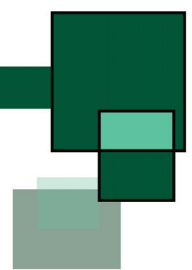
Tableau III : Stratégie thérapeutique du LDL-cholestérol (LDL-C) en fonction du niveau de risque cardiovasculaire (HAS 2015)

Prévention primaire : traitement par statine si concentration cible de LDL-C non obtenu après 3 mois de mesures hygiéno-diététiques	Cibles
Aucun facteur de risque	LDL-C < 2,2 g/l
1 facteur de risque	LDL-C < 1,9 g/l
2 facteurs de risque	LDL-C < 1,6 g/l
> 2 facteurs de risque	LDL-C < 1,3 g/l
Haut risque	LDL-C < 1 g/l
Prévention secondaire, traitement par statine associé aux mesures hygiéno-diététiques	LDL-C < 1 g/l

Mesures spécifiques

Mesures non médicamenteuses

Chez les patients présentant un surpoids ou une adiposité viscérale marquée, l'objectif est une perte de 7 à 10 %



du poids corporel. Deux volets de prise en charge sont préconisés en pratique :

- Le premier volet thérapeutique consiste en une modification des habitudes alimentaires avec des apports en macronutriments adaptés (Tableau IV). Le régime traditionnel méditerranéen a de très nombreux effets bénéfiques sur la santé globale. La consommation de café (notamment à la cafetière électrique) est plutôt protectrice de la stéatose voire de la fibrose hépatique [4, 7].

- Le deuxième volet de la prise en charge est celui de l'augmentation de l'activité physique (activité physique aérobie ou en résistance) et de la lutte contre la sédentarité. L'augmentation de l'activité physique améliore la stéatose hépatique même en l'absence de perte de poids [4].

L'association des mesures diététiques et l'augmentation de l'activité physique/lutte contre la sédentarité sont essentielles pour permettre une perte de poids significative et durable dans le temps. Cela doit s'inscrire dans un projet de modification durable du mode de vie.

En cas de troubles du comportement alimentaire caractérisé (addiction au sucre, au sel, boulimie), une prise en charge addictologique et/ou une thérapie de type cognitivo-comportementale sont importantes à mettre en place.

Mesures médicamenteuses

Bien qu'il soit impératif de mettre en place les mesures hygiéno-diététiques précédemment vues, il est parfois

extrêmement difficile chez certains malades de suivre ces mesures à long terme. Il est donc important d'identifier le moment où l'intervention pharmacologique, selon la gravité de la maladie hépatique, est utile.

Cependant, aucun médicament n'a actuellement l'autorisation de mise sur le marché dans cette indication au niveau des agences sanitaires américaines ou européennes. Les recommandations des sociétés savantes américaines et européennes proposent d'utiliser de la vitamine E (800 UI/j) [4, 8]. Cependant, son innocuité au long terme n'est pas clairement établie. Une augmentation du risque d'accident vasculaire hémorragique et de cancer de la prostate seraient présents.

La pioglitazone est également retenue par ces recommandations internationales [4, 8]. Cependant son usage au long cours est associé à une prise de poids, à un risque d'ostéoporose voire un risque de cancer de vessie. La metformine et l'acide urso-désoxycholique n'ont pas prouvé d'amélioration franche de l'histologie hépatique et ne sont pas recommandés. Les statines et les oméga-3 améliorent la stéatose, mais sont inefficaces sur la stéatohépatite ou la fibrose [4, 8]. Cependant, la metformine, les statines ± les oméga-3 ont des intérêts extra-hépatiques chez ces patients, notamment des effets préventifs anti-tumoraux. La recherche industrielle est actuellement très active dans le domaine pharmaceutique des stéatoses hépatiques [9, 10]. Parmi les potentiels médicaments du

Tableau IV : Recommandations pratiques de la prise en charge de la NAFLD, modifiées d'après les *guidelines* *EASL 2016* [4]

Cibles	Recommandations
Restriction énergétique	Diminution de la ration calorique de 500 à 1000 kcal afin d'induire une perte de poids de 500 à 1000 g/semaine Objectif : perte de 7 à 10 % du poids initial Approche au long cours, à combiner avec l'augmentation de l'activité physique selon les principes de thérapie cognitivo-comportementale
Composition en macronutriments	Régime méditerranéen Régime pauvre en graisse et riche ou modéré en hydrate de carbone (par ex. : hydrates de carbone 64 %, lipides 22 % avec <10 % de la ratio calorique apportée par des acides gras saturés, protéines 14 %) Privilégier des hydrates de carbone à faible index glycémique
Apports en fibres	Au moins 5 portions de fruits ou légumes par jour (apport en fibres > 20 g/j)
Apport en fructose industriel	Éviter les sodas et les aliments riches en fructose industriel
Prise d'alcool	Garder des apports inférieurs aux recommandations (30 g/j chez l'homme, 20 g/j chez la femme)
Café	Pas de limitation hépatique
Exercice/activité physique	≥ 150-200 mn/semaine d'activité physique modérée aérobie, en 3 à 5 sessions (marche rapide, vélo statique) Les exercices en résistance sont aussi efficaces. Le type d'activité physique doit dépendre des préférences du patients afin d'être maintenue au long cours

futur, l'acide obéticholique (agoniste du *Farnesoid X Receptor*), l'élafibranor (double agoniste du *Peroxisome proliferator-activated receptor*, PPAR, alpha et du PPAR delta), le sémaglutide (analogue du GLP1) et le cénicriviroc (antagoniste du *C-C chemokine receptor type 2* (CCR2) et CCR5) sont en cours d'essais thérapeutiques internationaux de phase 3 [11].

La modulation du microbiote intestinal à l'aide de prébiotiques, probiotiques, synbiotiques, antibiotiques voire par transplantation fécale est une piste en cours d'exploration [12].

Chirurgie bariatrique

La chirurgie bariatrique, notamment par *gastric by pass* ou *sleeve gastrectomy*, permet une perte de poids significative et durable dans le temps. Les données récentes de la littérature suggèrent une fréquente résolution de la stéatose, de la stéatohépatite (dans 85 % des cas) et de la fibrose (dans 50 % des cas) chez les patients NASH, 1 an après la chirurgie bariatrique [13, 14].

Conclusion

La NAFLD est une pathologie multi-systémique complexe. Le diagnostic repose sur un faisceau d'arguments cliniques et paracliniques (biologie, élastométrie voire anatomopathologie). La prise en charge des patients atteints de NAFLD repose sur une prise en charge multidisciplinaire, d'une part pour diagnostiquer les atteintes extra-hépatiques de la maladie (risque cardiovasculaire, diabète notamment), et d'autre part pour traiter ces patients. Les thérapeutiques spécifiques de la NAFLD sont très restreintes à l'heure actuelle et la pierre angulaire de la prise en charge repose sur les mesures hygiéno-diététiques.

Références

- 1- Younossi ZM et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016;64:73-84.
- 2- Rinella ME. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. *JAMA*. 2015;313:2263-73.
- 3- Alberti KG et al. 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;120:1640-5.

4- European Association for the Study of the L, European Association for the Study of D, European Association for the Study of O. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2016;64:1388-402.

5- European Association for Study of L, Asociacion Latinoamericana para el Estudio del H. EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis. *J Hepatol*. 2015;63:237-64.

6- Armstrong MJ et al. Liraglutide safety and efficacy in patients with non-alcoholic steatohepatitis (LEAN): a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet*. 2016;387:679-90.

7- Anty R et al. Regular coffee but not espresso drinking is protective against fibrosis in a cohort mainly composed of morbidly obese European women with NAFLD undergoing bariatric surgery. *J Hepatol*. 2012;57:1090-6.

8- Chalasani N et al. The Diagnosis and Management of Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Practice Guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. *Gastroenterology*. 2012;142:1592-609.

9- Ratziu V et al. Elafibranor, an Agonist of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-alpha and -delta, Induces Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis Without Fibrosis Worsening. *Gastroenterology*. 2016;150:1147-59.

10- Neuschwander-Tetri BA, Loomba R, Sanyal AJ, Lavine JE, Van Natta ML, Abdelmalek MF, Chalasani N, et al. Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT) : a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 2015;385:956-65.

11- Ratziu V. Novel Pharmacotherapy Options for NASH. *Dig Dis Sci*. 2016;61:1398-405.

12- Leung C et al. The role of the gut microbiota in NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016;13:412-25.

13- Caiazzo R et al. Roux-en-Y gastric versus adjustable gastric banding to reduce nonalcoholic fatty liver disease : a 5-year controlled longitudinal study. *Ann Surg*. 2014;260:893-8.

14- Lassailly G et al. Bariatric Surgery Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis in Morbidly Obese Patients. *Gastroenterology*. 2015;149:379-88. ■

Mise-au-point

*Non-alcoholic fatty liver disease:
natural history, mechanisms
and diagnostic guidelines*

Rodolphe Anty⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾,
Clémence M Canivet⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾,
Philippe Gual⁽²⁾⁽³⁾,
Albert Tran⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾

¹ CHU de Nice, Unité d'hépatologie, 151 route Saint Antoine de
Ginestière, 06202 Nice, France

² INSERM, U1065, Equipe 8 « Complications hépatiques de
l'obésité », Nice, France

³ Université de la Côte d'Azur, Nice, France

e-mail : <anty.r@chu-nice.fr>

Stéatoses hépatiques métaboliques : histoire naturelle, physiopathologie et démarche diagnostique

Résumé

Les stéatoses hépatiques métaboliques (également appelées stéatopathies dysmétaboliques ou maladie du foie gras non alcoolique, en anglais *non-alcoholic fatty liver disease* (NAFLD)) sont un problème de santé publique. La NAFLD regroupe la stéatose (en anglais *non-alcoholic fatty liver* (NAFL)), la stéatohépatite non alcoolique (en anglais *non-alcoholic steatohepatitis* (NASH)) et ses complications que sont la fibrose hépatique, la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire. Environ 25 % de la population mondiale aurait une NAFLD et 1,5 à 6,5 % une NASH. Ces fortes prévalences sont liées à l'épidémie de surpoids et d'obésité. Comme l'obésité, la NAFLD est une maladie complexe et hétérogène. En effet, la genèse, les manifestations cliniques hépatiques et extrahépatiques, et l'évolution de la NAFLD dépendent de multiples facteurs environnementaux et génétiques. Le syndrome métabolique, comprenant l'insulino-résistance, joue un rôle important mais non exclusif dans l'apparition de la NASH. La NAFLD, comme l'obésité et le diabète de type 2, est une maladie multisystémique associée à différentes complications (maladies cardiovasculaires, cancers extrahépatiques et hépatiques, atteinte rénale...).

La compréhension de la physiopathologie de la NAFLD a permis l'émergence de nombreuses approches thérapeutiques médicamenteuses ou non médicamenteuses innovantes en cours d'évaluation.

La prise en charge des patients nécessite une démarche diagnostique rigoureuse. La biopsie hépatique, qui est l'examen de référence, ne peut pas être proposée à l'ensemble des sujets à risque de NAFLD. Le développement et la validation d'outils non-invasifs sériques et/ou physiques évaluant de façon fiable et reproductible, la

Pour citer cet article : Anty R, Canivet CM, Gual P, Tran A. Stéatoses hépatiques métaboliques : histoire naturelle, physiopathologie et démarche diagnostique. *Hépatogastro* 2017 ; 24 : 702-718. doi : 10.1684/hpg.2017.1490

fibrose mais aussi la NASH et la stéatose sont un enjeu majeur. La mise à disposition de ces marqueurs non invasifs permettra de dépister, d'évaluer et de suivre les patients.

■ **Mots clés** : NAFLD, NASH, foie gras, stéatose, stéatohépatite, insulino-résistance, obésité, surpoids, syndrome métabolique

Abstract

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a major health problem which is now recognized by governmental agencies. NAFLD is a spectrum of diseases including non-alcoholic fatty liver (NAFL), non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and its complications: fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Worldwide, 25% of the general population have NAFL, and 1.5 to 6.5% have NASH. These high frequencies are linked to the epidemic of overweight and obesity. As for obesity, NAFLD is a complex and heterogeneous disease. The mechanisms, the clinical occurrence, the associated diseases and the natural history imply multiple genetic and environmental factors. Insulin-resistance may play a central but not exclusive role in the occurrence of NASH. NAFLD such as obesity and type 2 diabetes is a multisystem disease associated with various complications (cardio-vascular events, hepatic and extra hepatic cancers, chronic kidney disease...).

Advances in the knowledge of the mechanisms of NAFLD led to the development of new pharmacological or non pharmacological treatments, which are undergoing clinical trials.

The management of patients with NAFLD must be well structured, particularly because the liver biopsy, which is still the gold standard, cannot be performed in all suspected subjects.

There is a need to develop and validate new non-invasive tools based on analyses of serum or on physical assessment that allow reliable assessment of fibrosis, the NASH and steatosis. Their availability will allow easy screening, diagnosis and follow-up of patients.

■ **Key words**: NAFLD, NASH, fatty liver, steatohepatitis, insulin-resistance, obesity, overweight, metabolic syndrome

Introduction

La *non-alcoholic fatty liver disease* (NAFLD) constitue une maladie complexe et hétérogène. Nous aborderons sa définition histologique, son épidémiologie et son histoire naturelle. Nous verrons ensuite les bases physiopathologiques des traitements en cours d'évaluation préclinique et clinique. Enfin, nous proposerons une démarche diagnostique. La prise en charge thérapeutique sera abordée dans d'autres documents

constituant le dossier thématique dans laquelle s'insère cette mise au point.

Définition

Le terme NAFLD regroupe un spectre d'anomalies hépatiques allant de la stéatose (en anglais *non-alcoholic fatty liver* (NAFL)), à la stéatohépatite non alcoolique (en anglais *non-alcoholic steatohepatitis* (NASH)) et ses

Dossier thématique

complications : fibrose hépatique, cirrhose et carcinome hépatocellulaire (CHC).

“ **Le terme non-alcoholic fatty liver disease regroupe un spectre d'anomalies hépatiques allant de la stéatose à la stéato-hépatite non alcoolique et ses complications : fibrose hépatique, cirrhose et carcinome hépatocellulaire** ”

La caractérisation précise d'une NAFLD nécessite une analyse histologique par une biopsie du foie qui, du fait de ses contraintes, ne peut pas être proposée à l'ensemble des sujets à risque de NAFLD.

La stéatose est définie par la présence de vacuoles lipidiques, généralement macrovésiculaires, au sein des hépatocytes. Elle est significative lorsqu'elle est supérieure à 5 % et débute typiquement en région péri-centrolobulaire (figure 1A, B, C).

La NASH est définie par l'association d'une stéatose et d'une activité inflammatoire qui comprend une infiltration de cellules inflammatoires (dont des macrophages, des lymphocytes voire des cellules polynucléaires neutrophiles) et des signes de souffrance hépatocytaire à type de ballonnisation (figure 1D). La NASH peut être associée à des lésions de fibrose de sévérité variable. La fibrose au cours de la NASH, comme dans la maladie alcoolique du foie, se développe selon une localisation particulière, d'abord périsinusoidale en région péri-centrolobulaire (zone 3) (figure 1E), puis une fibrose sinusoidale dense peut apparaître, éventuellement associée à une fibrose en pont voire à une cirrhose. Rarement, une inflammation portale et une fibrose à point de départ portale peuvent être observées. D'autres lésions élémentaires peuvent être présentes (corps de Mallory-Denk, corps apoptotiques, réaction ductulaire...), en moindre intensité que ce qui est habituellement observé au cours des maladies alcooliques du foie. Différents scores histologiques sont utiles en routine clinique et en recherche, dont le score de fibrose selon la classification NASH CRN, le score NAS (NAFLD Activity Score) et surtout le score SAF (Stéatose, Activité, Fibrose), détaillés dans les (tableaux 1 et 2) [1-4].

“ **La stéatohépatite non alcoolique est définie par l'association d'une stéatose et d'une activité inflammatoire qui comprend une infiltration de cellules inflammatoires (dont des macrophages, des lymphocytes voire des cellules polynucléaires neutrophiles) et des signes de souffrance hépatocytaire à type de ballonnisation** ”

Le développement d'outils non invasifs, fiables, faciles d'accès et si possible peu onéreux, pour le diagnostic différentiel entre stéatose et NASH et/ou définissant la présence d'une fibrose est crucial. L'enjeu est que ces outils soient disponibles pour l'ensemble du corps médical prenant en charge ces patients (médecins généralistes, endocrinologues/diabétologues, cardiologues, hépatogastroentérologues de tout mode d'exercice et pédiatres).

Épidémiologie

La NAFLD constitue un problème de Santé publique en raison de la grande fréquence de ces lésions à travers le monde. Les estimations épidémiologiques les plus fiables sont basées sur la présence d'une stéatose en imagerie. Les études prenant en considération une élévation isolée de l'activité des transaminases ou de la GGT sous-estiment l'ampleur de la NAFLD, compte tenu de la fréquence de la normalité du bilan hépatique dans ce contexte. L'estimation de la NASH repose sur des approximations à partir de séries de patients ayant eu une biopsie hépatique. Globalement, la prévalence de la NAFLD serait de 25 % de la population adulte mondiale (24 % en Amérique du Nord, 30,5 % en Amérique du Sud, 24 % en Europe, 13,5 % en Afrique, 32 % au Moyen-Orient, 27 % en Asie). La NASH serait présente chez 1,5 à 6,5 % de la population générale [5].

“ **La prévalence de la non-alcoholic fatty liver disease serait de 25 % de la population adulte mondiale** ”

“ **La stéatohépatite non alcoolique serait présente chez 1,5 à 6,5 % de la population générale** ”

La prévalence de la NAFLD augmente avec l'âge des patients (22,4 % chez 30-39 ans, 26,5 % chez les 40-49 ans, 27,4 % chez les 50-59 ans, 28,9 % chez les 60-69 ans, 34 % chez 70-79 ans). La NAFLD et la NASH sont très associées à l'obésité et aux paramètres du syndrome métabolique (tableau 3).

Chez les patients américains ayant un diabète de type 2, la prévalence de la NAFLD est de 65 % dont 7 % aurait une fibrose avancée évaluée par élastographie par résonance magnétique [6].

L'agence américaine du médicament FDA a reconnu que cette maladie était une priorité pour les années à venir. Des recommandations pour le développement accéléré de traitements médicamenteux avec des critères de jugement adaptés ont été faites [7].

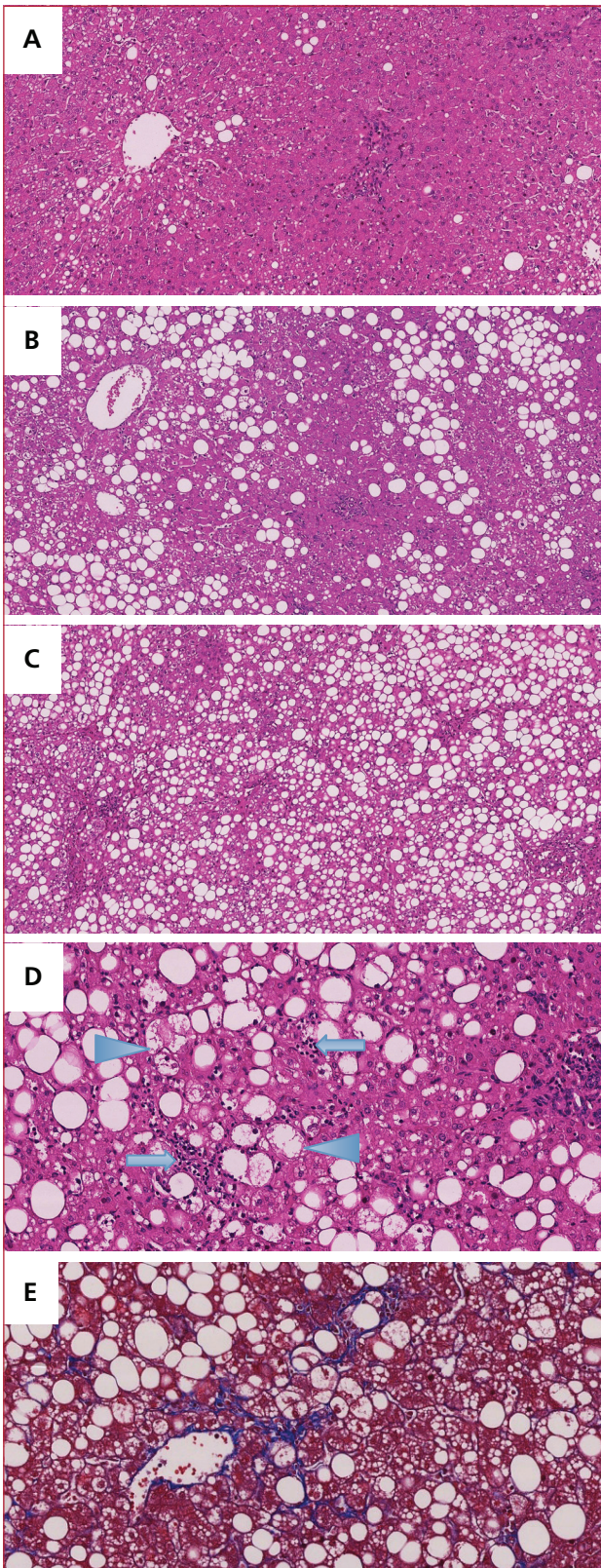


Tableau 1. Fibrose selon la classification NASH CRN (d'après [1])

Fibrose de 0 à 4 :
0 : normal
1 a : fibrose péri-centrolobulaire discrète
1 b : fibrose péri-centrolobulaire modérée
1 c : fibrose péri-portale
2 : fibrose sinusoidale, péri-centrolobulaire et péri portale
3 : septa fibreux
4 : cirrhose

Histoire naturelle

Plusieurs cohortes, avec des ponctions biopsies hépatiques répétées dans le temps, ont éclairé l'histoire naturelle de la maladie (figure 2).

Classiquement, la stéatose, présente chez environ 80 % des patients avec une NAFLD, est associée à un bon pronostic hépatique. Au contraire, la NASH, présente chez environ 20 % des patients avec une NAFLD, est associée à un risque d'évolution vers une fibrose voire une cirrhose. Une notion récente est que, parmi les patients non NASH, ceux qui présentent une stéatose et une inflammation (sans ballonnisation) peuvent développer une NASH et/ou une fibrose hépatique, quelques années plus tard. L'impact de la présence d'une stéatose avec des lésions de ballonnisation (sans inflammation), sur la progression de la fibrose, n'a pas été clairement étudié. Enfin, si les patients avec une « stéatose pure » (sans inflammation, ni ballonnisation hépatocytaire) ont un plus faible risque évolutif hépatique vers une NASH et/ou une fibrose significative, celui-ci est cependant bien présent [8-10].

“ Parmi les patients non NASH, ceux qui présentent une stéatose et une inflammation (sans ballonnisation) peuvent développer une NASH ”

La fibrose hépatique est le principal facteur pronostique de la mortalité hépatique et globale chez les patients.

Figure 1. Exemples de lésions histologiques de *non-alcoholic fatty liver disease* (NAFLD). A) stéatose pure S1 (5 %-33 %) ; B) stéatose pure S2 (33 %- 66 %) ; C) stéatose pure S3 (\geq 67 %) ; D) *non-alcoholic steatohepatitis* (NASH) caractérisée par la présence d'une stéatose, d'une inflammation lobulaire (flèches) et de ballonnisations hépatocytaires (pointes de flèches), coloration hématoxyne et éosine ; E) fibrose F1 péri-centrolobulaire, coloration au trichrome de Masson.

Tableau 2. Scores histologiques NAS (NAFLD Activity Score) et score SAF (Stéatose, Activité, Fibrose) pour la non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) (d'après [1-3])

Score NAS (NASH CRN)			Score SAF (Bedossa et al.)		
Stéatose	Inflammation Nombre foyer /grosissement 200	Ballonisation des hépatocytes	Stéatose	Inflammation Nombre foyer/ grosissement 200	Ballonisation des hépatocytes
0 : < 5 %	0 : 0	0 : absence	0 : < 5 %	0 : 0	0 : absence
1 : 5-33 %	1 : < 2	1 : quelques cellules	1 : 5-33 %	1 : ≤ 2	1 : taille de l'hépatocyte ballonné < 2 hépatocytes normaux
2 : 34-66 %	2 : 2-4	2 : nombreuses cellules	2 : 34-66 %	2 : > 2	2 : taille de l'hépatocyte ballonné ≥ 2 hépatocytes normaux
3 : 67-100 %	3 : > 4		3 : 67-100 %		
Score NAS = Stéatose + Inflammation + Ballonisation Score NAS entre 0 et 2 : « Non NASH » Score NAS entre 3 et 4 : « NASH borderline » Score NAS ≥ 5 : « NASH »			Score SAF : Stéatose S0-S3, Activité (Inflammation + Ballonisation) A0-A4, Fibrose F0-F4 (selon la définition NASH CRN du tableau 1)		

Le score NAS ne doit pas être utilisé pour porter le diagnostic de NASH. Son intérêt est présent dans l'évaluation histologique sous traitement par rapport à la biopsie initiale avant traitement.

Le score SAF peut être utilisé pour diagnostiquer une NASH (association d'une stéatose ≥ 1 et d'une activité (somme du score inflammation + ballonisation) ≥ 2 comportant au moins 1 point pour l'inflammation et au moins 1 point pour la ballonisation). Il peut également être utilisé lors de l'évaluation histologique sous traitement par rapport à la biopsie initiale avant traitement.

Ce facteur pronostique majeur amène à distinguer des patients avec une NASH précoce (« *Early NASH* ») qui ont une fibrose absente ou minime (F0-F1 selon la classification NASH CRN) ; des patients avec une NASH fibrosante (« *Fibrotic NASH* ») qui ont une fibrose significative (F2 selon la classification NASH CRN), ou une fibrose en pont ou sévère (F3 selon la classification NASH CRN) ; et enfin les patients avec une cirrhose NASH (« *Cirrhotic NASH* ») [11].

Tableau 3. Prévalence des anomalies métaboliques au cours de la non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) (stéatose + non-alcoholic steatohepatitis - NASH) et de la NASH à travers le monde (d'après [5])

	NAFLD	NASH
Obésité*	51,3 %	81,3 %
Diabète de type 2	22,5 %	43,6 %
Hyperlipidémie/dyslipidémie	69,2 %	72,1 %
Hypertension artérielle	39,3 %	68 %
Syndrome métabolique	42,5 %	70,6 %

* des disparités régionales existent.
Les définitions utilisées dans les études de cette méta-analyse n'étaient pas homogènes.

“ La fibrose hépatique est le principal facteur pronostique de la mortalité hépatique et globale chez les patients ”

Dans une méta-analyse récente, le taux annuel moyen de progression de la fibrose chez les patients NASH était de 0,09 (IC 95 % : 0,06-0,12) et le taux d'incidence pour 1 000 personnes-années de progression de la fibrose était de 40,8 (IC 95 % : 34,7-47,1) [5].

Cependant, la réversibilité des lésions de stéatose, de NASH et de fibrose (au moins dans les stades initiaux) a également été mise en évidence dans différentes circonstances : évolution spontanée, perte de poids ≥ 8-10 % du poids initial, effets de certains médicaments, chirurgie bariatrique.

L'apparition d'un CHC est l'une des craintes chez un patient ayant une NAFLD. L'incidence annuelle du CHC chez les patients NAFLD était de 0,44 (IC 95 % 0,29-0,66) pour 1 000 personnes-années contre 5,29 (IC 95 % 0,75-37,56) pour 1 000 personnes-années chez les patients NASH [5].

Un CHC au cours de la NAFLD survient dans 70 % des cas chez des patients cirrhotiques mais aussi, dans 30 % des cas, à des stades plus précoces de la maladie (NASH voire stéatose pure). Cela soulève le problème du dépistage du CHC chez ces patients qui sont actuellement très nombreux. Le développement d'outils non invasifs afin d'identifier les patients les plus à risque de développer

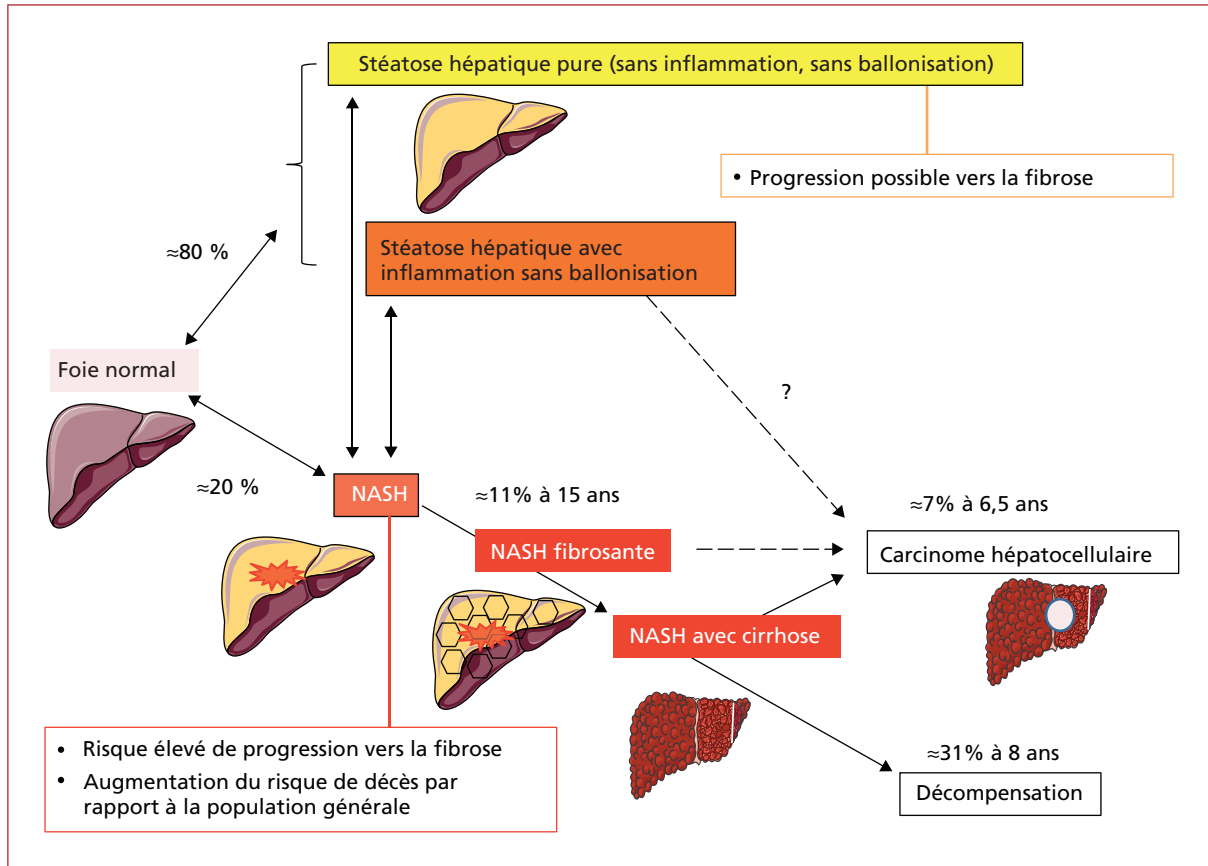


Figure 2. Représentation schématique de l'histoire naturelle de la *non-alcoholic fatty liver disease* (NAFLD). Classiquement, la stéatose, présente chez environ 80 % des patients avec une NAFLD, est associée à un bon pronostic hépatique. Au contraire, la *non-alcoholic steatohepatitis* (NASH) présente chez environ 20 % des patients avec une NAFLD, est associée à un risque d'évolution vers une fibrose voire une cirrhose. Cependant, une stéatose associée à une inflammation présente un risque d'évolution vers une NASH et/ou une fibrose hépatique, en quelques années. De plus, certains patients avec une « stéatose pure » (sans inflammation, ni ballonnisation hépatocytaire) ont aussi un risque évolutif hépatique. La fibrose hépatique est le principal (mais non exclusif) facteur pronostique de la mortalité hépatique et globale. Les lésions de stéatose, de NASH et de fibrose (au moins dans les stades initiaux) sont réversibles. Au cours de la NAFLD, un carcinome hépatocellulaire (CHC) peut compliquer une cirrhose. Cependant, 30 % des CHC apparaissent hors cirrhose, voire hors NASH (sur stéatose). Cela souligne la nécessité de définir les patients avec une NAFLD sans cirrhose devant bénéficier d'un dépistage du CHC (pas de recommandation actuellement).

cette complication et devant donc être dépistés est l'un des enjeux des années futures [12].

“ Un carcinome hépatocellulaire au cours de la *non-alcoholic fatty liver disease* survient dans 70 % des cas chez des patients cirrhotiques mais aussi, dans 30 % des cas, à des stades plus précoces de la maladie ”

La mortalité des patients ayant une NAFLD surtout dans le groupe NASH est augmentée par rapport à la population générale. Les causes de mortalité sont en premier lieu d'origine cardiovasculaires, puis vient la mortalité par cancers extrahépatiques et en 3^e place la mortalité d'origine hépatique [13, 14].

Les taux d'incidence de la mortalité hépatique et de la mortalité globale chez les patients NAFLD seraient de 0,77 (IC 95 % : 0,33-1,77) pour 1 000 personnes-années et 15,44 (IC 95 % : 11,72-20,34) pour 1 000 personnes-années respectivement. Les taux d'incidence de la mortalité hépatique et de la mortalité globale chez les patients NASH seraient de 11,77 (IC 95 % : 7,10-19,53) pour 1 000 personnes-années et 25,56 (IC 95 % : 6,29-103,8) pour 1 000 personnes-années respectivement [5].

“ La mortalité des patients ayant une *non-alcoholic fatty liver disease* surtout dans le groupe stéatohépatite non alcoolique est augmentée par rapport à la population générale. Les causes sont cardiovasculaires, par cancers extrahépatiques et d'origine hépatique ”

La NASH et ses complications sont actuellement la deuxième cause de transplantation hépatique aux USA. Elle est annoncée comme future première cause d'ici 2025 [15].

Physiopathologie

Comme l'obésité ou le diabète de type 2, la NAFLD est une maladie complexe qui implique l'interaction de nombreux paramètres environnementaux, génétiques et épigénétiques. Ces paramètres sont éminemment variables d'un sujet à un autre et expliquent l'hétérogénéité de la maladie. Cette hétérogénéité se traduit par des mécanismes, des expressions phénotypiques (cf. la section consacrées aux formes particulières de la NAFLD) et des complications divers d'un sujet à un autre, voire d'une population (groupe ethno-géographique) à une autre. Comme pour l'obésité, il est possible que la NAFLD ou que les conditions la favorisant s'acquièrent tôt dans la vie, possiblement avant la conception, *in utero* et dans les premières années [16].

“ La non-alcoholic fatty liver disease implique l'interaction de nombreux paramètres environnementaux, génétiques et épigénétiques ”

On estime que 40 % du déterminisme de la NAFLD est d'origine génétique. Une mini-revue dédiée aux facteurs génétiques et épigénétiques actuellement connus dans la physiopathologie de la NAFLD, est présente dans le dossier thématique dans lequel s'insère cette mise au point.

La NAFLD est souvent décrite comme la complication du surpoids, de l'obésité, du syndrome métabolique (cf. définition dans le *tableau 4*, [17]) et surtout de l'insulino-résistance. Cela est souvent vrai, cependant, la concordance n'est pas toujours parfaite. La NASH nécessite souvent des facteurs complémentaires pour apparaître et inversement l'amélioration isolée (par voie médicamenteuse) de l'insulino-résistance n'est pas toujours suffisante pour traiter une NASH.

“ La non-alcoholic fatty liver disease est souvent décrite comme la complication du surpoids, de l'obésité, du syndrome métabolique ”

Une maladie du tissu adipeux

L'une des causes de la NAFLD est un apport alimentaire inadapté, associant un excès calorique et des déséquilibres

nutritionnels. L'excès d'acides gras saturés, d'acides gras polyinsaturés oméga-6 et de fructose industriel (issu du sirop de maïs) est au premier plan. Très fréquemment, une sédentarité et un défaut d'activité physique participent à une balance énergétique entrée/sortie excédentaire pour les apports caloriques avec en conséquence un stockage dans le tissu adipeux. Il semblerait qu'au-delà d'une certaine quantité (variable d'un sujet à l'autre, selon la théorie de l'expensibilité du tissu adipeux) l'augmentation du tissu adipeux sous-cutané s'accompagne de différentes anomalies qui caractérisent le surpoids ou l'obésité « pathologique », dont une augmentation du tissu adipeux viscéral. En effet, il est frappant de constater que certaines prises de poids relativement faibles (de l'ordre d'une dizaine de kilos) peuvent s'associer à des NASH fibrosantes ± accompagnées d'un diabète de type 2, alors qu'à l'opposé 6 à 10 % des patients obèses morbides (indice de masse corporelle ≥ 40 kg/m²) ont un foie histologiquement normal.

“ L'une des causes de la non-alcoholic fatty liver disease est un apport alimentaire inadapté, associant un excès calorique et des déséquilibres nutritionnels. ”

“ Une sédentarité et un défaut d'activité physique participent à une balance énergétique entrée/sortie excédentaire pour les apports caloriques ”

Chez la majorité des patients néanmoins, la présence d'un surpoids ou d'une obésité, en particulier lorsqu'elle est située sur la partie supérieure du corps, s'accompagne de complications métaboliques. L'augmentation de la circonférence abdominale (qui est l'un des éléments constitutifs de la définition du syndrome métabolique) et/ou la présence d'une bosse de bison (lipohypertrophie dorso-cervicale) sont prédictives de la présence d'une NAFLD/NASH.

L'augmentation du tissu adipeux (hypertrophie et hyperplasie des adipocytes) s'accompagne de différentes anomalies qui peuvent participer à l'apparition et à l'aggravation de la NAFLD (*figure 3*). Parmi ces anomalies, on note, en premier, l'apparition d'une inflammation locale du tissu adipeux caractérisée par la présence de cellules inflammatoires (macrophages, lymphocytes et cellules dendritiques) et par une inflammation systématique de bas grade (appelée également inflammation métabolique ou métaflammation) [18]. Cette inflammation locale s'accompagne d'une discrète élévation sérique des protéines de la phase aiguë de l'inflammation (dont la *C-reactive protein*) et de cytokines pro-inflammatoires (Interleukine (IL) 6, IL1b...) produites en partie, par le tissu

Tableau 4. Définition internationale du syndrome métabolique (2009), (d'après [16])

3 éléments parmi :	
Obésité centrale	Tour de taille (variable selon l'ethnie) : Sujet européen : H \geq 94 cm, F \geq 80 cm Sujet américain : H \geq 102 cm, F \geq 88 cm Sujet asiatique : H \geq 90 cm F \geq 80 cm
Élévation des triglycérides	\geq 1,7 mmol/L (1,5 g/L) ou traitement spécifique
Baisse du HDL-cholestérol	H : $<$ 1,03 mmol/L (0,4 g/L) ; F : $<$ 1,29 mmol/L (0,5 g/L) ou traitement spécifique
Élévation de la pression artérielle	Systolique \geq 130 mmHg ou diastolique \geq 85 mmHg ou traitement spécifique
Élévation de la glycémie	\geq 5,6 mmol/L (1,0 g/L) ou diabète de type 2 connu

H : Homme ; F : Femme ; HDL : high density lipoprotein.

adipeux. En effet, la modification de facteurs produits et sécrétés par le tissu adipeux est la 2^e anomalie présente. Ces substances – les adipokines – sont plus d'une centaine et ont des actions autocrines, paracrines et endocrines. Certaines, qui favorisent notamment l'inflammation, l'insulino-résistance ou le tonus vasculaire, sont augmentées (leptine, IL6, PAI-1, résistine...), d'autres comme l'adiponectine, qui est insulino-sensibilisante, sont diminuées. Une 3^e anomalie est l'apparition d'une insulino-résistance du tissu adipeux, médiée en partie par cette inflammation locale, qui est associée à une élévation relative de la lipolyse. Celle-ci cause un relargage massif d'acides gras libres dans la circulation veineuse systémique (acides gras en provenance du tissu adipeux sous-cutané) et dans la circulation portale (acides gras en provenance du tissu adipeux viscéral).

Différentes anomalies peuvent participer à l'apparition et à l'aggravation de la non-alcoholic fatty liver disease : inflammation locale du tissu adipeux, modification de facteurs produits et sécrétés par le tissu adipeux, apparition d'une insulino-résistance du tissu adipeux

Ces acides gras inondent le foie et participent largement à l'afflux de lipides qui entraîne l'apparition de la stéatose (stockage ectopique). Ces acides gras vont également inonder le système musculaire squelettique et participent

à l'apparition d'une insulino-résistance de ce dernier. Cela entraîne un défaut de captation du glucose sérique par le système musculaire. Cet excès de glucose circulant est capté par le foie et participe à la formation de lipides intra-hépatiques via la lipogénèse *de novo* [19].

L'ensemble de ces anomalies est favorisé par un régime alimentaire déséquilibré, une sédentarité excessive et un manque d'activité physique. Il faut donc proposer systématiquement l'application de mesures diététiques (restriction calorique, limitation des aliments à haute densité énergétique, équilibre dans l'apport des macro-et des micronutriments), promouvoir une activité physique régulière (\geq 200 à 300 mn d'activité modérée à intense chaque semaine) et lutter contre la sédentarité (diminution du temps passé assis ou allongé devant un écran). La modification durable du mode de vie peut être renforcée par une approche de type thérapie cognitivo-comportementale. Cette approche hygiéno-diététique qui a de nombreux bénéfices sur la santé en général a cependant des limites en termes d'efficacité (seuls 10 % des patients en surpoids ou obèses arrivent à perdre 10 % du poids corporel initial, et 30 % des patients perdent 5 à 8 % du poids corporel). Une approche préventive centrée sur les enfants et les adolescents, serait essentielle à l'échelle de la société. Elle pourrait passer par des actions répétées éducatives familiales et scolaires, voire par des actions légales coercitives fortes (taxe soda et sucre raffiné).

Il faut proposer systématiquement l'application de mesures diététiques, la promotion d'une activité physique régulière et la lutte contre la sédentarité

La modification durable du mode de vie peut être renforcée par une thérapie cognitivo-comportementale

Rôle du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal contient environ 10^{12} à 10^{14} microorganismes (représentant 3,3 millions de gènes qui constituent « notre autre génome »), principalement des bactéries, avec lesquels nous vivons en symbiose. Le microbiote intestinal nous fournit de nombreux avantages tels qu'une assimilation de substances non digérées autrement, la production de métabolites trophiques pour les cellules intestinales, une modulation du cycle entéro-hépatique des acides biliaires, une protection par rapport à la colonisation/infection par des bactéries pathogènes. La modification durable du microbiote intestinal (dysbiose intestinale) comme élément central de l'apparition de nombreuses maladies systémiques notamment l'obésité et la NAFLD a été bien documentée grâce à l'arrivée de

Dossier thématique

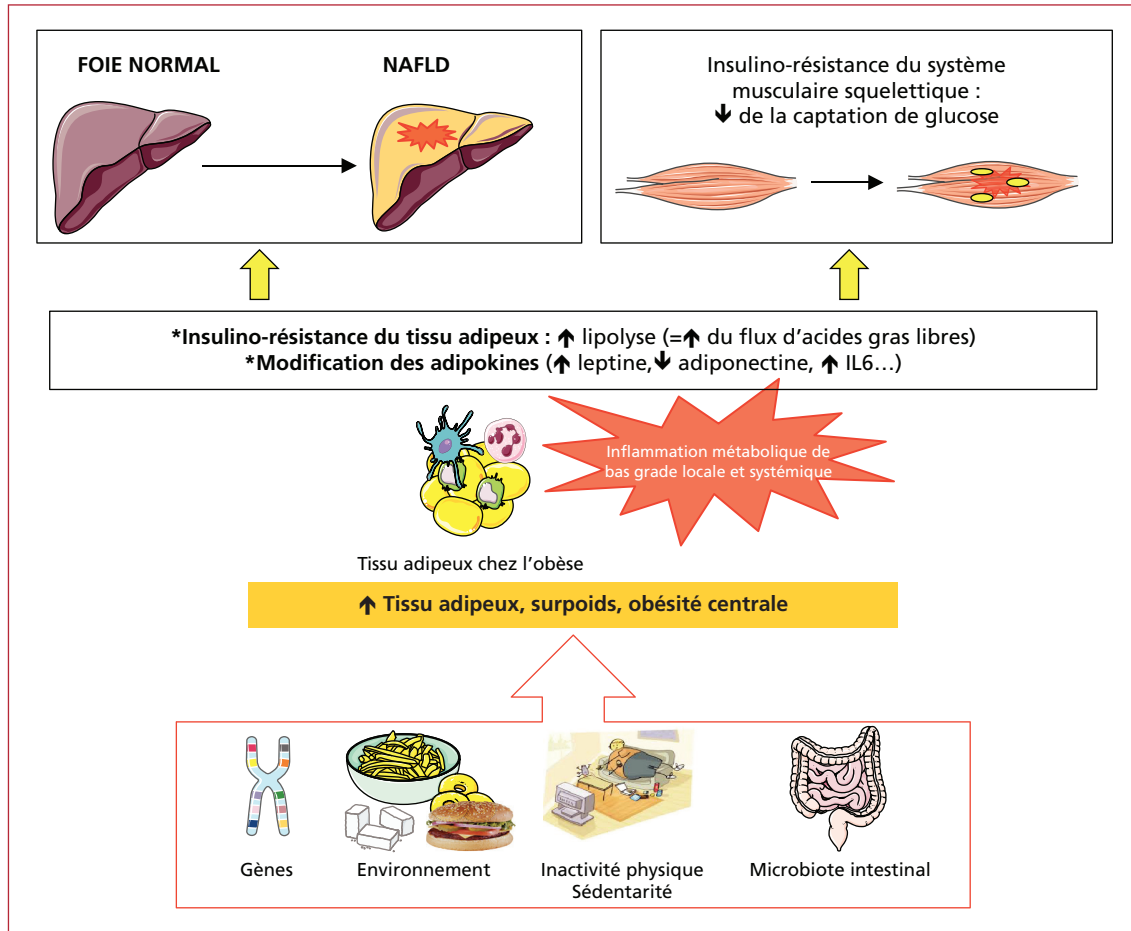


Figure 3. Représentation schématique des anomalies systémiques présentes au cours de l'augmentation du tissu adipeux conduisant au surpoids et à l'obésité. Différents facteurs génétiques, environnementaux (apports caloriques excessifs et déséquilibrés), ainsi que la sédentarité, le manque d'activité physique et une dysbiose intestinale participent à l'augmentation du tissu adipeux. Au-delà d'un certain seuil, une inflammation locale du tissu adipeux (avec infiltration de cellules macrophages et lymphocytaires) et une inflammation systémique de bas grade apparaissent. Celles-ci s'accompagnent d'une insulino-résistance du tissu adipeux caractérisée par une augmentation de la lipolyse et par une modification de la production et de la sécrétion des adipokines. Un flux d'acides gras libres va inonder les organes périphériques dont le foie et les muscles. Les dépôts graisseux ectopiques musculaires participeraient à une insulino-résistance musculaire qui diminue la captation musculaire de glucose et augmente le glucose circulant.

nouvelles technologies (métagénomique) dans des modèles expérimentaux murins et chez l'homme [20]. Chez l'homme, une diminution quantitative et qualitative de la richesse des populations bactériennes est associée à une augmentation de l'adiposité, de l'insulino-résistance, d'une dyslipidémie, et d'une inflammation systémique de bas grade [21]. Certaines de ces anomalies sont partiellement corrigées après une perte de poids liée à un régime hypocalorique mené pendant 6 semaines [22].

“ La modification durable du microbiote intestinal (dysbiose intestinale) comme élément central de l'apparition de nombreuses maladies systémiques a été bien documentée ”

Le microbiote intestinal du nourrisson s'acquiert à la naissance avec une transmission materno-fœtale qui est influencée par le mode d'accouchement (césarienne ou voie basse), l'alimentation (allaitement maternel ou produits du commerce) et l'exposition à l'environnement et aux antibiotiques. Une transmission partielle de l'obésité via le microbiote intestinal a été démontrée dans des modèles expérimentaux murins [23]. Chez l'adulte, différents genres bactériens au niveau du microbiote intestinal ont été associés à la présence d'une NASH (*Bacteroides*) ou d'une fibrose significative (*Prevotella*) [24]. Récemment, l'augmentation de l'ADN bactérien dans le sang a été corrélée à la présence de la fibrose hépatique chez des patients ayant une NAFLD.

Cette découverte du microbiote sanguin offrirait de nouveaux marqueurs de NASH [25].

Les modèles murins sont en faveur d'une augmentation de la perméabilité intestinale au cours de la NAFLD et de la NASH, avec une augmentation de la circulation portale et systémique de débris bactériens, les *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP), et du lipopolysaccharide (LPS). Ces éléments participeraient à l'activation des macrophages hépatiques via une activation de différents récepteurs membranaires spécifiques (*Toll Like Receptor*). Cette activation des macrophages jouerait un rôle clef dans l'apparition de la NASH. Au niveau intestinal, une augmentation de la production d'acides gras à chaîne courte, d'éthanol endogène, de triméthylamine et d'acides aminés ramifiés, associée à une diminution de la disponibilité de la choline, et à une modulation du *fasting-induced adipose factor* (FIAP) favoriseraient une NASH. Le FIAP est un inhibiteur circulant de la lipoprotéine lipase adipocytaire, produit par l'intestin, le foie et le tissu adipeux. La dysbiose intestinale est associée à des anomalies de l'immunité de la paroi intestinale médiée par différentes cellules. La modulation de molécules complexes intracellulaires (inflammasome), qui jouent un rôle-clé dans la réponse inflammatoire, a été mise en évidence lors de la manipulation du microbiote intestinal [26].

Il est possible que les anomalies du microbiote intestinal présentes au cours de l'obésité et de la NAFLD soient à la fois cause et conséquence au cours de ces maladies.

La modulation du microbiote intestinal par un régime alimentaire adapté (riche en fibres), l'usage de prébiotique(s), de probiotique(s), d'antibiotique(s), voire à terme la transplantation fécale ou de composés issus du microbiote est une voie de recherche dans la NAFLD. De façon similaire, des composés modulant la perméabilité intestinale, la réponse inflammatoire intestinale ou interférant avec le LPS ou avec différents PAMP sont également en cours d'évaluation préclinique.

Lésions hépatiques

• Stéatose

La stéatose hépatique chez l'homme au cours de la NAFLD, résulte d'un excès d'apport de lipides au foie et d'un défaut d'utilisation et d'export des lipides (figure 4).

“ La stéatose hépatique chez l'homme au cours de la non-alcoholic fatty liver disease résulte d'un excès d'apport de lipides au foie et d'un défaut d'utilisation et d'export des lipides ”

Ainsi, il a été démontré que la majorité (60 %) des lipides hépatiques est issue du flux d'acides gras venant d'un

relargage du tissu adipeux sous-cutané. Le tissu adipeux viscéral joue également un rôle mais paradoxalement dans une moindre mesure. Les autres apports de lipides viendraient de l'alimentation sous forme de chylomicrons (15 %) et par la lipogenèse *de novo* (25 %). Les voies d'utilisation des lipides sont la bêta-oxydation dans les mitochondries et l'export de VLDL. Au cours de la NAFLD, la bêta-oxydation semble plutôt augmentée (les données chez l'homme sont parfois contradictoires). Cette augmentation de la bêta-oxydation augmente la production de radicaux hydrogénés qui majorent le stress oxydatif. Lorsque les défenses antioxydantes sont dépassées, ce stress oxydatif devient délétère et altère les mitochondries et d'autres organelles cellulaires.

Au cours de la NAFLD, l'export des VLDL est augmenté ce qui contribue à l'augmentation des triglycérides et à la baisse du HDL-cholestérol (2 éléments participant à la définition du syndrome métabolique).

La présence d'une stéatose pure est, le plus souvent, associée à un bon pronostic hépatique. Cela vient du fait que le stockage des acides gras libres sous forme inerte de triglycérides n'est pas associé à des lésions hépatocytaires. Dans ce cas, la stéatose isolée serait un facteur protecteur pour le foie. Cependant, chez certains patients un défaut d'expansion de la stéatose entraînerait l'accumulation de lipides intermédiaires (acides gras libres, diacylglycérol, oxysterols, cholestérol, phospholipides, céramides...) particulièrement toxiques pour l'hépatocyte (concept de la « lipotoxicité »). Ces lipides toxiques peuvent également s'accumuler lors de l'altération de la bêta-oxydation présente lors de la dysfonction mitochondriale. La lipotoxicité est particulièrement impliquée dans l'apparition de la NASH en induisant différents stress cellulaires incluant le stress oxydatif et celui du réticulum endoplasmique et une altération de l'autophagie.

La présence d'une stéatose est souvent associée à une insulino-résistance hépatique. Celle-ci se traduit par une augmentation de la production endogène de glucose. Celle-ci participe à l'hyperglycémie à jeun voire à l'apparition d'un diabète de type 2 (éléments participant à la définition du syndrome métabolique) par épuisement des cellules insulino-sécrétrices des îlots de Langerhans. L'altération de la voie de la signalisation de l'insuline au niveau hépatique au cours de la stéatose, est favorisée par différents acteurs. Parmi ceux-ci, la translocation membranaire de la *protein kinase C* (PKC) isoform ϵ altère directement la fonctionnalité du récepteur membranaire de l'insuline [19].

“ La présence d'une stéatose est souvent associée à une insulino-résistance hépatique ”

Dossier thématique

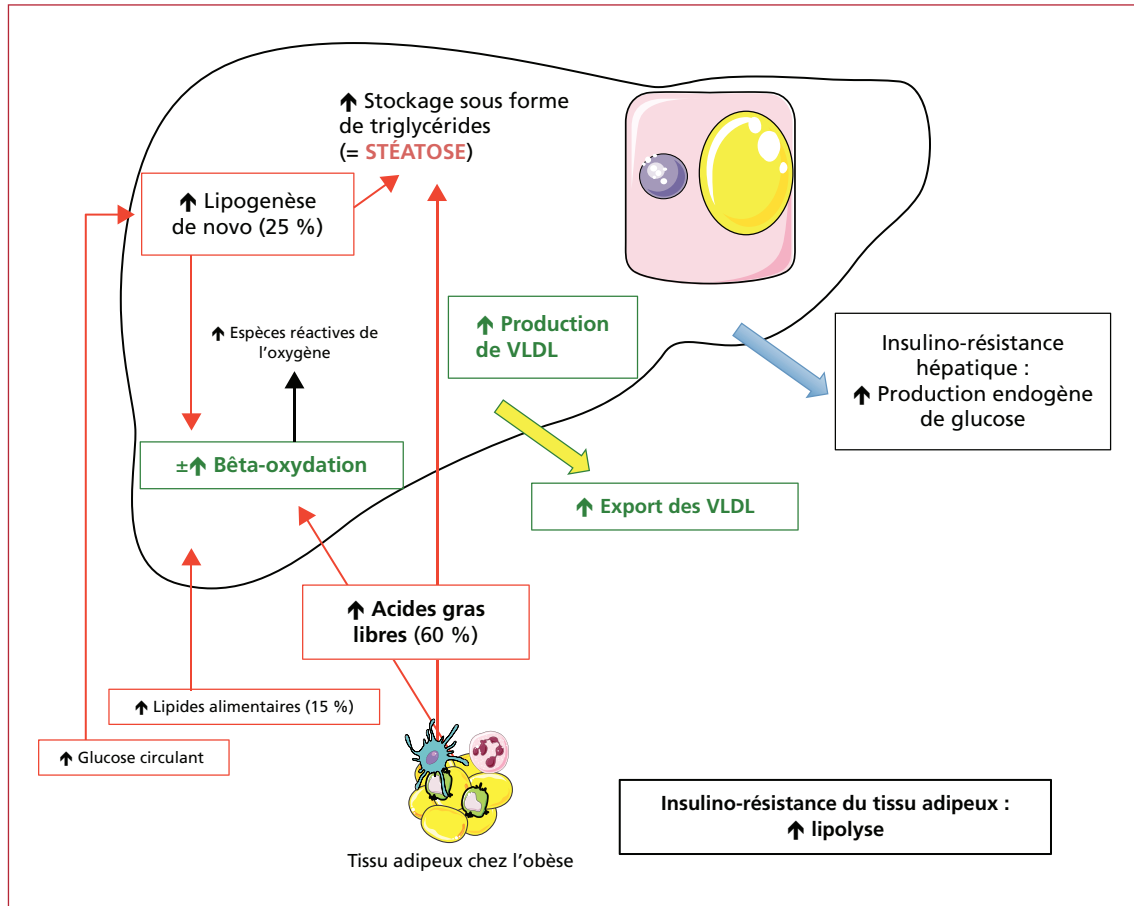


Figure 4. Représentation schématique de l'apparition d'une stéatose hépatique. La majorité (60 %) des lipides hépatiques est issue du flux d'acides gras venant d'un relargage du tissu adipeux sous-cutané. Le tissu adipeux viscéral joue également un rôle mais, paradoxalement, dans une moindre mesure. Les autres lipides viendraient de l'apport alimentaire sous forme de chylomicrons (15 %) et de la lipogénèse *de novo* (25 %) qui est notamment alimentée par l'excès de glucose circulant. Les voies d'utilisation des lipides sont la bêta-oxydation dans les mitochondries et l'export de VLDL. Au cours de la NAFLD, la bêta-oxydation semble plutôt augmentée (les données chez l'homme sont parfois contradictoires) ainsi que l'export des VLDL. La présence d'une stéatose est souvent associée à une insulino-résistance hépatique qui s'associe à une augmentation de la production endogène de glucose.

Ainsi, la stéatose hépatique est souvent considérée comme étant, à la fois, une conséquence et une cause de l'insulino-résistance.

mort cellulaire (voie de l'apoptose intrinsèque) qui sont présents lors de la souffrance cellulaire et peuvent conduire à l'apoptose hépatocytaire (figure 5).

“ La stéatose hépatique est souvent considérée comme étant, à la fois, une conséquence et une cause de l'insulino-résistance ”

“ La dysfonction mitochondriale joue un rôle essentiel dans l'apparition des lésions de non-alcoholic steatohepatitis ”

• Non-alcoholic steatohepatitis

Comme vu ci-dessus, la dysfonction mitochondriale joue un rôle essentiel dans l'apparition des lésions de NASH. La dysfonction mitochondriale se traduit par des anomalies de la chaîne respiratoire. L'altération de la physiologie mitochondriale peut amener à l'activation de signaux de

La lipotoxicité participe à une augmentation du stress du réticulum endoplasmique qui, au final, peut aussi générer des signaux de mort cellulaire (apoptose, nécrose, pyroptose) et amener à la production d'IL1b qui est une puissante cytokine pro-inflammatoire. L'inflammation, elle-même, aggrave cette souffrance hépatocytaire (*tumor necrosis factor α* (TNF α), FAS...).

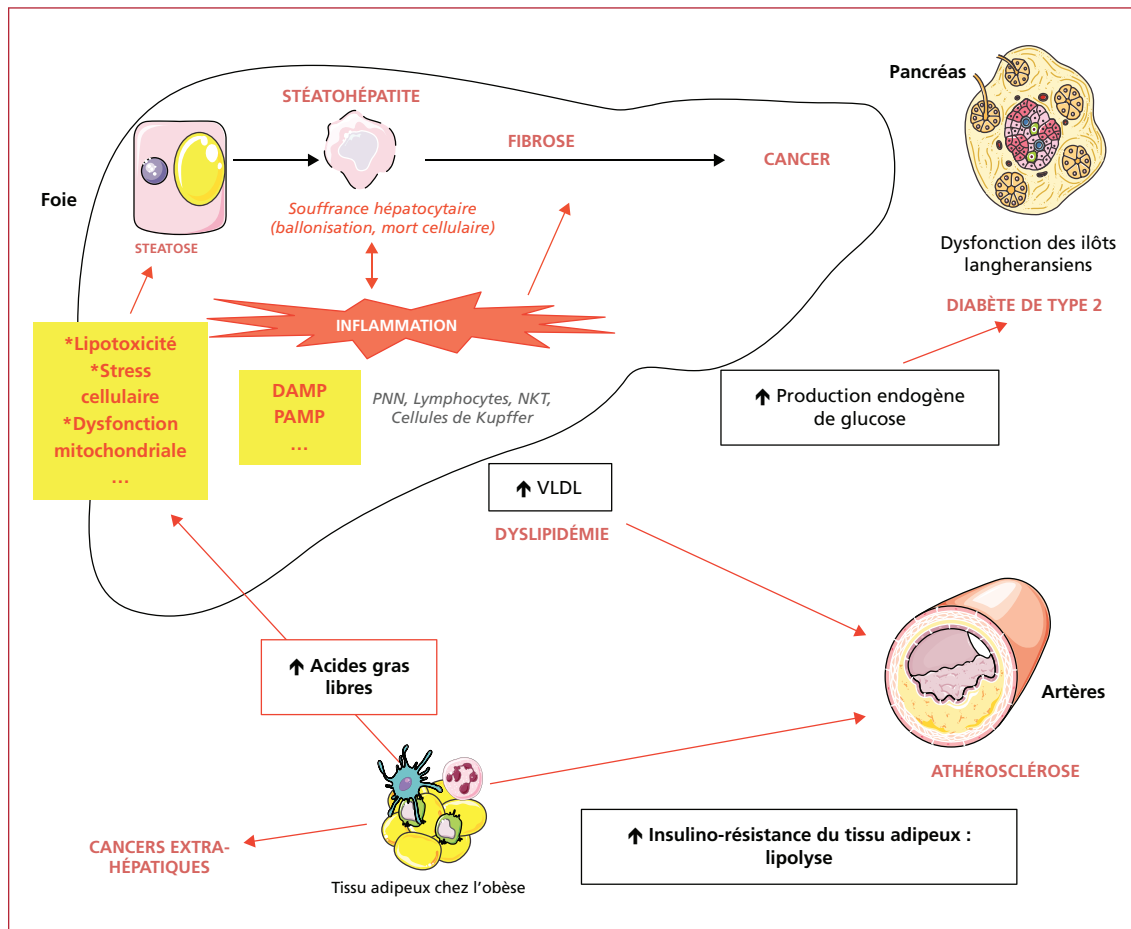


Figure 5. Représentation schématique de l'apparition d'une *non-alcoholic steatohepatitis* (NASH). Au cours de la NASH, l'augmentation de la bêta-oxydation s'associerait à une augmentation de la production de radicaux hydrogénés qui participeraient au stress oxydatif. Lorsque les défenses antioxydantes sont dépassées ce stress oxydatif devient délétère et altère les mitochondries et d'autres organelles cellulaires conduisant à une souffrance hépatocytaire. L'accumulation de lipides lipotoxiques (acides gras libres, diacylglycérol, oxysterols, cholestérol, phospholipides, céramides...) va aggraver la dysfonction mitochondriale, le stress cellulaire et l'inflammation. La souffrance ou la mort hépatocytaire libère des *damage-associated molecular patterns* (DAMP) qui favorisent l'inflammation et les lésions cellulaires. Ces signaux cellulaires vont activer les cellules de Kupffer, les lymphocytes, les cellules *natural killer T* (NKT) ainsi que les cellules stellaires en myofibroblastes et déclencher la fibrogenèse. Les cellules de Kupffer du foie peuvent également être activées par les *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) issus du microbiote intestinal, via des récepteurs spécifiques. Ces cellules inflammatoires et les cellules stellaires vont interagir entre elles et activeraient les cellules progénitrices qui peuvent participer à la carcinogenèse.

La souffrance ou la mort hépatocytaire libère des *damage-associated molecular patterns* (DAMP). Les DAMP regroupent différents éléments tels que les exosomes (petites vésicules membranaires qui véhiculent des signaux de stress à des cellules distantes), des débris membranaires ou de l'ADN cellulaire. Les DAMP peuvent avoir des effets autocrates et paracrines et peuvent activer les cellules inflammatoires hépatiques (notamment les cellules de Kupffer) et les cellules stellaires. De nombreux autres signaux de souffrance hépatocytaire ont été identifiés incluant des morphogènes, des cytokines, des micro-ARN, et le ligand Sonic Hedgehog qui vont entraîner la transcription de différents gènes

hépatocytaires impliqués dans la prolifération, la différenciation et la viabilité cellulaire. Ces différents signaux cellulaires vont activer les cellules stellaires en myofibroblastes et initier la fibrogenèse. Ces signaux vont également activer les cellules de Kupffer, les lymphocytes et les cellules *natural killer T* (NKT). Bien que les fonctions exactes des cellules lymphocytaires ne soient pas parfaitement connues, on estime que l'activation et la polarisation des lymphocytes T-helper (Th) 1 et Th17 contribueraient à la NASH alors que l'activation des cellules T régulatrices diminuerait la NASH en inhibant la réponse immunitaire. Ces cellules inflammatoires vont interagir entre elles et avec les cellules stellaires activées.

Copyright © 2019 John Libbey Eurotext. Téléchargé par MME CLEMENCE CANIVET le 12/11/2019.

Enfin, les signaux cellulaires vont aussi activer les cellules progénitrices qui peuvent participer à la carcinogenèse. Les cellules de Kupffer du foie, entre autres, peuvent également être activées par les *pathogen associated molecular patterns* (PAMP) issus du microbiote intestinal via leurs récepteurs *toll-like* (TLR). La balance entre les macrophages pro-inflammatoires de phénotype M1 et ceux anti-inflammatoires de phénotype M2 serait déséquilibrée en faveur du type M1 et de la production de différentes cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL1, IL6...).

Différentes cibles moléculaires font l'objet d'une recherche intense. Notre équipe a récemment montré que l'intégrine membranaire CD44 exprimée sur les cellules immunitaires activées était impliquée dans le recrutement et l'activation des macrophages intra-hépatiques (en réponse aux DAMP, au LPS et aux acides gras saturés). Cette voie participerait aux lésions hépatiques inflammatoires et fibrosantes et serait une cible thérapeutique potentielle [27]. La voie du récepteur nucléaire *farnesoid X receptor* (FXR) serait également impliquée. FXR participe au métabolisme normal des acides biliaires, a des propriétés anti-inflammatoires au niveau hépatique et intestinal, et augmenterait l'expression hépatique de la *nitric oxide synthase*. Un analogue de FXR, l'acide obéticholique est en cours d'évaluation dans un essai thérapeutique de phase 3 après que les données d'une étude de phase 2 aient montré une diminution de la stéatose, de l'inflammation, de la ballonnisation et de la fibrose hépatique chez des patients avec une NASH.

Les récepteurs nucléaires PPAR alpha sont impliqués dans le métabolisme lipidique hépatique en favorisant la bêta-oxydation et l'export de VLDL. L'élafibranor un double agoniste PPAR alpha et PPAR delta (impliqué notamment dans la bêta-oxydation musculaire) est en cours d'évaluation en phase 3 après que les données de phase 2 aient montré dans un sous-groupe de patients NASH une amélioration de la stéatose et de l'activité.

L'inhibition par le selonsertib de l'*apoptosis signal kinase-1* (ASK1), qui serait impliqué dans l'apoptose induite par le stress oxydatif, aurait un effet antifibrosant. La modulation des chémokines (C-C motif) receptor 2 (CCR 2) et CCR 5 par le composé cénicriviroc serait également associée à une diminution de la fibrose (mais pas de l'inflammation) [19, 28].

La meilleure connaissance des mécanismes moléculaires de la NASH, permet un foisonnement de la recherche privée et publique pour tester l'intérêt de nouvelles molécules anti-NASH et /ou antifibrosante.

Manifestations extrahépatiques

La NAFLD est une maladie multisystémique, ce qui explique que de nombreuses maladies extrahépatiques

soient associées. Ainsi, la NAFLD et la NASH sont associées à une augmentation des événements cardiovasculaires qui sont la première cause de mortalité chez ces patients.

“ La non-alcoholic fatty liver disease est une maladie multisystémique ”

La NASH est prédictive de l'apparition d'un diabète de type 2. Le dépistage d'un diabète doit donc être réalisé par une mesure de glycémie à jeun ($\geq 1,26$ g/L) ou une glycémie au hasard dans la journée (≥ 2 g/L) ou la mesure de l'hémoglobine glyquée ($\geq 6,5$ %) ou un test de tolérance orale du glucose, 2 heures après l'ingestion de 75 g de glucose (glycémie ≥ 2 g/L).

Une NAFLD peut être associée à la présence de cancers extrahépatiques, d'une hypothyroïdie, d'un syndrome des apnées et hypopnées obstructives du sommeil, d'une ostéoporose, d'une maladie rénale chronique et d'un syndrome des ovaires polykystiques [11].

Démarche diagnostique

Évoquer le diagnostic

Une NAFLD doit être cherchée (par exemple en réalisant une échographie abdominale \pm un bilan hépatique) chez tout patient ayant une insulino-résistance (indice HOMA IR élevé (≥ 2 à 3 – le seuil optimal doit faire l'objet d'évaluations futures-)) et/ou un surpoids ou une obésité ou un syndrome métabolique ou un diabète de type 2. Ce dépistage est particulièrement important chez les sujets à risque de NASH fibrosante (> 50 ans, diabète de type 2, syndrome métabolique).

“ Une non-alcoholic fatty liver disease doit être cherchée chez tout patient ayant une insulino-résistance et/ou un surpoids ou une obésité ou un syndrome métabolique ou un diabète de type 2 ”

Inversement, la découverte d'une stéatose hépatique (quel que soit le bilan hépatique) doit faire chercher les différents paramètres du syndrome métabolique.

“ La découverte d'une stéatose hépatique (quel que soit le bilan hépatique) doit faire rechercher les différents paramètres du syndrome métabolique ”

Enfin, une NAFLD doit être suspectée lors d'une anomalie du bilan hépatique (élévation de l'activité de l'ALAT \pm ASAT, \pm GGT) inexpliquée par ailleurs [11].

Chercher systématiquement une comorbidité hépatique associée

La recherche d'une prise d'alcool excessive (principal diagnostic différentiel) est à chercher de façon systématique. Malgré le nom de la NAFLD, l'association d'une atteinte hépatique liée à une NAFLD et à une prise d'alcool excessive est possible et est même relativement fréquente. Une prise en charge mixte addictologique et spécifiquement anti NAFLD/NASH doit alors être proposée.

Chercher une prise d'alcool excessive

Compte tenu de la fréquence des NAFLD/NASH dans la population générale, une démarche rigoureuse éliminant les différentes causes « classiques » d'atteinte hépatique doit être faite, lors de l'exploration d'une anomalie du bilan hépatique ou de la découverte d'une stéatose à l'imagerie. Ces différentes causes, parfois associées à une authentique NAFLD, sont une hépatite virale C (stéatose au cours de l'infection par un virus de génotype 3), une hépatite B, une atteinte médicamenteuse, une hémochromatose, une hépatite auto-immune, une maladie cœliaque... [11].

Une démarche rigoureuse est nécessaire pour éliminer les différentes causes « classiques » d'atteinte hépatique

Évoquer une NAFLD secondaire « rare »

Avant de retenir le diagnostic de NAFLD classique (primitive), il faut évoquer voire éliminer les causes rares de NAFLD secondaires notamment : la prise d'un médicament stéatogène (glucocorticoïdes, amiodarone, tamoxifène, 5-fluorouracile, irinotécan, cisplatine, asparaginase, méthotrexate, inhibiteurs nucléosidiques de la reverse transcriptase du VIH, tétracycline, acide valproïque, perhexiline...), une maladie de Wilson, une pullulation microbienne intestinale, une nutrition parentérale, une dénutrition sévère, une α /hypobétalipoprotéïnémie, un hypopituitarisme ou une hypothyroïdie. Exceptionnellement, un déficit partiel en lipase acide lysosomal (stéatose d'un sujet jeune avec une

dyslipidémie) peut être diagnostiqué (un test buvard de dépistage est facilement disponible) [11].

Avant de retenir le diagnostic de non-alcoholic fatty liver disease classique (primitive), il faut évoquer voire éliminer les causes rares de NAFLD secondaires

Pour tout patient avec une NAFLD, chercher et traiter

- les différents paramètres du syndrome métabolique : surpoids/obésité, intolérance au glucose ou diabète (*prescrire une « glycémie à jeun »*), dyslipidémie (*prescrire une « Exploration d'une Anomalie du bilan Lipidique (EAL) »*), hypertension artérielle mais aussi les autres facteurs de risque cardiovasculaire (tabagisme, élévation du LDL, antécédents personnels et familiaux d'événements cardiovasculaires). L'application des recommandations des sociétés savantes doit être faite. L'aide d'un réseau médical et paramédical (cardiologue, endocrinologue, addictologue, diététicien, psychologue...) peut être utile ;
- les manifestations extrahépatiques vues précédemment [11].

Évaluer l'état hépatique

L'évaluation de la fibrose hépatique est essentielle à la prise en charge des patients. Les recommandations 2016 de la société européenne d'étude du foie (EASL) préconisent la combinaison d'un test de biomarqueurs sériques et d'une mesure de l'élastographie impulsionnelle hépatique (FibroScan[®], sonde M ou sonde XL spécialement développée pour les patients obèses). Différents tests sériques gratuits (NAFLD fibrosis score (www.naflscore.com), Fib 4 (medicalcul.free.fr/fib4.html)) ou commerciaux (ELF[®], Fibrotest[®], FibroMeter[®]) sont disponibles. Les tests sériques commerciaux ne sont pas encore remboursés en France ce qui limite leur usage.

La Société européenne d'étude du foie préconise la combinaison d'un test de biomarqueurs sériques et d'une mesure de l'élastographie impulsionnelle hépatique

Parmi les tests physiques d'évaluation de l'élasticité hépatique, l'élastographie impulsionnelle par FibroScan[®] (Echosens, Paris, France) est la mieux évaluée. D'autres techniques prometteuses nécessitent des validations complémentaires comme la *point shear wave elastography* également appelée *acoustic radiation force impulse* (ARFI) (Virtual touch tissue quantificationTM, Siemens ;

elastography quantification ElastQM™, Philips), la *2D-shear wave elastography* (Aixplorer™ Supersonic Image, France) ou l'élastographie par résonance magnétique.

L'association du test sérique FibroMeter™ et de l'élastographie impulsionnelle à vibration contrôlée (VCTE™) (FibroMeter VCTE) semble avoir une performance diagnostique intéressante.

La détermination de seuils précis avec ces différents marqueurs non invasifs est toujours l'objet de recherches intenses. Récemment, l'élastographie impulsionnelle par FibroScan® avec la sonde M a été évaluée dans une cohorte bicentrique française de 291 patients NAFLD ayant eu une biopsie du foie. Parmi ces patients principalement en surpoids (30 %) ou obèse (60 %), la mesure d'élastographie impulsionnelle était en échec chez 14,4 % et n'était pas fiable (IQR/M > 0,3 pour des résultats $\geq 7,1$ kPa) chez 9 %. Les critères de fiabilité (IQR/M < 0,3 ou > 0,3 avec des résultats < 7,1 kPa) étaient remplis chez 76,6 % des patients. Les seuils associés à une sensibilité ≥ 90 %, étaient de 6,2 kPa pour une fibrose \geq F2, 8,2 kPa pour une fibrose \geq F3, et 9,5 kPa pour la cirrhose. Les seuils associés à une spécificité ≥ 90 %, étaient 9,8 kPa pour une fibrose \geq F2, 12,5 kPa pour une fibrose \geq F3 et 16,1 kPa pour la cirrhose [29].

Dans les cas où l'évaluation non invasive de la fibrose est inefficace ou discordante, une biopsie hépatique doit être proposée. Dans le cas où les méthodes non invasives sont en faveur de lésions de fibrose sévère ou de cirrhose, une biopsie hépatique de confirmation peut être réalisée [11, 30].

L'évaluation quantitative initiale de la stéatose n'est pas utile en routine clinique. Elle pourrait être intéressante dans le suivi des patients. Elle peut être faite avec des biomarqueurs (Fatty liver index, Steatostest®, NAFLD liver fat score) ou par imagerie (atténuation ultrasonore ou controlled attenuation parameter (CAP™)) ou spectro-IRM-H1). L'utilisation du CAP™ couplé au FibroScan® améliorerait la performance diagnostique de l'évaluation de la fibrose hépatique surtout pour les patients avec une fibrose F0-F2 [31].

L'évaluation non invasive de la NASH fait également l'objet d'une recherche intense. Aucun test ou marqueur proposé avec une excellente performance diagnostique n'a été validé à large échelle [11]. La biopsie hépatique est actuellement exigée pour permettre l'inclusion et le suivi dans les essais thérapeutiques de phase 2b ou 3 évaluant les médicaments anti-NASH.

“ L'évaluation non invasive de la non-alcoholic steatohepatitis fait également l'objet d'une recherche intense ”

Formes particulières

Non-alcoholic fatty liver disease chez l'enfant et l'adolescent

Chez les enfants obèses ou en surpoids, les lésions anatomo-pathologiques de NASH sont particulières. La majorité (51 %) des enfants présentent une forme histologique « de type pédiatrique » avec une quasi-absence de lésions de ballonnisation et fréquemment une inflammation portale et une fibrose à point de départ portal. Environ 17 % présentent une forme histologique « de type adulte ». Les 32 % restant présentent une forme intermédiaire. La NASH pédiatrique s'associerait à une accélération des lésions lorsque les adolescents deviennent des adultes jeunes. Le suivi prospectif de cohortes d'enfants et d'adolescents avec une NASH sera important pour affiner nos connaissances.

“ Chez les enfants obèses ou en surpoids, les lésions anatomo-pathologiques de non-alcoholic steatohepatitis sont particulières ”

L'utilisation des outils non invasifs d'évaluation de la fibrose hépatique (biomarqueurs, l'élastographie impulsionnelle par FibroScan® avec la sonde S ou M) est particulièrement utile chez eux. La biopsie du foie est généralement réalisée avec prudence dans cette population.

La prise en charge thérapeutique repose, là encore, sur l'application des mesures hygiéno-diététiques qui améliore la stéatose et l'inflammation mais peu ou pas la fibrose. De même, aucun médicament n'a démontré un effet sur la fibrose. Quelques cas de transplantations hépatiques pour NASH, chez des adolescents, ont été rapportés.

La prévention et l'innovation diagnostique et thérapeutique sont donc importantes à promouvoir chez les enfants et les adolescents [32].

Non-alcoholic fatty liver disease chez les patients « minces »

Une stéatose ou une NASH peut se voir chez des patients « minces » avec un indice de masse corporelle (IMC) < 25 kg/m² chez les occidentaux, et un IMC < 23 kg/m² chez les asiatiques. La prévalence de la NAFLD chez les sujets « minces » serait d'environ 7 % aux USA et en Chine. Cela illustre l'hétérogénéité de la NAFLD et le fait qu'un clinicien ne devrait pas exclure une NAFLD, à priori, pour le seul motif d'une absence de surpoids/obésité. Selon les séries, seuls 5 à 45 % de ces patients NAFLD "minces" ont un syndrome métabolique. Ces patients ont

néanmoins le plus souvent une insulino-résistance. La dernière définition du syndrome métabolique de 2009, qui n'exige plus la présence d'une augmentation du tour de taille (reflet de l'obésité abdominal) pour le définir, peut aider au repérage de ces patients atypiques. En effet, une insulino-résistance peut être présente en l'absence d'une obésité androïde, bien que la physiopathologie en soit mal connue.

“ Une stéatose ou une non-alcoholic steatohepatitis peut se voir chez des patients « minces » ”

Ces patients « minces » avec une NASH peuvent avoir une évolution fibrosante (F3-F4) dans les mêmes proportions que les patients obèses et doivent donc être surveillés et pris en charge activement comme les patients NAFLD/NASH classiques [11, 33-35].

Non-alcoholic steatohepatitis burnt-out

Au cours du temps, notamment chez le sujet âgé, une disparition progressive de l'activité inflammatoire voire de la stéatose peut être observée alors qu'une fibrose significative voire une cirrhose est présente. Ces NASH « burnt-out » seraient responsables de la majorité des cirrhoses cryptogéniques.

“ Les non-alcoholic steatohepatitis « burnt-out » seraient responsables de la majorité des cirrhoses cryptogéniques. ”

Non-alcoholic fatty liver disease en post-transplantation hépatique

La prise de poids et l'apparition d'un syndrome métabolique voire d'un diabète de type 2 en post transplantation hépatique sont extrêmement fréquentes. Ces anomalies relèvent de différents mécanismes, parmi lesquels une reprise pondérale chez les patients dénutris en pré-transplantation hépatique, l'effet des corticoïdes, un antécédent d'obésité, une infection par le virus de l'hépatite C, un terrain de polyaddiction, notamment au sucre.

Deux tableaux sont observés. D'une part, la récurrence d'une NASH chez des patients transplantés pour une cirrhose NASH décompensée ou compliquée d'un CHC. D'autre part, la NASH « de novo » qui apparaît chez des sujets transplantés pour une hépatopathie non liée à une NASH et qui ont une forte prise de poids et l'apparition d'anomalies dysmétaboliques en post transplantation hépatique.

Take home messages

- La *non-alcoholic fatty liver disease* (NAFLD) est un spectre d'anomalies hépatiques incluant la stéatose simple, la stéatohépatite (NASH), la NASH fibrosante, la cirrhose NASH et le carcinome hépatocellulaire.
- La NAFLD toucherait environ 25 % de la population mondiale.
- Une NASH serait présente chez 1,5 à 6,5 % de la population mondiale.
- Le diagnostic positif et différentiel de la NAFLD doit être rigoureux.
- Les principales anomalies physiopathologiques au cours de la NASH (inflammation métabolique, insulino-résistance, dysbiose intestinale, lipotoxicité, dysfonction mitochondriale, stress cellulaire, mort hépatocytaire et inflammation hépatique...) sont de potentielles cibles thérapeutiques.

La prise en charge thérapeutique vise à limiter les facteurs favorisant la prise de poids en post transplantation hépatique, à lutter énergiquement contre les différents paramètres du syndrome métabolique et à appliquer les mêmes recommandations que chez les patients NAFLD/NASH hors transplantation hépatique. Un suivi cardiovasculaire rapproché est particulièrement important chez ces patients [36, 37].

Conclusion

La NAFLD génère, à travers le monde, une recherche clinique et expérimentale très active. Cela a permis et va permettre encore une meilleure compréhension de sa physiopathologie et le développement d'outils non invasifs afin de mieux dépister, mieux diagnostiquer et mieux suivre les patients. Les progrès dans les thérapeutiques pharmacologiques et non pharmacologiques devraient également permettre une meilleure stabilisation voire une régression des lésions hépatiques et extrahépatiques.

Remerciements : les auteurs remercient le fond documentaire Servier qui a servi à composer les figures 2, 3 et 4.

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt en rapport avec l'article. ■

Références

Les références importantes apparaissent en gras.

1. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, *et al.* Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005 ; 41 : 1313-21.
2. Brunt EM, Kleiner DE, Wilson LA, *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score and the histopathologic diagnosis in NAFLD : distinct clinicopathologic meanings. *Hepatology* 2011 ; 53 : 810-20.
3. Bedossa P, Poitou C, Veyrie N, *et al.* Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology* 2012 ; 56 : 1751-9.
4. Bedossa P, Patel K. Biopsy and noninvasive methods to assess progression of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2016 ; 150 : Error: FPage (1811) is higher than LPage (22e4)!.
5. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, *et al.* Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 2016 ; 64 : 73-84.
6. Doycheva I, Cui J, Nguyen P, *et al.* Non-invasive screening of diabetics in primary care for NAFLD and advanced fibrosis by MRI and MRE. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2016 ; 43 : 83-95.
7. Sanyal AJ, Friedman SL, McCullough AJ, *et al.* Challenges and opportunities in drug and biomarker development for nonalcoholic steatohepatitis : findings and recommendations from an American Association for the Study of Liver Diseases-U.S. Food and Drug Administration Joint Workshop. *Hepatology* 2015 ; 61 : 1392-405.
8. Pais R, Charlotte F, Fedchuk L, *et al.* A systematic review of follow-up biopsies reveals disease progression in patients with non-alcoholic fatty liver. *J Hepatol* 2013 ; 59 : 550-6.
9. McPherson S, Hardy T, Henderson E, *et al.* Evidence of NAFLD progression from steatosis to fibrosing-steatohepatitis using paired biopsies : implications for prognosis and clinical management. *J Hepatol* 2015 ; 62 : 1148-55.
10. Singh S, Allen AM, Wang Z, *et al.* Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver vs nonalcoholic steatohepatitis : a systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2015 ; 13 : 643-54.
11. European Association for the Study of the L, European Association for the Study of D, European Association for the Study of O. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2016 ; 64 : 1388-402.
12. Goossens N, Hoshida Y. Is hepatocellular cancer the same disease in alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases? *Gastroenterology* 2016 ; 150 : 1710-7.
13. Soderberg C, Stal P, Asklung J, *et al.* Decreased survival of subjects with elevated liver function tests during a 28-year follow-up. *Hepatology* 2010 ; 51 : 595-602.
14. Angulo P, Kleiner DE, Dam-Larsen S, *et al.* Liver fibrosis, but no other histologic features, is associated with long-term outcomes of patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2015 ; 149 : 389-97 e10.
15. Wong RJ, Aguilar M, Cheung R, *et al.* Nonalcoholic steatohepatitis is the second leading etiology of liver disease among adults awaiting liver transplantation in the United States. *Gastroenterology* 2015 ; 148 : 547-55.
16. Barker DJ. Human growth and chronic disease : a memorial to Jim Tanner. *Ann Hum Biol* 2012 ; 39 : 335-41.
17. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, *et al.* 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 : 1640-5.
18. Bertola A, Ciucci T, Rousseau D, *et al.* Identification of adipose tissue dendritic cells correlated with obesity-associated insulin-resistance and inducing Th17 responses in mice and patients. *Diabetes* 2012 ; 61 : 2238-47.
19. Machado MV, Diehl AM. Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* 2016 ; 150 : 1769-77.
20. Le Roy T, Llopis M, Lepage P, *et al.* Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Gut* 2013 ; 62 : 1787-94.
21. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, *et al.* Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 2013 ; 500 : 541-6.
22. Cotillard A, Kennedy SP, Kong LC, *et al.* Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature* 2013 ; 500 : 585-8.
23. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, *et al.* An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006 ; 444 : 1027-31.
24. Boursier J, Mueller O, Barret M, *et al.* The severity of NAFLD is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota. *Hepatology* 2016 ; 63 : 764-75.
25. Lelouvier B, Servant F, Paise S, *et al.* Changes in blood microbiota profiles associated with liver fibrosis in obese patients : A pilot analysis. *Hepatology* 2016 ; 64 : 2015-27.
26. Leung C, Rivera L, Furness JB, *et al.* The role of the gut microbiota in NAFLD. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 2016 ; 13 : 412-25.
27. Patouraux S, Rousseau D, Bonnafous S, *et al.* CD44 is a key player in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2017.
28. Gao B, Tsukamoto H. Inflammation in Alcoholic and Nonalcoholic Fatty Liver Disease : Friend or Foe? *Gastroenterology* 2016 ; 150 : 1704-9.
29. Cassinotto C, Boursier J, de Ledinghen V, *et al.* Liver stiffness in nonalcoholic fatty liver disease : A comparison of supersonic shear imaging, FibroScan, and ARFI with liver biopsy. *Hepatology* 2016 ; 63 : 1817-27.
30. European Association for Study of L, Asociacion Latinoamericana para el Estudio del H. EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines : Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis. *J Hepatol* 2015 ; 63 : 237-64.
31. Petta S, Wong VW, Camma C, *et al.* Improved noninvasive prediction of liver fibrosis by liver stiffness measurement in patients with nonalcoholic fatty liver disease accounting for controlled attenuation parameter values. *Hepatology* 2017 ; 65 : 1145-55.
32. Nobili V, Alisi A, Newton KP, *et al.* Comparison of the phenotype and approach to pediatric vs adult patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2016 ; 150 : 1798-810.
33. Younossi Z, Henry L. Contribution of alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease to the burden of liver-related morbidity and mortality. *Gastroenterology* 2016 ; 150 : 1778-85.
34. Leung JC, Loong TC, Wei JL, *et al.* Histological severity and clinical outcomes of nonalcoholic fatty liver disease in nonobese patients. *Hepatology* 2017 ; 65 : 54-64.
35. Cusi K. Nonalcoholic steatohepatitis in nonobese patients : Not so different after all. *Hepatology* 2017 ; 65 : 4-7.
36. Dumortier J, Giostra E, Belbouab S, *et al.* Non-alcoholic fatty liver disease in liver transplant recipients : another story of "seed and soil". *Am J Gastroenterol* 2009 ; 105 : 613-20.
37. Siddiqui MS, Charlton M. Liver Transplantation for alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease : Pretransplant selection and posttransplant management. *Gastroenterology* 2016 ; 150 : 1849-62.

CD44 is a key player in non-alcoholic steatohepatitis

Stéphanie Patouraux^{1,2,3,†}, Déborah Rousseau^{1,2,†}, Stéphanie Bonnafous^{1,2,4}, Cynthia Lebeaupin^{1,2}, Carmelo Luci^{1,2}, Clémence M. Canivet^{1,2,4}, Anne-Sophie Schneck^{1,2,4}, Adeline Bertola^{1,2}, Marie-Christine Saint-Paul^{1,2,3}, Antonio Iannelli^{1,2,4}, Jean Gugenheim^{1,2,4}, Rodolphe Anty^{1,2,4}, Albert Tran^{1,2,4}, Béatrice Bailly-Maitre^{1,2}, Philippe Gual^{1,2,*}

¹INSERM, U1065, C3M, Team 8 "Hepatic Complications in Obesity", Nice, France; ²Université Côte d'Azur, Nice, France; ³CHU of Nice, Biological Center, Pasteur Hôpital, Nice, France; ⁴CHU of Nice, Digestive Center, Nice, France

Background & Aims: Cluster of differentiation (CD)44 regulates adipose tissue inflammation in obesity and hepatic leukocyte recruitment in a lithogenic context. However, its role in hepatic inflammation in a mouse model of steatohepatitis and its relevance in humans have not yet been investigated. We aimed to evaluate the contribution of CD44 to non-alcoholic steatohepatitis (NASH) development and liver injury in mouse models and in patients at various stages of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) progression.

Methods: The role of CD44 was evaluated in *CD44*^{-/-} mice and after injections of an α CD44 antibody in wild-type mice challenged with a methionine- and choline-deficient diet (MCDD). In obese patients, hepatic CD44 (n = 30 and 5 NASH patients with a second liver biopsy after bariatric surgery) and serum sCD44 (n = 64) were evaluated.

Results: Liver inflammation (including inflammatory foci number, macrophage and neutrophil infiltration and CCL2/CCR2 levels), liver injury and fibrosis strongly decreased in *CD44*^{-/-} mice compared to wild-type mice on MCDD. CD44 deficiency enhanced the M2 polarization and strongly decreased the activation of macrophages by lipopolysaccharide (LPS), hepatocyte damage-associated molecular patterns (DAMPs) and saturated fatty acids. Neutralization of CD44 in mice with steatohepatitis strongly decreased the macrophage infiltration and chemokine ligand (CCL)2 expression with a partial correction of liver inflammation and injury. In obese patients, hepatic CD44 was strongly upregulated in NASH patients ($p = 0.0008$) and correlated with NAFLD activity score (NAS) ($p = 0.001$), ballooning ($p = 0.003$), alanine transaminase ($p = 0.005$) and hepatic CCL2 ($p < 0.001$) and macrophage marker CD68 ($p < 0.001$) expression. Correction of NASH was associated with a strong decrease in liver CD44⁺ cells. Finally, the soluble form of CD44 increased with severe steatosis ($p = 0.0005$) and NASH ($p = 0.007$).

Conclusion: Human and experimental data suggest that CD44 is a marker and key player of hepatic inflammation and its targeting partially corrects NASH.

Lay summary: Human and experimental data suggest that CD44, a cellular protein mainly expressed in immune cells, is a marker and key player of non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Indeed, CD44 enhances the non-alcoholic fatty liver (NAFL) (hepatic steatosis) to NASH progression by regulating hepatic macrophage polarization (pro-inflammatory phenotype) and infiltration (macrophage motility and the MCP1/CCL2/CCR2 system). Targeting CD44 partially corrects NASH, making it a potential therapeutic strategy.

© 2017 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

Global prevalence of non-alcoholic fatty liver diseases (NAFLD) ranges from 22% to 28%.¹ The spectrum of these hepatic abnormalities extends from isolated steatosis to steatohepatitis (non-alcoholic steatohepatitis, NASH) and steatofibrosis leading to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. NAFLD is one of the main causes of cirrhosis and increases the risk of liver-related death and hepatocellular carcinoma. Despite this major public health concern, treatment of NAFLD is still elusive (apart from lifestyle changes) as there is lack of efficacious pharmacological treatment. Whereas the molecular mechanisms responsible for the progression from a "safe" state to NASH are still unclear, hepatic inflammation is a key factor involved in the progression of NAFLD. Recent findings suggest that cluster of differentiation (CD)44 could play an important role in the development and progression of NAFLD, by regulating adipose tissue and liver inflammation.²⁻⁵

CD44 is expressed on many cell types that contribute to inflammation, such as leukocytes, neutrophils and macrophages. It has been recently reported in an animal model of obesity that CD44 plays an important role in adipose tissue inflammation by promoting macrophage recruitment, which in turn enhances insulin resistance and hepatic steatosis.^{2,3} Neutralization of CD44 by specific antibodies reduces fasting blood glucose levels,

Keywords: CD44; Liver; NAFLD; Steatosis; NASH; MCP1; Macrophages.

Received 27 May 2016; received in revised form 1 February 2017; accepted 2 March 2017; available online 16 March 2017

* Corresponding author. Address: INSERM U1065, Bâtiment Universitaire ARCHIMED, Equipe 8 "Complications hépatiques de l'obésité", 151 route Saint Antoine de Ginestière, BP 2 3194, 06204 Nice Cedex 03, France. Tel.: +33 4 89 06 42 23; fax: +33 4 89 06 42 21.

E-mail address: philippe.gual@inserm.fr (P. Gual).

[†] These authors contributed equally as joint first authors.



weight gain, liver steatosis and insulin resistance in a dietary mouse model of obesity.⁴ CD44 also promotes hepatic inflammatory cell recruitment during fatty liver formation in a lithogenic diet-fed mouse model.⁵ In line with these data, human adipose tissue CD44 is associated with localized inflammation and systemic insulin resistance;⁶ weight loss in obese patients is associated with a strong decrease in the gene expression of CD44 and the macrophage marker CD68 in subcutaneous adipose tissue.⁷ Since osteopontin (OPN), E-selectin and hyaluronic acid (HA) are the main ligands of CD44 and are involved in liver disease,^{8–12} we can presume that the activation of the CD44 pathway could be involved in NAFLD progression. As previously reported in human NAFLD, hepatic osteopontin and E-selectin are strongly upregulated with fibrosis and NASH, respectively.^{8,9} Upon injury, local HA production increases and is fragmented, generating low-molecular weight HA (LMW-HA) that functions as a pro-inflammatory danger-associated molecular pattern and cleared via CD44-mediated endocytosis.¹¹ The interaction of CD44 and HA is the dominant mechanism for neutrophil sequestration in inflamed liver sinusoids.¹³ HA is also a biomarker for severe fibrosis and cirrhosis in various liver diseases including NAFLD and alcoholic liver disease (ALD).^{14–16} The possible contribution of the CD44 pathway to the evolution from simple steatosis to NASH and fibrosis has not been fully investigated so far. We therefore evaluated the contribution of CD44 in NASH development and liver injury in experimental mouse models and in a cohort of patients at various stages of NAFLD progression.

Patients and methods

Human studies

Morbidly obese patients

A total of 93 patients (30 patients for the gene expression, 64 patients for the sCD44 and 5 patients for the follow-up) were recruited through the Department of Digestive Surgery and Liver Transplantation (Nice hospital) where they under-

went bariatric surgery for their morbid obesity. Bariatric surgery was indicated for these patients in accordance with French guidelines. Exclusion criteria were: presence of a hepatitis B or hepatitis C infection, excessive alcohol consumption (>20 g/d) or another cause of chronic liver disease as previously described.^{17–19} The characteristics of the study groups for the gene expression are described in Table 1. Before surgery, fasting blood samples were obtained and used to measure alanine and aspartate transaminases (ALT and AST, respectively), glucose, insulin and HbA1c. Insulin resistance was calculated using the homeostatic model assessment (HOMA-IR) index.²⁰ Liver biopsies were obtained during surgery and no ischemic preconditioning had been performed. A second liver biopsy and a concomitant diagnostic work-up were offered to five patients who underwent a laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass (LRYGB), who initially displayed biopsy-proven NASH and completed a minimum follow-up period of 30 months after surgery. Hepatic histopathological analysis was performed according to the scoring system of Kleiner *et al.*²¹ Four histopathological features were semi-quantitatively evaluated: grade of steatosis (0, <5%; 1, 5%–30%; 2, >30%–60%; 3, >60%), lobular inflammation (0, no inflammatory foci; 1, <2 inflammatory foci per 200x field; 2, 2–4 inflammatory foci per 200x field; 3, >4 inflammatory foci per 200x field), hepatocellular ballooning (0, none; 1, few balloon cells; 2, many cells/prominent ballooning), and stage of fibrosis (from 0, none to 4, cirrhosis).

Control participants

Liver tissue was obtained from five lean participants (5 women; age, 44 ± 9 years; BMI, 21 ± 1.9 kg/m²) undergoing partial hepatectomy for benign tumours (neighbour tissues from four adenoma and one focal nodular hyperplasia). Three participants underwent a left lobectomy or a bisegmentectomy without ischemic preconditioning and two patients underwent a right hepatectomy with a potential ischemic preconditioning (missing data). Liver samples did not display any hepatic steatosis, inflammation or fibrosis. All participants gave their informed written consent to participate in this study in accordance with French legislation regarding Ethics and Human Research (Huriet-Serusclet law). The "Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale de Nice" approved the study (07/04:2003, N° 03.017).

Animals and study design

19-week-old male wild-type (WT) and CD44-deficient (CD44^{-/-}) (B6.Cg-Cd44^{tm1Hbg/j}) from Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) C57BL/6 mice were acclimated to our animal facilities under a 12/12 h light/dark cycle at a temperature of 21 ± 2 °C and were fed *ad libitum* either a methionine- and choline-deficient diet (MCDD) or control diet (Ctr D) for 2, 4 or 7 weeks (diets from MP Biomedicals (MCDD # 960439, Ctr diet # 960440) and Ssniff (MCDD # E15653-94; Ctr diet # E15654-04)).

Table 1. Characteristics of the obese patients.

	Without NAFLD	Steatosis	NASH
n	8	13	9
Age (years)	34.7 ± 4.4	36.8 ± 2.7	41.0 ± 3.3
BMI (kg/m ²)	43.4 ± 0.5	42.9 ± 1.12	43.3 ± 1.9
ALT (IU/L)	17.4 ± 2.9	29.2 ± 2.4*	104.8 ± 28.0* [#]
AST (IU/L)	20.7 ± 2.9	22.1 ± 1.0	60.2 ± 15.8* [#]
Fasting insulin (mIU/L)	9.7 ± 2.4	15.2 ± 3.8	41.8 ± 10.2* [#]
Fasting glucose (mmol/L)	4.8 ± 0.1	5.3 ± 0.2	8.3 ± 1.7
HOMA-IR	2.0 ± 0.5	3.7 ± 1.0	14.4 ± 3.9* [#]
HbA1c (%)	5.3 ± 0.1	5.6 ± 0.1	7.0 ± 0.7* [#]
NAFLD activity score (n)	0 (8)	2 (5) 3 (8)	5 (9)
Grade of steatosis (n)	0 (8)	2 (6) 3 (7)	3 (9)
Lobular inflammation (n)	0 (8)	0 (13)	1 (9)
Hepatocellular ballooning (n)	0 (8)	0 (13)	1 (9)
Hepatic gene expression (vs. lean)			
TNFα	1.80 ± 0.52	2.28 ± 0.35	7.63 ± 1.35* [#]
IL1β	1.23 ± 0.21	1.52 ± 0.28	7.80 ± 2.36* [#]
MCP1	1.26 ± 0.33	2.64 ± 0.64*	6.48 ± 1.46* [#]

Without NAFLD: patients with normal liver histology; Steatosis: patients with steatosis; NASH: patients with severe steatosis and NASH. Data are expressed as mean ± SEM and compared using the non-parametric Mann Whitney test.

* p <0.05 compared with "Without NAFLD".

p <0.05 compared with Steatosis.

Research Article

Anti-CD44 treatment

WT C57BL/6 male mice (19 weeks of age) were fed MCDD for 4 weeks. During the last 6 days of MCDD, mice received daily intra-peritoneal injections of either purified rat anti-mouse CD44 mAb (n = 5; IM7, BD Pharmingen, catalog #553131; BD Biosciences) or purified rat IgG2b, κ isotype control (n = 6; A95-1, BD Pharmingen, catalog #553986; BD Biosciences) (100 μ g/mouse the first day then 50 μ g/mouse). At the end of the treatment, the blood was collected and mice were immediately sacrificed, after which the liver was removed. One part of the liver was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis. The second part was fixed in buffered formalin, paraffin-embedded, sectioned, and stained with hematoxylin-eosin-saffron or Masson's trichrome. The last part was used for flow cytometric analysis. The guidelines of laboratory animal care were followed, and the local ethical committee approved the animal experiments (NCE/2013-108, APAFIS#5100-2015121110477413 v6).

Flow cytometric analysis

The cells were surface-stained with antibodies against mouse CD45 (clone 30-F11), CD44 (clone IM7), F4/80 (clone BM8), CD11b (clone M1/70), CD11c (clone HL3), Gr1 (clone RB6-8C5), CD206 (clone C068C2) or CD301 (clone ER-MP23) purchased from BD Biosciences, eBioscience, Bio Rad ABD Serotec. Samples were acquired using a fluorescence activated cell sorting (FACS) Canto II flow cytometer, and the data were analyzed using the FACSDiva software version 8.0.1 (BD Biosciences).

Real-time quantitative PCR analysis

Total liver RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (74104, Qiagen, Hilden, Germany) and treated with Turbo DNA-free (AM 1907, Thermo Fisher Scientific Inc.) following the manufacturer's protocol. The quantity and quality of the RNA were determined using the Agilent 2100 Bioanalyzer with RNA 6000 Nano Kit (5067-1511, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Total RNA (1 μ g) was reverse transcribed with a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.). Real-time quantitative PCR was performed in duplicate for each sample using the StepOne Plus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc.) as previously described.^{15,22} TaqMan gene expression assays were purchased from Thermo Fisher Scientific Inc. and listed in [Supplementary data](#). Gene expression was normalized to the housekeeping gene β 2M (β 2 micro globuline, mouse) or RPLP0 (Ribosomal Phosphoprotein Large P0, mouse and human) and calculated based on the comparative cycle threshold Ct method ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$).

Immunohistochemistry

Sections measuring 2 μ m were cut from each paraffin block and were put to dry at 37°C for 12 h. After deparaffinization and rehydration, all sections were pre-treated at pH 6 with Flex Target Retrieval Solution (TRS) Low (PTLink DAKO, Glostrup, Denmark) for 20 min. Endogenous peroxidase was blocked in 1% hydrogen peroxide for 5 min (DAKO, Glostrup, Denmark) at room temperature. After rinsing with phosphate buffered saline, the sections were incubated with a ready to use anti-CD44 (8E1, #5640, Cell signaling) antibody for 20 min at room temperature. Then sections were incubated with an appropriate secondary antibody from the Envision flex/HRP kit (Dako, Glostrup, Denmark) for 20 min, at room temperature. Next, slides were incubated in phosphate buffered saline (PBS), for 20 min, at room temperature, and then peroxidase activity was detected by diaminobenzidine tetrahydrochloride for 8 min and used for visualization. Sides were then counterstained with haematoxylin (Dako, Glostrup, Denmark) for 6 min.

Statistical analysis

Statistical significance of differential gene expression between two study groups was determined using the nonparametric Mann-Whitney *U* test with the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ of each group. Other data from mice and cell preparations were statistically analyzed using the Mann-Whitney *U* test or the Student's *t* test. Data from cell lines were statistically analyzed using the Student's *t* test. Correlations were analyzed using the Pearson's correlation test. $p < 0.05$ was considered as significant.

For further details regarding the materials used, please refer to the [Supplementary material](#) and the [CIAT table](#)

Results

Upregulation of hepatic expression of CD44 with steatohepatitis

We first evaluated the hepatic level of CD44 in wild-type (WT) mice with MCDD-induced steatohepatitis. The hepatic level of the CD44 was strongly increased after 2 weeks of MCDD at the protein (Fig. 1A) and mRNA (Fig. 1B) levels. Steatohepatitis was thus associated with the hepatic upregulation of CD44 expression.

CD44 deficiency partially prevented liver injury, hepatic steatosis and steatohepatitis induced by MCDD challenge

The role of CD44 in liver injury and steatohepatitis induced by MCDD was then investigated using mice deficient for CD44. As expected, MCDD challenge was associated with elevated aspartate (AST) and ALT activity in WT mice (Fig. 1C). The $CD44^{-/-}$ mice showed less liver damage as shown by the lower AST and ALT levels. Furthermore, histological analyses displayed less hepatic steatosis and showed less accumulation of inflammatory foci in the livers of MCDD-fed $CD44^{-/-}$ mice compared with livers of MCDD-fed WT mice (Fig. 1D, E). These results indicated that the CD44 deficiency resulted in partial prevention of the liver injury, steatosis and steatohepatitis induced by MCDD challenge.

CD44 deficiency strongly prevented the recruitment of monocytes and neutrophils into the liver and liver inflammation induced by MCDD challenge

Since CD44 can regulate the homing of immune cells,^{3,5,10,13,23} we investigated the composition of immune cells in the liver by flow cytometric analysis. While MCDD challenge did not promote the enrichment of T cells ($CD4^{+}$ and $CD8^{+}$ cells) in liver (data not shown), MCDD challenge mediated a strong hepatic enrichment in macrophages ($F4/80^{+}$ cells), pro-inflammatory M1 macrophages ($F4/80^{+} CD11c^{+}$) and monocytes/neutrophils ($Gr1^{+}$) (Fig. 1F). Interestingly, CD44 deficiency robustly prevented the enrichment of monocyte/macrophages and M1 macrophages into the liver (Fig. 1F). This later was associated with less hepatic inflammation as evaluated by M1 markers including tumor necrosis factor (*TNF*) α , interleukin (*IL*)1 β , inducible nitric oxide synthase (*iNOS*), and monocyte chemotactic protein (*MCP*)1 (Fig. 1G). CD44 deficiency still prevented the more severe accumulation of inflammatory foci (MCDD-fed $CD44^{-/-}$ mice: 14 ± 4 foci number/10 fields, n = 7, vs. MCDD-fed WT mice: 34 ± 3 foci number/10 fields, n = 6, $p = 0.010$, data not shown) and non-parenchymal hepatic cells (MCDD-fed $CD44^{-/-}$ mice: 10 ± 1 million/liver, n = 7, vs. MCDD-fed WT mice: 17 ± 1 million/liver, n = 6, $p = 0.045$, data not shown) after four weeks of MCDD challenge. CD44 deficiency strongly prevented the recruitment of infiltrating monocytes ($F4/80^{+} CD11b^{\text{high}}$ cells) vs. resident Kupfer macrophages, ($F4/80^{+} CD11b^{+}$ cells) (Fig. 2A, B) and infiltrating neutrophils ($CD11b^{+} Gr1^{\text{high}}$ cells) (Fig. 2A, B) into the liver. Importantly, CD44 deficiency was not associated with the depletion of monocytes from the circulation (Fig. 2C), which would have explained the decreased infiltrating monocytes into the liver. In contrast, hepatic infiltrating neutrophils correlated with blood neutrophil levels (Fig. 2C). Since CD44 deficiency strongly altered the chemotaxis of peritoneal macrophages in response to *MCP1/CCL2*²³ and *MCP1/CCL2* plays an important role in the

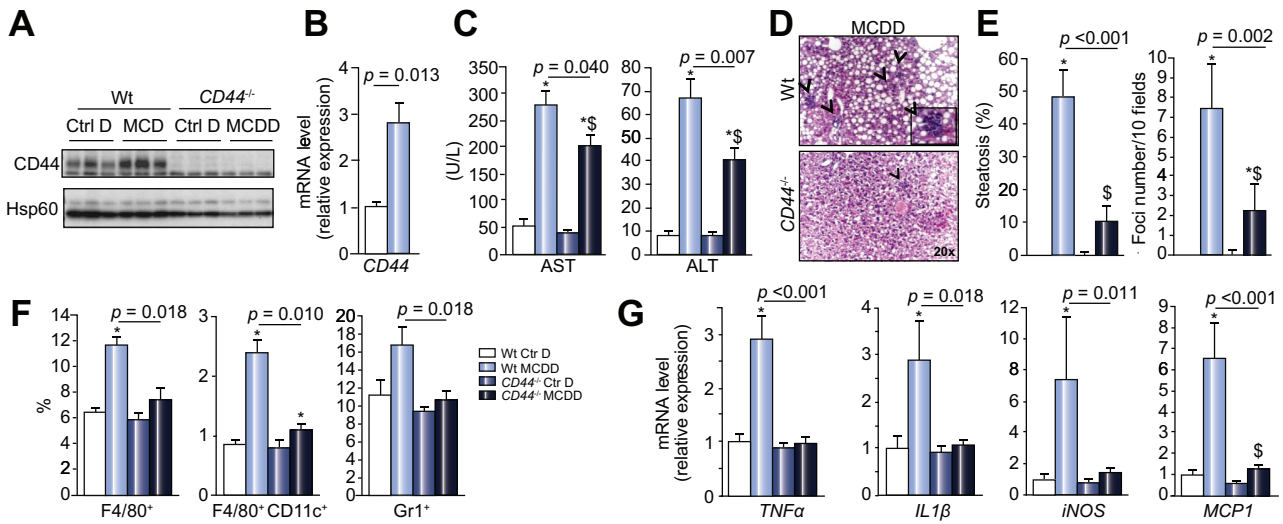


Fig. 1. CD44 deficiency partially prevented liver injury, hepatic steatosis and steatohepatitis induced by MCDD challenge. Wild-type (WT; n = 31) and *CD44*^{-/-} (n = 30) mice fed a control diet (Ctr D) or MCDD for 2 weeks. Hepatic CD44 expression was evaluated in WT Ctr D and MCDD mice at the protein (A) (3 mice/group) and at the mRNA levels (B) (4–8 mice/group). (C) The plasma levels of ALT and AST were evaluated (WT: 14–17 mice/group; *CD44*^{-/-}: 12–18 mice/group). (D) H&E staining of liver tissue sections samples from WT and *CD44*^{-/-} after MCDD as indicated. Representative pictures are shown. (E) Quantification of hepatic steatosis and inflammatory foci. (F) Hepatic non-parenchymal cells were stained for CD45, F4/80, CD11c and Gr1 and analyzed by flow cytometry (4–7 mice/group). (G) Hepatic mRNA expression levels of *TNFα*, *IL1β*, *iNOS* and *MCP1* were analyzed by real-time quantitative PCR (4–15 mice/group). Data are presented as relative mRNA levels normalized to $\beta 2M$ mRNA levels. Data are expressed as means \pm SEM and statistically analyzed using the Mann-Whitney *U* test. **p* < 0.05, compared with WT Ctr D mice; §*p* < 0.05, compared with *CD44*^{-/-} Ctr D.

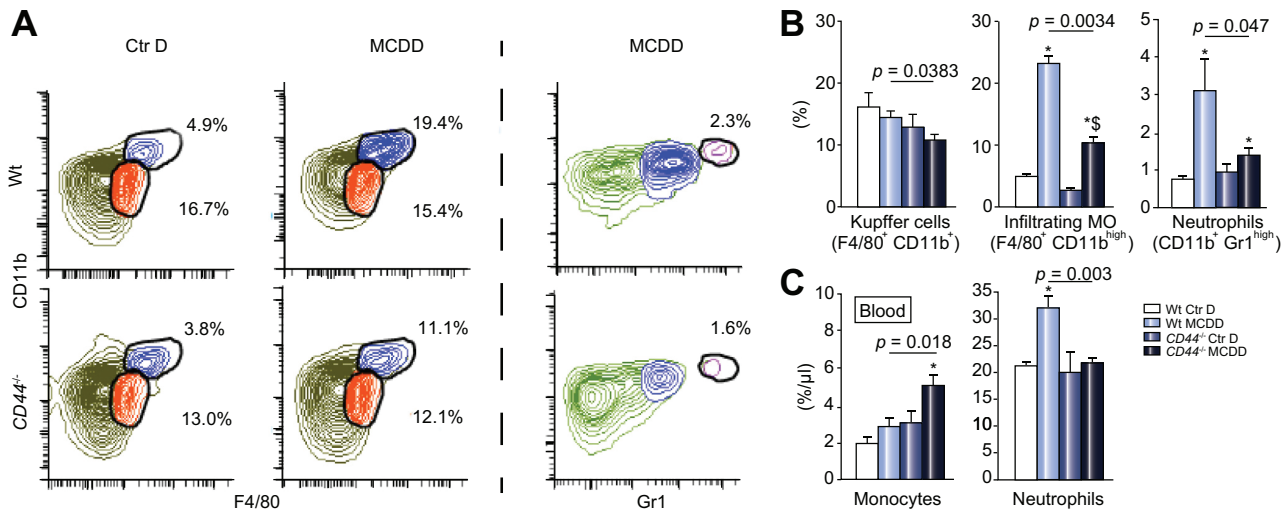


Fig. 2. CD44 deficiency partially prevented hepatic monocyte and neutrophil infiltration induced by MCDD challenge. Wild-type (WT; n = 10) and *CD44*^{-/-} (n = 11) mice fed a control diet (Ctr D) or MCDD for 4 weeks. (A) and (B) Hepatic non-parenchymal cells were stained for CD45, F4/80, CD11c and Gr1 and analyzed by flow cytometry (4–7 mice/group). Percentage of Kupffer cells (F4/80⁺ CD11b⁺), infiltrating macrophages (F4/80⁺ CD11b^{high}) and neutrophils (CD11b⁺ Gr1^{high}) are expressed as means \pm SEM and statistically analyzed using the Mann-Whitney *U* test. (C) Blood monocyte and neutrophil percentages (4–7 mice/group) (evaluated by automated differential cell counting) are expressed as means \pm SEM and statistically analyzed using the Mann-Whitney *U* test. **p* < 0.05, compared with WT Ctr D mice, §*p* < 0.05, compared with *CD44*^{-/-} Ctr D. (This figure appears in colour on the web.)

recruitment of macrophages into the liver,²⁴ the unresponsiveness of CD44-deficient macrophages to MCP1 and the lower levels of hepatic MCP1 expression in MCDD-fed *CD44*^{-/-} mice (Fig. 1G) might be involved in the decreased number of hepatic infiltrating monocytes.

CD44 silencing or deficiency strongly enhanced the M2 macrophage polarization

In addition to the regulation of the MCP1-mediated macrophage chemotaxis, CD44 could also control the properties and the

Research Article

activities of the macrophages. We then investigated its potential role in the macrophage polarization. Whereas CD44 deficiency did not alter the macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)-mediated macrophage differentiation of bone marrow monocytes (Fig. 3A), it strongly enhanced the proportion of M2 bone marrow derived macrophages (BMDM) (CD206⁺-F4/80⁺CD11b⁺ BMDM) in the basal condition and in response to IL4 (Fig. 3B). In RAW 264.7 macrophages, CD44 silencing with siRNA also led to a substantial increase in M2 macrophages (CD301⁺ cells), in the expression of CD301 and arginase 1 (*Arg1*; at the mRNA level) and in the IL10 secretion in response to IL4 (Fig. S1).

CD44 silencing or deficiency strongly limited pro-inflammatory phenotypes of macrophages

On the contrary, CD44 deficiency in BMDM or CD44 silencing in RAW 264.7 macrophages strongly decreased the expression of pro-inflammatory cytokines such as *IL6* and *TNF α* in response to lipopolysaccharides (LPS) (Figs. 3C, 4A, respectively). In addition to LPS, CD44 silencing in LPS-primed RAW 264.7 macrophages also strongly decreased the expression of pro-inflammatory cytokines such as *IL6*, *TNF α* and *IL1 β* in response to damage-associated molecular patterns (DAMPs) from damaged fatty primary hepatocytes (Fig. 4A). Supernatant of primary fatty hepatocytes isolated from MCDD-fed mice (2 weeks) and exposed to heat shock (increased lactate dehydrogenase (LDH) release, data not shown) also increased the CD44 expression in LPS-primed RAW 264.7 macrophages (Fig. 4A). Finally, CD44 silencing in RAW 264.7 macrophages also decreased the expression of *IL6* and *TNF α* in response to saturated fatty acid palmitate (PA) (Fig. 4B). palmitic acid (PA) stimulation further decreased the mRNA levels of M2 marker CD206, which was strongly overcome by the CD44 silencing (Fig. 4B). These results indicate that the deficiency of CD44 modified the properties of macrophages with higher susceptibility to M2 polarization and accordingly, lower pro-inflammatory phenotypes upon activation.

Neutralization of CD44 corrected the hepatic inflammation, macrophage recruitment and liver injury induced by MCDD challenge

We then investigated if the neutralization of CD44 by a specific antibody could correct the liver complications induced by MCDD. After 3 weeks of MCDD, mice received a daily intraperitoneal injection of either purified rat anti-CD44 mAb or isotype control for six additional days of MCDD. The treatment with anti-mouse CD44 mAb strongly depleted the hepatic CD44 positive cells (Fig. 5A), strongly decreased the liver injury as evaluated by the AST/ALT activity (Fig. 5B) and hepatic inflammation as evaluated by the presence of inflammatory foci (Fig. 5C, D). The correction of hepatic inflammation was also associated with less hepatic enrichment in macrophages (F4/80⁺ cells), pro-inflammatory M1 macrophages (F4/80⁺CD11c⁺), monocytes/neutrophils (Gr1⁺) (Fig. 5E) and a strong decrease in liver and serum MCP1 levels (Fig. 5F). In these experimental conditions, the correction of steatohepatitis by CD44 neutralization was not associated with an improvement of hepatic steatosis (Fig. 5C, D).

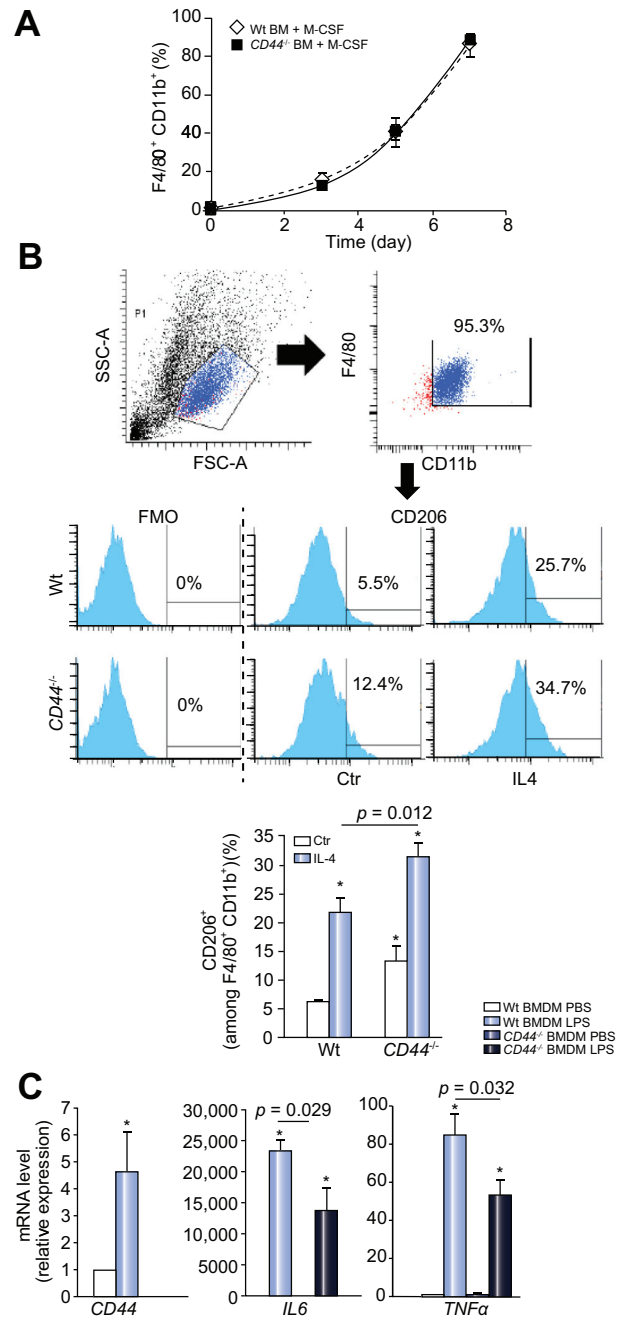


Fig. 3. CD44 deficiency in bone marrow derived macrophages enhanced IL4-mediated M2 polarization and decreased LPS-induced *IL6* and *TNF α* expression. (A) Bone marrow derived macrophage differentiation of WT and CD44^{-/-} monocytes after M-CSF stimulation has been analyzed at indicated time by flow cytometry and expressed as % of F4/80⁺CD11b⁺ cells (n = 5). (B) WT and CD44^{-/-} bone marrow derived macrophages (BMDM) were incubated without or with IL4 (20 ng/ml) for 18–24 h, stained for CD45, F4/80, CD11b and CD206 and then analyzed by flow cytometry. The percentages of CD206⁺ cells among the F4/80⁺CD11b⁺ cells are expressed as means \pm SEM and statistically analyzed using the Student's *t* test (n = 4). (C) WT and CD44^{-/-} BMDMs were incubated with PBS or LPS (100 ng/ml) for 6 h. The gene expressions of *CD44*, *IL6* and *TNF α* were then evaluated (n = 3). The mRNA levels were normalized to *RPLP0* mRNA levels and expressed as fold stimulation (mean \pm SEM) vs. WT BMDM + PBS. Data were statistically analyzed using the Student's *t* test. **p* < 0.05, compared with WT BMDM Ctr. (This figure appears in colour on the web.)

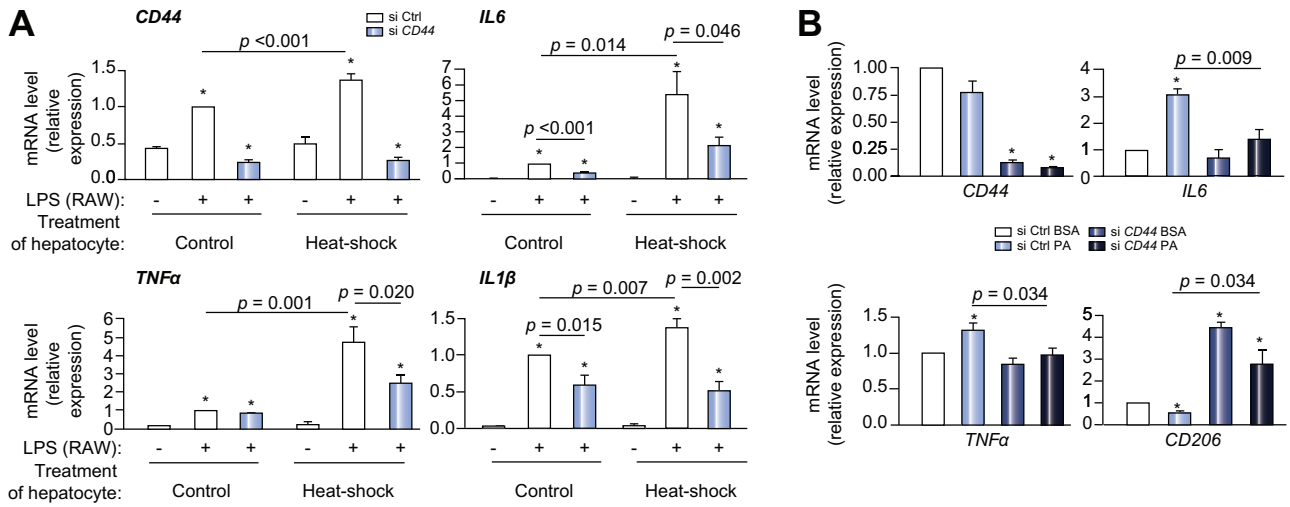


Fig. 4. CD44 silencing strongly decreased the expression of pro-inflammatory cytokines in activated macrophages. RAW 264.7 macrophages after control (siCtrl) or CD44 silencing (siCD44) were stimulated or not with (A) supernatants of control (37 °C for 6 h) and heat shock (45 °C for 6 h) primary fatty hepatocytes (from WT mice fed 2 weeks of MCDD) with or without LPS (100 ng/ml) for 6 h (n = 4) or (B) palmitic acid (PA) (500 μM) for 24 h in 'cell medium' supplemented with 1% bovine serum albumin (n = 3). The gene expressions of CD44, TNFα, IL6, IL1β and CD206 were then evaluated. The mRNA levels were normalized to RPLP0 mRNA levels and expressed as fold stimulation (mean ± SEM) vs. siCtrl/conditioned medium of fatty hepatocyte/LPS (A) or siCtrl BSA (B). Data were statistically analyzed using the Student's t test. * $p < 0.05$, compared with siCtrl/conditioned medium of fatty hepatocyte (A) or siCtrl BSA (B).

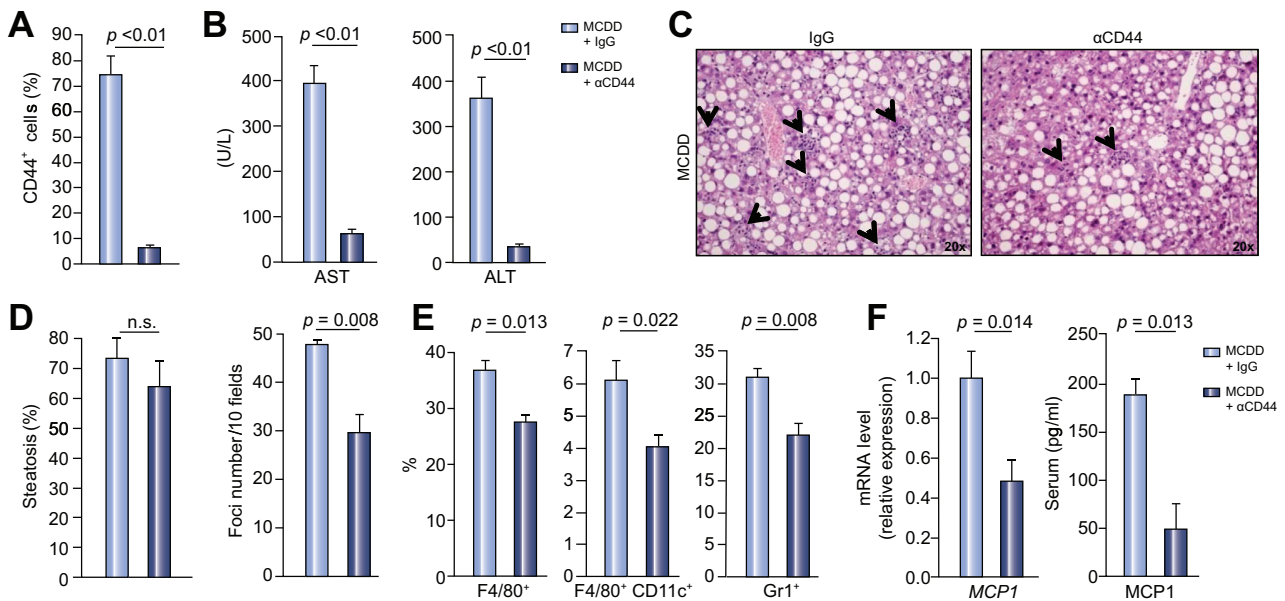


Fig. 5. Neutralization of CD44 corrected the hepatic inflammation, the macrophages recruitment and liver injury induced by MCDD challenge. After 3 weeks of MCDD, the mice received a daily intra-peritoneal injection of either purified rat anti-mouse CD44 mAb (αCD44) or purified rat IgG2b, κ isotype control (αIgG) for six additional days on MCDD diet (5–6 mice/group). (A and E) Hepatic non-parenchymal cells were stained for CD44, F4/80, CD11c and Gr1 and analyzed by flow cytometry. (B) ALT and AST plasma levels were evaluated. (C) H&E staining of liver samples from αCD44- and αIgG-treated mice as indicated. Representative pictures are shown. (D) Quantification of hepatic steatosis and inflammation (number of inflammatory foci). (F) Hepatic mRNA expression and plasma levels of MCP1 were analyzed by real-time quantitative PCR and ELISA, respectively. Data are expressed as means ± SEM and statistically analyzed using the Mann-Whitney U test.

CD44 deficiency strongly decreased the hepatic fibrosis induced by MCDD

Hepatic injury and inflammation are key actors in the fibrogenic process. Since the development of hepatic fibrosis required a

long-lasting MCDD challenge, WT and CD44^{-/-} mice were then challenged with MCDD for 7 weeks. In addition to reduced hepatic steatosis and inflammation (Fig. 6A), CD44 deficiency was also associated with less fibrosis as evaluated by collagen staining (Masson's trichrome stain, Fig. 6B) and lower gene expression of

Research Article

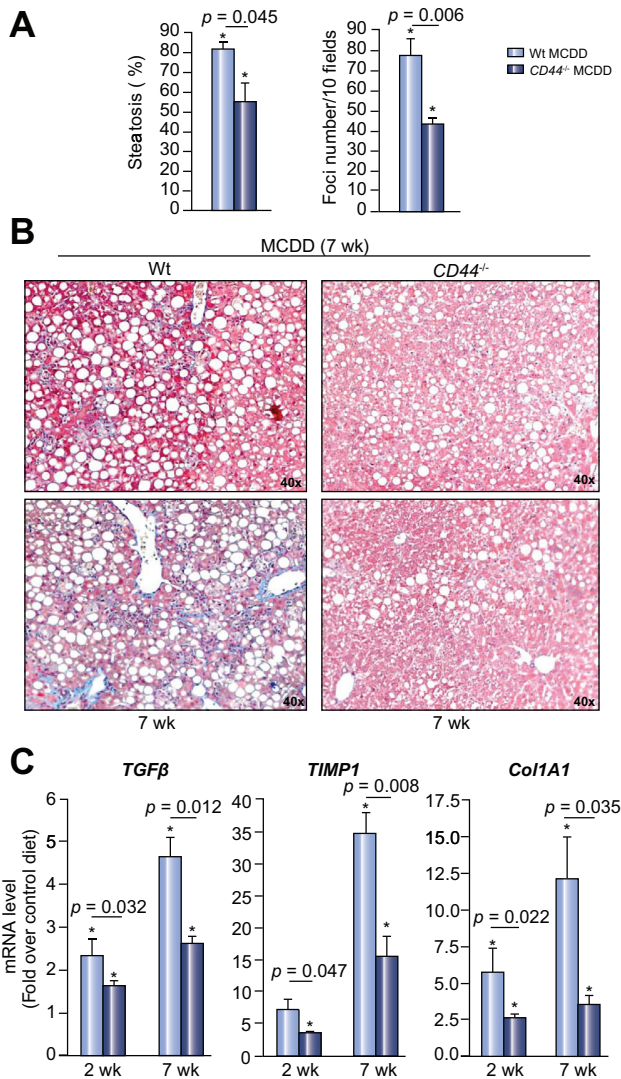


Fig. 6. CD44 deficiency strongly decreased the hepatic fibrosis induced by MCDD. WT and CD44^{-/-} mice were challenged with a Ctr D or MCDD for 7 weeks (5–6 mice/group). (A) Quantification of hepatic steatosis and inflammation (inflammatory foci) after H&E staining of liver samples. (B)(C) Hepatic fibrosis was evaluated by (B) collagen staining (Masson's trichrome) (representative pictures are shown) and (C) gene expression of markers of fibrosis including *TGFβ*, *TIMP1* and *Col1A1*. Data are presented as relative mRNA levels normalized to $\beta 2M$ mRNA levels. Data are expressed as means \pm SEM and statistically analyzed using the Mann-Whitney *U* test: **p* < 0.05, compared with WT Ctr D mice.

fibrosis markers like transforming growth factor (*TGFβ*), *TIMP1* and *Col1A1* (Fig. 6C). The partial prevention of hepatic fibrosis induced by CD44 deficiency was again associated with reduced liver injury, M1 macrophage enrichment as well as in MCP1 and CCR2 expression upon the long-term MCDD challenge (Fig. S2). Interestingly, the CD44 deficiency already prevented the upregulation of *TGFβ*, *TIMP1* and *Col1A1* in the early stages (in response to 2 weeks of MCDD) even before liver collagen accumulation (Fig. 6C). By regulating hepatic inflammation and liver injury, CD44 thus plays an important role in the progression of NAFLD to more severe complication (NASH-related fibrosis).

Hepatic CD44 correlated with NASH, hepatic MCP1 expression and liver macrophage enrichment in obese patients

We then investigated the relevance of our findings in the context of human NAFLD. We examined the relationship of hepatic CD44 expression to the progression of normal liver to hepatic steatosis and then NASH in liver biopsies obtained from morbidly obese patients undergoing bariatric surgery (Table 1). Patients were classified into three groups: without NAFLD, with hepatic steatosis (steatosis) and with NASH (NASH). Hepatic expression of CD44 was specifically upregulated in NASH patients at the mRNA (Fig. 7A) and protein levels (Fig. 7B) and preferentially correlated with the presence of NASH, hepatocyte ballooning and ALT activ-

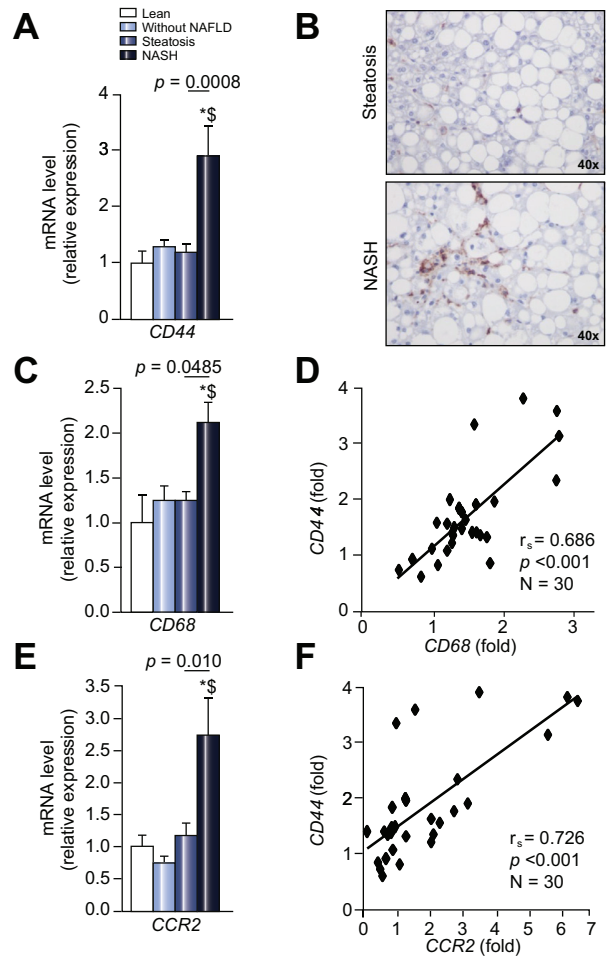


Fig. 7. Hepatic CD44 correlated with NASH, hepatic MCP1 expression and liver macrophage infiltration in obese patients. Liver CD44 (A), CD68 (C) and CCR2 (E) mRNA expression levels were analyzed by real-time quantitative PCR in lean patients (*n* = 4), in morbidly obese patients without NAFLD (*n* = 8), with hepatic steatosis (*n* = 13) and with NASH (*n* = 9). The gene expression was normalized to the mRNA levels of *RPLP0*. Results are expressed relative to the expression level in controls (means \pm SEM) and statistically analyzed using the Mann-Whitney *U* test. **p* < 0.05, compared with lean; [§]*p* < 0.05, compared with obese patients without NAFLD. (B) α CD44 staining of liver tissue sections from morbidly obese patients with severe hepatic steatosis (*n* = 5) and with NASH (*n* = 5). Representative pictures are shown. Correlations between CD44 and CD68 (D) or CCR2 (F) mRNA expression levels (fold vs. lean) were analyzed using the Pearson's correlation test.

Table 2. Correlation between hepatic CD44 expression and liver features in obese patients.

	Steatosis			NASH			Ballooning			NAS			ALT		
	r_s	p value	N	r_s	p value	N	r_s	p value	N	r_s	p value	N	r_s	p value	N
Liver CD44	0.480	0.007	30	0.668	< 0.001	30	0.531	0.003	30	0.562	0.001	30	0.496	0.005	30

Spearman's rank correlation test.

ity levels (Table 2). In line with our animal results, NASH was associated with the recruitment of additional macrophages (vs. resident Kupffer cells) as evaluated by the expression of CD68 (Fig. 7C) which strongly correlated with hepatic expression of CD44 (Fig. 7D). Hepatic expression of MCP1 (Table 1) and CCR2 (Fig. 7E) strongly increased with NASH. The upregulation of CD44 also correlated with markers of inflammation including TNF α , IL1 β , MCP1 (Fig. S3) and CCR2 (Fig. 7F). MCP1, which could play a key role in liver macrophage recruitment via CCR2, correlated with the hepatic expression of CD68 ($r_s = 0.481$, $p = 0.007$, $n = 30$) (data not shown) and CCR2 ($r_s = 0.808$, $p < 0.001$, $n = 30$) (Fig. S3).

Correction of NASH was associated with less hepatic CD44 positive cells in patients

We then investigated the potentially beneficial effect of bariatric surgery (LRYGB) on NASH, CD44 expression and macrophages enrichment in morbidly obese patients. Four women and one man, with a median age of 38 [26; 62] years at the time of LRYGB and with biopsy-proven NASH, had a second liver biopsy after ≥ 30 months of follow-up. The median interval between the LRYGB and the second liver biopsy was 45 [37; 81] months. LRYGB was associated with significant weight loss (Fig. 8A) (median BMI loss: -12.8 [-18.6 ; -8.7] kg/m 2), improvement of hepatic steatosis in all patients (total resolution for two patients) (Fig. 8B), and resolution of hepatic inflammation and hepatocyte ballooning in 100% of the cases (Fig. 8B). The intensity of the hepatic CD44 labeling, in addition to the number of CD44 positive cells, strongly decreased after surgery (Fig. 8C). This was associated with a decrease in hepatic macrophages (data not shown). The correction of NASH by bariatric surgery was thus associated with an improvement of CD44-positive cells (mainly monocytes/macrophages) in patients.

Serum levels of soluble CD44 increased with the severity of steatosis and NAFLD

Since soluble CD44 (sCD44) is generated by the proteolytic cleavage of the ectodomain of CD44 from cell surfaces and serum

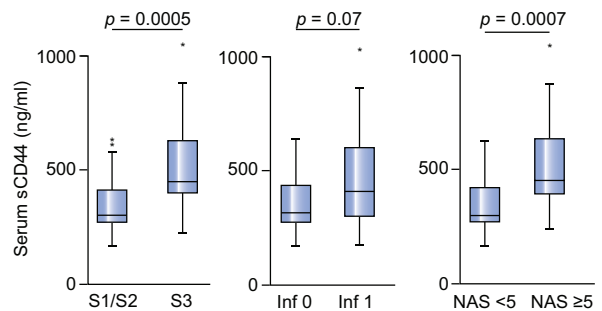


Fig. 9. The serum level of soluble CD44 increased with the severity of steatosis and NAFLD. (A) The serum sCD44 level was evaluated by ELISA in 64 obese patients with different grades of hepatic steatosis without or with NASH. Results are expressed with respect to (i) hepatic steatosis (severe [S3; n = 21] vs. mild or moderate hepatic steatosis [S1/S2; n = 43], to NASH vs. non-NASH (25 vs. 39) and to the NAFLD activity score (NAS) (NAS ≥ 5 [n = 17] vs. NAS < 5 [n = 47]). Results were expressed as the median (25th, 75th percentile) and statistically analyzed using the Mann-Whitney U test.

sCD44 levels could be associated with insulin resistance and hyperglycemia in patients,² we evaluated the relationship between sCD44 and liver complications in human. sCD44 levels were evaluated in 64 obese patients with different grades of hepatic steatosis without or with NASH. As shown in Fig. 9A, the serum level of sCD44 was higher in patients with severe steatosis (S3) (21 S3 vs. 43 with mild or moderate hepatic steatosis (S1/S2)) and tended to be higher in patients diagnosed NASH vs. non-NASH (25 NASH vs. 39 non-NASH). We then classified the patients with respect to their NAFLD activity score (NAS) generated by Brunt *et al.*²⁵ The serum sCD44 level was significantly higher in patients with NAS ≥ 5 vs. patients with NAS < 5 (17 vs. 47 with NAS < 5). In line with these results, the hepatic expression of ADAM10, a membrane-associated matrix metalloproteinases (MMPs) involved in the cleavage of the ectodomain of CD44, was upregulated in obese patients with severe steatosis compared to obese patients with moderate steatosis (Fig. S3C). Hepatic CD44 and its soluble form could thus be related to the development of hepatic inflammation in obese patients.

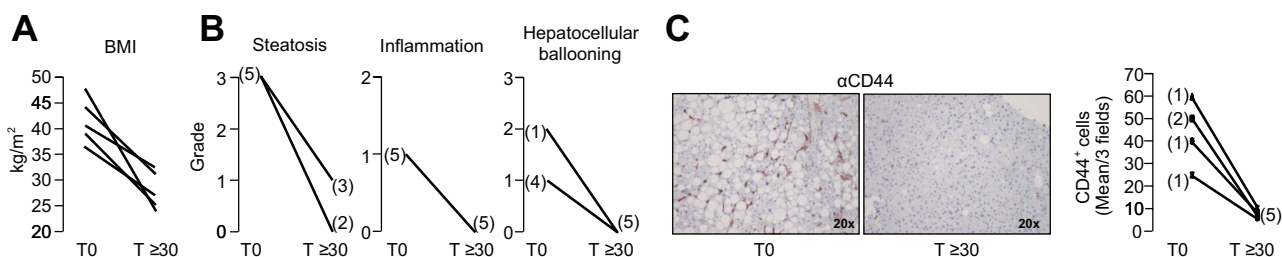


Fig. 8. Correction of NASH was associated with decreased hepatic CD44 $^+$ cells in patients. Four women and a man, with a median age of 38 [26; 62] years at the time of laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass (LRYGB) and with biopsy-proven NASH, had a second liver biopsy after ≥ 30 months of follow-up (45 [37; 81] months). BMI (A), hepatic steatosis, inflammation (NASH) and hepatocellular ballooning (B) were evaluated before and after LRYGB. (C) α CD44 staining of liver samples from morbidly obese patients with NASH (n = 5) before and after LRYGB. Representative pictures and quantification of CD44-positive cells are shown.

Research Article

Discussion

We first described in this study that steatohepatitis was associated with the upregulation of hepatic CD44 in mice and obese patients. While this upregulation of CD44 has also been reported in steatotic livers in mouse models of NAFLD,^{3,5} hepatic CD44 is more specifically increased in NASH patients. We then reported that CD44 deficiency strongly prevented liver steatosis, inflammation, injury and fibrosis in mice challenged with MCDD. This could be independent of adipose tissue inflammation and systemic insulin resistance since both events are not induced by MCDD.^{26,27} Furthermore, the prevention of hepatic complications by CD44 deficiency was associated with a strong decrease in hepatic infiltration of monocyte/macrophages and inflammation as evaluated by the number of inflammatory foci and expression of TNF α , IL1 β and iNOS, respectively. The prevention of macrophage infiltration into the liver by CD44 deficiency was not related to the decrease in circulating levels of monocytes. Whereas it has been reported that CD44 can direct lymphocytes to inflammatory sites,²⁸ the deficiency of CD44 did not impact the number of hepatic CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ cells in our mice (data not shown). Since hepatic monocyte/macrophage infiltration strongly contributes to the development of steatohepatitis,^{29,30} CD44 deficiency could prevent the development of steatohepatitis by regulating the liver monocyte/macrophage infiltration.

This effect of CD44 deficiency on liver monocyte/macrophage recruitment could be explained by several mechanisms. It has been clearly established that the deficiency of CD44 in macrophages abrogated the chemotaxis induced by various chemoattractants including MCP1/CCL2 and osteopontin.²³ The decrease in hepatic expression of chemoattractants could also prevent the liver recruitment of monocytes/macrophages. We here reported that liver MCP1/CCL2 expression was already increased after 2 weeks of MCDD and the deficiency of CD44 strongly prevented this upregulation. In mice, CD44 deficiency also prevented the upregulation of hepatic CCR2 expression (CCL2 receptor) after 2 (data not shown) and 7 weeks (Fig. S2D) of MCDD. In contrast, hepatic (data not shown) and serum levels of osteopontin (Fig. S4) was later upregulated (after 4–7 weeks of MCDD) with a partial decrease in CD44^{-/-} mice (Fig. S4). This could indicate that osteopontin could be more related to hepatic fibrosis than steatohepatitis, as previously reported.^{15,31–35}

The prevention of hepatic inflammation by the CD44 deficiency was also associated with less hepatic neutrophil infiltration. While further investigations are required, we can suggest that CD44 could regulate the neutrophil infiltration via E-selectin based on recent reports.^{10,12} This ligand of CD44 was upregulated in NASH livers in mice (Fig. S2) and patients⁹ and its hepatic expression decreased in MCDD-fed CD44^{-/-} mice vs. MCDD-fed WT mice (Fig. S2).

We also showed that targeting CD44 with a specific antibody (daily injection for 6 days) corrected the steatohepatitis and liver injury in MCDD-fed mice. This was associated with a decrease in hepatic monocyte/macrophage enrichment and in hepatic and circulating levels of MCP1/CCL2. While the depletion of CD44-positive cells did not correct hepatic steatosis in our mouse models, it has been recently reported that targeting CD44 with the same approach (anti-CD44 antibody) for 4 weeks corrected liver steatosis in a high fat diet-fed mouse model. But the beneficial effects of this long-term treatment (4 weeks in this study vs. 6 days in our trial) results from a strong decrease in weight gain, visceral adipose tissue

macrophages and MCP1/CCL2 expression, fasting blood glucose levels, and improvement of insulin sensitivity compared to controls.⁴ This highlights that CD44 is also important in the recruitment of macrophages into adipose tissue leading to adipose tissue inflammation and insulin resistance as previously reported.² Adipose tissue insulin resistance increases lipolysis and the release of free fatty acids from adipocytes into the circulation, which in turn promote liver steatosis and NAFLD.³⁶ This upregulation of adipose tissue CD44 has also been reported in obese people.² Furthermore, we have previously reported that the correction of adipose tissue inflammation after bariatric surgery decreased the expression of CD44 and macrophage marker CD68 in human adipose tissue.⁷

While different results on the role of the CCL2/CCR2 system have been obtained in mice with different genetic backgrounds,^{37,38} the contribution of this system has recently been confirmed in mice challenged with a lithogenic diet through a marked reduction in leukocyte recruitment in the absence of CCL2 in mouse strains susceptible to fat accumulation.⁵ *In vivo*, macrophage tracking also indicated that in the absence of CCL2 or CCR2, accumulation of macrophages is reduced by 80% in the liver and around 40% in adipose tissue.²⁴ Furthermore, targeting CCR2 by deficiency or using a CCR2 inhibitor (CCR2-selective chemokine receptor antagonist RS102895) prevented the recruitment of macrophages into the liver, hepatic inflammation and fibrosis in choline-deficient amino acid-defined diet-fed mice.²⁹ The pharmacological inhibition of MCP1/CCL2 also prevented hepatic monocyte/macrophage infiltration, hepatic steatosis and inflammation in MCDD-fed mice.³⁰

In addition to the regulation of the monocyte/macrophage infiltration into the liver, we report here that the CD44 deficiency modified the properties of macrophages with higher susceptibility to anti-inflammatory (M2) polarization and lower pro-inflammatory phenotypes (M1) upon activation. The alteration of the M1/M2 balance is an important mechanism in the initiation of liver injury and NAFLD progression.^{39–41} The resulting exacerbated release of M1 resident Kupffer cell-derived mediators (such as TNF α) contributes to the pathogenesis of several liver lesions including hepatocyte steatosis and apoptosis, and inflammatory cell recruitment.^{39,42,43,44} Interestingly, the CD44 deficiency in macrophages prevented the expression of pro-inflammatory cytokines including TNF α and IL6 in response to DAMPs from damaged fatty hepatocytes, saturated fatty acid and pathogen-associated-molecular-pattern molecules such as LPS. In our MCDD-fed mice, hepatocyte steatosis and injury and LPS levels, as evaluated by the serum level of anti-LPS antibodies (Ctr D-fed WT mice: 380 \pm 58 ng/ml, n = 8, MCDD-fed mice: 629 \pm 51, n = 15, *p* = 0.006, upon 7 weeks of MCDD challenge, data not shown), strongly increased with steatohepatitis. CD44 deficiency in resident Kupffer cells could prevent their activation by increased levels of DAMPs, LPS and fatty acid. In turn, CD44^{-/-} Kupffer cells could secrete less pro-inflammatory cytokines (TNF α , IL6) and chemokines such as MCP1, leading to the prevention of hepatocyte glucido-lipid alteration and hepatic macrophage infiltration, respectively. Concerning hepatocyte alteration, MCDD-fed CD44^{-/-} mice displayed a lower hepatic expression of markers of cellular stresses (endoplasmic stress: CHOP/BIP, oxidative stress: sestrin-2 [Sesn2]) and lipogenesis (Srebp1) and hepatokine (FGF21) compared with MCDD-fed WT mice (Fig. S5). The prevention of freshly infiltrating hepatic macrophages could consecutively reduce the progression of chronic liver injury and fibrosis.

We then reported a specific increase in hepatic CD44 expression with NASH in obese patients. Hepatic CD44 expression also correlated with hepatic expression of the macrophage markers *CD68*, *MCP1/CCL2*, *TNF α* and *IL1 β* . *CCR2* was also specifically upregulated with NASH and strongly correlated with *MCP1* ($r_s = 0.808$, $p < 0.001$, $n = 30$). *CD68* also correlated with the hepatic expression of *MCP1* ($r_s = 0.481$, $p = 0.007$, $n = 30$). Correction of NASH after bariatric surgery-induced weight loss was associated with a strong decrease in CD44-positive cells in the liver. While the recruitment of macrophages into the liver could be mediated by several chemokines,⁴⁵ *MCP1/CCL2* is upregulated in the serum and liver of patients with NASH.^{9,46} Upregulation of hepatic CD44 could thus be related to the recruitment of macrophages but also to the activation level of recruited and resident macrophages (Kupffer cells). Indeed, we here reported that the deficiency of CD44 strongly decreased the expression of *TNF α* and *IL6* in activated macrophages. In accordance with this, the circulating level of sCD44, which results from the proteolytic cleavage of CD44 by membrane-associated matrix metalloproteinases such as ADAM10, was significantly higher in obese patients with NAS ≥ 5 vs. patients with NAS < 5 . Since CD44 is also expressed in the adipose tissue, we cannot rule out that its circulating levels could also be related to adipose tissue inflammation and insulin resistance as recently reported.² Although serum sCD44 and liver ADAM10 levels increased in our mouse model of steatohepatitis (Fig. S2) and sCD44 concentration increased in patients with severe acute or chronic liver disease from different etiologies (142 patients including 14 with acute hepatitis; 45 with noncirrhotic chronic liver disease, 34 with cirrhosis),⁴⁷ sCD44 as biomarker to accurately estimate NASH should be validated in a larger cohort of patients.

In conclusion, CD44 plays an important role in the development of NASH by regulating hepatic macrophage polarization (pro-inflammatory phenotype) and infiltration (macrophage motility and the *MCP1/CCL2/CCR2* system). In mice, targeting CD44 through deficiency or by depletion can prevent and correct steatohepatitis, respectively. In patients, hepatic CD44 and serum sCD44 increase with hepatic inflammation. By regulating the macrophage infiltration in the adipose tissue, CD44 could also enhance the development of adipose tissue inflammation and hepatic steatosis. Since CD44 is also expressed in other immune cells and in fibroblasts/stellate cells,^{48,49} studies focusing on the role of CD44 in specific cells should provide more insight into the pathogenesis of NASH/NAFLD.

Financial support

This work was supported by grants from INSERM (France), the University of Nice, the Programme Hospitalier de Recherche Clinique (Centre Hospitalier Universitaire of Nice), and charities (Association Française pour l'Étude du Foie (AFEF)/LFB to PG, AFEF/Aptalis to BBM, Société Francophone du Diabète (SFD) to PG, SFD/Roche Pharma to PG, SFD/MSD to BBM, European Foundation for the study of Diabetes/Lilly European Diabetes Research Programme to PG). This work was also funded by the French Government (National Research Agency, ANR) through the "Investments for the Future" LABEX SIGNALIFE: program reference #ANR-11-LABX-0028-01 and #ANR-15-CE14-0016-01.

Conflict of interest

The authors who have taken part in this study declared that they do not have anything to disclose regarding funding or conflict of interest with respect to this manuscript.

Authors' contributions

PG, SP and DR conceived the research and wrote the paper. SP, DR, SB, C Lebeaupin and C Luci planned and performed the experiments. CMC, RA, AI, MCSP and JG participated in human sample and data collection. AB, BBM, AT and all the other authors corrected and approved the final submitted draft.

Acknowledgments

The authors thank i) Dr V. Corcelle and the INSERM U1065 animal facility staff for their excellent care of mice; ii) Dr D. Alcor and the C3 M Imaging CORE Facility (Microscopy and Imaging platform Côte d'Azur, MICA; and iii) Dr F Larbret and the flow cytometry platform, Archet Hospital. We also thank Dr C. Postic (INSERM U1016 Institut Cochin, Paris, France) and Dr S. Lotersztajn (INSERM UMR 1149-Center for Research on Inflammation, Paris, France) for helpful discussions. We also thank Julie Cazareth (CNRS UMR7275, Flow Cytometry Facility, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Sophia-Antipolis, France) for performing multiplex bead array assays.

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2017.03.00>.

References



Author names in bold designate shared co-first authorship

- [1] Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 2016;64:73–84.
- [2] Kodama K, Horikoshi M, Toda K, Yamada S, Hara K, Irie J, et al. Expression-based genome-wide association study links the receptor CD44 in adipose tissue with type 2 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:7049–7054.
- [3] Kang HS, Liao G, DeGraff LM, Gerrish K, Bortner CD, Garantzios S, et al. CD44 plays a critical role in regulating diet-induced adipose inflammation, hepatic steatosis, and insulin resistance. *PLoS One* 2013;8:e58417.
- [4] Kodama K, Toda K, Morinaga S, Yamada S, Butte AJ. Anti-CD44 antibody treatment lowers hyperglycemia and improves insulin resistance, adipose inflammation, and hepatic steatosis in diet-induced obese mice. *Diabetes* 2015;64:867–875.
- [5] Egan CE, Daugherty EK, Rogers AB, Abi Abdallah DS, Denkers EY, Maurer KJ. CCR2 and CD44 promote inflammatory cell recruitment during fatty liver formation in a lithogenic diet fed mouse model. *PLoS One* 2013;8:e65247.
- [6] Liu LF, Kodama K, Wei K, Tolentino LL, Choi O, Engleman EG, et al. The receptor CD44 is associated with systemic insulin resistance and proinflammatory macrophages in human adipose tissue. *Diabetologia* 2015;58:1579–1586.
- [7] Bertola A, Deveaux V, Bonnafous S, Rousseau D, Anty R, Wakkach A, et al. Elevated expression of osteopontin may be related to adipose tissue macrophage accumulation and liver steatosis in morbid obesity. *Diabetes* 2009;58:125–133.

Research Article

- [8] Nagoshi S. Osteopontin: Versatile modulator of liver diseases. *Hepatol Res* 2014;44:22–30.
- [9] Bertola A, Bonnafous S, Anty R, Patouraux S, Saint-Paul MC, Iannelli A, et al. Hepatic expression patterns of inflammatory and immune response genes associated with obesity and NASH in morbidly obese patients. *PLoS One* 2010;5:e13577.
- [10] Katayama Y, Hidalgo A, Chang J, Peired A, Frenette PS. CD44 is a physiological E-selectin ligand on neutrophils. *J Exp Med* 2005;201:1183–1189.
- [11] Ruppert SM, Hawn TR, Arrigoni A, Wight TN, Bollyky PL. Tissue integrity signals communicated by high-molecular weight hyaluronan and the resolution of inflammation. *Immunol Res* 2014;58:186–192.
- [12] Bertola A, Park O, Gao B. Chronic plus binge ethanol feeding synergistically induces neutrophil infiltration and liver injury in mice: a critical role for E-selectin. *Hepatology* 2013;58:1814–1823.
- [13] McDonald B, Kubes P. Interactions between CD44 and Hyaluronan in Leukocyte Trafficking. *Front Immunol* 2015;6:68.
- [14] Rostami S, Parsian H. Hyaluronic Acid: from biochemical characteristics to its clinical translation in assessment of liver fibrosis. *Hepat Mon* 2013;13:e13787.
- [15] **Patouraux S, Bonnafous S**, Voican CS, Anty R, Saint-Paul MC, Rosenthal-Allieri MA, et al. The osteopontin level in liver, adipose tissue and serum is correlated with fibrosis in patients with alcoholic liver disease. *PLoS One* 2012;7:e35612.
- [16] **Lavallard VJ, Bonnafous S**, Patouraux S, Saint-Paul MC, Rousseau D, Anty R, et al. Serum markers of hepatocyte death and apoptosis are non invasive biomarkers of severe fibrosis in patients with alcoholic liver disease. *PLoS One* 2011;6:e17599.
- [17] **Bekri S, Gual P**, Anty R, Luciani N, Dahman M, Ramesh B, et al. Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH. *Gastroenterology* 2006;131:788–796.
- [18] Anty R, Bekri S, Luciani N, Saint-Paul MC, Dahman M, Iannelli A, et al. The inflammatory C-reactive protein is increased in both liver and adipose tissue in severely obese patients independently from metabolic syndrome, Type 2 diabetes, and NASH. *Am J Gastroenterol* 2006;101:1824–1833.
- [19] **Bertola A, Ciucci T**, Rousseau D, Bourlier V, Duffaut C, Bonnafous S, et al. Identification of adipose tissue dendritic cells correlated with obesity-associated insulin-resistance and inducing th17 responses in mice and patients. *Diabetes* 2012;61:2238–2247.
- [20] Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care* 2004;27:1487–1495.
- [21] Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;41:1313–1321.
- [22] **Patouraux S, Rousseau D, Rubio A**, Bonnafous S, Lavallard VJ, Lauron J, et al. Osteopontin deficiency aggravates hepatic injury induced by ischemia-reperfusion in mice. *Cell Death Dis* 2014;5:e1208.
- [23] Zhu B, Suzuki K, Goldberg HA, Rittling SR, Denhardt DT, McCulloch CA, et al. Osteopontin modulates CD44-dependent chemotaxis of peritoneal macrophages through G-protein-coupled receptors: evidence of a role for an intracellular form of osteopontin. *J Cell Physiol* 2004;198:155–167.
- [24] Oh DY, Morinaga H, Talukdar S, Bae EJ, Olefsky JM. Increased macrophage migration into adipose tissue in obese mice. *Diabetes* 2012;61:346–354.
- [25] Brunt EM, Kleiner DE, Wilson LA, Belt P, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score and the histopathologic diagnosis in NAFLD: distinct clinicopathologic meanings. *Hepatology* 2011;53:810–820.
- [26] Jha P, Knopf A, Koefeler H, Mueller M, Lackner C, Hoefler G, et al. Role of adipose tissue in methionine-choline-deficient model of non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Biochim Biophys Acta* 2014;1842:959–970.
- [27] Leclercq IA, Lebrun VA, Starkel P, Horsmans YJ. Intrahepatic insulin resistance in a murine model of steatohepatitis: effect of PPARgamma agonist pioglitazone. *Lab Invest* 2007;87:56–65.
- [28] DeGrendele HC, Estess P, Siegelman MH. Requirement for CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site. *Science* 1997;278:672–675.
- [29] Miura K, Yang L, van Rooijen N, Ohnishi H, Seki E. Hepatic recruitment of macrophages promotes nonalcoholic steatohepatitis through CCR2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012;302:G1310–G1321.
- [30] Baeck C, Wehr A, Karlmark KR, Heymann F, Vucur M, Gassler N, et al. Pharmacological inhibition of the chemokine CCL2 (MCP-1) diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury. *Gut* 2012;61:416–426.
- [31] Syn WK, Choi SS, Liaskou E, Karaca GF, Agboola KM, Oo YH, et al. Osteopontin is induced by hedgehog pathway activation and promotes fibrosis progression in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2011;53:106–115.
- [32] Urtasun R, Lopategi A, George J, Leung TM, Lu Y, Wang X, et al. Osteopontin, an oxidant stress sensitive cytokine, up-regulates collagen-I via integrin alpha(V)beta(3) engagement and PI3K/pAkt/NFkappaB signaling. *Hepatology* 2012;55:594–608.
- [33] Coombes JD, Swiderska-Syn M, Dolle L, Reid D, Eksteen B, Claridge L, et al. Osteopontin neutralisation abrogates the liver progenitor cell response and fibrogenesis in mice. *Gut* 2015;64:1120–1131.
- [34] Coombes JD, Choi SS, Swiderska-Syn M, Manka P, Reid DT, Palma E, et al. Osteopontin is a proximal effector of leptin-mediated non-alcoholic steatohepatitis (NASH) fibrosis. *Biochim Biophys Acta* 2016;1862:135–144.
- [35] Arriazu E, Ge X, Leung TM, Magdaleno F, Lopategi A, Lu Y, et al. Signalling via the osteopontin and high mobility group box-1 axis drives the fibrogenic response to liver injury. *Gut* 2016. <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310752>.
- [36] Tran A, Gual P. Non-alcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2013;37:17–29.
- [37] Kassel KM, Guo GL, Tawfik O, Luyendyk JP. Monocyte chemoattractant protein-1 deficiency does not affect steatosis or inflammation in livers of mice fed a methionine-choline-deficient diet. *Lab Invest* 2010;90:1794–1804.
- [38] Galastri S, Zamara E, Milani S, Novo E, Provenzano A, Delogu W, et al. Lack of CC chemokine ligand 2 differentially affects inflammation and fibrosis according to the genetic background in a murine model of steatohepatitis. *Clin Sci (Lond)* 2012;123:459–471.
- [39] Tacke F, Zimmermann HW. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. *J Hepatol* 2014;60:1090–1096.
- [40] Sakaguchi S, Takahashi S, Sasaki T, Kumagai T, Nagata K. Progression of alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis: common metabolic aspects of innate immune system and oxidative stress. *Drug Metab Pharmacokinet* 2011;26:30–46.
- [41] Wan J, Benkdane M, Teixeira-Clerc F, Bonnafous S, Louvet A, Lafdil F, et al. M2 Kupffer cells promote M1 Kupffer cell apoptosis: a protective mechanism against alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2014;59:130–142.
- [42] Huang W, Metlakunta A, Dedousis N, Zhang P, Sipula I, Dube JJ, et al. Depletion of liver Kupffer cells prevents the development of diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *Diabetes* 2010;59:347–357.
- [43] Li Z, Yang S, Lin H, Huang J, Watkins PA, Moser AB, et al. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2003;37:343–350.
- [44] Koca SS, Bahcecioğlu IH, Poyrazoğlu OK, Ozercan IH, Sahin K, Ustundag B. The treatment with antibody of TNF-alpha reduces the inflammation, necrosis and fibrosis in the non-alcoholic steatohepatitis induced by methionine- and choline-deficient diet. *Inflammation* 2008;31:91–98.
- [45] Marra F, Tacke F. Roles for chemokines in liver disease. *Gastroenterology* 2014;147:577–594 e571.
- [46] Haukeland JW, Damas JK, Konopski Z, Loberg EM, Haaland T, Goverud I, et al. Systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2. *J Hepatol* 2006;44:1167–1174.
- [47] Falletti E, Pirisi M, Fabris C, Bortolotti N, Soardo G, Gonano F, et al. Circulating standard CD44 isoform in patients with liver disease: relationship with other soluble adhesion molecules and evaluation of diagnostic usefulness. *Clin Biochem* 1997;30:69–73.
- [48] Meran S, Luo DD, Simpson R, Martin J, Wells A, Steadman R, et al. Hyaluronan facilitates transforming growth factor-beta1-dependent proliferation via CD44 and epidermal growth factor receptor interaction. *J Biol Chem* 2011;286:17618–17630.
- [49] Midgley AC, Rogers M, Hallett MB, Clayton A, Bowen T, Phillips AO, et al. Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1)-stimulated fibroblast to myofibroblast differentiation is mediated by hyaluronan (HA)-facilitated epidermal growth factor receptor (EGFR) and CD44 co-localization in lipid rafts. *J Biol Chem* 2013;288:14824–14838.

Screening for therapeutic trials and treatment indication in clinical practice: MACK-3, a new blood test for the diagnosis of fibrotic NASH

J. Boursier¹  | R. Anty² | L. Vonghia³ | V. Moal¹ | T. Vanwolleghem³ |
C. M. Canivet² | S. Michalak¹ | S. Bonnafous² | P. Michielsen³ | F. Oberti¹ |
A. Iannelli² | L. Van Gaal³ | S. Patouraux² | O. Blanchet¹ | A. Verrijken³ | P. Gual² |
M.-C. Rousselet¹ | A. Driessen³ | G. Hunault¹ | S. Bertrais¹ | A. Tran² |
P. Calès¹  | S. Francque³

¹Angers, France

²Nice, France

³Antwerp, Belgium

Correspondence

Prof. J Boursier, Service d'Hépatologie, Angers University Hospital, Angers, France.
Email: JeBoursier@chu-angers.fr

Funding information

Nice University; Agence Nationale de la Recherche; Angers University Hospital; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale; National Research Agency

Summary

Background: The composite histological endpoint comprising nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and NAFLD activity score ≥ 4 and advanced fibrosis ($F \geq 2$) ("fibrotic NASH") is becoming an important diagnostic target in NAFLD: it is currently used to select patients for inclusion in phase III therapeutic trials and will ultimately be used to indicate treatment in clinical practice once the new drugs are approved.

Aim: To develop a new blood test specifically dedicated for this new diagnostic target of interest.

Methods: Eight Hundred and forty-six biopsy-proven NAFLD patients from three centres (Angers, Nice, Antwerp) were randomised into derivation and validation sets.

Results: The blood fibrosis tests BARD, NFS and FIB4 had poor accuracy for fibrotic NASH with respective AUROC: 0.566 ± 0.023 , 0.654 ± 0.023 , 0.732 ± 0.021 . In the derivation set, fibrotic NASH was independently predicted by AST, HOMA and CK18; all three were combined in the new blood test MACK-3 (hoMa, Ast, CK18) for which 90% sensitivity and 95% specificity cut-offs were calculated. In the validation set, MACK-3 had a significantly higher AUROC (0.847 ± 0.030 , $P \leq 0.002$) than blood fibrosis tests. Using liver biopsy in the grey zone between the two cut-offs (36.0% of the patients), MACK-3 provided excellent accuracy for the diagnosis of fibrotic NASH with 93.3% well-classified patients, sensitivity: 90.0%, specificity: 94.2%, positive predictive value: 81.8% and negative predictive value: 97.0%.

Conclusion: The new blood test MACK-3 accurately diagnoses fibrotic NASH. This new test will facilitate patient screening and inclusion in NAFLD therapeutic trials and will enable the identification of patients who will benefit from the treatments once approved.

1 | INTRODUCTION

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), the liver manifestation of the metabolic syndrome (MetS), encompasses a wide spectrum of liver lesions.¹ While isolated steatosis is generally considered benign, nonalcoholic steatohepatitis (NASH) represents the aggressive form of the disease responsible for accelerated liver fibrosis progression, higher rates of cirrhosis and its associated complications, and higher rates of hepatocellular carcinoma.² Now that the burden of NAFLD among the general population has reached 25%,³ NASH is expected to become the leading indication for liver transplantation in the United States within 10-20 years.⁴

Knowledge of the pathophysiological mechanisms driving NAFLD has advanced considerably and resultantly research in drug development has become a highly active field within which numerous therapeutic trials are underway.⁵ A recent workshop conducted by the American Association for the Study of Liver Diseases concluded that therapeutic trials in NAFLD should enrol patients having an active disease defined by the presence of steatohepatitis and a NAFLD activity score (NAS) ≥ 4 .⁶ The first phase III trials in NASH were recently launched with the aim of demonstrating the clinical benefits of obeticholic acid (REGENERATE study, NCT02548351) and Elafibranor (RESOLVE-IT study, NCT02704403). These two trials are using clinical outcomes as study endpoints and, to be included, patients must have biopsy-proven NASH, a NAS ≥ 4 and significant/advanced F2-3 fibrosis. This enrichment of the study populations with fibrotic patients is intended to ensure that the number of required clinical events will occur during patient follow-up and within a reasonable time frame. Because it is a condition required for inclusion in phase III trials, the composite criterion of "NASH and NAS ≥ 4 and fibrosis $F \geq 2$ " is therefore becoming an important new diagnostic target in NAFLD. More importantly, it will become an indication for treatment in clinical practice when and if these drugs receive their market authorisations. This second aspect particularly reinforces the interest of non-invasive tests able to accurately diagnose this composite histological endpoint. Several blood fibrosis tests are available but they have been usually developed for the diagnosis of advanced fibrosis and they are less accurate for earlier stages of fibrosis.⁷ Serum level of apoptotic caspase-3 generated cytokeratin-18 fragments (CK18) has been shown as a candidate biomarker for NASH⁸ but a large study has recently challenged its diagnostic accuracy.⁹

In the present work, we aimed to evaluate the accuracy of blood fibrosis tests and CK18 for the diagnosis of "NASH and NAS ≥ 4 and fibrosis $F \geq 2$ " in a large multicentre series of NAFLD patients, and to improve the accuracy by developing an accurate blood test specifically designed for this new diagnostic target of interest.

2 | PATIENTS AND METHODS

2.1 | Patients

The study population was obtained by pooling the data from three published studies performed in Angers (France),⁷ Antwerp (Belgium)¹⁰

and Nice (France).¹¹ Inclusion criteria were biopsy-proven NAFLD as defined by the presence of liver steatosis after exclusion of concomitant steatosis-inducing drugs (such as corticosteroids, tamoxifen, amiodarone, or methotrexate), excessive alcohol consumption (>30 g/d in men or >20 g/d in women), chronic hepatitis B or C infection, and histological evidence of other concomitant chronic liver disease. Patients were excluded if they had cirrhosis complications (hepatic encephalopathy, ascites, variceal bleeding, systemic infection or hepatocellular carcinoma). Patient recruitment differed across the three centres: Angers centre included out-patients from its hepatology department; Antwerp centre included obese patients without pre-existing diabetes who presented at their obesity clinic; and Nice centre included morbidly obese patients referred for bariatric surgery. Metabolic syndrome was defined as the presence of at least three of the following parameters:¹² elevated waist circumference (≥ 94 cm in men or ≥ 80 cm in women), elevated blood pressure (systolic blood pressure ≥ 130 mm Hg or diastolic blood pressure ≥ 85 mm Hg or antihypertensive drug), elevated glycemia (≥ 100 mg/dL or anti-diabetic drug), elevated triglycerides (≥ 150 mg/dL or lipid-lowering drug), low HDL cholesterol (<40 mg/dL in men or <50 mg/dL in women or lipid-lowering drug).

2.2 | Histology

Liver biopsy was performed percutaneously (16-gauge Menghini in Angers and Antwerp) or during surgery (14-gauge Tru-Cut in Antwerp or hepatic wedges in Nice). In each centre, pathological examination of liver biopsies was performed by a senior expert specialised in hepatology and blinded for patient data. Steatosis, lobular inflammation and ballooning were semi-quantitatively graded using the NASH-CRN scoring system.¹³ The NAS, ranging from 0 to 8, corresponded to the sum of the scores for steatosis, lobular inflammation and ballooning.¹⁴ NASH was defined according to the latest recommendations^{6,15} as the presence of a score ≥ 1 for each of the three components of the NAS. "Active NASH" was defined as the presence of NASH with a NAS score ≥ 4 . Liver fibrosis was staged from F0 to F4 according to the NASH-CRN scoring system.¹³ Significant fibrosis was defined as $F \geq 2$ and advanced fibrosis as $F \geq 3$. Finally, the presence of an active NASH with significant fibrosis, ie NASH and NAS ≥ 4 and fibrosis $F \geq 2$, was termed "fibrotic NASH". This latter was the primary diagnostic target of the study.

A subgroup of 30 patients covering the histological spectrum of NAFLD lesions was selected in the Angers population to study the inter-centre agreement on histopathological evaluation of liver lesions. Liver biopsies were digitised using an Aperio digital slide scanner (Scanscope CS System, Aperio Technologies, Vista CA 92081, USA) image processor that provided high quality 30 000 \times 30 000 pixel images at a resolution of 0.5 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ (magnification $\times 20$). Two slides were digitised for each patient: one stained with haematoxylin and eosin and one with picrosirius red. The digitised slides were sent to the expert pathologist from each of the three investigating centres (SM, SP, AD) to score steatosis,

lobular inflammation, ballooning and fibrosis according to the NASH-CRN scoring system.

2.3 | Blood parameters

All blood samples from the three original studies were taken in fasting conditions.^{7,10,11} The blood results available from these works enabled the calculation of the following blood fibrosis tests according to published formulas: BARD,¹⁶ FIB4,¹⁷ and NAFLD fibrosis score (NFS).¹⁸ Serum level of insulin were measured on fresh samples using Chimiluminescence I2000 (Abbott) in Angers, Cobas Instrument (Roche) in Antwerp, and Centaur XP (Siemens) in Nice. HOMA was calculated as follow: fasting glucose (mmol/L) * fasting insulin ($\mu\text{U}/\text{mL}$)/22.5. To limit the influence of supra-physiological results of insulinemia induced by insulin therapy, the HOMA was capped at 10. Serum levels of CK18 were measured on frozen (-80°C) samples in each centre using the M30-Apoptosense enzyme-linked immunosorbent assay kit (PEVIVA, Bromma, Sweden).

2.4 | Statistics

Quantitative variables were expressed as mean \pm standard deviation. Inter-observer agreement of the histological scoring was determined using the Fleiss' Kappa score.¹⁹ Correlations between quantitative variables were determined using the Spearman correlation coefficient (Rs). The accuracy of non-invasive tests was evaluated using the area under the receiver operating characteristics (AUROC) and compared between tests using the Delong test.

2.4.1 | Development of the new blood test for the diagnosis of fibrotic NASH

To facilitate future automatic calculation by laboratory systems, only biological parameters were considered for the development of the new blood test dedicated to the diagnosis of fibrotic NASH. Variables with skewed distribution were ln transformed. The study population was randomly divided into derivation and validation sets. In the derivation set, the statistically significant variables identified by the univariate analysis ($P < 0.05$) were introduced in a multivariate analysis (stepwise forward binary logistic regression) whose regression formula was used to develop the new blood test. The diagnostic accuracy of the new test was then evaluated in the validation set.

2.4.2 | Sample size calculation

With α risk: 5%, β risk: 10%, fibrotic NASH prevalence: 25%, expected AUROC for fibrotic NASH: 0.70 for the best blood fibrosis test and 0.85 for the new test, AUROC correlation: 0.30 and bilateral testing, the required sample size for the validation set was 264 patients. The whole study population ($n = 846$) was therefore 2:1 randomly divided so that the validation set included 282 patients.

Statistical analyses were performed using SPSS version 18.0 software (IBM, Armonk, NY, USA) and SAS 9.1 (SAS Institute Inc., Cary,

NC, USA). All authors had access to the study data and reviewed and approved the final manuscript.

3 | RESULTS

3.1 | Patient characteristics

The characteristics of the 846 patients included in the study are detailed in Table 1. A total of 62.1% were female and mean age was 47.5 ± 13.6 years. MetS was present in 67.7% of the patients and diabetes in 27.2% of them. In Angers and Antwerp, mean liver biopsy length was 24 ± 12 mm, 91.0% of biopsies were ≥ 10 mm, 73.9% were ≥ 15 mm and 60.8% were ≥ 20 mm. NASH was diagnosed in 54.0% of patients, $\text{NAS} \geq 4$ in 46.9% and $F \geq 2$ in 51.4%. Finally, 23.3% had fibrotic NASH as defined by the presence of all the three criteria: NASH, $\text{NAS} \geq 4$ and $F \geq 2$.

3.2 | Inter-observer agreement on histopathological evaluation of liver lesions

The liver biopsies of the 30 patients were all read by the expert pathologist from each investigating centre, for a total of 90 observations. The distribution of the recorded scores is shown in Table S1. Fleiss' Kappa score was 0.77 for steatosis, 0.62 for lobular inflammation, 0.64 for ballooning, 0.58 for NASH, 0.81 for the fibrosis stage, and 0.60 for fibrotic NASH. These results were similar to those obtained in a previous inter-observer reproducibility study performed between nine experts of the NASH-CRN (Table S2).

3.3 | Accuracy of blood fibrosis tests and CK18 for the diagnosis of fibrotic NASH

As expected, blood fibrosis tests performed better in diagnosing advanced fibrosis and cirrhosis (Table 2). In contrast, their accuracy was poor for the diagnosis of NASH or $\text{NAS} \geq 4$ with AUROCs ≤ 0.65 . For the diagnosis of fibrotic NASH, FIB4 had a higher AUROC (0.732 ± 0.021) than NFS (0.654 ± 0.023 , $P < 0.001$) or BARD (0.566 ± 0.023 , $P < 0.001$). Two diagnostic cut-offs are published for FIB4 (1.30 and 2.67) and for NFS (-1.455 and 0.676) in NAFLD.^{18, 20} Their low cut-offs provided only poor to moderate sensitivity for fibrotic NASH: 49.0% of the patients with fibrotic NASH were included in the lower interval of the FIB4 (< 1.30) and 30.4% in the lower interval of the NFS (< -1.455 ; Figure S1A). In addition, their high cut-offs identified very few patients with fibrotic NASH (FIB4: 10.8%, NFS: 18.0%; Figure S1A) and had poor positive predictive value (FIB4: 55.3%, NFS: 38.0%; Figure S1B). Taken together, these results suggest that BARD, FIB4, and NFS do not perform optimally for the detection of fibrotic NASH in NAFLD patients.

CK18 correlated significantly with steatosis, lobular inflammation, ballooning and fibrosis with significant differences between most of the adjacent grades/stages (Table S3). Furthermore, CK18 was significantly higher in patients with NASH compared to those without

TABLE 1 Patient characteristics at inclusion

	Angers (n = 309)	Antwerp (n = 270)	Nice (n = 267)	P ^a
Age (y)	56.1 ± 12.4	44.9 ± 12.3	40.3 ± 10.7	<0.001
Male sex (%)	60.8	37.8	11.6	<0.001
BMI (kg/m ²)	32.5 ± 6.0	40.0 ± 6.6	43.8 ± 4.8	<0.001
Elevated waist circumference (%) ^b	95.8	100.0	100.0	<0.001
Elevated blood pressure (%) ^c	79.5	69.7	51.3	<0.001
Elevated glycemia (%) ^d	75.7	19.3	44.4	<0.001
Elevated triglycerides (%) ^e	60.4	48.7	37.5	<0.001
Reduced HDL cholesterol (%) ^f	68.4	57.8	36.1	<0.001
Metabolic syndrome (%) ^g	83.1	62.8	54.4	<0.001
Diabetes (%) ^h	53.4	3.3	21.1	<0.001
Biopsy length (mm)	30 ± 12	16 ± 8	— ⁱ	<0.001
Steatosis (0/1/2/3, %)	5.8/46.3/29.1/18.8	0.0/44.1/31.5/24.4	6.4/36.3/26.2/31.1	<0.001
Lobular inflammation (0/1/2/3, %)	17.2/69.9/12.9/0.0	18.9/44.4/25.6/11.1	83.5/16.1/0.4/0.0	<0.001
Ballooning (0/1/2, %)	23.0/50.2/26.9	17.8/44.1/38.1	82.4/16.9/0.7	<0.001
NAS	3.6 ± 1.5	4.3 ± 1.8	2.2 ± 1.4	<0.001
NASH (%)	70.2	72.6	16.5	<0.001
Fibrosis stage (0/1/2/3/4, %)	8.4/26.2/29.8/29.4/6.1	60.4/18.1/12.6/8.1/0.7	1.5/33.0/60.3/5.2/0.0	<0.001
Fibrotic NASH (%) ^j	42.1	15.9	9.0	<0.001
AST (IU/l)	45 ± 24	33 ± 18	27 ± 16	<0.001
ALT (IU/l)	64 ± 38	48 ± 28	35 ± 28	<0.001
Gamma GT (IU/L)	118 ± 141	44 ± 33	43 ± 40	<0.001
Bilirubin (μmol/L)	11 ± 6	10 ± 4	8 ± 4	<0.001
Prothrombin time (%)	98 ± 12	94 ± 10	92 ± 9	<0.001
Platelets (G/L)	224 ± 67	294 ± 66	278 ± 66	<0.001
CK18 (IU/L)	289 ± 321	264 ± 243	260 ± 172	0.082
HbA1c (%)	6.6 ± 1.3	5.7 ± 0.6	6.0 ± 1.2	<0.001

BMI, body mass index.

^aBy Kruskal–Wallis test; ^bwaist circumference ≥94 cm in men or ≥80 cm in women; ^csystolic blood pressure ≥130 mm Hg or diastolic blood pressure ≥85 mm Hg or antihypertensive drug; ^dglycemia ≥100 mg/dL or antidiabetic drug; ^etriglycerides ≥150 mg/dL or lipid-lowering drug; ^fHDL cholesterol <40 mg/dL in men or <50 mg/dL in women or lipid-lowering drug; ^gdefined as ≥3 of the following parameters: elevated waist circumference, elevated blood pressure, elevated glycemia, elevated triglycerides, low HDL cholesterol; ^hglycemia ≥126 mg/dL or antidiabetic drug; ⁱsurgical samples; ^jdefined as the presence of NASH and NAS ≥4 and fibrosis F ≥ 2.

(respectively: 319 ± 316 vs 217 ± 142 IU/l, $P < 0.001$). Despite this, CK18 showed low accuracy for the diagnosis of NASH, with an AUROC at 0.595 ± 0.019 (Table 2). Thereafter, CK18 was evaluated as a function of NASH, NAS ≥ 4 and F ≥ 2. In the NAS < 4 and NAS ≥ 4 subgroups, CK18 levels did not differ significantly between patients with or without NASH (Figure S2A). Interestingly, in the four subgroups defined by NASH and NAS ≥ 4, CK18 levels were significantly higher in F ≥ 2 patients compared to F0-1 patients (Figure S2B). Consequently, CK18 performed better in diagnosing fibrotic NASH (Table 2) and appeared to be a candidate biomarker for this diagnostic target.

3.4 | New blood test for the non-invasive diagnosis of fibrotic NASH

The 846 patients were 2:1 randomly divided into derivation and validation sets, between which patients characteristics were not

significantly different (Table S4). To facilitate a future automatic calculation of the new test by laboratory systems, only biological parameters were tested in the derivation set. Multivariate analysis identified AST, HOMA and CK18 as independent predictors of fibrotic NASH (Table S5). A new blood test combining these three parameters was derived using the regression formula of the multivariate analysis. This new test, called MACK-3 (hoMa, Ast, CK18), provides a result ranging from 0 to 1. In the derivation set, the MACK-3 thresholds corresponding to 90% sensitivity and 95% specificity for fibrotic NASH were, respectively, 0.134 and 0.550.

In the validation set, MACK-3 had a significantly higher AUROC for the diagnosis of fibrotic NASH (0.847 ± 0.030) than BARD, NFS and FIB4 ($P \leq 0.002$, Table 3). 48.3% of the patients had MACK-3 ≤ 0.134 (90% sensitivity threshold), 36.0% were in the intermediate grey zone (0.135–0.549) and 15.7% had MACK-3 ≥ 0.550 (95% specificity threshold). The prevalence of fibrotic NASH in these three intervals was, respectively, 4.7%, 25.0% and 71.4% ($P < 0.001$,

TABLE 2 AUROCs of blood fibrosis tests and CK18 for the diagnosis of NAFLD lesions

Diagnostic target	BARD	NFS	FIB4	CK18
Mild fibrosis ($F \geq 1$)	0.626 ± 0.022	0.721 ± 0.020	0.653 ± 0.021	0.607 ± 0.022
Significant fibrosis ($F \geq 2$)	0.641 ± 0.019	0.686 ± 0.018	0.648 ± 0.019	0.634 ± 0.019
Advanced fibrosis ($F \geq 3$)	0.633 ± 0.025	0.720 ± 0.023	0.808 ± 0.021	0.659 ± 0.027
Cirrhosis (F4)	0.648 ± 0.065	0.865 ± 0.036	0.874 ± 0.040	0.572 ± 0.061
NASH	0.466 ± 0.020	0.521 ± 0.020	0.651 ± 0.019	0.595 ± 0.019
NAS ≥ 4	0.433 ± 0.020	0.490 ± 0.020	0.604 ± 0.019	0.643 ± 0.019
NASH and NAS ≥ 4	0.449 ± 0.020	0.493 ± 0.020	0.597 ± 0.020	0.638 ± 0.019
Fibrotic NASH ^a	0.566 ± 0.023	0.654 ± 0.023	0.732 ± 0.021	0.715 ± 0.022

NAS, NAFLD activity score.

^aDefined as the presence of NASH and NAS ≥ 4 and $F \geq 2$.

TABLE 3 AUROCs of MACK-3 and blood fibrosis tests for the diagnosis of fibrotic NASH

Test	All	Derivation set	Validation set	P
BARD	0.566 ± 0.023	0.584 ± 0.028	0.528 ± 0.042	0.267
NFS	0.654 ± 0.023	0.671 ± 0.027	0.618 ± 0.040	0.272
FIB4	0.732 ± 0.021	0.738 ± 0.025	0.721 ± 0.037	0.703
MACK-3	0.846 ± 0.016	0.845 ± 0.019	0.847 ± 0.030	0.955
Comparison (P)				
BARD vs NFS	<0.001	0.003	0.015	—
BARD vs FIB4	<0.001	<0.001	<0.001	—
BARD vs MACK-3	<0.001	<0.001	<0.001	—
NFS vs FIB4	<0.001	0.007	<0.001	—
NFS vs MACK-3	<0.001	<0.001	<0.001	—
FIB4 vs MACK-3	<0.001	<0.001	0.002	—

Figure 1). MACK-3 ≤ 0.134 provided 90.0% sensitivity for fibrotic NASH, and MACK-3 ≥ 0.550 had 94.2% specificity. Among the patients in the highest interval (MACK-3 ≥ 0.550), 85.7% had fibrotic NASH or advanced F3-4 fibrosis (Figure 1). Using liver biopsy in the grey zone between the 0.134 and 0.550 thresholds, MACK-3 showed an excellent diagnostic accuracy for fibrotic NASH with 93.3% well-classified patients (Table 4).

3.5 | Sensitivity analysis

The accuracy of MACK-3 for the diagnosis of fibrotic NASH was different across the three centres (Table S6), likely reflecting the different populations they included. To evaluate whether there was a centre effect or this was due to the different characteristics of the three populations, we tested the influence of centre, age, sex, BMI, MetS, oral antidiabetic treatment, insulin treatment, biopsy length ≥ 20 mm, NAFLD/bariatric patients and derivation/validation set. By multivariate analysis including all these parameters, only MetS was independently associated with the rate of well-classified patients by MACK-3 (Table S7). Diagnostic accuracy of MACK-3 as a function of MetS presence/absence is presented in Table S6.

3.6 | Practical algorithm for clinical practice

NAFLD represents a very large population in which using MACK-3 to identify the subgroup of patients who need to be treated would require extensive measurement of CK18 and HOMA-IR. To limit unnecessary measurements of these biomarkers, we evaluated whether simple parameters available in routine practice (age, sex, BMI, MetS, AST, ALT, GGT) can be used in a first step to identify a subgroup with no need for MACK-3 calculation because of a very low prevalence of fibrotic NASH. In the derivation set, multivariate analysis including the seven simple parameters identified AST and MetS as independent predictors of fibrotic NASH. 25.1% of the patients had neither MetS nor elevated AST ≥ 35 UI/L with very low prevalence of fibrotic NASH in this subgroup (0.7%). This result was confirmed in the validation set where the prevalence of fibrotic NASH was 1.5% in patients having neither MetS nor AST ≥ 35 UI/L. This very low prevalence was also consistent across the three centres: 0.0% in Angers, 1.3% in Antwerp and 1.0% in Nice ($P = 0.876$).

Therefore, we derived the MACK-3 algorithm where we propose to use MACK-3 only in patients having MetS and/or AST ≥ 35 UI/L (Figure 2). Accuracy of the MACK-3 algorithm was not significantly different between the derivation and the validation sets (Table S8).

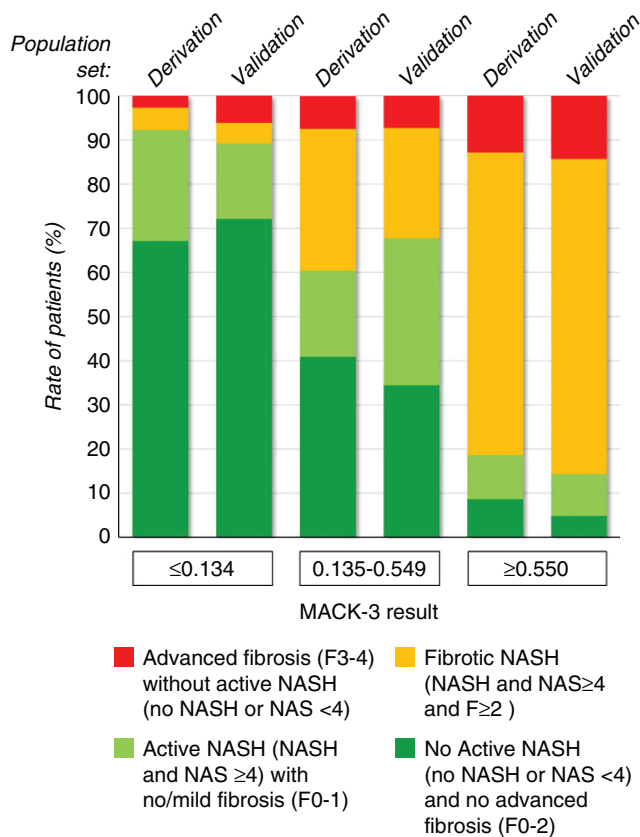


FIGURE 1 Prevalence of NAFLD lesions as a function of the 3 intervals of MACK-3 results and derivation/validation sets

TABLE 4 Accuracy of MACK-3 for the diagnosis of fibrotic NASH. MACK-3 was used with its 2 thresholds (≤ 0.134 : no fibrotic NASH; ≥ 0.550 : fibrotic NASH). Liver biopsy was performed in the grey zone

	All	Derivation set	Validation set	P value
DA	93.5	93.6	93.3	0.881
Se	90.0	90.0	90.0	1.000
Spe	94.5	94.7	94.2	0.852
NPV	96.9	96.8	97.0	—
PPV	83.4	84.2	81.8	—
-LR	0.11	0.11	0.11	—
+LR	16.4	16.9	15.5	—
OR	155.1	160.0	146.3	—
LB	38.4	39.6	36.0	0.356

DA, overall diagnostic accuracy (ie, rate of well-classified patients, %); Se, sensitivity (%); Spe, specificity (%); NPV, negative predictive value (%); PPV, positive predictive value; -LR, negative likelihood ratio; +LR, positive likelihood ratio; OR, diagnostic odds ratio; LB, liver biopsy requirement (%).

In the whole population, the rates of patients included in the four subgroups of the MACK-3 algorithm were, respectively, 25.6%, 26.1%, 34.4% and 13.9%. The prevalence of fibrotic NASH in the 4 subgroups of the MACK-3 algorithm was, respectively, 1.0%, 8.7%,

33.5% and 69.1% (Figure 3). Among the patients included in the last subgroup (MetS and/or $AST \geq 35$ UI/L with $MACK-3 \geq 0.550$), 82.7% had fibrotic NASH or advanced F3-4 fibrosis (Figure 3). Only 10.7% of the patients with fibrotic NASH and 15.3% of the patients with advanced F3-4 fibrosis were missed by the MACK-3 algorithm, which respectively represented 2.5% and 2.8% of the whole population. Finally, the MACK-3 algorithm provided an excellent accuracy for the diagnosis of fibrotic NASH with 93.2% well-classified patients, 89.3% sensitivity, 94.4% specificity, 83.1% positive predictive value and 96.6% negative predictive value (Table S8).

4 | DISCUSSION

NAFLD is closely linked to obesity and insulin resistance, and consequently its treatment is primarily based on lifestyle modifications.¹ Weight loss of $\geq 10\%$ is associated with a 90% resolution in NASH but less than 10% of patients are able to achieve and maintain that objective.²¹ In this context, the development of new drugs to reduce liver inflammation and stop fibrosis progression in NAFLD is receiving a great amount of attention.²²⁻²⁶ Fibrotic NASH is now used in the stratification of NAFLD severity by the latest international EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines.¹ Two recently launched phase III therapeutic trials use the presence of fibrotic NASH as an inclusion criterion. As it is very difficult to correctly identify this subset of patients within the very large population of NAFLD patients, we performed a large multicentre study that resulted in the development of MACK-3. This new blood test showed a very good 0.846 ± 0.016 AUROC for the diagnosis of fibrotic NASH. We finally proposed the new three-step MACK-3 algorithm with an excellent 93.2% diagnostic accuracy. To facilitate MACK-3 calculation for a patient in clinical practice or for an entire dataset in a clinical study, we have developed an online calculator available at the following weblink: <http://forge.info.univ-angers.fr/~gh/wstat/mack3-calculator.php>

Because fibrosis is part of the definition of fibrotic NASH, we first evaluated known blood fibrosis tests for this diagnostic target. NFS and FIB4 showed only moderate diagnostic accuracy, with respective AUROCs at 0.65 and 0.73. We also evaluated CK18 and our results (AUROC: 0.60) confirmed the poor diagnostic accuracy of CK18 for the diagnosis of NASH recently reported by Cusi et al.⁹ Interestingly, however, CK18 was significantly correlated with each of the individual liver lesions observed in NAFLD (Table S3) and was highest in patients with fibrotic NASH (Figure S2B). Finally, rather than a biomarker for the single diagnosis of NASH, CK18 was more globally associated with the severity of NAFLD and showed promise as a potential candidate for the non-invasive diagnosis of fibrotic NASH.

To improve the non-invasive diagnosis of fibrotic NASH, we identified relevant biomarkers by multivariate analysis in the derivation set and combined them in a new blood test. The new blood test MACK-3 includes biomarkers associated with liver inflammation (AST), insulin resistance (HOMA), and apoptosis (CK18). All these

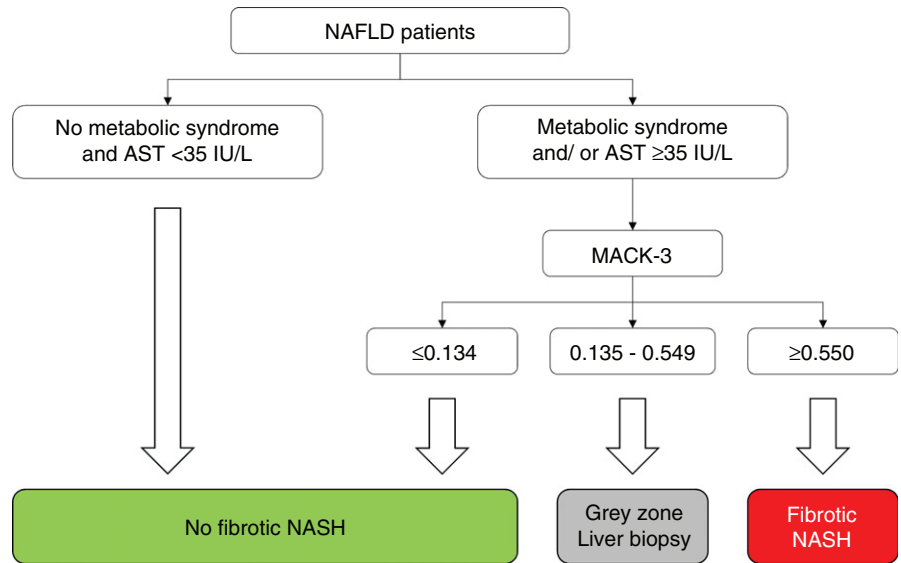


FIGURE 2 MACK-3 algorithm for the diagnosis of fibrotic NASH in clinical practice

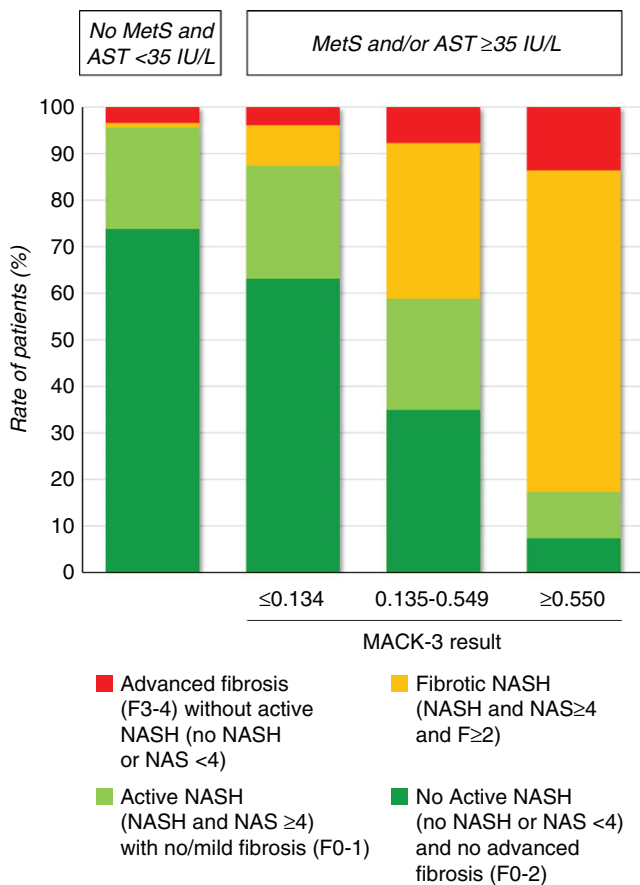


FIGURE 3 Prevalence of NAFLD lesions as a function of the 4 subgroups defined by the MACK-3 algorithm

conditions are closely linked with NAFLD severity, providing thus pathophysiological relevance for this new diagnostic test. Inclusions in phase III therapeutic trials in the setting of NASH are currently challenged by high rates of screening failure. Since the MACK-3 ≥ 0.550 threshold identifies a subset of NAFLD patients with a

high rate of fibrotic NASH, the use of this new test should considerably reduce the rate of screening failure.

NAFLD now concerns 25% of the general population.³ Consequently, with the upcoming arrival of new treatments in the clinic, many patients will need to be tested for the presence of fibrotic NASH. With the aim of limiting extensive measurements of specialised biomarkers and therefore costs related to the use of MACK-3 in clinical practice, we sought to identify simple parameters able to exclude fibrotic NASH. Such approach has been previously developed for the non-invasive diagnosis of advanced fibrosis in chronic liver diseases.²⁷ In the derivation set, we found that the absence of MetS combined with AST <35 UI/L defined a subgroup of patients within which the prevalence of fibrotic NASH was only 0.7%. This result was confirmed in the validation set and was consistent across the three centres. Thus, in the MACK-3 algorithm, we propose to perform MACK-3 calculation only for patients who have either MetS or AST ≥ 35 UI/L, and to use liver biopsy in a third step if MACK-3 results fall in the grey zone. The MACK-3 algorithm provided excellent accuracy for the diagnosis of fibrotic NASH: the rate of correctly classified patients was 93.2%, sensitivity was 89.3%, and positive predictive value was 83.1%.

The populations included by the three centres in our study were significantly different, due to different recruitment sources. That difference does however reflect the heterogeneity of NAFLD patients in clinical practice. We decided to pool our three populations because large multicentre samples are more suitable for the development of diagnostic tests than single centre populations, the latter being closely linked to intrinsic characteristics of the local population, as well as centre procedures and expertise. Finally, we estimate that pooling our three NAFLD populations was an advantage, allowing us to cover a large spectrum of NAFLD patients and the wide heterogeneity of the dysmetabolic disease. Our results are thus probably more robust than they would have been if we had limited our study population to a single centre.

The reading of liver biopsies by local pathologists as the different assays used to measure insulinemia could have introduced inter-centre variability in our work.^{13,28} To test this, we performed a multivariate analysis including the “center” variable and the parameters that differed significantly between the three populations. The only parameter associated with the rate of correctly classified patients by MACK-3 was the metabolic syndrome, with no effect of the “center.” This suggested that the difference in correctly classified patients we observed between the three investigating sites was linked to the different prevalence of the metabolic syndrome and not to local expertise or procedures. The reproducibility study between the three pathologists involved in the study showed an inter-observer agreement that was very close to what has been previously observed between nine expert pathologists of the NASH-CRN.¹³ These results validate the expertise of our pathologists and therefore the quality of the liver biopsy examinations performed in our work. Nonetheless, we acknowledge that further studies are required to independently validate the diagnostic accuracy of MACK-3 in larger, “real-life” NAFLD patient sets, and to evaluate inter-laboratory reproducibility.

Fibrotic NASH, defined by the presence of NASH + NAS_{≥4} + F _{≥2}, has the limitation to exclude F3-4 patients without NASH. Several accurate methods exist for the non-invasive evaluation of liver fibrosis in NAFLD.²⁹ In a recent large study where we directly compared Fibroscan and eight blood fibrosis tests, FibroMeter^V and Fibroscan showed the best accuracies for the non-invasive diagnosis of advanced F3-4 fibrosis in NAFLD.⁷ Further works will have to evaluate whether the combination of MACK-3 with FibroMeter^V and/or Fibroscan improves the stratification of NAFLD patients.

Despite it is well established that fibrosis stage is the main predictor of NAFLD prognosis,³⁰ it remains to demonstrate that fibrotic NASH is predictive of patient outcome. Liver biopsy is an imperfect reference for liver lesions because of sample bias and suboptimal inter-observer reproducibility.^{31,32} This is well illustrated by our results: despite our three pathologists involved were all senior experts specialised in hepatology, inter-observer reproducibility for fibrotic NASH was modest with kappa index at 0.60. Due to this lack of gold standard, it is not possible to assess the true diagnostic accuracy of MACK-3. Longitudinal studies circumvent this limitation by evaluating the prognostic significance of non-invasive tests.³³ Such longitudinal works are now required to validate if a blood test targeted for fibrotic NASH, like MACK-3, accurately identifies the NAFLD patients who have impaired prognosis and therefore require treatment with the upcoming new drugs.

In conclusion, MACK-3 is a new blood test combining AST, HOMA and CK18 for an accurate diagnosis of fibrotic NASH. This test will improve the screening of patients for therapeutic trials in NASH and, in the future, the identification of patients who will benefit from treatment with the new drugs currently under evaluation.

ACKNOWLEDGEMENTS

Data Collection and data management: Sandra Girre, Pascal Veillon, Audrey Morisset, Marc de Saint Loup.

Declaration of personal interests: None.

Declaration of funding interests: This work was supported by grants from the University Hospital of Angers (France), INSERM (France), the University of Nice and charities (Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF)/LFB and Société Francophone du Diabète/Roche Pharma to PG). This work was also funded by the French Government (National Research Agency, ANR) through #ANR-15-CE14-0016-01.

AUTHORSHIP

Guarantor of the article: Pr Jerome Boursier.

Author contributions: Jerome Boursier, study design, data acquisition, analysis, and draft writing/critical revision; Rodolphe Anty, study design, data acquisition, and draft writing/critical revision; Luisa Vonghia, Valérie Moal, Thomas Vanwolleghem, Clemence Canivet, Sophie Michalak, Stephanie Bonnafous, Peter Michielsen, Frédéric Oberti, Antonio Iannelli, Luc Van Gaal, Stéphanie Patouraux, Odile Blanchet, An Verrijken, Philippe Gual, Marie-Christine Rousset, Ann Driessen, data acquisition; Gilles Hunault, Sandrine Bertrais, analysis; Albert Tran, data acquisition; Paul Cales, data acquisition, analysis, and draft writing/critical revision; Sven Francque, study design, data acquisition, and draft writing/critical revision.

ORCID

J. Boursier  <http://orcid.org/0000-0002-7282-1436>

P. Calès  <http://orcid.org/0000-0003-4866-5274>

REFERENCES

1. EASL EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2016;64:1388-1402.
2. Marengo A, Jouness RI, Bugianesi E. Progression and natural history of nonalcoholic fatty liver disease in adults. *Clin Liver Dis.* 2016;20:313-324.
3. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology.* 2016;64:73-84.
4. Charlton MR, Burns JM, Pedersen RA, Watt KD, Heimbach JK, Dierkhising RA. Frequency and outcomes of liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis in the United States. *Gastroenterology.* 2011;141:1249-1253.
5. Ratziu V, Goodman Z, Sanyal A. Current efforts and trends in the treatment of NASH. *J Hepatol.* 2015;62:S65-S75.
6. Sanyal AJ, Brunt EM, Kleiner DE, et al. Endpoints and clinical trial design for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2011;54:344-353.
7. Boursier J, Vergniol J, Guillet A, et al. Diagnostic accuracy and prognostic significance of blood fibrosis tests and liver stiffness

- measurement by FibroScan in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2016;65:570-578.
8. Kwok R, Tse YK, Wong GL, et al. Systematic review with meta-analysis: non-invasive assessment of non-alcoholic fatty liver disease—the role of transient elastography and plasma cytokeratin-18 fragments. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014;39:254-269.
 9. Cusi K, Chang Z, Harrison S, et al. Limited value of plasma cytokeratin-18 as a biomarker for NASH and fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2014;60:167-174.
 10. Francque SM, Verrijken A, Mertens I, et al. Noninvasive assessment of nonalcoholic fatty liver disease in obese or overweight patients. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012;10:1162-1168.
 11. Anty R, Iannelli A, Patouraux S, et al. A new composite model including metabolic syndrome, alanine aminotransferase and cytokeratin-18 for the diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Aliment Pharmacol Ther*. 2010;32:1315-1322.
 12. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, et al. 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;120:1640-1645.
 13. Kleiner DE, Brunt EM, van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;41:1313-1321.
 14. Brunt EM, Kleiner DE, Wilson LA, Belt P, Neuschwander-Tetri BA, Network NCR. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score and the histopathologic diagnosis in NAFLD: distinct clinicopathologic meanings. *Hepatology*. 2011;53:810-820.
 15. Sanyal AJ, Friedman SL, McCullough AJ, et al. American Association for the Study of Liver D. Challenges and opportunities in drug and biomarker development for nonalcoholic steatohepatitis: findings and recommendations from an American Association for the Study of Liver Diseases-U.S. Food and Drug Administration Joint Workshop. *Hepatology*. 2015;61:1392-1405.
 16. Harrison SA, Oliver D, Arnold HL, Gogia S, Neuschwander-Tetri BA. Development and validation of a simple NAFLD clinical scoring system for identifying patients without advanced disease. *Gut*. 2008;57:1441-1447.
 17. Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology*. 2006;43:1317-1325.
 18. Angulo P, Hui JM, Marchesini G, et al. The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology*. 2007;45:846-854.
 19. Shrout PE, Fleiss JL. Intraclass correlations: uses in assessing rater reliability. *Psychol Bull*. 1979;86:420-428.
 20. Shah AG, Lydecker A, Murray K, Tetri BN, Contos MJ, Sanyal AJ. Comparison of noninvasive markers of fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009;7:1104-1112.
 21. Vilar-Gomez E, Martinez-Perez Y, Calzadilla-Bertot L, et al. Weight loss through lifestyle modification significantly reduces features of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2015;149:367-378. e365.
 22. Friedman SL, Ratziu V, Harrison SA, et al. A randomized, placebo-controlled trial of cenicriviroc for treatment of nonalcoholic steatohepatitis with fibrosis. *Hepatology*. 2017; doi: 10.1002/hep.29477.
 23. Loomba R, Lawitz E, Mantry PS, et al. The ASK1 Inhibitor Selonsertib in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis: a Randomized, Phase 2 Trial. *Hepatology*. 2017; in press.
 24. Neuschwander-Tetri BA, Loomba R, Sanyal AJ, et al. Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2015;385:956-965.
 25. Ratziu V, Harrison SA, Francque S, et al. Elafibranor, an Agonist of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-alpha and -delta, Induces Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis Without Fibrosis Worsening. *Gastroenterology*. 2016;150:e1145.
 26. Townsend SA, Newsome PN. Review article: new treatments in non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2017;46:494-507.
 27. Boursier J, de Ledinghen V, Leroy V, et al. A stepwise algorithm using an at-a-glance first-line test for the non-invasive diagnosis of advanced liver fibrosis and cirrhosis. *J Hepatol*. 2017;66:1158-1165.
 28. Tohidi M, Arbab P, Ghasemi A. Assay-dependent variability of serum insulin concentrations: a comparison of eight assays. *Scand J Clin Lab Invest*. 2017;77:122-129.
 29. Festi D, Schiumerini R, Marzi L, et al. Review article: the diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease – availability and accuracy of non-invasive methods. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013;37:392-400.
 30. Dulai PS, Singh S, Patel J, et al. Increased risk of mortality by fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease: systematic review and meta-analysis. *Hepatology*. 2017;65:1557-1565.
 31. Bedossa P, Dargere D, Paradis V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003;38:1449-1457.
 32. Rousselet MC, Michalak S, Dupre F, et al. Sources of variability in histological scoring of chronic viral hepatitis. *Hepatology*. 2005;41:257-264.
 33. Boursier J, Brochard C, Bertrais S, et al. Combination of blood tests for significant fibrosis and cirrhosis improves the assessment of liver-prognosis in chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014;40:178-188.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information will be found online in the supporting information tab for this article.

How to cite this article: Boursier J, Anty R, Vonghia L, et al. Screening for therapeutic trials and treatment indication in clinical practice: MACK-3, a new blood test for the diagnosis of fibrotic NASH. *Aliment Pharmacol Ther*. 2018;47:1387–1396. <https://doi.org/10.1111/apt.14621>

APPENDIX 1

THE AUTHORS' COMPLETE AFFILIATIONS

Jerome Boursier, Hepatology Department, Angers University Hospital and HIFIH Laboratory, UPRES 3859, SFR 4208, Bretagne Loire University, Angers, France; Rodolphe Anty, CHU of Nice, Digestive Center and INSERM, U1065, C3M, Team 8 “Hepatic complications in obesity” and Université Côte d’Azur, Nice, France; Luisa Vonghia, Department of Gastroenterology and Hepatology, Antwerp University Hospital & Laboratory of Experimental Medicine and Pediatrics, University of Antwerp, Antwerp, Belgium; Valérie Moal, HIFIH

Laboratory, UPRES 3859, SFR 4208, Bretagne Loire University and Biochemistry Department, Angers University Hospital, Angers, France; Thomas Vanwolleghem, Department of Gastroenterology and Hepatology, Antwerp University Hospital & Laboratory of Experimental Medicine and Pediatrics, University of Antwerp, Antwerp, Belgium; Clemence M Canivet, CHU of Nice, Digestive Center and INSERM, U1065, C3M, Team 8 "Hepatic complications in obesity" and Université Côte d'Azur, Nice, France; Sophie Michalak, Pathology Department, Angers University Hospital, Angers, France; Stephanie Bonnafous, CHU of Nice, Digestive Center and INSERM, U1065, C3M, Team 8 "Hepatic complications in obesity" and Université Côte d'Azur, Nice, France; Peter Michielsen, Department of Gastroenterology and Hepatology, Antwerp University Hospital & Laboratory of Experimental Medicine and Pediatrics, University of Antwerp, Antwerp, Belgium; Frédéric Oberti, Hepatology Department, Angers University Hospital and HIFIH Laboratory, UPRES 3859, SFR 4208, Bretagne Loire University, Angers, France; Antonio Iannelli, CHU of Nice, Digestive Center and INSERM, U1065, C3M, Team 8 "Hepatic complications in obesity" and Université Côte d'Azur, Nice, France; Luc Van Gaal, Department of Gastroenterology and Hepatology, Antwerp University Hospital & Laboratory of Experimental Medicine and Pediatrics, University of Antwerp, Antwerp, Belgium; Stéphanie Patouraux, INSERM, U1065, C3M, Team 8 "Hepatic complications in

obesity" and Université Côte d'Azur and CHU of Nice, Biological Center, Pasteur Hôpital, Nice, France; Odile Blanchet, CHU of Nice, Biological Center, Pasteur Hôpital, Nice, France; An Verrijken, Department of Gastroenterology and Hepatology, Antwerp University Hospital & Laboratory of Experimental Medicine and Pediatrics, University of Antwerp, Antwerp, Belgium; Philippe Gual, CHU of Nice, Digestive Center and INSERM, U1065, C3M, Team 8 "Hepatic complications in obesity" and Université Côte d'Azur, Nice, France; Marie-Christine Rousselet, HIFIH Laboratory, UPRES 3859, SFR 4208, Bretagne Loire University and Pathology Department, Angers University Hospital, Angers, France; Ann Driessen, Department of Pathology, Antwerp University Hospital, Antwerp, Belgium; Gilles Hunault, HIFIH Laboratory, UPRES 3859, SFR 4208, Bretagne Loire University, Angers, France; Sandrine Bertrais, HIFIH Laboratory, UPRES 3859, SFR 4208, Bretagne Loire University, Angers, France; Albert Tran, CHU of Nice, Digestive Center and INSERM, U1065, C3M, Team 8 "Hepatic complications in obesity" and Université Côte d'Azur, Nice, France; Paul Calès, Hepatology Department, Angers University Hospital and HIFIH Laboratory, UPRES 3859, SFR 4208, Bretagne Loire University, Angers, France; Sven Francque, Department of Gastroenterology and Hepatology, Antwerp University Hospital & Laboratory of Experimental Medicine and Pediatrics, University of Antwerp, Antwerp, Belgium.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

The Differential Expression of Cide Family Members is Associated with Nafld Progression from Steatosis to Steatohepatitis

Arnaud Sans^{1,2}, Stéphanie Bonnafous^{1,2}, Déborah Rousseau¹, Stéphanie Patouraux^{1,2}, Clémence M. Canivet^{1,2}, Pierre S. Leclere¹, Jeanne Tran-Van-Nhieu³, Carmelo Luci¹, Béatrice Bailly-Maitre¹, Xu Xu⁴, Ann-Hwee Lee⁵, Kaori Minehira⁶, Rodolphe Anty^{1,2}, Albert Tran^{1,2}, Antonio Iannelli^{1,2} & Philippe Gual¹

Improved understanding of the molecular mechanisms responsible for the progression from a “non-pathogenic” steatotic state to Non-Alcoholic Steatohepatitis is an important clinical requirement. The cell death-inducing DFF45 like effector (CIDE) family members (A, B and FSP27) regulate hepatic lipid homeostasis by controlling lipid droplet growth and/or VLDL production. However, CIDE proteins, particularly FSP27, have a dual role in that they also regulate cell death. We here report that the hepatic expression of CIDEA and FSP27 (α/β) was similarly upregulated in a dietary mouse model of obesity-mediated hepatic steatosis. In contrast, CIDEA expression decreased, but FSP27- β expression strongly increased in a dietary mouse model of steatohepatitis. The inverse expression pattern of CIDEA and FSP27 β was amplified with the increasing severity of the liver inflammation and injury. In obese patients, the hepatic CIDEA (human homologue of mouse FSP27 β) expression strongly correlated with the NAFLD activity score and liver injury. The hepatic expression of CIDEA tended to increase with obesity, but decreased with NAFLD severity. In hepatic cell lines, the downregulation of FSP27 β resulted in the fractionation of lipid droplets, whereas its overexpression decreased the expression of the anti-apoptotic BCL2 marker. This, in turn, sensitized cells to apoptosis in response to TNF α and saturated fatty acid. Considered together, our animal, human and *in vitro* studies indicate that differential expression of FSP27 β /CIDEA is related to NAFLD progression and liver injury.

Non Alcoholic Fatty Liver Diseases (NAFLD) is a major public health concern with global prevalence ranging from 22% to 28%¹. NAFLD is increasingly recognized as the most common chronic liver disease¹. The spectrum of the hepatic diseases ranges from steatosis (fatty liver) to nonalcoholic steatohepatitis (NASH) (steatosis, inflammation, liver injury) and subsequently to the activation of fibrogenic pathways, which correlates with a high risk of developing cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Despite lifestyle changes and bariatric surgery for severe/morbid obesity, the treatment of NAFLD (NASH) is still limited because of the lack of effective pharmacological treatment as well as lack of effective and practical diagnostic tools. NAFLD is associated with obesity and metabolic syndrome and the presence of type 2 diabetes mellitus can increase the risk of liver diseases^{2,3}. Inversely, NAFLD is also a risk factor for many metabolic diseases, including type 2 diabetes⁴ and cardiovascular disease⁵.

The mechanisms underlying the transition from steatosis to NASH are multifactorial and not fully elucidated. The hepatocyte accumulation of triglycerides in lipid droplets is a protective mechanism that buffers free fatty acids and prevents lipotoxicity⁶. However, this protective mechanism can be overwhelmed. To illustrate this, it has

¹Université Côte d’Azur, INSERM, U1065, C3M, Nice, France. ²Université Côte d’Azur, CHU, INSERM, U1065, C3M, Nice, France. ³HU Henri Mondor, Department of Pathology, AP-HP - Université Paris Est Créteil, Créteil, France. ⁴Weill Cornell Medicine, Department of Medicine, Division of Gastroenterology and Hepatology, New York, USA. ⁵Department of Pathology and Laboratory Medicine, Weill Cornell Medical College, New York, USA. ⁶University of Lausanne, Department of Physiology, Lausanne, Switzerland. Arnaud Sans, Stéphanie Bonnafous and Déborah Rousseau contributed equally. Correspondence and requests for materials should be addressed to P.G. (email: philippe.gual@inserm.fr)

been reported that the inhibition of the triglyceride synthesis via the targeting of diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2) improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with NASH⁷. The vulnerable fatty hepatocytes generate danger signals including the release of alarmins and damage-associated molecular patterns as well as the enrichment of apoptotic bodies. This activation of sterile inflammation is involved in the initiation of a vicious cycle, where inflammation enhances hepatocyte death and *vice-versa*.

The cell death-inducing DFF45 like effector (CIDE) protein family, including CIDEA, CIDEB and CIDEC/fat-specific protein 27 (FSP27), are lipid droplet-associated proteins. Since these proteins regulate lipid droplet synthesis and hepatic lipid homeostasis, they could be key players in the control of NAFLD progression⁸. The CIDEA is a short-lived protein that is mainly controlled by the sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c; master transcription factor regulated *de novo* lipogenesis) and shows increased expression in the case of hepatic steatosis^{9,10}. Its overexpression in mouse liver resulted in augmented hepatic lipid accumulation and the formation of large lipid droplets. In contrast, the hepatic knockdown of CIDEA in obese mice resulted in significantly reduced hepatic lipid accumulation and smaller lipid droplets¹⁰. CIDEB is highly and constitutively expressed in the liver and controls both insulin sensitivity and VLDL maturation^{11,12}. CIDEC, also known as fat-specific protein 27 (FSP27) in mouse, is also highly expressed in fatty liver and knock-down of its expression in fatty liver tissue ameliorated hepatic steatosis^{13–17}. Its overexpression in hepatic cells enhanced the triglyceride content of lipid droplets¹⁷. The two FSP27 α and β isoforms of mouse FSP27 (corresponding to human CIDEC1 and 2, respectively) are regulated by the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ)^{14–17} and cyclic-AMP-responsive-element-binding protein H (CREBH)^{18,19}. The CIDE protein family can also mediate cell death depending on their expression levels and cellular localization^{20–23}.

The relative expression levels of the three CIDE members over the transition period from simple steatosis to NASH has not yet been investigated. Interestingly, it has recently been reported that the strong upregulation of FSP27/CIDEC, with no change to CIDEA and CIDEB expression levels, contributes to alcohol-induced liver damage¹⁹. We therefore evaluated the expression level of the three CIDE members in NASH development and liver injury in experimental mouse models and in a cohort of patients at various stages of NAFLD progression.

Results

Hepatic expression of CIDEA, FSP27 α and β increased with obesity-induced hepatic steatosis.

We first evaluated the hepatic expression levels of CIDEA, CIDEB and FSP27 α and β in dietary mouse models of obesity and hepatic steatosis. After 33 weeks of high-fat diet (HFD), the wild-type C57BL/6 (Wt) mice developed obesity (Supplementary Fig. 1A), severe hepatic steatosis (Supplementary Fig. 1B,C) and hepatic injury as assessed by ALT activity (Supplementary Fig. 1D). The hepatic expression levels of CIDEA and FSP27 α and β were robustly increased upon 33 weeks of HFD at both the mRNA (Fig. 1A) and protein (CIDEA and FSP27) (Fig. 1B) level. Hepatic expression of CIDEA, FSP27 α and β also correlated with hepatic steatosis and liver injury (Fig. 2A,B). These occurred at the same extent as evaluated by the FSP27 α /CIDEA and FSP27 β /CIDEA ratios which did not change with hepatic steatosis and did not correlate with liver injury (Figs 1C, 2C). The hepatic expression of FSP27 α and β were similarly increased in obese mice (Fig. 1C: relative expression of FSP27 β versus FSP27 α). Even though it is robustly expressed in the liver (data not shown), hepatic expression of CIDEB did not change with obesity or hepatic steatosis (Fig. 1A). Steatosis and/or obesity were thus associated with the upregulation of the hepatic expression of CIDEA, FSP27 α and β .

Differential expression of CIDEA and FSP27 β is related to the severity of the MCDD-mediated steatohepatitis.

To subsequently investigate the behavior of the CIDECs in response to the progression and the severity of the NAFLD, we monitored their hepatic expression in wild-type mice fed a diet deficient in methionine and choline (MCDD) for 2 and 7 weeks. At 2 weeks, mice developed moderate hepatic steatosis with mild hepatic inflammation and liver injury (Supplementary Fig. 2). The long-lasting MCDD challenge (7 weeks) aggravated the liver complications with severe steatosis (from $50 \pm 8\%$ at 2 w to $81 \pm 3\%$ at 7 w, $p = 0.0201$), inflammation (from 9 ± 3 foci/10 fields at 2 w to $77 \pm 7\%$ at 7 w, $p = 0.0024$) and liver injury (ALT activity from 51 ± 7 U/L at 2 w to 282 ± 42 U/L at 7 w, $p = 0.0024$) (Supplementary Fig. 2). Hepatic CIDEA decreased in concert with the severity of the NAFLD at both the mRNA and the protein level (Fig. 3A, D). Its hepatic expression negatively correlated with hepatic inflammation (number of inflammatory foci) and liver injury (ALT activity) after 7 weeks of MCDD (Fig. 4A). In contrast, the hepatic FSP27 β was robustly augmented as NAFLD severity increased, from a 13-fold (± 3) increase at 2 weeks to a 28-fold (± 2) increase after 7 weeks of MCDD (Fig. 3B, D). Hepatic FSP27 β also correlated with inflammation and liver injury after 7 weeks of MCDD (Fig. 4B). The increased FSP27 expression was mainly caused by the upregulation of FSP27 β since FSP27 α expression tended to decrease (Fig. 3B). This inverse regulation pattern for CIDEA and FSP27 β expression was better illustrated by the FSP27 β /CIDEA ratio, with a 21-fold increase at 2 weeks versus a 48-fold increase at 7 weeks, $p = 0.017$ (Fig. 3C). This ratio also strongly correlated with hepatic inflammation and liver injury (Fig. 4C). The severity of the steatohepatitis was thus associated with an opposite expression of CIDEA and FSP27 β .

Hepatic CIDEC2 correlated with the severity of the NAFLD in obese patients.

To address the human relevance of our findings, we examined the relationship between hepatic CIDEA, CIDEB, CIDEC1 and CIDEC2 expression and the NAFLD progression from normal liver to steatosis and subsequent NASH in human liver biopsies from morbidly obese patients seeking for bariatric surgery. Patients were classified into 3 groups: without NAFLD, with hepatic steatosis (Steatosis) and with NASH (NASH) (assessed on the basis of three histopathological features steatosis, lobular inflammation and hepatocellular ballooning; Table 1, Supplementary Fig. 3 and Supplementary Methods). Liver mRNA levels of CIDEC2 were progressively upregulated with hepatic steatosis and subsequent NASH (Fig. 5A). This expression correlated with NAFLD features including hepatic steatosis, NASH and NAFLD activity score (NAS)(Fig. 5B). Hepatic CIDEC2 also correlated with hepatic injury as assessed

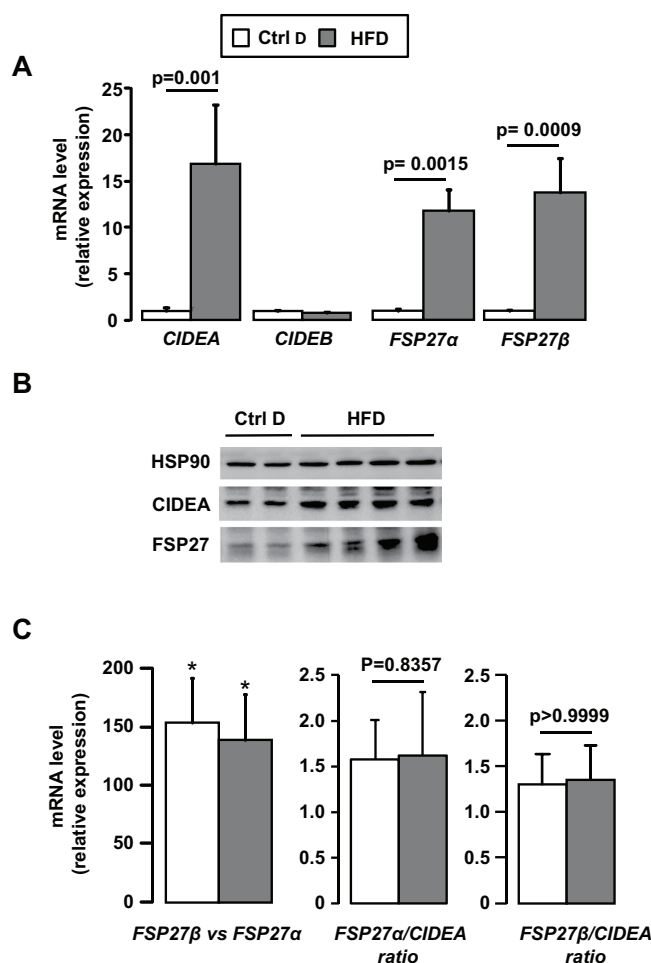


Figure 1. Hepatic expression of CIDEA, FSP27 α and FSP27 β increased with hepatic steatosis induced by HFD challenge. Wild-type mice fed a control diet (Ctrl D) ($n = 7$) or HFD ($n = 7$) for 33 weeks. (**A**, **C**) Hepatic expression of CIDEA, CIDEB, FSP27 α and FSP27 β was evaluated in Wt, Ctrl D and HFD mice at the mRNA level (7 mice/group). The gene expression was normalized to the mRNA levels of B2M or 36B4. Results are expressed relative to the expression level in controls (means \pm SEM) and statistically analyzed using the Mann-Whitney test. (**B**) Hepatic expression of CIDEA, FSP27 and HSP90 was evaluated in Wt, Ctrl D and HFD mice at the protein level (2–4 mice/group). * $p < 0.05$.

by ALT activity (Fig. 5C) and serum levels of keratin 18 (hepatocyte death marker) and caspase-generated keratin 18 fragment (hepatocyte apoptotic marker)^{24,25} (Fig. 5C). As reported in the mouse model of steatohepatitis, the upregulation of CIDEA is mainly related to CIDEA2 expression since CIDEA1 is not altered (data not shown). In contrast, hepatic CIDEA tended to increase in obesity (lean versus obese patients without NAFLD) and then to decrease in NAFLD (Fig. 5A). This relationship was significantly amplified when the CIDEA2/CIDEA ratio was evaluated (with NAS: $r_s = 0.861$, $p < 0.001$, $n = 26$) (Supplementary Fig. 3). Consistent with our animal results, the CIDEA expression was not modified with obesity and NAFLD (Fig. 5A) in human studies.

Down regulation of FSP27 β resulted in a decreased lipid droplet size in mouse hepatocytes.

Since FSP27 β is localized on the surface of lipid droplets and is known to suppress lipolysis¹⁸, we therefore investigated if altered FSP27 β expression could affect hepatocyte lipid droplet synthesis. The down-regulation of FSP27 β in AML12 hepatocytes (Fig. 6A), the main isoform expressed in hepatocyte (Fig. 6A), modified the size distribution of the lipid droplets in response to oleic acid (Fig. 6B, C). The number of small lipid droplets increased, while the number of large lipid droplets decreased. FSP27 β expression could thus be involved in the development of hepatic macro-steatosis.

Overexpression of FSP27 β sensitized hepatocytes to cell death in response to TNF α and palmitic acid and led to decreased BCL2 expression.

FSP27, in addition to regulating lipid droplet development, could also mediate apoptosis in an expression-dependent fashion^{21,22,26}. Furthermore, our human and experimental data strongly suggested that the expression level of FSP27 β (mouse)/CIDEA2 (human) was associated with NAFLD progression and correlated with liver injury in NAFLD (Figs 2, 4 and 5). As TNF α was strongly upregulated in NASH liver, strongly correlated with ALT activity (HFD mice: $r_s = 0.666$, $p = 0.007$, $n = 15$; 7 weeks MCDD mice: $r_s = 0.879$, $p = 0.002$, $n = 9$) and well reported to mediate hepatocyte death^{27–30}, we first

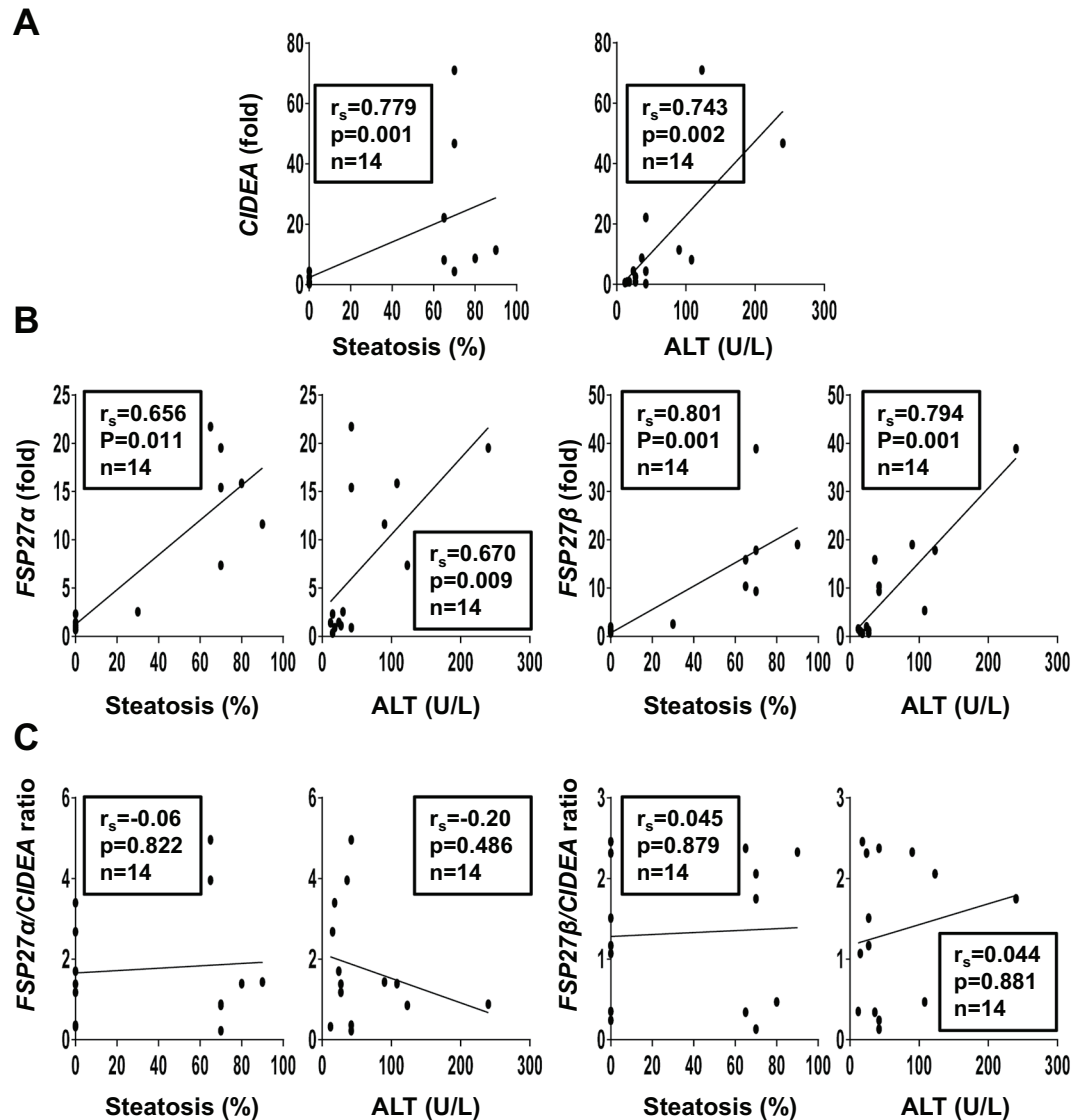


Figure 2. Hepatic *CIDEA*, *FSP27 α* and *FSP27 β* correlated with hepatic steatosis and liver injury in HFD-induced obese mice. Correlation between hepatic expression of *CIDEA* (A), *FSP27 α* , *FSP27 β* (B), *FSP27 α* /*CIDEA* ratio or *FSP27 β* /*CIDEA* ratio (C) (fold) with hepatic steatosis (%) and ALT in Wt, Ctrl D and HFD mice (7 mice/group, 33 weeks of challenges) were analyzed using the Pearson's correlation test.

evaluated the effect of the *FSP27 β* overexpression on the sensitivity to cell death under basal conditions and in response to $\text{TNF}\alpha$ and $\text{TNF}\alpha$ with actinomycin D (Acti D). At baseline, the overexpression of *FSP27 β* (Fig. 7A) caused minor increased cell death as evaluated by flow cytometry (Fig. 7B). This slight effect could be explained by the low percentage of transfected cells ($20.48 \pm 2.84\%$ of GFP^+ cells; $n = 4$). Interestingly, this cell death was associated with a decrease in anti-apoptotic *BCL2* expression (Fig. 7A). Furthermore, these effects were further amplified in response to $\text{TNF}\alpha$ and $\text{TNF}\alpha$ with Acti D in HEPG2 cells overexpressing *FSP27 β* , versus control HEPG2 hepatocytes (Fig. 7B). We then evaluated the effect of the *FSP27 β* overexpression on HEPG2 viability in response to saturated fatty acid (palmitic acid), key player in hepatocyte lipotoxicity. Again, the cell viability was further decreased in response to palmitic acid in HEPG2 cells overexpressing *FSP27 β* , versus control HEPG2 hepatocytes (Fig. 7C). By regulating hepatic steatosis and liver injury, *FSP27 β* thus plays a key role in the NAFLD progression to more severe complications, i.e., NASH.

Discussion

Here we report differential hepatic expression of *CIDEA* and *FSP27 β* /*CIDEA* in response to increasing NAFLD severity. Hepatic *FSP27 β* /*CIDEA* expression was not associated with obesity, but progressively increased with hepatic steatosis and subsequent steatohepatitis in mouse and human studies, respectively. In contrast, hepatic *CIDEA* increased with obesity but its hepatic expression tended to decrease with the severity of the steatohepatitis. The *FSP27 β* /*CIDEA* ratios better illustrated this opposing regulatory pattern and strongly

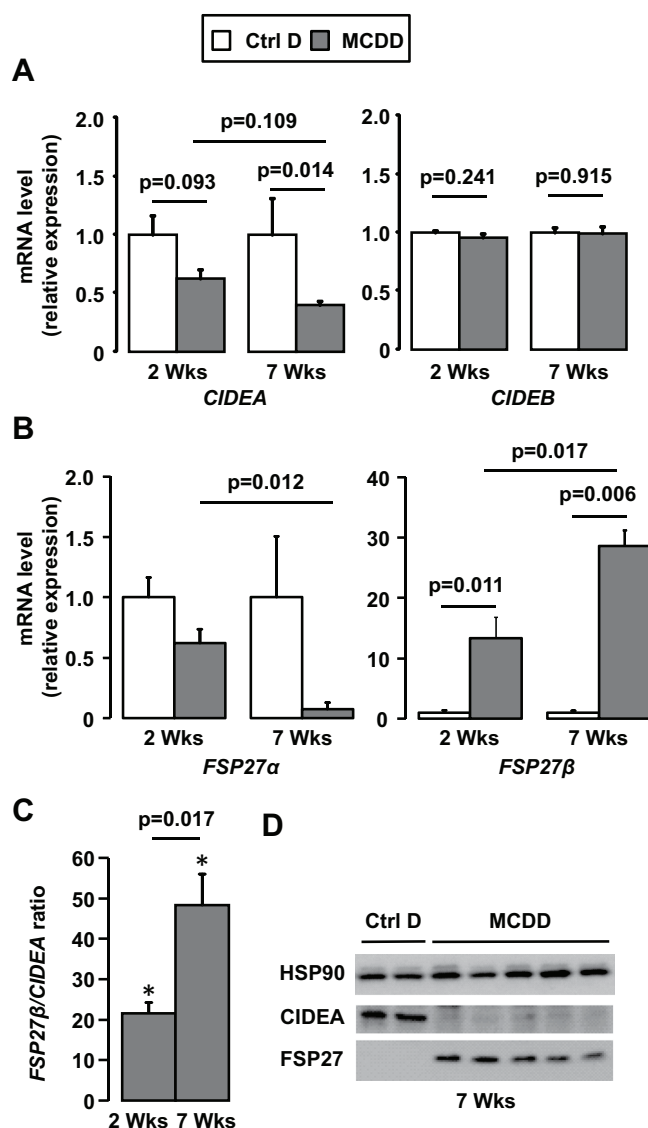


Figure 3. Hepatic expression of FSP27 β strongly increased with the severity of NAFLD whereas CIDEA expression decreased. Wild-type mice fed a control diet (Ctrl D) (n = 4) or MCDD (n = 6) for 2 and 7 weeks. (A, B, C) Hepatic expression of CIDEA, CIDEB, FSP27 α and FSP27 β was evaluated in Wt, Ctrl D and MCDD mice at the mRNA level (4–6 mice/group). The gene expression was normalized to the mRNA levels of B2M or 36B4. Results are expressed relative to the expression level in controls (means \pm SEM) and statistically analyzed using the Mann–Whitney test. (D) Hepatic expression of CIDEA, FSP27 and HSP90 was evaluated in Wt, Ctrl D and MCDD mice at the protein level (2–5 mice/group). *, versus Ctrl D, $p < 0.05$

correlated with hepatic inflammation (number of inflammatory foci in mouse studies, and NASH and NAS in patients) and liver injury (ALT activity in mouse and human studies).

As previously demonstrated, the hepatic expression of CIDEA is increased in a mouse model of diet-induced obesity and hepatic steatosis^{9,10}. This upregulation could be more closely associated with obesity than hepatic steatosis. Indeed, its hepatic expression tended to increase in obese patients without liver complications and metabolic syndrome, compared to lean patients. It has also been reported that the hepatic expression of CIDEA correlates with body mass index in obese patients³¹. CIDEA polymorphism has also been associated with obesity in human^{32,33}, although this could be more closely related to its role in adipose tissue. The role of CIDEA in hepatic triglyceride accumulation and lipid droplet formation has been clearly demonstrated and its targeting (overexpression and down regulation) regulates hepatic steatosis in obese mice¹⁰. In our cohort of obese patients and in a mouse model of steatohepatitis, the hepatic expression of CIDEA decreased with the severity of liver injury and steatohepatitis. However, it is important to emphasize that this is specific for CIDEA. Indeed, other important elements in the regulation of lipid droplet synthesis, such as PLIN5 and PNPLA2, are still upregulated in the fatty liver tissue of MCDD mice (after 7 weeks of MCDD: 2.3-fold increase for PLIN5, $p = 0.0142$; 3.13-fold increase for PNPLA2) and strongly correlate with hepatic steatosis in obese patients (PLIN5: $r_s = 0.698$, $p < 0.001$, $n = 30$; PNPLA2, $r_s = 0.767$, $p < 0.001$, $n = 30$). Since CIDEA expression is mainly dependent on SREBP1c^{9,10} and

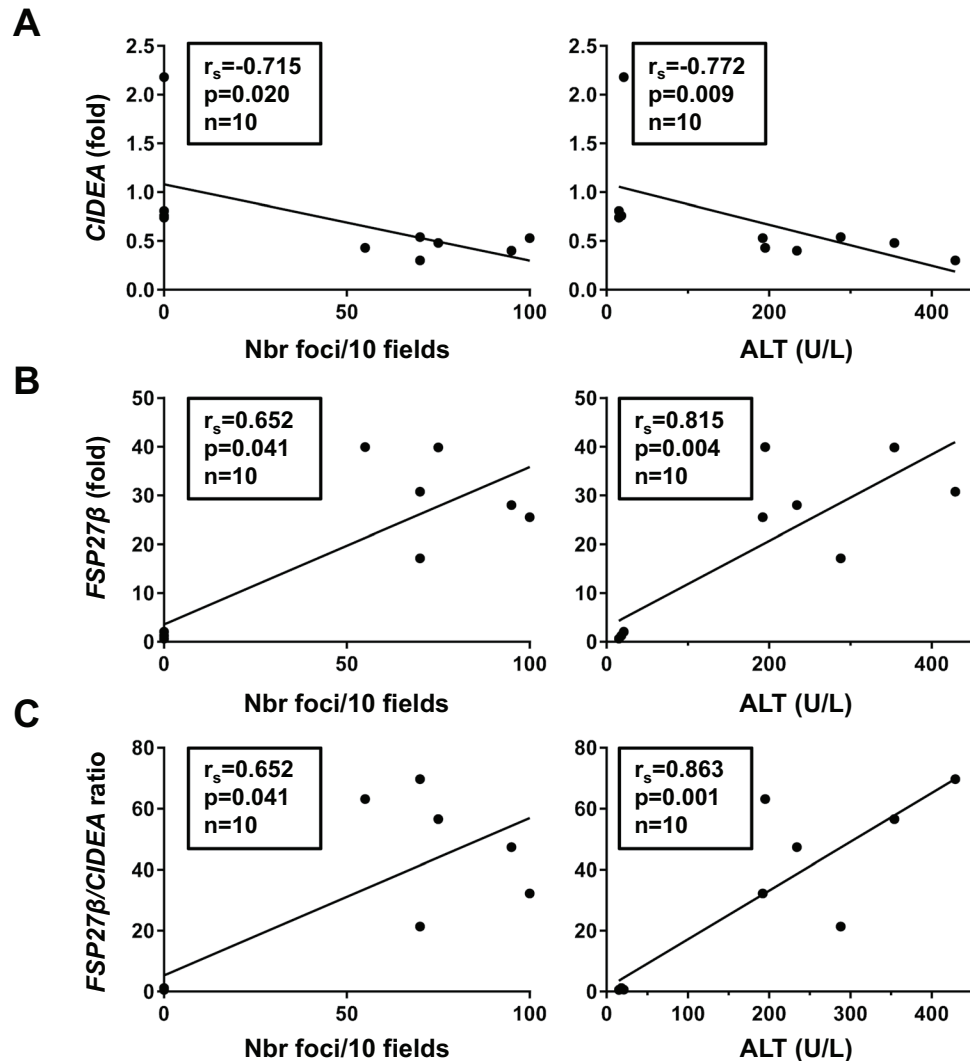


Figure 4. Hepatic CIDEA and FSP27 β negatively and positively correlated with steatohepatitis and liver injury in MCDD mice, respectively. Correlation between hepatic expression of CIDEA (A), FSP27 β (B) or FSP27 β /CIDEA ratio (C) (fold) with hepatic steatosis (%) and ALT activity (U/L) in Wt, Ctrl D and MCDD mice (4–6 mice/group, 7-week challenge) were analyzed using the Pearson's correlation test.

the down-regulation of SREBP-1c has been associated with the development of burned-out NASH³⁴, the decrease in CIDEA could reflect the severity of NAFLD (NASH with fibrosis).

Similarly, the progressive upregulation of FSP27 β /CIDEA2 with the progression of NAFLD could be a marker but also an important player. This gradual increase is more closely associated with FSP27 β /CIDEA2 than FSP27 α /CIDEA1 in mouse and human studies. Xu *et al.*, who first described the β isoform of FSP27 in fatty liver, also reported its upregulation in mouse models of diet-induced obesity and steatohepatitis and in human studies¹⁸. The “mild” upregulation of FSP27 β could be related to hepatic steatosis as we and other groups have previously reported (Fig. 1 and^{13–17}). Furthermore, we have observed that its down-regulation in hepatic cells promoted the fractionation of lipid droplets in response to oleic acid. In accordance with this, it has been reported that the down-regulation of FSP27 β in steatotic liver tissue resulted in reduced accumulation of hepatic triglycerides and lipid droplets¹⁷.

The strong upregulation of FSP27 β /CIDEA2 could be more closely related to steatohepatitis and liver injury. Hepatic expression of FSP27 β /CIDEA2 shows a strong correlation with liver injury as evaluated by ALT activity (in mouse and human studies) and a serum marker of hepatocyte apoptosis (in humans). With the increasing severity of the steatohepatitis, hepatic expression of FSP27 β rises to a 28-fold (± 2) increase in 7 weeks MCDD mice, versus a 13-fold (± 3) increase in 2 weeks MCDD and HFD mice. We also observed that overexpression of FSP27 β sensitized hepatocytes to cell death mediated by cytokine (TNF α) and saturated fatty acid (palmitic acid). Several groups have reported that FSP27 is a potent apoptotic inducer via the activation of the pro-apoptotic caspases, which trigger both the release of cytochrome c from mitochondria and DNA fragmentation^{20–23}. This apoptotic role for FSP27 was found to require the CIDE-C domain. In line with this, overexpression of CIDE-C domain containing FSP27 α also sensitized hepatocytes to cell death mediated by cytokine (TNF α)

	without NAFLD	with steatosis	with NASH	p
n	5	14	9	
Age (years)	39.4 ± 5.9	37.4 ± 2.4	45.8 ± 3.6	0.186
Sex (F/M)	4/1	14/0	4/5	0.005
BMI (kg/m ²)	43.4 ± 0.7	44.1 ± 1.4	43.3 ± 1.8	0.851
ALT (IU/L)	18.20 ± 4.48	26.47 ± 2.95	81.44 ± 26.19 ^{*,#}	<0.001
Insulin level (mIU/L)	7.00 ± 1.10	15.46 ± 3.21	28.67 ± 4.56 ^{*,#}	0.003
Glucose level (mmol/L)	4.88 ± 0.14	5.44 ± 0.13 [*]	6.70 ± 0.72 [*]	0.014
HOMA-IR	1.52 ± 0.24	3.77 ± 0.80 [*]	8.51 ± 1.36 ^{*,#}	0.001
HbA1c (%)	5.34 ± 0.22	5.62 ± 0.12	6.40 ± 0.38 ^{*,#}	0.028
Triglycerides (mmol/L)	1.05 ± 0.15	1.41 ± 0.17	3.42 ± 1.07 ^{*,#}	0.007
HDL cholesterol (mmol/L)	1.53 ± 0.18	1.52 ± 0.10	1.07 ± 0.37 ^{*,#}	0.006
NAFLD Activity Score (n)	0(5)	1(4)/2(4)/3(6)	5(9)	
Grade of steatosis (n)	0(5)	1(4)/2(4)/3(6)	3(9)	
Lobular inflammation (n)	0(5)	0(14)	1(9)	
Hepatocellular ballooning (n)	0(5)	0(14)	1(9)	

Table 1. Characteristics of 28 morbidly obese patients. Without NAFLD: patients with normal liver histology; Steatosis: patients with steatosis; NASH: patients with severe steatosis and NASH. Data are expressed as mean ± SEM and compared using the non parametric Kruskal-Wallis test (column p) and Mann Whitney test (*, #) for quantitative values and or Khi-deux test for qualitative values. *p < 0.05 compared with “Without NAFLD”. #p < 0.05 compared with “Steatosis”.

(Supplementary Fig. 4), while FSP27 α expression tended to decrease with the severity of the steatohepatitis. Interestingly, the same domain of FSP27 also mediated its localization to lipid droplets and its interaction with CIDEA^{21,35}. The inverse patterns of regulation for the hepatic expression of CIDEA (down-regulated) and FSP27 β (up-regulated) is robustly amplified with the NAFLD progression (FSP27 β /CIDEA ratio ranges from 1.6 ± 0.6 in simple steatosis (HFD mice) to 21 ± 2 in steatohepatitis (2 weeks MCDD mice) and 48 ± 7 with advanced steatohepatitis (7 weeks MCDD mice)). This opposing regulatory pattern could also modify the role of the C domain of FSP27 β , which could be more involved in the alteration of lipid droplets or the initiation of the apoptotic program, rather than binding with CIDEA.

Interestingly, the role of FSP27/CIDEA has recently been investigated in alcoholic steatohepatitis. Xu *et al.* have reported that the elevation of FSP27 (both isoforms with FSP27 β 1000-fold higher than FSP27 α) was likely to induce steatosis and liver injury in mouse model of chronic plus binge ethanol feeding. In this mouse model, the expression of CIDEA and CIDEB was not modified, hepatic FSP27 was strongly upregulated and the down regulation of FSP27 in hepatocytes prevented liver injury combined with the mitochondrial production of ROS. The authors also reported that hepatic expression of CIDEA mRNA increased more than 40-fold in samples from patients with alcoholic hepatitis and correlated with severity of the disease¹⁹. The authors further reported that the sustained FSP27 elevation in hepatocytes likely causes chronic liver injury and inflammation, and may subsequently induce fibrosis in a mouse model that combines chronic and acute-on chronic liver injury¹⁹.

Finally, we also report that the hepatic expression of CIDEA (at the mRNA level) is independent of obesity, as previously reported^{31,36}, and also independent of hepatic steatosis and steatohepatitis in mouse and human studies. While the level of gene expression was stable, CIDEB was the most highly expressed among the 3 members of the CIDE family in hepatocytes (2000x more than CIDEA and 400x more than FSP27/CIDEA in mice and humans) and could be an important player in the development of hepatic steatosis since it regulates the formation of triacylglycerol-enriched VLDL particles³⁶.

In this current study, we demonstrated that the hepatic expressions of the members of the CIDE family are differentially regulated according to the development and the severity of NAFLD in mouse and human studies. The gradual elevation of FSP27 β /CIDEA2 expression with the development of hepatic steatosis and subsequent steatohepatitis reinforces our interest in this protein as a potential therapeutic target. It would need to be targeted only when robustly upregulated, and in a hepatocyte-specific manner in order to maintain its beneficial role in the storage of lipids in adipocytes³⁷.

Material and Methods

Human samples. In this study, human samples (blood, liver biopsy) were from twenty-eight morbidly obese patients and five lean subjects. All information relative to the patients are described in Supplementary Methods, Table 1 and Ethics approval section.

Mice. Male mice were used in all experiments described in Supplementary Methods. All animal experiments were approved by the CIEPAL and Use committee.

Real-time quantitative PCR analysis has been performed as previously described^{38,39} and described in the Supplementary Methods.

Immunoblotting. Cells or frozen tissues were solubilized in lysis buffer (20 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 150 mM NaF, 2 mM sodium orthovanadate, 10 mM pyrophosphate, proteases inhibitors cocktail,

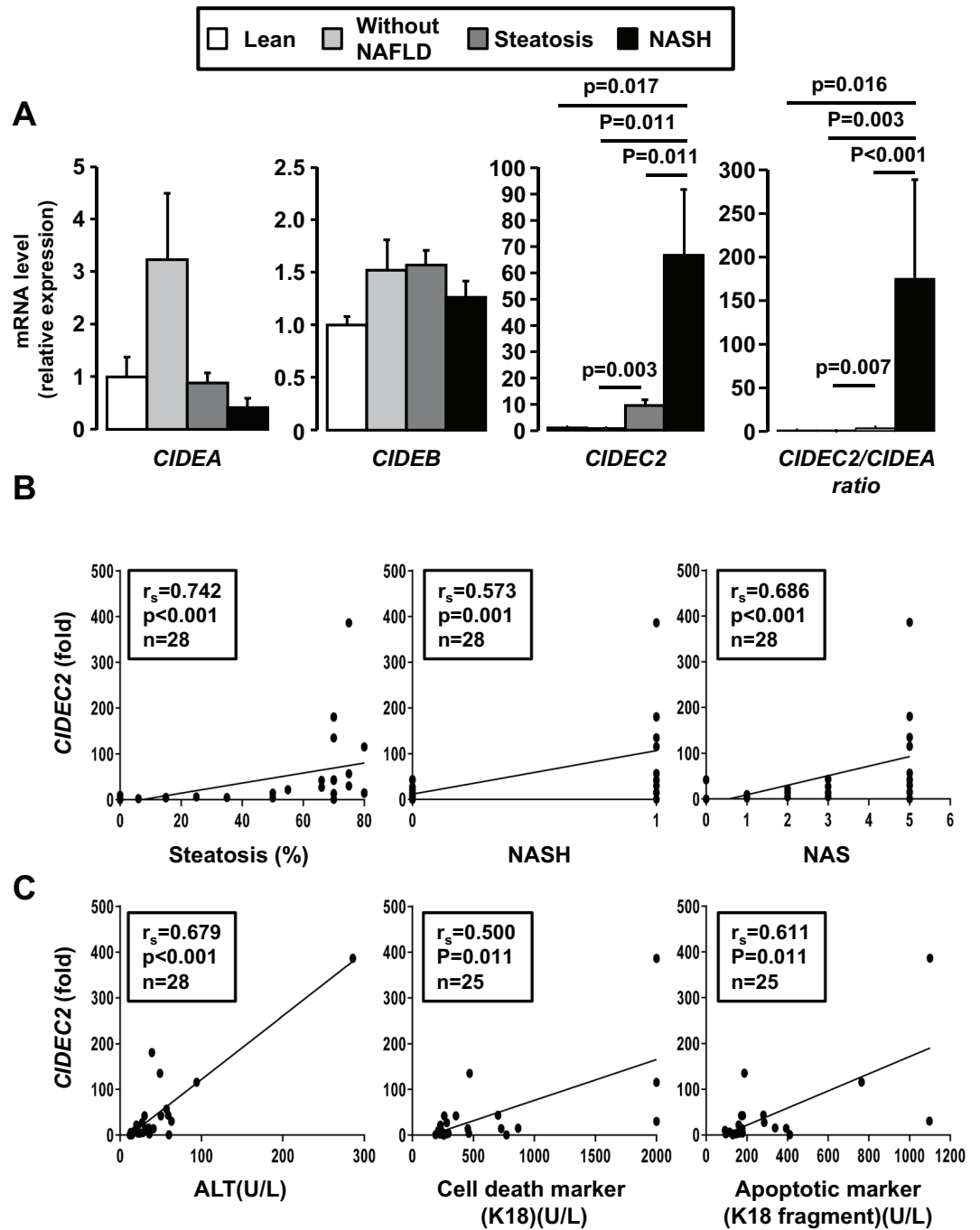


Figure 5. Hepatic CIDEA2 expression progressively increased with steatosis and NASH in obese patients. (A) Liver *CIDEA*, *CIDEB* and *CIDEA2* mRNA expression levels were analyzed by real-time quantitative PCR in lean patients (n = 5), in morbidly obese patients without NAFLD (n = 5), with hepatic steatosis (n = 14) and with NASH (n = 9). The gene expression values were normalized to RPLP0 mRNA levels. Results are expressed relative to the expression level in controls (means ± SEM) and statistically analyzed using the Mann–Whitney test. (B, C) Correlation between hepatic CIDEA2 expression (fold) with hepatic steatosis (%), ALT, NASH and NAFLD activity score (NAS), serum markers of hepatocyte apoptosis (caspases-generated keratin 18 fragment) and hepatocyte death (keratin 18) in 25–28 obese patients were analyzed using the Pearson’s correlation test.

and 1% Triton X-100) for 45 min at 4°C. Lysates were cleared (14 000 rpm, 15 min). Proteins were quantified (BCA Protein assay kit, 23225 Thermo Fisher Scientific Inc.), separated by SDS-PAGE and immunoblotted as previously described³⁸. The proteins were probed with anti-CIDEA (NBP1-76950, Novus Biologicals), anti-FSP27 (ab77115, ab198204 Abcam), and anti-HSP90 (#4877, Cell Signaling) antibodies at 1 µg/mL.

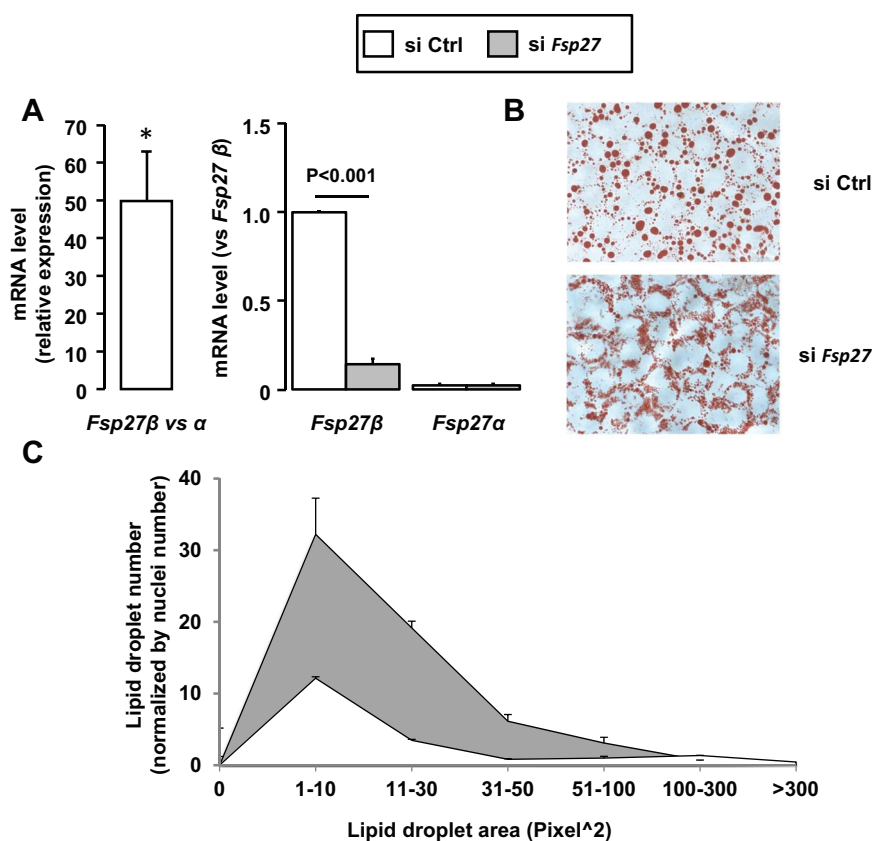


Figure 6. Down regulation of FSP27 β resulted in the fractionation of lipid droplets in AML12 hepatocytes. AML12 hepatocytes after control (siCtrl) or FSP27 silencing (si FSP27) were stimulated with oleic acid (0.5 mM) for 16 h (n = 3). (A) FSP27 α and FSP27 β mRNA expression levels were analyzed by real-time quantitative PCR. The gene expression was normalized to RPLP0 mRNA levels. (B,C) Lipid droplets were stained by Oil-Red O solution for 5 min. (B) Representative pictures are shown. (C) Lipid droplet areas were quantified (in pixels squared) and normalized according to the number of nuclei on the slides. Results are expressed relative to the control (siCtrl) as means \pm SEM. Data were statistically analyzed using the Student's t-test. *, versus siCtrl, $p < 0.05$.

Cellular models and treatments. Down regulation of FSP27. Down regulation of FSP27 was achieved using ON-TARGET plus SMART pool technologies (L-040997, Mouse FSP27, NM_178373 or non-targeting siRNA as a control, Dharmacon, CO) and Lipofectamine RNAiMAX technologies (MSS236551, Mouse FSP27 Life Technologies) in AML-12 hepatocytes (ATCC, CRL-2254). Following a 24-hour transfection, oleic acid (0.5 mM) was applied to cells for 16 hours. Cells were then rinsed twice with PBS and fixed with 4% formaldehyde solution. Lipid droplets were stained by Oil-Red O solution for 5 min. Microscope slides were prepared (x60 magnification) for lipid droplet quantification. The area of the lipid droplets was quantified (in pixels squared) and normalized by the number of nuclei on the slides.

Overexpression of FSP27 β . HEPG2 cells (ATCC HB-8065) were transfected with pCMV-HA FSP27 β or the empty plasmid (provided by Drs Xu Xu and Ann-Hwee Lee¹⁸) using a Jet PEI-hepatocyte mix assay (102-05NOzyme). After 48 h, cells were treated with TNF α (20 ng/ml), actinomycin D (0.1 μ g/ml) with TNF α (20 ng/ml) or palmitic acid (1 mM) for 16 h. Gene expression, cell viability and cell death were then evaluated as indicated.

MTT assay. The assay is dependent on the ability of viable cells to metabolize a water-soluble tetrazolium salt into a water-insoluble formazan product. Following the indicated treatments, cells were incubated for 2 h with 0.5 mg/mL MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) in serum-free medium (DMEM). After removing the supernatant, DMSO was added to completely dissolve the formazan product. Aliquots of the resulting solutions were transferred to 96-well plates and the absorbance was recorded at 550 nm using the microplate spectrophotometer system (ELX800, Bio-TEK instruments). Results are presented as a percentage of the control values.

Cell death. Flow cytometry was used to evaluate cell death following double staining with annexin-V-PE and 7-AAD according to the manufacturer's instructions (Annexin V-PE apoptosis detection kit I, BD Biosciences, Pont de claux, France).

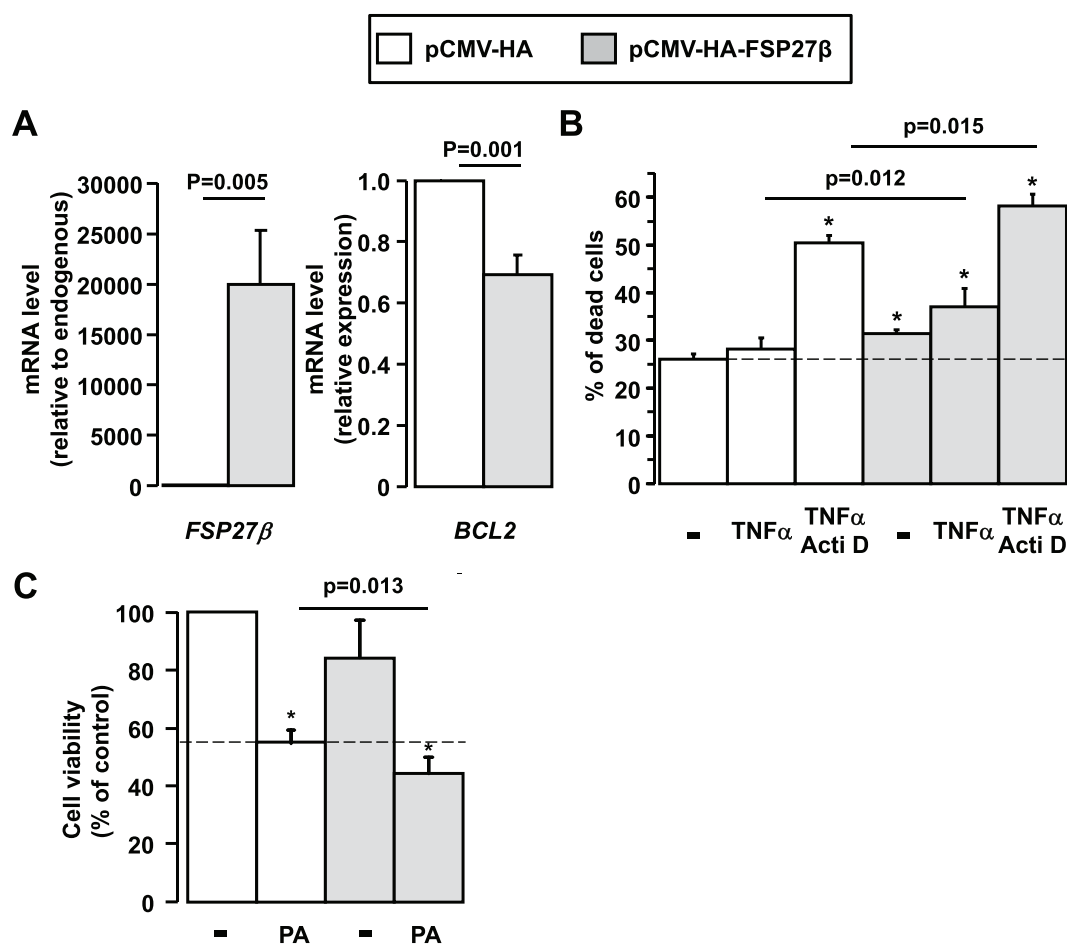


Figure 7. Overexpression of FSP27 β enhanced cell death in response to TNF α and palmitic acid in HEPG2 hepatocytes. (A) HEPG2 cells were transfected with pCMV-HA and pCMV-HA-FSP27 β as indicated. After 48 h, the human *BCL2*, mouse *FSP27* and human *CIDEA* mRNA expression levels were analyzed by real-time quantitative PCR. The gene expression values were normalized to RPLP0 mRNA levels ($n = 4$). (B,C) After overexpression of FSP27 β with pCMV-HA-FSP27 β transfection in HEPG2 cells, (B) cell death (flow cytometry) ($n = 4$) were evaluated in the basal state and in response to TNF α (20 ng/ml) and actinomycin D (0.1 μ g/ml) with TNF α (20 ng/ml) for 16 h and (C) cell viability (MTT assay) ($n = 3$), in response to palmitic acid (1 mM) for 16 h. Results relative to the control (pCMV-HA) are expressed as means \pm SEM. Data were statistically analyzed using the Student's t-test. *, versus pCMV-HA $p < 0.05$.

Statistical analysis. Statistical significance between two human or mouse study groups was determined using the nonparametric Mann–Whitney test. Data from cell lines were statistically analyzed using the Student t-test. Pearson's correlation test has been used for the correlative analysis. Significance has been considered for $P < 0.05$.

Ethics approval. All subjects gave their informed written consent to participate in this study in accordance with French legislation regarding Ethics and Human Research (Huriet-Serusclet law). The "Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biom dicale de Nice" approved the study (07/04:2003, N  03.017). The guidelines of laboratory animal care were followed. The local CIEPAL committee (Comité Institutionnel d'Ethique Pour l'Animal de Laboratoire, national agreement n  28) has approved the animal experiments (NCE/2013-108, APAFIS#51 00-20 15121 1 10477413 v6). (Authorization of the C3M animal facility: B06-088-20).

References

1. Younossi, Z. M. *et al.* Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* **64**, 73–84, <https://doi.org/10.1002/hep.28431> (2016).
2. Samuel, V. T. & Shulman, G. I. Nonalcoholic Fatty Liver Disease as a Nexus of Metabolic and Hepatic Diseases. *Cell Metab* **27**, 22–41, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.08.002> (2018).
3. Raff, E. J. *et al.* Diabetes Mellitus Predicts Occurrence of Cirrhosis and Hepatocellular Cancer in Alcoholic Liver and Non-alcoholic Fatty Liver Diseases. *J Clin Transl Hepatol* **3**, 9–16, <https://doi.org/10.14218/JCTH.2015.00001> (2015).
4. Lallukka, S. & Yki-Jarvinen, H. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of type 2 diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **30**, 385–395, <https://doi.org/10.1016/j.beem.2016.06.006> (2016).

5. Targher, G., Day, C. P. & Bonora, E. Risk of cardiovascular disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* **363**, 1341–1350, <https://doi.org/10.1056/NEJMra0912063> (2010).
6. Listenberger, L. L. *et al.* Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 3077–3082, <https://doi.org/10.1073/pnas.0630588100> (2003).
7. Yamaguchi, K. *et al.* Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **45**, 1366–1374, <https://doi.org/10.1002/hep.21655> (2007).
8. Minehira, K. & Gual, P. Role of Lipid Droplet Proteins in the Development of NAFLD and Hepatic Insulin Resistance. In: Valenzuela Baez R (eds) *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease* IntechOpen, 55–77, <https://doi.org/10.5772/intechopen.71572> (2018).
9. Wang, R. *et al.* Sterol-regulatory-element-binding protein 1c mediates the effect of insulin on the expression of Cidea in mouse hepatocytes. *Biochem J* **430**, 245–254, <https://doi.org/10.1042/BJ20100701> (2010).
10. Zhou, L. *et al.* Cidea promotes hepatic steatosis by sensing dietary fatty acids. *Hepatology* **56**, 95–107, <https://doi.org/10.1002/hep.25611> (2012).
11. Li, J. Z. *et al.* Cideb regulates diet-induced obesity, liver steatosis, and insulin sensitivity by controlling lipogenesis and fatty acid oxidation. *Diabetes* **56**, 2523–2532, <https://doi.org/10.2337/db07-0040> (2007).
12. Li, X. *et al.* Opposing roles of cell death-inducing DFF45-like effector B and perilipin 2 in controlling hepatic VLDL lipidation. *J Lipid Res* **53**, 1877–1889, <https://doi.org/10.1194/jlr.M026591> (2012).
13. Aibara, D. *et al.* Expression of hepatic fat-specific protein 27 depends on the specific etiology of fatty liver. *Biol Pharm Bull* **36**, 1766–1772, <https://doi.org/10.1248/bpb.b13-00351> (2013).
14. Uno, K. *et al.* Hepatic peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-fat-specific protein 27 pathway contributes to obesity-related hypertension via afferent vagal signals. *Eur Heart J* **33**, 1279–1289, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr265> (2012).
15. Flach, R. J., Qin, H., Zhang, L. & Bennett, A. M. Loss of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 protects from hepatic steatosis by repression of cell death-inducing DNA fragmentation factor A (DFFA)-like effector C (CIDEA)/fat-specific protein 27. *J Biol Chem* **286**, 22195–22202, <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.210237> (2011).
16. Yu, S. *et al.* Adipocyte-specific gene expression and adipogenic steatosis in the mouse liver due to peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 (PPARgamma1) overexpression. *J Biol Chem* **278**, 498–505, <https://doi.org/10.1074/jbc.M210062200> (2003).
17. Matsusue, K. *et al.* Hepatic steatosis in leptin-deficient mice is promoted by the PPARgamma target gene Fsp27. *Cell Metab* **7**, 302–311, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.03.003> (2008).
18. Xu, X., Park, J. G., So, J. S. & Lee, A. H. Transcriptional activation of Fsp27 by the liver-enriched transcription factor CREBH promotes lipid droplet growth and hepatic steatosis. *Hepatology* **61**, 857–869, <https://doi.org/10.1002/hep.27371> (2015).
19. Xu, M. J. *et al.* Fat-Specific Protein 27/CIDEA Promotes Development of Alcoholic Steatohepatitis in Mice and Humans. *Gastroenterology* **149**, 1030–1041 e1036, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.06.009> (2015).
20. Inohara, N., Koseki, T., Chen, S., Wu, X. & Nunez, G. CIDEA, a novel family of cell death activators with homology to the 45 kDa subunit of the DNA fragmentation factor. *EMBO J* **17**, 2526–2533, <https://doi.org/10.1093/emboj/17.9.2526> (1998).
21. Liu, K. *et al.* Functional analysis of FSP27 protein regions for lipid droplet localization, caspase-dependent apoptosis, and dimerization with CIDEA. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **297**, E1395–1413, <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00188.2009> (2009).
22. Tang, X., Xing, Z., Tang, H., Liang, L. & Zhao, M. Human cell-death-inducing DFF45-like effector C induces apoptosis via caspase-8. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **43**, 779–786, <https://doi.org/10.1093/abbs/gmr073> (2011).
23. Yonezawa, T., Kurata, R., Kimura, M. & Inoko, H. Which CIDE are you on? Apoptosis and energy metabolism. *Mol Biosyst* **7**, 91–100, <https://doi.org/10.1039/c0mb00099j> (2011).
24. Anty, R. *et al.* A new composite model including metabolic syndrome, alanine aminotransferase and cytokeratin-18 for the diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Aliment Pharmacol Ther* **32**, 1315–1322, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2010.04480.x> (2010).
25. Lavallard, V. J. *et al.* Serum markers of hepatocyte death and apoptosis are non invasive biomarkers of severe fibrosis in patients with alcoholic liver disease. *PLoS One* **6**, e17599, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017599> (2011).
26. Kim, J. Y. *et al.* Assessment of fat-specific protein 27 in the adipocyte lineage suggests a dual role for FSP27 in adipocyte metabolism and cell death. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **294**, E654–667, <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00104.2007> (2008).
27. Crespo, J. *et al.* Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology* **34**, 1158–1163, <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.29628> (2001).
28. Feldstein, A. E. & Gores, G. J. Apoptosis in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *Front Biosci* **10**, 3093–3099, <https://doi.org/10.2741/1765> (2005).
29. Ribeiro, P. S. *et al.* Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors, and activation of NF-kappaB in the liver of nonalcoholic and alcoholic steatohepatitis patients. *Am J Gastroenterol* **99**, 1708–1717, <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2004.40009.x> (2004).
30. Bertola, A. *et al.* Hepatic expression patterns of inflammatory and immune response genes associated with obesity and NASH in morbidly obese patients. *PLoS One* **5**, e13577, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013577> (2010).
31. Hall, A. M., Brunt, E. M., Klein, S. & Finck, B. N. Hepatic expression of cell death-inducing DFFA-like effector C in obese subjects is reduced by marked weight loss. *Obesity (Silver Spring)* **18**, 417–419, <https://doi.org/10.1038/oby.2009.236> (2010).
32. Dahlman, I. *et al.* The CIDEA gene V115F polymorphism is associated with obesity in Swedish subjects. *Diabetes* **54**, 3032–3034, <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.10.3032> (2005).
33. Zhang, L., Miyaki, K., Nakayama, T. & Muramatsu, M. Cell death-inducing DNA fragmentation factor alpha-like effector A (CIDEA) gene V115F (G > T) polymorphism is associated with phenotypes of metabolic syndrome in Japanese men. *Metabolism* **57**, 502–505, <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2007.11.011> (2008).
34. Nagaya, T. *et al.* Down-regulation of SREBP-1c is associated with the development of burned-out NASH. *J Hepatol* **53**, 724–731, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.04.033> (2010).
35. Jambunathan, S., Yin, J., Khan, W., Tamori, Y. & Puri, V. FSP27 promotes lipid droplet clustering and then fusion to regulate triglyceride accumulation. *PLoS One* **6**, e28614, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028614> (2011).
36. Ye, J. *et al.* Cideb, an ER- and lipid droplet-associated protein, mediates VLDL lipidation and maturation by interacting with apolipoprotein B. *Cell Metab* **9**, 177–190, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.12.013> (2009).
37. Rajamoorthi, A., Arias, N., Basta, J., Lee, R. G. & Baldan, A. Amelioration of diet-induced steatohepatitis in mice following combined therapy with ASO-Fsp27 and fenofibrate. *J Lipid Res* **58**, 2127–2138, <https://doi.org/10.1194/jlr.M077941> (2017).
38. Patouraux, S. *et al.* CD44 is a key player in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* **67**, 328–338, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.03.003> (2017).
39. Patouraux, S. *et al.* Osteopontin deficiency aggravates hepatic injury induced by ischemia-reperfusion in mice. *Cell Death Dis* **5**, e1208, <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.174> (2014).

Acknowledgements

Our thanks to (i) the INSERM U1065 animal facility staff and Dr V. Corcelle and (ii) Abby Cuttriss from the Office of International Scientific Visibility for comments on the English version of the manuscript. This work was supported by grants from INSERM (France), the University of Nice, the PHRC (Centre Hospitalier Universitaire of Nice), and charities (Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF)/LFB to PG, AFEF/Aptalis to BBM, Société Francophone du Diabète (SFD) to PG, SFD/Roche Pharma to PG, SFD/MSD to BBM). This work was

also funded by the French Government (National Research Agency, ANR): #ANR-15-CE14-0016-01, #ANR-18-CE14-0019-02 and through the “Investments for the Future” LABEX SIGNALIFE (#ANR-11-LABX-0028-01) and the UCAJEDI Investments in the Future project (#ANR-15-IDEX-01).

Author Contributions

P.G., A.S. and A.I. designed the research and wrote the paper. A.S., S.P., D.R., S.B., K.M. and P.L. performed the experiments. C.M.C., R.A., A.I. and J.T.V.N. contributed to human sample and data collection. X.X. and A.N.L. provided the fsp27 tools. B.B.M., A.T. and all the other authors edited and approved the final submitted draft.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43928-7>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher’s note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article’s Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

The mid-infrared spectroscopy: A novel non-invasive diagnostic tool for NASH diagnosis in severe obesity

Rodolphe Anty,^{1,†,*} Marie Morvan,^{2,†} Maëna Le Corvec,³ Clémence M Canivet,¹ Stéphanie Patouraux,¹ Jean Gugenheim,¹ Stéphanie Bonnafous,¹ Béatrice Bailly-Maitre,⁴ Olivier Sire,⁵ Hugues Tariel,³ Jérôme Bernard,³ Thierry Piche,¹ Olivier Loréal,⁶ Judith Aron-Wisniewsky,⁷ Karine Clément,⁷ Albert Tran,¹ Antonio Iannelli,¹ Philippe Gual¹

¹Université Côte d'Azur, CHU, INSERM, U1065, C3M, France; ²University of Rennes, CNRS, IRMAR - UMR, 6625, Rennes, France; ³DIAFIR, Avenue Chardonnet, Parc Lorans 26 J, Rennes; ⁴Université Côte d'Azur, INSERM, U1065, C3M, France; ⁵IRDL UMR CNRS 6027, Vannes; ⁶INSERM, Univ Rennes, INRA, Nutrition Metabolisms and Cancer (NuMeCan), UMR-1241, Rennes, France; ⁷Sorbonne Université/Inserm Unité UMRS NutriOmics, Assistance publique hôpitaux de Paris, service de Nutrition, Paris, France

JHEP Reports 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2019.09.005>

Background & Aims: There is an urgent medical need to develop non-invasive tests for non-alcoholic steatohepatitis (NASH). This study evaluates the diagnostic performance of an innovative model based on mid-infrared (MIR) spectroscopy for the diagnosis of NASH.

Methods: Severely obese patients who underwent a bariatric procedure at the University Hospital of Nice, France (n = 395) were prospectively recruited. The clinico-biological characteristics were measured prior to surgery. Liver biopsies were collected during the surgical procedure and assessed by a pathologist. A training group (316 patients, NASH: 16.8%) and a validation group (79 patients, NASH: 16.5%) were randomly defined. MIR spectra were acquired by fiber evanescent wave spectroscopy, using chalcogenide glass fiber optic sensors and a spectrometer. This absorption spectroscopic technique delivers a spectrum that identifies the molecular composition of a sample, defining a patient's metabolic fingerprint.

Results: The areas under the receiver operating curve (AUROC) for the diagnosis of NASH were 0.82 and 0.77 in the training and validation groups, respectively. The best threshold was 0.15, which was associated with a sensitivity of 0.75 and 0.69, and a specificity of 0.72 and 0.76. Negative predictive values of 0.94 and 0.93 and positive predictive values of 0.35 and 0.36, as well as correctly classified patient rates of 72% and 75% were obtained in the training and validation groups, respectively. A composite model using aspartate aminotransferase level, triglyceride level and waist circumference alongside the MIR spectra led to an increase in AUROC (0.88 and 0.84 for the training and validations groups, respectively).

Conclusions: MIR spectroscopy provides good sensitivity and negative predictive values for NASH screening in patients with severe obesity.

© 2019 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

The global epidemic of obesity is responsible for numerous chronic complications including non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD).¹ Whereas NAFLD affects up to 25% of the world population, non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is present in 1.5–6.45% of the world population.² In severely obese individuals, the prevalence of NAFLD can reach 80–92%, with NASH occurring in 15–30% of patients.^{3,4} With such a high number of patients, the development of non-invasive markers is needed to effectively screen for liver injury.

Although several non-invasive blood or physical tests (such as measurement of liver stiffness by elastography) have been developed for liver fibrosis over the past 15 years, the non-invasive

diagnosis of NASH remains a challenge, especially in routine practice.⁵ Currently, no non-invasive test for the screening or the diagnosis of NASH has emerged that has good diagnostic performance.⁶ Fibrosis has indeed been shown to be the main predictor of liver-related and global mortality and NASH is well recognized as the main driver of liver fibrosis.^{7,8} The presence of NASH is associated with the occurrence of type 2 diabetes (T2D) and cardiovascular complications, which are the main causes of mortality in patients with NAFLD without cirrhosis.^{9,10} Thus, there is an urgent medical need to develop non-invasive tests.⁶ Indeed, screening for the presence of NASH is of interest even in patients with NAFLD and a low stage of fibrosis. To date, drug development mainly targets patients with overt NASH and significant fibrotic or cirrhotic NASH.⁷ However, one can hypothesize that early screening of NASH among patients with NAFLD could lead to early lifestyle modification proposals and help in patient compliance. Indeed, 10% weight loss is well known to improve patient liver condition and decrease cardiometabolic risks.^{9,11}

Furthermore, screening for NASH among severely obese patients could provide an indication for bariatric surgery (BS), since BS has been demonstrated to be beneficial for the liver.^{12–14} However, liver biopsy, the sole tool to confirm the diagnosis of NASH, cannot be proposed to all at-risk patients. In the field of

Keywords: Fiber evanescent wave spectroscopy; mid-infrared (MIR) spectroscopy; chalcogenide glass; non-alcoholic steatohepatitis; NASH; severely obese patients; non-invasive test; metabolic fingerprint.

Received 8 May 2019; received in revised form 23 September 2019; accepted 28 September 2019

* Corresponding author. Address: Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Digestive Center, 151 route de Saint Antoine de Gineștière, 06202 Nice, France; Tel.: +33 (0) 4 92 03 59 43, fax: +33 (0) 4 92 03 92 39.

E-mail address: anty.r@chu-nice.fr (R. Anty).

[†]Both authors contributed equally to the manuscript.



non-invasive tests, the main options are blood-based tests and physical tests. An emerging technology with the potential to meet these requirements is based on fiber evanescent wave spectroscopy (FEWS) performed in the mid-infrared (MIR) spectral domain. Ideally, using such technology, screening for NASH should be easily performed by the clinician, easily accepted by the patient, reliable and cost-effective.

FEWS records a broad metabolic profile from a drop of serum that is placed on a chalcogenide glass fiber optic sensor on the basis of a MIR absorption spectrum.¹⁵ MIR spectroscopy is based on the ability of organic molecular chemical bonds to undergo vibrational transition in the MIR region and to generate absorption bands in specific and thus assignable frequency ranges. An evanescent wave is the part of the electromagnetic field that propagates at the surface of a fiber when the infrared (IR) beam is internally reflected at the fiber/air interface; this evanescent wave is absorbed by the chemical groups that are in close contact with the fiber. Thus, merely placing a biological sample in contact with the fiber allows one to resolve an absorption spectrum at the fiber output. The spectrum reflects the organic molecular composition of the whole sample, thus providing a metabolic fingerprint.¹⁶

Many bio-spectroscopic studies have demonstrated the potential of MIR spectroscopy for medical diagnosis, generally using tissue,¹⁷ yet more recently also using biofluids like serum,^{18,19} plasma,^{20,21} and tears.²² In hepatology, pilot studies have unveiled the relevance of MIR spectroscopy for the diagnosis of liver or bile duct cancer, or for the prognostic evaluation of decompensated cirrhosis.^{23–27}

The aim of this study was to identify the relevance of FEWS technology to identify obese patients with or without NASH using a comparison approach between this novel technique and liver biopsy-based NASH diagnosis.

Patients and methods

Patient inclusion

Three hundred and ninety-five consecutive severely and morbidly obese patients referred for bariatric surgery to the University Hospital of Nice, were included in the study between January 2006 and July 2012. These patients were indicated for bariatric surgery in agreement with French guidelines and the 1991 NIH Consensus Conference guidelines for gastrointestinal surgery for obesity.^{28,29} The study protocol was performed according to French legislation regarding Ethics and Human Research and was approved by the local Ethics Committee (Huriet-Serusclet law, DGS 2003/0395). Written informed consent was obtained from all patients. All patients were negative for hepatitis B and C viral markers, for auto-antibodies indicative of autoimmune hepatitis, and had negligible alcohol consumption (<20 g/day in women and <30 g/day in men). Alcohol abuse was also excluded by interviewing the patients' relatives. Patients with a history of inflammatory disease (including rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, and inflammatory bowel disease), current infection, a recent history of cancer (<5 years), and severe pulmonary or cardiac disease were not enrolled in the study. Surgical liver biopsy was obtained during the operation for all patients, as previously reported.³⁰

Preoperative assessment

The data included in this study are issued from a prospective cohort of morbidly obese patients undergoing bariatric surgery

at our tertiary bariatric referral center at a time when patients had no preoperative diet restriction, or other preoperative treatments (such as omega-3 fatty acids for example) that may have interfered with the evolution of NAFLD. Clinico-biological preoperative assessment was performed 2 to 3 weeks before surgery and included: a medical history and physical examination, blood pressure analysis, anthropometric measurements (weight, height, waist circumference), psychiatric and nutritional evaluation, blood samples obtained after overnight fasting for determination of plasma levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), gamma-glutamyltransferase (GGT), glucose, insulin, C-peptide, glycosylated hemoglobin, triglycerides, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, and low-density lipoprotein (LDL) cholesterol. ALT and AST levels were determined using the Roche assay with pyridoxal phosphate on a Hitachi Modular according to the International Federation of Clinical Chemistry and the Société Française de Biologie Clinique recommendations. In our center, the upper limit of normal ALT was 31 IU/L for women and 41 IU/L for men. Glycosylated hemoglobin was determined with the Biorad Dual kit A1c on a Variant 2 Biorad (Biorad, USA). All patients also had a chest X-ray, electrocardiogram, abdominal ultrasound and upper gastrointestinal endoscopy. Metabolic syndrome was defined as the presence of at least 3 of the following parameters: elevated waist circumference (≥ 94 cm in men or ≥ 80 cm in women), elevated blood pressure (systolic blood pressure ≥ 130 mmHg or diastolic blood pressure ≥ 85 mmHg or antihypertensive drug), elevated blood glucose (≥ 100 mg/dl or anti-diabetic drug), elevated triglycerides (≥ 150 mg/dl or lipid-lowering drug), and low HDL cholesterol (<40 mg/dl in men or <50 mg/dl in women or lipid-lowering drug).³¹ Notably, all obese patients who were candidates for bariatric surgery had a waist circumference above the defined threshold for metabolic syndrome. Type 2 diabetes was defined by 2 elevated measurements for fasting plasma glucose ≥ 7 mmol/L. Serum was collected from each patient and immediately stored at -80°C .

Liver assessment

Hepatic wedges were obtained during bariatric surgery by surgeons specialized in liver surgery and transplantation (AI and JG). Hepatic wedges were at least 10 mm long. Surgical liver biopsies were reviewed by 1 liver pathologist (SP), blinded regarding the clinical or biological characteristics of the patients. Routine haematoxylin-eosin-safran and Sirius red staining was performed on all biopsies. Biopsies were graded according to the NAFLD activity score (NAS)³³ and the steatosis, activity and fibrosis (SAF) score.³⁴ The diagnosis of NASH was retained in patients with steatosis grade ≥ 1 + lobular inflammation grade ≥ 1 + ballooning grade ≥ 1 (according to the SAF score). Liver fibrosis was assessed by Sirius red staining and was classified into 7 stages according to the NASH Clinical Research Network Scoring System Definition and Scores as follows: F0: no fibrosis, F1a: mild zone 3 sinusoidal fibrosis, F1b: moderated zone 3 sinusoidal fibrosis, F1c: peri-portal sinusoidal fibrosis, F2: zone 3 sinusoidal fibrosis and peri-portal sinusoidal fibrosis, F3: bridging fibrosis, F4: cirrhosis.^{32,34}

Follow-up cohort

Ten patients with NASH at baseline, as determined by liver biopsy, were contacted and had an additional liver biopsy to follow changes in the liver pathology after bariatric surgery. Clinico-biological data and serum were collected at the time of

the follow-up liver biopsy. Diagnostic performance of the MIR spectroscopy was also assessed.

Fiber evanescent wave spectroscopy

Acquisition of spectra

The MIR spectra were recorded using a DIAFIR SPID™ FT-IR spectrometer (Rennes - France). The FTIR absorption spectra were acquired in the 4,000–600 cm⁻¹ frequency range. The nominal spectral resolution was set to 4 cm⁻¹ and a zero-filling factor of 2 was employed, yielding a discrete spectral point spacing of 2 cm⁻¹. A Blackman Harris 3-term apodization function was used for Fourier transformation. For each spectrum, 64 scans were co-added.

For spectral acquisition, a disposable FEWS infrared sensor was placed in the spectrometer, the background signal was recorded in air, and 7 µl of serum was deposited on the sensor. The serum spectrum was acquired 8 min after deposition to obtain an accurate signal and remove excess water that can screen some infrared bands of interest.

All measures were made on thawed sera samples collected before surgery.

Pre-treatments

MIR spectra were pre-processed and analyzed in the 3,800–950 cm⁻¹ frequency domain, where most of the biomolecules are apparent. Several signal quality parameters (signal intensity, signal to noise ratio, water vapor) were measured and validated, and data homogeneity (outlier identification) was visually checked. A straight line was generated from 2,800 to 1,800 cm⁻¹ to eliminate the contribution of environmental CO₂. Second derivatives were calculated, smoothed using a 13-point Savitzky-Golay smoothing algorithm, and vector normalized over the whole spectral range.

Statistical analysis of spectra

The statistical analyses of spectra aimed to discriminate patients without NASH from those with NASH.

Spectral analysis required the number of spectral variables (*i.e.*, wavenumbers) to be reduced from a few hundred to approximately a dozen, to minimize the influence of noisy and/or redundant variables. The population was randomly separated into 2 groups: the training group (4/5 of the cohort, 316 patients) and the validation group (1/5 of the cohort, 79 patients) and the sets were compared to make sure that there were no significant differences in clinical and histological features (Table 1). Wave-number selection and optimization were performed with the sole training group to limit the overlearning risk. The spectro-metric curves (vector normalized second derivatives) were first projected on a Spline basis to reduce the dimension of the data and smooth the curves. Variable selection was then performed on the Spline coefficients, with a stability selection procedure based on repetition of random forest variable selection³⁵ with subsamples of the training set. For each run of the stability selection procedure a subsample containing 4/5 individuals from the training set was selected and a random forest regression performed. The most important variables, according to the decrease in the Gini index (a multivariate measure of variable importance of the random forest), were collected.³⁶ These steps were repeated 200 times, and the variables that were finally retained were those with the highest probability of selection. Once the optimized wavenumber set (20 variables) was defined, a mixture of a logistic regression model was built using this set with the

Table 1. Characteristics of the patients in the training and validation groups.

	Patients in the training group (n = 316)	Patients in the validation group (n = 79)	p value
Age (years)	40 (31–48)	41 (34–48)	0.4
Weight (kg)	117 (107–131)	113 (104–128)	0.2
BMI (kg/m ²)	44 (41–47)	43 (40–47)	0.3
AST (IU/L)	24 (20–30)	24 (21–35)	0.5
ALT (IU/L)	27 (19–41)	24 (19–36)	0.6
GGT (IU/L)	31 (20–50)	28 (19–49)	0.5
Blood glucose level (mmol/L)	5.2 (4.8–6.1)	5.3 (4.9–5.8)	0.7
Insulin (mmol/L)	19 (13–27)	18 (11–23)	0.08
HbA1c (%)	5.6 (5.4–6)	5.6 (5.3–6.1)	0.4
Total cholesterol (mmol/L)	5.3 (4.6–6.1)	5.4 (4.7–6)	0.9
HDL cholesterol (mmol/L)	1.3 (1.2–1.6)	1.4 (1.2–1.7)	0.4
LDL cholesterol (mmol/L)	3.2 (2.6–3.8)	3.2 (2.6–3.8)	0.8
Triglyceride (mmol/L)	1.5 (1.1–2.2)	1.3 (1–1.9)	0.1
Waist circumference (cm)	120 (120–128)	117 (116–125)	0.06
Type 2 diabetes presence (%)	20	23	0.7
Metabolic Syndrome presence (%)	50	42	0.2
Steatosis (%), S0-S1-S2-S3	6-40-26-28	8-37-29-26	0.9
Ballooning (%), B0-B1-B2	80.4-19.3-0.3	81-16.5-2.5	0.1
Inflammation (%), I0-I1-I2	83-16-1	82-18-0	0.8
No NASH/NASH (%)	83.2/16.8	83.5/16.5	1
Fibrosis (%), F0-F1-F2-F3	13.1-61.7-19.8-5.4	16.7-62.8-16.7-3.8	0.7

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; GGT, gamma-glutamyltransferase; HbA1c, glycated hemoglobin; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; NASH, non-alcoholic steatohepatitis. Quantitative values are displayed as median and interquartile range.

training population, and the performance was checked on the validation population.

The best threshold was that which provided the best association between sensitivity and specificity for the screening of NASH. All the statistical analyses were performed with the R statistical software. Algorithm performances of the MIR spectroscopy model were estimated according to the area under the ROC curve (AUROC), sensibility, specificity, negative predictive values and positive predictive values at the best threshold.

Elaboration of a model using clinico-biological and spectral data to diagnose NASH

Clinical and biological variables are given as the median and the standard deviation. All variables were tested for a normal distribution with the Shapiro-Wilk test. Comparisons were made using the Student's *t* test for normally distributed data or with the Mann-Whitney *U* test. Nominal data were tested using the Fisher's exact test. A logistic regression analysis based on variables significantly associated with NASH was conducted using a univariate analysis (*p* < 0.05). Patients with missing clinical parameter data were not included in the multivariate model. The clinico-biological data independently associated with NASH

were used to calculate a clinical model. Moreover, these clinico-biological data were used with the score obtained on the spectral analysis to construct a new model to diagnose NASH (composite model). Comparisons of the AUROCs were made using Delong's tests³⁷ and bootstrap sampling.

All the statistical analyses were performed with the R statistical software.

Results

Characteristics of the patients

Three hundred and ninety-five patients were included. Sixty-six of these patients had NASH (17%). The cohort was randomly split into 2 groups to obtain a training group (4/5 of the overall cohort, including 53 patients with NASH and 263 patients without NASH) and a validation group (1/5 of the overall cohort, including 13 patients with NASH and 66 patients without NASH). As mentioned in the patients and method section, the training and validation groups were similar for all clinico-biological variables (Table 1). The patient characteristics of the overall cohort are shown in Table 2.

As expected, AST, ALT, GGT, blood glucose, insulin, glycosylated hemoglobin, triglyceride level, waist circumference and the prevalence of metabolic syndrome were higher in patients with NASH compared to patients without NASH. HDL cholesterol levels were lower in patients with NASH compared to patients without NASH. The grade of steatosis and stage of fibrosis were higher in patients with NASH.

Table 2. Characteristics of the severely obese patients in the entire cohort.

	Patients with NASH (n = 66)	Patients without NASH (n = 329)	p value
Age (years)	43 (38–51)	39 (31–47)	4.10 ⁻³
Weight (kg)	123 (110–135)	114 (106–129)	0.02
BMI (kg/m ²)	44 (42–48)	43 (41–47)	0.15
AST (IU/L)	35 (26–44)	23 (19–29)	5.10 ⁻⁹
ALT (IU/L)	43 (28–64)	24 (18–36)	2.10 ⁻⁸
GGT (IU/L)	54 (30–81)	28 (19–45)	8.10 ⁻⁸
Blood glucose level (mmol/L)	5.7 (5–8)	5.2 (4.8–5.8)	3.10 ⁻⁴
Insulin (mmol/L)	23 (15–33)	18 (11–25)	6.10 ⁻⁴
HbA1c (%)	6 (5.5–7.2)	5.6 (5.3–5.9)	2.10 ⁻⁶
Total cholesterol (mmol/L)	5.2 (4.5–6.1)	5.4 (4.7–6)	0.8
HDL cholesterol (mmol/L)	1.2 (1.1–1.5)	1.4 (1.2–1.6)	5.10 ⁻³
LDL cholesterol (mmol/L)	2.9 (2.4–3.7)	3.2 (2.6–3.8)	0.04
Triglyceride (mmol/L)	1.7 (1.1–2.9)	1.4 (1.1–1.9)	9.10 ⁻⁴
Waist circumference (cm)	127 (126–134)	118 (117–125)	1.10 ⁻⁶
Type 2 diabetes presence (%)	38	17	3.10 ⁻⁴
Steatosis (%), S0-S1-S2-S3	72	46	4.10 ⁻⁴
Ballooning (%), B0-B1-B2	0-8-32-60	7-46-26-21	4.10 ⁻¹²
Inflammation (%), I0-I1-I2	0-95-5	97-3-0	10 ⁻¹⁶
Steatosis (%), S0-S1-S2-S3	0-97-3	99-1-0	10 ⁻¹⁶
Fibrosis (%), F0-F1-F2-F3	15.4-52.3-16.9-15.4	13.5-63.8-19.6-3.1	5.10 ⁻³

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; GGT, gamma-glutamyltransferase; HbA1c, glycated hemoglobin; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; NASH, non-alcoholic steatohepatitis. Quantitative values are displayed as median and interquartile range.

Diagnostic performance of MIR spectroscopy for the diagnosis of NASH in severely obese patients at the time of surgery

When comparing histological diagnosis of NASH to that obtained by MIR spectroscopy, the AUROC for the diagnosis of NASH were 0.82 and 0.77 for the training and validation groups, respectively (Fig. S1). The best threshold was 0.15, which was associated with a sensitivity of 0.75 and 0.69, and a specificity of 0.72 and 0.76, negative predictive values of 0.94 and 0.93, positive predictive values of 0.35 and 0.36. Finally, correctly classified patient rates of 72% and 75% were obtained for the training and validation groups, respectively (Table 3).

Association of the MIR spectroscopic score with the severity of liver pathology

We next analyzed, in each group, the relationship between the MIR technology-based score and individual histological lesions defining NASH – steatosis, inflammation, ballooning – as well as with the NAS and the fibrosis level (Fig. 1).

In the training group, despite large inter-individual variability, the MIR spectroscopic score was significantly higher in patients with steatosis S2 and S3 as compared to S0 and S1 (Fig. 1A). The MIR technology score was also significantly higher in patients with either grade 1 or grade 2 inflammation compared to grade 0 (Fig. 1B), as well as in patients with grade 1 ballooning compared to grade 0 (Fig. 1C). A significantly higher MIR technology score was also found in patients with NAS ≥5 compared to patients with 3 ≤ NAS <5, and with NAS <3; and in patients with 3 ≤ NAS <5 compared to patients with NAS <3 (Fig. 1D), as well as in patients with fibrosis grade 3 compared to grades 2, 1 and 0 (Fig. 1E).

In the validation group, similar observations were made except for fibrosis, probably because of the limit number of patients in each stage (Fig 1F-J).

Diagnostic performance of spectroscopy for NASH after surgery

The model was also applied to a group of 10 severely obese patients treated with laparoscopic Roux-en-Y gastric-by-pass who were followed for 5 (3–6.5) years after surgery. Clinico-biological data and liver pathology at baseline, and at the time of the liver biopsy, are shown in Table S1. Initially all patients had NASH. At the time of the additional biopsy, only 1 patient had persistent NASH. The AUROC of the model was 0.81. The only patient with NASH was correctly classified. Among the 9 patients without NASH, 5 were correctly classified (Table S2).

The individual variations of spectroscopy results in these 10 patients are presented in Fig. 2.

Table 3. Diagnostic performance of MIR spectroscopy for the diagnosis of NASH in severely obese patients at the time of the surgery.

	Patients in the training group (n = 316)	Patients in the validation group (n = 79)
AUROC	0.82	0.77
Sensitivity	0.75	0.69
Specificity	0.72	0.76
Negative predictive value	0.94	0.93
Positive predictive value	0.35	0.36
Correctly classified patients (%)	72	75

AUROC, area under the receiver operating curve; MIR, mid-infrared; NASH, non-alcoholic steatohepatitis. Pure spectral model, at the best threshold (0.15).

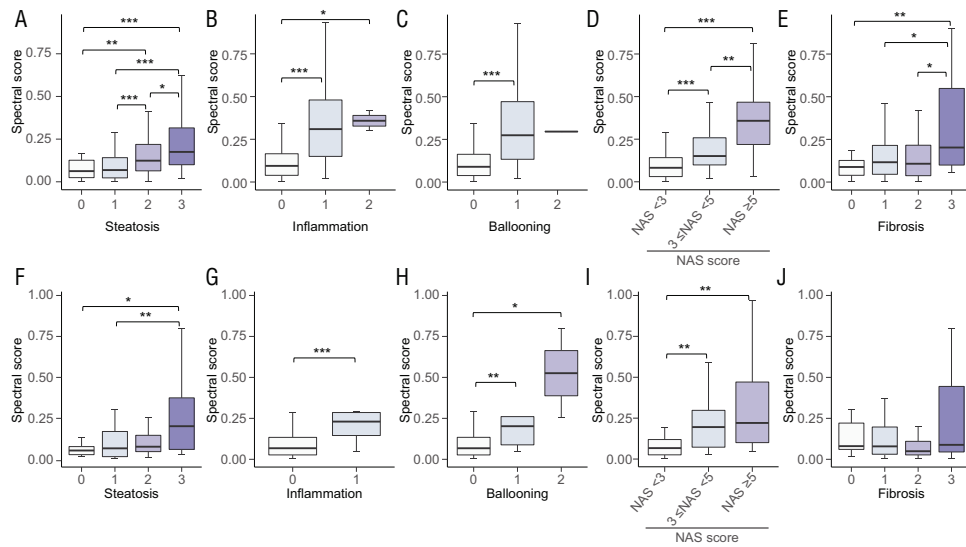


Fig. 1. Association of the MIR spectroscopic values with the severity of liver pathology, for the training and the validation groups. (A-E) Training group, various grades of (A) steatosis; (B) inflammation; (C) ballooning; (D) NAFLD activity score; and (E) fibrosis are represented. (F-J) Validation group, various grades of (F) steatosis; (G) inflammation; (H) ballooning; (I) NAFLD activity score; and (J) fibrosis are represented. To facilitate visualization, outliers are not represented; see method for details regarding the liver pathology analysis. MIR, mid-infrared; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease.

Diagnostic performance of a composite model including spectroscopic and clinico-biological data

To improve the diagnostic performance, a new composite model was computed that also took clinico-biological data into account. The multivariate analysis and the clinical variable selection for the diagnosis of NASH were performed on the calibration set (see Table S3 for details of the differences between patients with or without NASH for the calibration set). Using a logistic regression model, the AST, triglyceride level and waist circumference were included, as they were the only independent parameters that were significantly associated with NASH in the training group (Table S4). The diagnostic values of a clinico-biological model that only used these 3 parameters are presented in Table S5. A new composite model was therefore computed to diagnose NASH. The diagnostic performance is displayed in Table 4. The AUROC were 0.88 and 0.84 for the training and validation groups, respectively (Fig. S2). The best threshold was 0.13, which was associated with sensitivities of 0.80 and 0.67, specificities of 0.79 and 0.80, negative predictive values of 0.95 and 0.93, positive predictive values of 0.43 and 0.38, as well as correctly classified patient rates of 79% and 78% for the training and validation groups, respectively. Even if the AUROC were slightly higher in this composite model (0.88 and 0.84), compared to the sole spectral model (0.82 and 0.77), there was no statistical difference between them for the validation set ($p = 0.09$) due to the small sample size. However, we noted that there was a significant difference between the AUROC of these 2 models for the calibration set ($p = 0.02$). The bootstrap sampling confirmed these results (Table S6).

Discussion

This clinical study using a newly developed technology demonstrated that FEWS performed in the MIR spectral domain is an encouraging method for the non-invasive diagnose of NASH in obese patients. The diagnostic performance, with good sensitivity

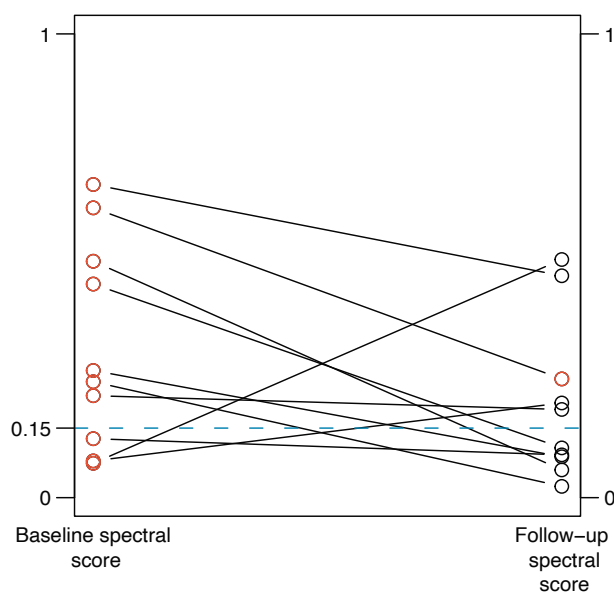


Fig. 2. Individual variations of spectroscopy results in the 10 severely obese patients from the follow-up cohort. Circle in red: patients with NASH; circle in black: patients without NASH; Blue dash line: threshold of the spectral model. NASH, non-alcoholic steatohepatitis.

Table 4. Diagnostic performance of a multivariate model for the diagnosis of NASH in severely obese patients at the time of surgery.

	Patients in the training group (n = 297)	Patients in the validation group (n = 77)
AUROC	0.88	0.84
Sensitivity	0.8	0.67
Specificity	0.79	0.8
Negative predictive value	0.95	0.93
Positive predictive value	0.43	0.38
Correctly classified patients (%)	79	78

Mixed model associating spectral data with clinico-biological data for the diagnosis of NASH at the best threshold (0.13). AUROC, area under the receiver operating curve; NASH, non-alcoholic steatohepatitis.

and a very good negative predictive value, suggests that MIR technology could be used in routine care as a screening test for NASH.

Development of non-invasive tests for patients with NAFLD/NASH remains a major challenge.^{6,38} Although numerous tests have been proposed for non-invasive assessment of fibrosis, no satisfactory test has yet been developed for the diagnosis and screening of NASH.^{6,38}

In this context, FEWS performed with MIR provides several benefits: it is minimally invasive, easy both to perform and to interpret for the clinician, and provides a quick answer, almost at the bedside. Easy and rapid screening for NASH with this sensitive test offers several advantages, in the new area of personalized medicine: i) it identifies patients at a low risk of NASH, thus enabling clinicians to reassure these patients and propose a lighter follow-up dedicated towards prevention and efforts to control cardiovascular risk factors, which will also avoid non-useful and potentially expensive complementary liver tests for these patients; ii) it will enable clinicians to focus on more aggressive care for patients diagnosed with NASH.

It might be anticipated that in the future, the MIR technology should be associated with other non-invasive tests dedicated to screening for the presence and/or severity of fibrosis in patients diagnosed with "NASH", since MIR technology displayed poor specificity and a low positive predictive value. For example, common liver fibrosis tests such as FIB-4 or the NAFLD fibrosis score, or the measurement of liver stiffness by elastography, could be performed to identify patients at a high risk of fibrotic NASH.³⁹ The precise potential contribution of the MIR spectroscopy model to the algorithm for the diagnosis of NASH and NASH with fibrosis will have to be determined in the future. The lack of a strong positive predictive value is a critical issue in non-invasive test development for fibrosis particularly for intermediate stages of fibrosis.³⁹ We combined clinico-biological variables to the spectral ones to improve the MIR spectroscopy model. Although we did not succeed in significantly improving the positive predictive value, we observed a significant difference between the AUROC of these 2 models, for the diagnosis of NASH, for the calibration set (0.88 vs. 0.82; $p = 0.02$). Moreover, the distribution of the AUROC values according to the bootstrap sampling showed that the performance of the composite model was higher and less variable.

The lack of positive predictive values probably originates from the low prevalence of patients with NASH in our cohort (17%), nevertheless concordant with other series studying severely obese patients referred for bariatric surgery.⁴⁰ This relatively low prevalence is particularly challenging for a diagnostic test.

This study is then the first to demonstrate the potential for FEWS to be performed with MIR for the diagnosis of NASH in severely obese patients. This is a monocentric study performed on a large number of well-characterized patients. All patients had a liver biopsy assessed by 1 pathologist (SP), which is the reference examination to classify the severity of NAFLD. A robust spectral method has been implemented to yield a model that allows patients with and without NASH to be detected using training and validation groups. Based on the current study, assessing the relationships between the different hepatic lesions and the MIR spectroscopic score, our data support the idea that serum metabolic alterations associated with inflammation and ballooning are critical in determining the score. This finding reinforces the potential interest of the test for the follow-up of patients and is in line with data that we obtained from the group of patients for whom the histological studies after post-bariatric surgery evolved in parallel to the decreasing score.

We nevertheless have a number of challenges to address. The relevance of this technology will have to be replicated and externally validated in several independent cohorts of severely obese patients. Accordingly, a European multicentric prospective study of severely obese patients is being developed to validate this technology and will start recruitment in the near future (NCT 03978247). Of course, validation in populations of patients with NAFLD outside bariatric surgery is required before transfer to clinical practice. So, the tests have to be extended for the diagnosis of NASH in overweight and moderately obese patients who

represent most of the patients seen by hepatologists. Its interest in the sequential or parallel association with other non-invasive tests for fibrosis or fibrotic NASH screening will have to be defined. Finally, its potential interest for patients in diabetic clinics and/or in the general population will have to be assessed. Interestingly in our cohort, T2D status did not improve nor change the accuracy of this new non-invasive tool, suggesting that it could adequately screen for NASH in patients T2D.

In conclusion, MIR-FEWS offers new opportunities to non-invasively assess the liver of severely obese patients, thereby providing a sensitive test to screen for NASH. Further multicentric studies are required to complete the clinical validation of this technology and to confirm its potential as a non-invasive test to detect NASH.

Abbreviations

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; AUROC, area under the receiver operating curve; BMI, body mass index; FEWS, fiber evanescent wave spectroscopy; FTIR, Fourier transform infrared; GGT, gamma-glutamyltransferase; HbA1c, glycated hemoglobin; HDL, high-density lipoprotein; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; IR, infrared, LDL, low-density lipoprotein; MIR, mid-infrared; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; NAS, NAFLD activity score; NASH, non-alcoholic steatohepatitis; SAF, steatosis, activity and fibrosis; T2D, type 2 diabetes.

Financial support

This work was supported by grants from INSERM (France), Université Nice Sophia-Antipolis, PHRC (Centre Hospitalier Universitaire de Nice), Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF)/LFB to PG, AFEF/Aptalis to BBM, Société Francophone du Diabète (SFD) to PG, SFD/Roche Pharma to PG, and SFD/MSD to BBM. This work was also funded by the French Government (National Research Agency, ANR): #ANR-15-CE14-0016-01, #ANR-18-CE14-0019-02, the Investments for the Future LABEX SIGNALIFE (#ANR-11-LABX-0028-01) and the UCA^{EDU} Investments in the Future project (#ANR-15-IDEX-01).

Conflict of interest

Rodolphe Anty, Clémence M Canivet, Stéphanie Patoureaux, Jean Gugenheim, Stéphanie Bonnafous, Béatrice Bailly-Maitre, Thierry Piche, Olivier Sire, Judith Aron-Wisniewsky, Karine Clément, Albert Tran, Antonio Iannelli, Philippe Gual have nothing to disclose; Marie Morvan is a service provider for DIAFIR; Maëna Le Corvec is a DIAFIR employee; Jérôme Bernard is the DIAFIR General Manager for Healthcare; Hugues Tariel is the DIAFIR Chief Executive Officer; Olivier Loréal is a DIAFIR co-founder.

Please refer to the accompanying ICMJE disclosure forms for further details.

Authors' contributions

OL, HT, OS developed the concept; MM, MLC, RA obtained data; RA, MM, MLC, JB, designed the study; RA, MM, MLC wrote the manuscript; MM performed the statistical analysis; RA, AI, JG, TP recruited patients; RA, CMC, SP, SB, BBM managed clinico-biological data and samples; PG, OL, AT, AI, JAW, KC provided critical reading of the manuscript and all other co-authors approved the paper.

Acknowledgments

Our thanks to Abby Cuttriss from the Office of International Scientific Visibility for comments on the English version of the manuscript.

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2019.09.005>.

References

- [1] Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2014;384:766-781.
- [2] Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 2016;64:73-84.
- [3] Anty R, Marjoux S, Iannelli A, Patoureaux S, Schneck AS, Bonnafous S, et al. Regular coffee but not espresso drinking is protective against fibrosis in a cohort mainly composed of morbidly obese European women with NAFLD undergoing bariatric surgery. *J Hepatol* 2012;57:1090-1096.
- [4] Bedossa P, Tordjman J, Aron-Wisniewsky J, Poitou C, Oppert J-M, Torcivia A, et al. Systematic review of bariatric surgery liver biopsies clarifies the natural history of liver disease in patients with severe obesity. *Gut* 2017;66:1688-1696.
- [5] Eddowes PJ, Sasso M, Allison M, Tsochatzis E, Anstee QM, Sheridan D, et al. Accuracy of FibroScan Controlled Attenuation Parameter and Liver Stiffness Measurement in Assessing Steatosis and Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 2019 May;156:1717-1730.
- [6] Castera L, Friedrich-Rust M, Loomba R. Non-Invasive Assessment of Liver Disease in Patients with NAFLD. *Gastroenterology* 2019 Apr;156:1264-1281.
- [7] Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, Sanyal AJ. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med* 2018;24:908-922.
- [8] Angulo P, Kleiner DE, Dam-Larsen S, Adams LA, Bjornsson ES, Charatcharoenwitthaya P, et al. Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 2015;149:389-397.
- [9] Francque SM, van der Graaff D, Kwanten WJ. Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk: Pathophysiological mechanisms and implications. *J Hepatol* 2016;65:425-443.
- [10] Vilar-Gomez E, Calzadilla-Bertot L, Wai-Sun Wong V, Castellanos M, Aller-de la Fuente R, Metwally M, et al. Fibrosis Severity as a Determinant of Cause-Specific Mortality in Patients With Advanced Nonalcoholic

- Fatty Liver Disease: A Multi-National Cohort Study. *Gastroenterology* 2018;155:443–457.
- [11] Romero-Gómez M, Zelber-Sagi S, Trenell M. Treatment of NAFLD with diet, physical activity and exercise. *J Hepatol* 2017;67:829–846.
- [12] Mathurin P, Gonzalez F, Kerdraon O, Leteurtre E, Arnalsteen L, Hollebecque A, et al. The evolution of severe steatosis after bariatric surgery is related to insulin resistance. *Gastroenterology* 2006;130:1617–1624.
- [13] Mathurin P, Hollebecque A, Arnalsteen L, Buob D, Leteurtre E, Caiazzo R, et al. Prospective study of the long-term effects of bariatric surgery on liver injury in patients without advanced disease. *Gastroenterology* 2009;137:532–540.
- [14] Lassailly G, Caiazzo R, Buob D, Pigeyre M, Verkindt H, Labreuche J, et al. Bariatric Surgery Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis in Morbidly Obese Patients. *Gastroenterology* 2015;149:379–388.
- [15] Keirsse J, Lahaye E, Bouter A, Dupont V, Boussard-Plédel C, Bureau B, et al. Mapping bacterial surface population physiology in real-time: infrared spectroscopy of *Proteus mirabilis* swarm colonies. *Appl Spectrosc* 2006;60:584–591.
- [16] Anne M-L, Le Lan C, Monbet V, Boussard-Plédel C, Ropert M, Sire O, et al. Fiber evanescent wave spectroscopy using the mid-infrared provides useful fingerprints for metabolic profiling in humans. *J Biomed Opt* 2009;14:054033.
- [17] Kallenbach-Thieltges A, Großerüschkamp F, Mosig A, Diem M, Tannapfel A, Gerwert K. Immunohistochemistry, histopathology and infrared spectral histopathology of colon cancer tissue sections. *J Biophotonics* 2013;6:88–100.
- [18] Ollesch J, Heinze M, Heise HM, Behrens T, Brüning T, Gerwert K. It's in your blood: spectral biomarker candidates for urinary bladder cancer from automated FTIR spectroscopy. *J Biophotonics* 2014;7:210–221.
- [19] Hands JR, Dorling KM, Abel P, Ashton KM, Brodbelt A, Davis C, et al. Attenuated total reflection fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectral discrimination of brain tumour severity from serum samples. *J Biophotonics* 2014;7:189–199.
- [20] Barlev E, Zelig U, Bar O, Segev C, Mordechai S, Kapelushnik J, et al. A novel method for screening colorectal cancer by infrared spectroscopy of peripheral blood mononuclear cells and plasma. *J Gastroenterol* 2016;51:214–221.
- [21] Peuchant E, Richard-Harston S, Bourdel-Marchasson I, Dartigues J-F, Letenneur L, Barberger-Gateau P, et al. Infrared spectroscopy: a reagent-free method to distinguish Alzheimer's disease patients from normal-aging subjects. *Transl Res* 2008;152:103–112.
- [22] Travo A, Paya C, Déléris G, Colin J, Mortemousque B, Forfar I. Potential of FTIR spectroscopy for analysis of tears for diagnosis purposes. *Anal Bioanal Chem* 2014;406:2367–2376.
- [23] Thumanu K, Sangrajrang S, Khuhaprema T, Kalalak A, Tanthanuch W, Pongpiachan S, et al. Diagnosis of liver cancer from blood sera using FTIR microspectroscopy: a preliminary study. *J Biophotonics* 2014;7:222–231.
- [24] Zhang X, Thiéfin G, Gobinet C, Untereiner V, Taleb I, Bernard-Chabert B, et al. Profiling serologic biomarkers in cirrhotic patients via high-throughput Fourier transform infrared spectroscopy: toward a new diagnostic tool of hepatocellular carcinoma. *Transl Res* 2013;162:279–286.
- [25] Untereiner V, Sockalingum GD, Garnotel R, Gobinet C, Ramaholimihaso F, Ehrhard F, et al. Bile analysis using high-throughput FTIR spectroscopy for the diagnosis of malignant biliary strictures: a pilot study in 57 patients. *J Biophotonics* 2014;7:241–253.
- [26] Baker MJ, Hussain SR, Lovergne L, Untereiner V, Hughes C, Lukaszewski RA, et al. Developing and understanding biofluid vibrational spectroscopy: a critical review. *Chem Soc Rev* 2016;45:1803–1818.
- [27] Le Corvec M, Jezequel C, Monbet V, Fatih N, Charpentier F, Tariel H, et al. Mid-infrared spectroscopy of serum, a promising non-invasive method to assess prognosis in patients with ascites and cirrhosis. *PLoS ONE* 2017 Oct 11;12:e0185997.
- [28] HAS. Prise en charge HAS de l'obésité : prise en charge chirurgicale. https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_765529/fr/obesite-prise-en-charge-chirurgicale-chez-l-adulte.
- [29] NIH conference. Gastrointestinal surgery for severe obesity. Consensus Development Conference Panel. *Ann Intern Med* 1991;115:956–961.
- [30] Anty R, Iannelli A, Patouraux S, Bonnafous S, Lavallard VJ, Senni-Buratti M, et al. A new composite model including metabolic syndrome, alanine aminotransferase and cytokeratin-18 for the diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2010;32:1315–1322.
- [31] Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. 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;120:1640–1645.
- [32] Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2467–2474.
- [33] Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;41:1313–1321.
- [34] Bedossa P, Poitou C, Veyrie N, Bouillot JL, Basdevant A, Paradis V, et al. Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology* 2012;56:1751–1759.
- [35] Menze BH, Petrich W, Hamprecht FA. Multivariate feature selection and hierarchical classification for infrared spectroscopy: serum-based detection of bovine spongiform encephalopathy. *Anal Bioanal Chem* 2007;387:1801–1807.
- [36] Breiman L, Friedman JH, Olshen RA, Stone CJ. *Classification and Regression Trees*. Belmont, California: Wadsworth, 1984.
- [37] DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a non-parametric approach. *Biometrics* 1988;44:837–845.
- [38] Machado MV, Cortez-Pinto H. Non-invasive diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease. A critical appraisal. *J Hepatol* 2013;58:1007–1019.
- [39] Boursier J, Vergniol J, Guillet A, Hiriart J-B, Lannes A, Le Bail B, et al. Diagnostic accuracy and prognostic significance of blood fibrosis tests and liver stiffness measurement by FibroScan in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2016;65:570–578.
- [40] Zimmermann E, Anty R, Tordjman J, Verrijken A, Gual P, Tran A, et al. C-reactive protein levels in relation to various features of non-alcoholic fatty liver disease among obese patients. *J Hepatol* 2011;55:660–665.