



**HAL**  
open science

**La stéatose hépatique non alcoolique en France,  
épidémiologie et pronostic : analyse des données de la  
cohorte Constances et du Système National des Données  
de Santé (SNDS)**

Oumarou Nabi

► **To cite this version:**

Oumarou Nabi. La stéatose hépatique non alcoolique en France, épidémiologie et pronostic : analyse des données de la cohorte Constances et du Système National des Données de Santé (SNDS). Santé publique et épidémiologie. Sorbonne Université, 2022. Français. NNT : 2022SORUS247 . tel-03827839

**HAL Id: tel-03827839**

**<https://theses.hal.science/tel-03827839>**

Submitted on 24 Oct 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.

**THÈSE DE DOCTORAT DE  
SORBONNE UNIVERSITÉ**

**"ÉCOLE DOCTORALE PIERRE LOUIS DE SANTÉ PUBLIQUE A PARIS : ÉPIDÉMIOLOGIE ET  
SCIENCES DE L'INFORMATION BIOMÉDICALE"**

Spécialité :  
**Santé Publique et Épidémiologie clinique**

Présentée par  
**M. Oumarou NABI**

Pour l'obtention du grade de :  
**DOCTEUR de SORBONNE UNIVERSITÉ**

Sujet de la thèse :

**La Stéatose Hépatique Non Alcoolique en France, Épidémiologie et  
Pronostic : Analyse des Données de la Cohorte Constances et du  
Système National des Données de Santé (SNDS)**

Soutenue le 26 septembre 2022

Devant le jury composé de :

M. Christophe MASSARD  
Mme. Karine LACOMBE  
M. Nathanaël LAPIDUS  
Mme. Patrizia CARRIERI  
M. Sébastien DHARANCY  
Mme. Valérie PARRADIS  
M. Lawrence SERFATY  
Mme. Marie ZINS

Président du jury  
Directeur de thèse  
Co-directeur de thèse  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examinatrice  
Examineur  
Examinatrice

Cette thèse a été réalisée au sein de l'équipe de recherche Épidémiologie clinique des maladies virales chroniques de l'Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique (IPLESP) et préparée dans le cadre de l'Ecole Doctorale ED393 de l'Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique animée par Sorbonne Université.

---

## Résumé

---

La stéatose métabolique (ou stéatopathie non alcoolique) est devenue la première cause de maladies chroniques du foie. Sa prévalence globale est estimée entre 25% et 45% avec de fortes disparités selon les régions du monde, superposables à l'épidémiologie de l'obésité et du diabète. Elle est en passe de devenir la première cause de transplantation hépatique. Cependant, les données épidémiologiques sur la stéatopathie non alcoolique (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease ou NAFLD) en population générale font défaut. En France, aucune donnée épidémiologique globale n'est disponible, en dehors d'études de modélisation. Seuls 21,5% des patients atteints de NAFLD sont diagnostiqués, limitant ainsi la compréhension de ses déterminants et son fardeau sur les indicateurs de santé. La première partie des travaux réalisés dans cette thèse sur un grand échantillon représentatif de la population française adulte, nous a permis de mettre en évidence la forte prévalence (18,2%) de la NAFLD dans la population générale en France sans infection par le virus de l'hépatite B et/ou C et sans consommation à risque d'alcool pour la santé, soit 8,491 millions de personnes dont plus de 2,6% (220 776 personnes) était à un stade avancé. Le sexe masculin, l'âge et les troubles métaboliques en particulier le diabète étaient les principaux facteurs de risque qui leur étaient associés.

À la suite de ce premier travail, nous avons mené plusieurs analyses dont le but était d'évaluer le fardeau de la stéatose métabolique sur la morbi-mortalité en population. Les deux premières études portaient sur l'ensemble de la population générale avec cependant deux schémas différents. Dans un premier temps, nous avons évalué l'association entre la stéatose métabolique et les antécédents de comorbidités extra-hépatiques tels que les accidents cardiovasculaires, les cancers extra-hépatiques et l'insuffisance rénale de grade III. Dans un second temps, nous avons analysé l'impact de la stéatose métabolique sur l'incidence des complications hépatiques (cirrhose, carcinome hépatocellulaire, greffe du foie) et extra-hépatiques ainsi que la mortalité toutes causes confondues, tout en la comparant aux autres causes historiques de maladies hépatiques (infection au virus de l'hépatite B ou C) et la consommation à risque d'alcool pour la santé. Dans les deux cas, la stéatose métabolique était associée à une très forte augmentation de la morbi-mortalité hépatique et extra-hépatique et ce, quel que soit le niveau de sévérité de l'atteinte hépatique, mais avec un effet de gradient

selon le degré de la fibrose hépatique. Ces résultats confirment en particulier le positionnement de la NAFLD comme, un problème majeur de santé publique par ailleurs en très forte progression.

Bien que représentant un véritable progrès pour une prise de conscience globale sur la problématique de la NAFLD, le manque de traitement pharmacologique efficace et l'absence de preuves d'un bénéfice du dépistage systématique constituent quelques limites potentielles. Cependant, les données de la littérature montrent qu'un diagnostic précoce et une prise en charge adaptée comme par exemple la perte de poids chez les personnes en situation d'obésité pourrait être bénéfiques sur la progression de la maladie. Se pose alors la question de l'identification des sous-populations pouvant bénéficier de stratégies proactives du fait du risque plus élevé de progression de la maladie. Ainsi notre troisième axe d'étude a voulu répondre à cette problématique en se focalisant sur les patients souffrant de diabète, en raison de la forte interaction entre les deux entités nosologiques. Cette analyse a permis de montrer une forte association entre coexistence du diabète et de la NAFLD sur la morbi-mortalité. Elle montre en particulier que l'interaction entre les facteurs de risque et protecteurs de la NAFLD et du diabète ainsi que leur impact sur la morbi-mortalité étaient médiés par leur ancienneté et leur sévérité respectives. Ceci suggère la nécessité d'un dépistage et une prise en charge précoce de ces maladies. De plus, il s'avère que certains médicaments anti-diabétiques améliorent la sensibilité à l'insuline et donc pourraient être bénéfiques également sur la progression de la NAFLD.

De futures études permettant d'évaluer précisément les bénéfices cliniques, médico-économiques et les critères de la mise en place d'un dépistage systématique et/ou ciblé de la stéatose métabolique, sont nécessaires en attendant des traitements efficaces.

Ces travaux montrent que la stéatose métabolique est devenue un problème majeur de santé, que seul un sursaut politique et des programmes diligents de santé publique permettraient de contenir.

---

## Abstract

---

Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) has become the leading cause of chronic liver disease. Its overall prevalence is estimated between 25% and 45% with strong disparities depending on the regions of the world, superimposable on the epidemiology of obesity and diabetes. It is fast becoming the leading cause of liver transplantation. However, epidemiological data on NAFLD in the general population are lacking. In France, no overall epidemiological data is available, apart from modeling studies. Only 21.5% of patients with NAFLD are diagnosed, thus limiting the understanding of its determinants and its burden on health indicators. The first part of the work carried out in this thesis on a large representative sample allowed us to highlight the high prevalence (18.2%) of NAFLD in France general population, i.e. 8.491 million France adult peoples with not infected with the hepatitis B and/or C virus and without hazardous alcohol consumption, of whom more than 2.6% (220,776 peoples) was at an advanced stage (advanced fibrosis). Male sex, age and metabolic disorders, in particular diabetes, were the main risk factors associated with them.

Following this initial work, we conducted several analyzes aimed at assessing the burden of NAFLD on morbidity and mortality in the general population. The first two studies focused on the entire general population with, however, two different patterns. First, we assessed the association between NAFLD and a history of extra-hepatic comorbidities such as cardiovascular events, extra-hepatic cancers and grade III renal failure. In a second set of analyses, we analyzed the impact of metabolic steatosis on the incidence of hepatic (cirrhosis, hepatocellular carcinoma, liver transplantation) and extra-hepatic complications as well as all-cause mortality while comparing it to other liver diseases (hepatitis B and/or C virus infection) and hazardous alcohol consumption. In both cases, NAFLD was associated with a very strong increase in hepatic and extra-hepatic morbidity and mortality, regardless of the level of severity of liver damage (fibrosis), but with a gradient effect depending on the degree of hepatic fibrosis. These results confirm in particular the positioning of NAFLD as one of the major public health problems, which is also experiencing very strong growth.

Although representing real progress for a global awareness of the problem of NAFLD, the lack of effective pharmacological treatment and the absence of evidence of the benefit of systematic screening constitute some potential limitations. However, data from the literature

show that early diagnosis and appropriate management such as weight loss in obese subjects could be beneficial for disease progression. This raises the question of identifying subpopulations that can benefit from proactive strategies due to the higher risk of disease progression. Thus, our third axis of study wanted to answer this problem by focusing on diabetic subjects, because of the strong interaction between the two nosological entities. This analysis showed a strong association between the coexistence of diabetes and NAFLD on morbidity and mortality. In particular, it shows that the interaction between risk and protective factors for NAFLD and diabetes as well as their impact on morbidity and mortality were mediated by their respective age and severity. This suggests the need for early detection and management of these diseases. In addition, it turns out that certain anti-diabetic drugs improve insulin sensitivity and therefore could also be beneficial for the progression of NAFLD.

Future studies to precisely assess the clinical and medico-economic benefits and the criteria for implementing systematic and/or targeted screening for metabolic steatosis are needed pending effective treatments.

This work shows that NAFLD has become a major health problem, which only a political leap and diligent public health programs could contain.

---

## Remerciements

---

Le travail présenté dans cette thèse est la consécration de la collaboration, l'aide et l'investissement personnel de nombreuses personnes que j'aimerais remercier ici. Je n'aurai pas assez de place sur ces quelques lignes pour vous exprimer ma plus profonde reconnaissance pour la quantité impressionnante de travail que vous avez abattu pour m'aider dans cette thèse.

Je tiens tout d'abord à remercier très chaleureusement ma directrice de thèse, Karine LACOMBE, pour m'avoir donné l'opportunité de faire ce travail de thèse. Merci pour l'acceptation et l'encadrement pendant ces quatre dernières années qui furent pour moi très enrichissantes ! Je voudrais aussi vous remercier tout particulièrement, pour la liberté que vous m'avez laissée, d'un point de vue personnel et intellectuel, tout au long de ces années : merci pour votre compréhension et votre confiance. Je vous remercie également pour vos qualités tant professionnelles que personnelles, pour votre engagement, votre disponibilité ainsi que votre patience. Vous resterez un modèle pour moi.

Je remercie tout particulièrement Lawrence SERFATY, responsable et coordonnateur du projet « NASHCO ». Comme vous le savez, ce n'était pas gagné, mais sans jamais désespérer et avec le sourire, vous avez su me redonner de l'espoir et la force pour l'aboutissement de ce projet. Je vous remercie également pour votre soutien, vos précieux conseils et votre disponibilité malgré votre emploi du temps chargé. Toutes nos discussions enrichissantes auront permis de faire que cette thèse soit, pour moi, un réel accomplissement. Collaborer avec vous sur ce projet a été un vrai plaisir. Merci encore !

A mon co-directeur de thèse, Nathanaël Lapidus, merci pour votre enseignement bienveillant et les discussions enrichissantes. Merci de m'avoir initié à votre sens de la précision qui restera un excellent guide pour moi à l'avenir !

Je remercie tous les membres de l'équipe NASHCO pour leur investissement dans l'aboutissement de ce projet.



Je voudrais remercier Marie Zins responsable de l'Unité Inserm UMS 011 et de la Cohorte Constances qui n'a ménagé aucun effort pour m'accueillir, me soutenir et m'accompagner durant ces années pour l'aboutissement de ce projet.

A toute l'équipe de l'UMS 011, vous m'avez accueilli avec bienveillance dans « votre maison » et avez fait preuve d'une grande disponibilité. Au delà de la mise à ma disposition des données, de supports matériels et logistiques qui m'ont permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions possibles, vous avez su me faire partager votre engagement professionnel.

Je remercie Fabrice CARRAT, directeur de l'Unité Inserm UMR S1136, et responsable de l'équipe 2, pour m'avoir accepté au sein de son équipe ainsi que pour les supports matériels et logistiques mis à ma disposition.

Un grand merci à tous les membres, passés ou actuels, de l'équipe 2 de l'IPLESP avec qui j'ai passé de bons moments.

Merci en particulier à Maria, ma co-stagiaire de master 2 et co-doctorante au sein de l'équipe. Merci pour ta disponibilité et tes aides multiformes.

Merci également à toute l'équipe de l'Unité de Recherche Clinique du Département de Maladies Infectieuses et Tropicales de l'hôpital Saint-Antoine avec qui j'ai passé de très bons moments ces derniers mois.

Je remercie aussi Madame Ede et Madame Molonda, et leur famille, qui m'ont accueilli comme des parents pendant ces années en France.

Merci à mes amis en particulier Ines, Gwladys, Antoine qui m'ont soutenu dans toutes les situations durant toutes ces années. Plus que des amis, vous êtes des frères ! Merci pour tous les moments que nous avons pu partager ensemble et ceux à venir !

Mes remerciements à l'endroit de ma famille, feu mon père, et ma mère, qui m'ont inconditionnellement soutenu et encouragé, par tous les moyens possibles, dans mes choix. Je ne vous remercierai jamais assez même si vous ne me l'avez jamais demandé.

Merci également à mes frères et sœurs, qui ont toujours été là pour moi. Ce travail est également le vôtre.

---

## Production scientifique durant la thèse

---

### Articles publiés

**Nabi O**, Lacombe K, Boursier J, Mathurin P, Zins M, Serfaty L. Prevalence and Risk Factors of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Advanced Fibrosis in General Population: the French Nationwide NASH-CO Study. *Gastroenterology*. 1 août 2020 ;159(2) :791-793.e2.

**Nabi O**, Boursier J, Lacombe K, Mathurin P, de Ledinghen V, Goldberg M, et al. Comorbidities Are Associated with Fibrosis in NAFLD Subjects: A Nationwide Study (NASH-CO Study). *Digestive Diseases and Sciences*. 1 juin 2022;67(6):2584

**Nabi O**, Boursier J, Lapidus N, Mathurin P, de Ledinghen V, Petit J-M, et al. The burden of NAFLD in type 2 diabetic subjects from the general population: A Nationwide population-based follow-up study (NASHCO). *Liver Int*. mars 2022;42(3):595-606.

Amadou C, **Nabi O**, Serfaty L, Lacombe K, Boursier J, Mathurin P, et al. Association between birth weight, preterm birth, and nonalcoholic fatty liver disease in a community-based cohort. *Hepatology*. 26 avr 2022. [on line].

### Communications orales

**Nabi O**, Lapidus N, Lacombe K, Boursier J, Mathurin P, de Ledinghen V, Zins M, Goldberg M, Serfaty L. Lean NAFLD from the French General Population have more Severe Liver Disease and Poorer Outcomes (NASH-CO). International liver congress 2021. June 23-26, 2021, Dublin (Irlande), Virtual congress. CO 612

**Nabi O**, Lacombe K, Boursier J, Mathurin P, de Ledinghen V, Zins M, Goldberg M, Serfaty L. Étude longitudinale de la prévalence, caractéristiques et la morbidimortalité de la stéatose hépatique non alcoolique chez le sujet mince en population générale, 2012-2020 (étude NASH-CO). JFHOD 2021. 18-21 mars 2021, Paris (France). CO 170

**Nabi O**, Lacombe K, Boursier J, Mathurin P, de Ledinghen V, Zins M, Goldberg M, Serfaty L. Effets Additifs du Diabète et de la Stéatose Non Alcoolique (SNA) sur la Sévérité de la Fibrose et les Comorbidités en Population Générale (Étude NASH-CO). JFHOD 2021. 18-21 mars 2021, Paris (France). CO 009

**Nabi O**, Lapidus N, Lacombe K, Boursier J, Mathurin P, de Ledinghen V, Zins M, Goldberg M, Serfaty L. Lean NAFLD from the French General Population have more Severe Liver Disease and Poorer Outcomes (NASH-CO). Digital Liver Cancer Summit 2021. February 5-6, 2021, Virtual congress.

**Nabi O**, Lacombe K, Boursier J, Mathurin P, de Ledinghen V, Goldberg M, Zins M, Serfaty L. Prevalence and Characteristics of Lean NAFLD in the General Population: a Population-Based Cohort Study (NASH-CO). AASLD Annual Meeting. November 8-12, 2019, Boston, Massachusetts (Unites States). *Hepatology*. 2019; 70(1s):716A. CO 1188

**Nabi O**, Lacombe K, Boursier J, Mathurin P, de Ledinghen V, Zins M, Goldberg M, Serfaty L. La stéatose non alcoolique et son impact sur les comorbidités chez les sujets diabétiques de type

2 en population générale (ETUDE NASH-CO). 85èmes Journées scientifiques de l'AFEF. 2-5 octobre 2019, Marseille (France). CO-009

**Nabi O**, Lacombe K, Boursier J, Mathurin P, de Ledinghen V, Goldberg M, Zins M, Serfaty L La stéatose non alcoolique et le risque de maladie cardiovasculaire, de cancer extra-hépatique et de maladie rénale chronique dans la population générale française : une étude chez 118 664 sujets (NASH-CO) 83èmes Journées scientifiques de l'Association Française pour l'Étude du Foie (AFEF), 3-6 octobre 2018, Lyon (France). CO-029

**Nabi O**, K. Lacombe, J. Boursier, P. Mathurin, V. De Ledinghen, M. Goldberg, M. Zins, L. Serfaty. Epidémiologie de la stéatose non alcoolique et de la fibrose dans la population générale française : une étude chez 118 664 sujets (NASH-CO). 83èmes Journées scientifiques de l'Association Française pour l'Étude du Foie (AFEF), Lyon (France, 3-6 octobre 2018, Lyon (France). CO-013

### **Posters**

**Nabi O**, Lapidus N, Lacombe K, Boursier J, Mathurin J, de Ledinghen V, Zins M, Goldberg M, Serfaty L. Additive Effects of Diabetes and NAFLD on Liver Disease Severity and Clinical Outcomes in the General Population (NASH-CO study). International liver congress 2021. June 23-26, 2021, Dublin (Irlande) Virtual congress. PN 614

**Nabi O**, Lacombe K, Boursier J, Mathurin P, de Ledinghen V, Goldberg M, Zins M, Serfaty L. NAFLD and its Impact on Comorbidities among Type 2 Diabetic Subjects in the General Population: a Population-Based Cohort Study (NASH-CO). AASLD Annual Meeting. November 8-12, 2019, Boston, Massachusetts (Unites States). Hepatology. 2019; 70(1s) :720A. PN 1194

**Nabi O**, Lacombe K, Boursier J, Mathurin P, de Ledinghen V, Goldberg M, Zins M, Serfaty L. Lifestyle is a major contributor to NAFLD in the General Population: a Population-Based Cohort Study (NASH-CO). AASLD Annual Meeting. November 8-12, 2019, Boston, Massachusetts (Unites States). Hepatology. 2019; 70(1s) :719A. PN 1193

**Nabi O**, Lacombe K, Boursier J, Mathurin P, de Ledinghen V, Zins M, Goldberg M, Serfaty L. Mode de vie et stéatose non alcoolique en population générale (ETUDE NASH-CO). 85èmes Journées scientifiques de l'AFEF. 2-5 octobre 2019, Marseille (France). PO 63

**Nabi O**, Lacombe K, Boursier J, Mathurin P, de Ledinghen V, Goldberg M, Zins M, Serfaty L. Prévalence et caractéristiques de la stéatose non alcoolique chez les sujets minces en population générale (ETUDE : NASH-CO). 85èmes Journées scientifiques de l'AFEF. 2-5 octobre 2019, Marseille (France). PO 64

Serfaty L, **Nabi O**, Boursier J, Mathurin P, de Ledinghen V, Goldberg M, Zins M, Lacombe K. Epidemiology of NAFLD and advanced fibrosis in the French general population: A populationbased cohort study in 118,664 subjects (NASH-CO study) International liver congress (the annual EASL meeting), April 10-14, 2019, Vienna (Austria). THU-340

**Nabi O**, Lacombe K, Boursier J, Mathurin P, de Ledinghen V, Goldberg M, Zins M, Serfaty L. Epidemiology of NAFLD and Advanced Fibrosis in the French General Population: A Population-Based Cohort Study in 118,664 Subjects (NASH-CO study). AASLD Annual Meeting.

November 9-13, 2018, San Francisco, California (United States). Hepatology. 2018; 68(1s) :991A-992A. PN 1740

**Nabi O**, Lacombe K, Boursier J, Mathurin P, de Ledinghen V, Goldberg M, Zins M, Serfaty L. NAFLD and the Risk of Cardiovascular Disease, Extrahepatic Cancer and Chronic Kidney Disease in the French General Population: A Population-Based Cohort Study in 118,664 Subjects (NASH-CO study). AASLD Annual Meeting. November 9-13, 2018, San Francisco, California (United States). Hepatology. 2018 ; 68(1s) :1000A. PN 1754

---

## Table des matières

---

<b>Résumé</b> .....	iii
<b>Abstract</b> .....	v
<b>Remerciements</b> .....	vii
<b>Production scientifique durant la thèse</b> .....	ix
<b>Liste des tables et des figures</b> .....	xv
<b>Abréviations</b> .....	xvi
<b>Introduction générale</b> .....	1
<b>A. Première partie</b> .....	2
<b>I. Définition, épidémiologie et facteurs de risque</b> .....	2
1. Définition.....	2
2. Epidémiologie.....	4
3. Incidence de la NAFLD.....	6
4. Facteurs de risque .....	6
a. Obésité .....	6
b. Diabète de type 2 .....	7
c. Syndrome métabolique.....	7
d. Insulino-résistance.....	8
e. Hypertension artérielle et les dyslipidémies.....	9
f. La sarcopénie.....	9
g. Hygiène de vie .....	9
h. Age, sexe et « origine » géographique .....	11
i. Génétique.....	11
j. Epigénétique : la dysfonction mitochondriale .....	12
k. Microbiote intestinal .....	14
<b>II. Pathogenèse</b> .....	15
<b>III. Diagnostic et surveillance</b> .....	17

1.	Circonstances de découverte .....	17
2.	Diagnostic .....	17
a.	Histologie de la ponction-biopsie hépatique .....	17
b.	Tests non-invasifs .....	19
c.	Imagerie médicale .....	24
3.	Évaluation de la sévérité de l'atteinte hépatique .....	25
4.	Surveillance et dépistage.....	27
a.	Surveillance hépatique .....	27
b.	Surveillance extra-hépatique .....	28
5.	Dépistage systématique .....	28
<b>IV.</b>	<b>Histoire naturelle</b> .....	<b>29</b>
<b>B.</b>	<b>Deuxième partie : Impact de la Stéato-hépatite Non Alcoolique sur la Morbi-mortalité en Population Générale Française (Etude NASHCO)</b> .....	<b>30</b>
<b>I.</b>	<b>Contexte</b> .....	<b>30</b>
<b>II.</b>	<b>Objectifs de la thèse</b> .....	<b>30</b>
<b>III.</b>	<b>Méthodes</b> .....	<b>31</b>
1.	La Cohorte Constances .....	31
2.	Diagnostic de la NAFLD et de la fibrose.....	34
3.	Méthodes statistiques.....	38
<b>IV.</b>	<b>Chapitre I : Études transversales</b> .....	<b>39</b>
	<b>Présentation des deux études</b> .....	<b>39</b>
	<b>Discussion générale aux deux études</b> .....	<b>40</b>
1.	Article 1: "Prevalence and Risk Factors of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Advanced Fibrosis in General Population: the French Nationwide NASH-CO Study" .....	43
2.	Article 2: "Comorbidities are Associated with Fibrosis in NAFLD Subjects: A Nationwide Study (NASH-CO Study)" .....	48
<b>V.</b>	<b>Chapitre II : Études Longitudinales :« Impact de la NAFLD sur la morbi-mortalité en population générale »</b> .....	<b>58</b>

<b>A. Impact de la NAFLD sur la morbi-mortalité en population générale (Ci-après dénommée « NASHCO-STUDY »)</b> .....	58
<b>Présentation de l'étude</b> .....	58
<b>Discussion générale de l'article</b> .....	60
Article 3: Hepatitis C and NAFLD as main causes of liver-related morbidity and mortality in the French general population: a Nationwide Study (NASH-CO study) .....	62
<b>B. La NAFLD chez les personnes atteintes de diabète : quel impact sur la santé ? (« NASHCO-STUDY »)</b> .....	91
<b>Présentation de l'étude</b> .....	91
<b>Discussion générale de l'article</b> .....	92
<b>Synthèse</b> .....	113
<b>A. Partie I : La NAFLD, quelle prévalence, quel risque ?</b> .....	113
<b>B. Partie II : La NAFLD en population générale, quels impacts sur la santé ?</b> .....	114
<b>C. Partie III : Diabète et NAFLD quel risque ?</b> .....	115
<b>Discussion et perspectives</b> .....	117
<b>A. La NAFLD en population générale : au-delà de sa prévalence</b> .....	117
<b>B. Limites méthodologiques dans l'estimation de la prévalence, facteurs de risque et de la NAFLD comme problème de santé publique</b> .....	120
<b>Conclusion</b> .....	122
<b>Références</b> .....	124

---

## Liste des tables et des figures

---

### Tables

Tableau 1: Causes secondaires de stéatose .....	4
Table 2: polymorphismes génétiques associés à la NAFLD et à sa progression.....	12
Table 3: Marqueurs non-invasifs du diagnostic de la NAFLD et de la fibrose avancée .....	21
Table 4: Méthodes d'imagerie médicale et leurs disponibilité et accessibilité pour l'évaluation de la stéatose hépatique .....	25
Table 5: Rythme de surveillance de la NAFLD selon l'EASL.....	28

### Figures

Figure 1: Anatomopathologie et histoire naturelle de la NAFLD .....	4
Figure 2: Prévalence mondiale de la NAFLD et de la distribution du gène PNPLA3 .....	5
Figure 3: Facteurs de risque alimentaires de la NAFLD .....	11
Figure 4: Variation de la prévalence de la NAFLD en fonction des apports caloriques journaliers (kilocalories) .....	11
Figure 5: Principales voies impliquées dans la susceptibilité à la NAFLD et les polymorphismes géniques fortement associés au développement et à la progression de la maladie.....	14
Figure 6: Représentation schématique de l'apparition d'une stéatose et d'une stéatohépatite métabolique (NASH).....	16
Figure 7 : Algorithme pour le dépistage de la fibrose en soins de santé primaire et hors des services d'hépatologie.....	27
Figure 8: Répartition des Centres d'examen de santé incluant des participants de Constances, France.....	34
Figure 9: Courbe ROC et AUC à l'inclusion pour la prédiction de complications hépatiques sévères à 10 ans .....	37



---

## Abréviations

---

AASLD	American Association for the Study of Liver Diseases
ADAPT	Age, Diabetes, PRO-C3 and Platelet count
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNmt	Acide Désoxyribonucléique Mitochondrial
AG	Acide Gras
AGL	Acide Gras Libre
AIT	Accident Ischémique Transitoir
ALAT	Alanine Amino-Transferase
ASAT	Aspartate Amino-Transférase
AUROC	Area Under Receiver Operator Characteristic
AVC	Accident Vasculaire Cérébral
BAAT	Age, Aspartate Aminotransferase, triglycerides score
BARD	Aspartate Aminotransferase, Alanine Aminotransferase ratio and and diabetes
BMI	Body Mass index
Camieg	Caisse d'assurance maladie des industries électriques et gazières
CCR2-5	C-C Chemokine Receptors 5
CES	Centre d'examen de santé
CHC	Carcinome Hépatocellulaire
CIM-10	Classification internationale des maladies
CK18	Ciculating keratin 18
CnamTS	Caisse nationale d'assurance maladie des travailleurs salariés
Cnav	Caisse nationale d'assurance vieillesse
CNIL	Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés
CRM	Chaîne Respiratoire Mitochondriale
DSM-5	Diagnostic and Statistical Manual 5
EASL	Association Européenne pour l'Etude du foie
ELF	Enhanced liver fibrosis test
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FDA	Food and Drug Administration

FIB-4	Fibrosis-4
FLI	Fatty liver index
GGT	Gamma-GlutamylTransferase
GLP-1	Glucagon-Like Peptide 1
HAS	Haute Autorité de Santé
HDL	High-Density Lipoprotein
HSI	Hepatic Steatosis Index
HTA	Hypertension Artérielle
IL	Interleukine
IMC	Indice de Masse Corporelle
INSERM	Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
Log	Logarithme
M65ED	M65 EpiDeath
MCF	Maladie Chronique du Foie
MCV	Maladie Cardiovasculaire
MetS	Syndrome Métabolique
MFP	Mutuelles issues des Fonctions publiques d'État
MGEN	Mutuelle générale de l'éducation nationale
MSA	Mutualité sociale agricole
NAFL	Non-Alcoholic Fatty Liver
NAFLD	Non-Alcoholic Fatty Liver Disease
NAFLD LFS	NAFLD Liver Fat Score
NASH	Non-Alcoholic Steatohepatitis
NASH CRN	NASH Clinical Research Network
NFS	NAFLD Fibrosis Score
OCA	Acide Obéticholique
PIIINP	Procollagen III N-Terminal Propeptide
PNPLA3	Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PRO-C3	Type III procollagen

RG	Régime Général
RNIAM	Répertoire national inter-régimes de l'assurance-maladie
ROS	Reactive oxygen species
RSI	Régime social des indépendants
SAF	Steatosis Activity Fibrosis
SREBP-1	Sterol regulatory element-binding proteins 1
TIMP1	Tissue inhibitor matrix metalloproteinase 1
TM6SF2	Transmembrane 6 Superfamily 2
TNF	Tumor necrosis Factor
TyGI	Triglyceride glucose (TyG) index
VAI	Visceral adiposity index
VHB	Virus de l'Hépatite B
VHC	Virus de l'Hépatite C
WC	Waist Circumference

---

## Introduction générale

---

La stéatose hépatique non alcoolique (ou Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD) est devenue la principale cause des maladies chroniques du foie (MCF) (1,2). Sa prévalence mondiale est estimée entre 25% et 45% chez l'adulte et 10% chez l'enfant. Elle progresse concomitamment avec l'épidémiologie de l'obésité, du diabète de type 2 et du syndrome métabolique (3,4).

L'incidence de la cirrhose et des carcinomes hépatocellulaires (CHC) secondaires à la NAFLD est en constante augmentation et en passe de devenir la première cause de transplantation hépatique (5–8). Alors que la stéatose hépatique pure (ou NAFL pour Non-Alcoholic Fatty Liver) est considérée comme bénigne avec un faible potentiel évolutif vers des complications hépatiques, environ 20% des patients atteints de NAFLD présentent des signes histologiques de nécroinflammation avec ou sans fibrose, indiquant une stéatohépatite non alcoolique (Non-Alcoholic Steatohepatitis, NASH), cette dernière étant plus à risque d'évoluer vers une cirrhose, un carcinome hépatocellulaire et une insuffisance hépatique terminale (9).

Outre les complications hépatiques, des données (essentiellement hospitalières) suggèrent que la NAFLD pourrait favoriser la survenue de maladies cardiovasculaires, de cancers extra-hépatiques et de maladies rénales chroniques (10–12).

A ce jour, les données épidémiologiques sur la NAFLD en population générale font défaut particulièrement en Europe (13). En France, en dehors d'études de modélisation (13,14), estimant le nombre de personnes atteintes de NAFLD à 14 545 923, dont 911 952 atteintes de NASH, 135 514 au stade de cirrhose et 1760 de CHC, aucune donnée épidémiologique en population générale n'est disponible. Il a été en outre démontré que la NAFLD reste une maladie sous-diagnostiquée en pratique clinique, avec seulement 21,5% des patients atteints de NAFLD diagnostiqués (15). Les principales raisons au sous-diagnostic de la NAFLD seraient liées d'une part au fait qu'il s'agit d'une maladie asymptomatique qui évolue à bas bruit et qui ne se révèle que par ses complications, et d'autre part par le fait que les étiologies virales et alcoolique restent de loin les diagnostics de première intention, même devant des signes d'appel. En effet, les médecins « de ville » ne semblent pas assez imprégnés de la problématique de la maladie (15). Ces facteurs limitent la compréhension des déterminants et le fardeau de la NAFLD en termes de morbi-mortalité dans la population générale.

Le travail présenté dans cette thèse porte principalement sur l'estimation de la prévalence et le fardeau de la NAFLD en termes de morbi-mortalité en population générale en France. En effet, bien que les données sur la prévalence et l'impact de la NAFLD restent sous-évaluées dans la plupart des pays du monde, la situation des pays riches mérite une attention toute particulière du fait de la prévalence du diabète et de l'obésité.

La première partie de cette thèse a pour objectif de faire l'état des lieux des connaissances et les acquis actuels sur la stéatose métabolique. Seront présentées dans cette partie, d'abord la définition, puis les principales caractéristiques cliniques et anatomopathologiques de la maladie. Ensuite, nous en décrirons l'épidémiologie et les facteurs de risque. Des aspects de la pathogénèse seront brièvement évoqués. Puis nous terminerons par les différents moyens diagnostiques et un aperçu des connaissances actuelles sur l'histoire naturelle de la maladie. La deuxième partie, portera sur l'analyse de l'épidémiologie de la NAFLD et son impact sur la morbi-mortalité en population générale. Dans un premier chapitre et par une approche transversale, nous analyserons l'épidémiologie de la NAFLD et son impact sur la prévalence des comorbidités extra-hépatiques. Dans un second chapitre, nous analyserons son impact sur la morbi-mortalité selon une approche longitudinale.

## **A. Première partie**

### **I. Définition, épidémiologie et facteurs de risque**

#### **1. Définition**

La stéatose métabolique ou stéatose hépatique non alcoolique ou Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD, traduction anglo-saxonne), est une maladie métabolique liée à l'accumulation excessive de graisse (stéatose) dans le foie. Elle est définie par la présence de gouttelettes lipidiques (stéatose) dans plus de 5% des hépatocytes à l'histologie (5,6% en spectroscopie ou à l'imagerie par résonance magnétique (IRM)) (16). La NAFLD a été décrite pour la première fois en 1980 par Ludwig et al. comme une maladie de cause inconnue qui imite histologiquement l'hépatite alcoolique et qui peut évoluer vers la cirrhose (17). Cette définition a rapidement évolué et repose maintenant sur des critères histologiques, cliniques et pronostiques regroupés en deux entités nosologiques distinctes :

- la stéatose pure avec ou sans inflammation lobulaire minime (NAFL: Non-Alcoholic Fatty Liver). Elle représente 75 à 95% des patients atteints de NAFLD et est caractérisée par une

stéatose touchant plus de 5% des hépatocytes sans lésions de nécroinflammation et sans fibrose. Elle est considérée comme bénigne avec un faible risque d'évolution vers des complications hépatiques ;

- la stéatohépatite non alcoolique (NASH: Non-Alcoholic Steatohepatitis) qui représente 5 à 25% des patients et est caractérisée par une stéatose touchant plus de 5% des hépatocytes avec des lésions d'inflammation lobulaire ou de ballonnisation hépatocytaire avec ou sans fibrose (9,18). Elle est plus à risque d'évoluer vers les complications hépatiques sévères (fibrose, cirrhose, carcinome hépatocellulaire, insuffisance hépatique) (9). Du point de vue histologique, la NASH est constituée d'un spectre lésionnel assez large et non exclusif (inflammation lobulaire, inflammation portale, ballonnisation hépatocytaire, fibrose, corps de Mallory, méga-mitochondries, noyaux glycogéniques, lipogranulomes) (9,19) (*Figure 1*). Cette définition purement histopathologique a par la suite été complétée par la notion d'« absence de consommation d'alcool à risque pour la santé » soit une consommation n'excédant pas 30 grammes par jour (ou 140 grammes par semaine) chez l'homme et 20 grammes par jour (ou 70 grammes par semaine) chez la femme durant les douze derniers mois et « en dehors de toute maladie chronique du foie (MCF) » notamment les virus de l'hépatite B ou C et les autres causes de stéatose telles que l'hépatite auto-immune, la maladie de Wilson, l'hémochromatose, le déficit en alpha-1-antitrypsine, ou les médicaments connus comme hépatotoxiques (20,21) (*Tableau 1*).

Cependant, des données récentes suggèrent une possible coexistence de la NAFLD avec d'autres MCF (les hépatites virales ou la maladie alcoolique du foie) (22–24). Un panel d'experts a proposé plus récemment au vu des progrès dans la compréhension de la maladie et pour prendre en compte le spectre des étiologies de la maladie et sa possible coexistence avec d'autres MCF, que la définition de la maladie par une exclusion (« non alcoolique ») qui était liée à une nébuleuse de causes inconnues puisse être remplacée par une définition plus inclusive. Ils proposent que l'appellation « Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) » soit remplacée par « Metabolic Associated Fatty Liver Disease (MAFLD)» (25). Cette nouvelle dénomination aurait pour finalité de mieux conceptualiser la maladie pour améliorer la recherche et la prise en charge des patients. Il ne serait donc pas impossible de voir coexister ces deux terminologies (NAFLD et MAFLD) dans la littérature.

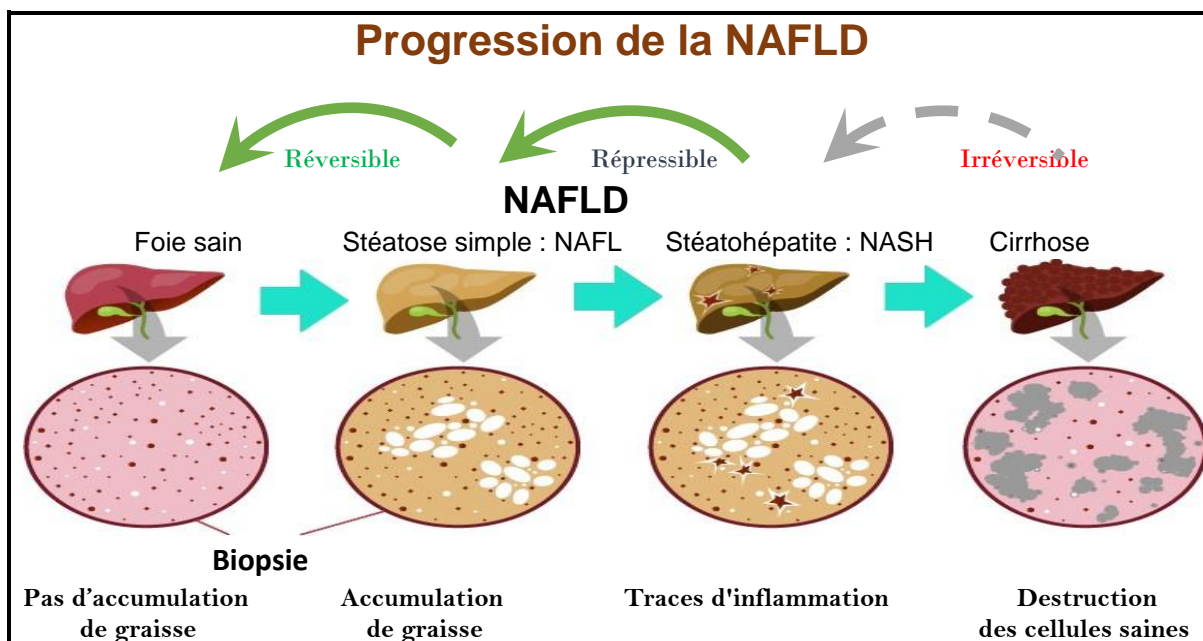


Figure 1: Anatomopathologie et histoire naturelle de la NAFLD  
 (Source modifiée : <https://xn--ana-sant-i1a.fr/la-steatose-hepatique-non-alcoolique-nafld>).

Tableau 1: Causes secondaires de stéatose

Médicaments	Nutritionnelles/chirurgicales	Génétiques ou métaboliques
- Corticostéroïdes	- Bypass Jéjuno-iléal	- Maladie de Wilson
- Tamoxifène	- Nutrition parentérale totale	- Hypo-bétalipoprotéïnémie
- Inhibiteurs calciques	- Jeûne prolongé	- Syndromes lipodystrophiques
- Amiodarone	- Malnutrition protéique	- Maladie de Weber-Christian
- Estrogènes		- Maladie de Wolman
- Tétracyclines		- Maladie de dépôt des esters du cholestérol
- Anti-rétroviraux anti-VIH		

## 2. Epidémiologie

La NAFLD est devenue une pandémie, touchant aussi bien les pays occidentaux que les pays en développement (3). Elle est devenue la première cause des maladies chroniques du foie (2). Sa prévalence en constante augmentation est estimée à 25% de la population mondiale avec des disparités géographiques dues à des différences de mode vie et d'alimentation, ainsi qu'à des polymorphismes génétiques (3,26,27). Les pays du Moyen-Orient et de l'Amérique du Sud présentent les taux les plus élevés (30%), tandis que l'Afrique enregistre la plus faible prévalence (13,5%) (3,26,27) (Figure 2). En Europe et en Amérique du Nord, on estime qu'environ 24% de la population adulte est atteinte par la NAFLD, soit 64 et 52 millions de personnes respectivement (3,26–29). On estime en outre que 1,5 à 6% de la population

générale vivrait avec une NASH (3) et environ 10% des patients atteints de NASH sont atteints de fibrose hépatique au diagnostic (30,31).

L'avènement des antiviraux directs a radicalement changé le profil épidémiologique des MCF, notamment celle de l'hépatite virale liée au virus de l'hépatite C. La NAFLD est dès lors en passe de devenir la première cause de transplantation hépatique par décompensation de cirrhose et par carcinome hépatocellulaire (CHC) (5–8,32). On estime que la NAFLD est responsable de plus de 1,27 millions de décès par an dont 13% de cause cardiovasculaire et 2,2% (soit plus de 28 000 patients) par complications hépatiques directes (13,33). Elle est devenue à cet effet un problème majeur de santé publique (13,33). Des projections issues de données de modélisation suggèrent que la prévalence et la morbi-mortalité liée à la NAFLD vont continuer à progresser et particulièrement dans les pays développés(33). Par exemple, on estime que 33% (+21 % par rapport à 2015) de la population adulte des États-Unis sera touchée par la NAFLD à l'horizon 2030. Environ 27 millions de personnes y seraient alors atteints de NASH, 3,1 millions de cirrhose compensée, 376 100 de cirrhose décompensée, 24 900 de carcinome hépatocellulaire et 7 610 devraient bénéficier d'une transplantation hépatique, soit une progression de +63%, +163%, +180% et +59% respectivement par rapport à 2015 (33).

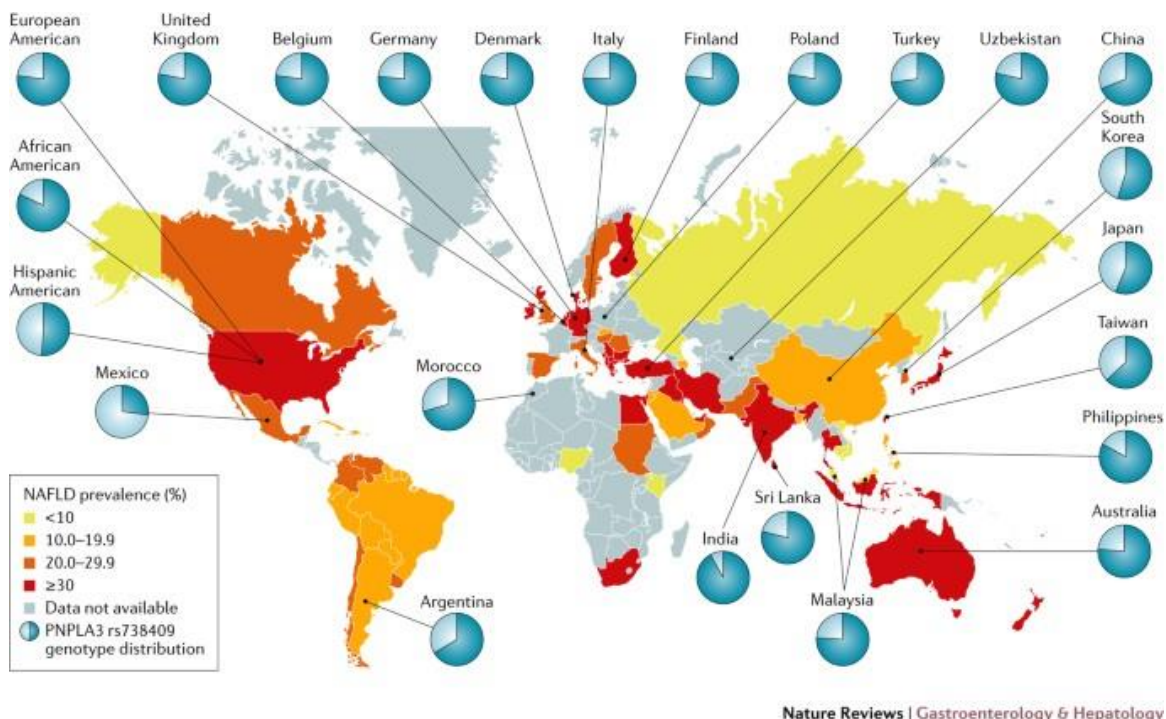


Figure 2: Prévalence mondiale de la NAFLD et de la distribution du gène PNPLA3 (Source : Younossi Z et al. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2018)



### **3. Incidence de la NAFLD**

L'incidence de la NAFLD a été très peu évaluée. L'essentiel des études qui ont rapporté des incidences de la NAFLD ont été réalisées dans les pays asiatiques. Les taux d'incidence dans ces études étaient très variables et estimés entre 19,9 et 87 pour 1000 personnes-années en Inde et au Japon (34–37) et entre 34 et 91 pour 1000 personnes-années en Chine (38–40). En Israël, Zelber-Sagi et al. avaient rapporté un taux d'incidence de 28 pour 1000 personnes-années (41). Younossi et al. dans une méta-analyse récente, rapportaient des taux d'incidence estimés à 52,34 pour 1000 personnes-années pour l'Asie et 28,01 pour 1000 personnes-années pour Israël (3).

### **4. Facteurs de risque**

La NAFLD est une maladie dysmétabolique très complexe qui implique l'interaction de nombreux paramètres environnementaux, comportementaux, alimentaires, génétiques et épigénétiques. L'implication de ces facteurs dans la pathogénèse est très variable et explique l'hétérogénéité de ses expressions phénotypiques et ses complications, d'une personne à une autre ou d'une population à une autre. Sa prévalence est bien souvent étroitement associée à celle des comorbidités métaboliques du même spectre notamment l'obésité, le syndrome métabolique, le diabète de type 2, les dyslipidémies et surtout l'insulino-résistance. Elle est par ailleurs souvent décrite comme une de leurs complications.

#### **a. Obésité**

La prévalence de la NAFLD est fortement associée aux composantes du syndrome métabolique, notamment l'obésité. L'obésité est un des facteurs de risque majeurs d'un bon nombre de pathologies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires, le diabète de type 2 et les cancers par l'intermédiaire de l'inflammation chronique et du stress oxydatif qui lui sont associés (42). La grande majorité des études qui ont analysé les facteurs de risque de NAFLD ont mis en évidence une relation linéaire forte entre l'indice de masse corporelle, le tour de taille et la NAFLD (3,36,43–46). Chez les personnes en situation d'obésité sévère (en particulier centrale), la prévalence de la NAFLD peut atteindre 98% dont environ 37% au stade de NASH (47–50). En effet, l'excès de masse adipeuse centrale (obésité androïde), s'accompagne d'une insulino-résistance avec une augmentation et un maintien d'une activité lipolytique, la libération d'acides gras libres qui affluent dans le foie via le drainage portal et une surexpression de cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL1 $\beta$ ) qui maintiennent

un état inflammatoire chronique et participent à la physiopathologie de la NAFLD (42,51–54). Le diabète de type 2 chez les personnes en situation d'obésité est en partie lié à cette inflammation chronique responsable de la résistance à l'insuline, autant de facteurs qui tous contribuent à la physiopathologie de la NAFLD. L'Association Européenne pour l'étude du foie (European Association for the Study of the Liver, EASL) recommande par ailleurs la recherche systématique de la NAFLD chez les personnes en situation d'obésité ou avec un syndrome métabolique (20) . Néanmoins, les personnes avec un IMC <30 kg/m<sup>2</sup>, voire <25kg/m<sup>2</sup>, peuvent également présenter une authentique NAFLD (« Lean NAFLD »)(55–60).

#### b. Diabète de type 2

Environ 70% des personnes souffrant de diabète sont atteints de NAFLD (61–65). Le diabète chez les personnes atteintes de NAFLD est associé à des formes plus sévères de la maladie (63). Des études basées sur l'histologie hépatique montrent que 80% des personnes souffrant de diabète avec NAFLD présentent une NASH et une fibrose avancée dans 17% à 40 % des cas (61,63,66–70). Inversement, la présence d'une NAFLD augmente de 2 à 5 fois le risque de développer un diabète de type 2 (62,63,65,71,72). Cet effet bidirectionnel serait la conséquence de l'insulino-résistance présente dans le diabète et la NAFLD. L'EASL recommande un dépistage du diabète de type 2 chez les personnes atteintes de NAFLD. De même, chez les personnes atteintes de diabète, la présence d'une NAFLD doit être recherchée, quel que soit le niveau des enzymes hépatiques car ces patients sont à risque de maladies hépatiques évolutives (16,20).

#### c. Syndrome métabolique

Le syndrome métabolique (MetS) est défini par l'association d'un tour de taille  $\geq 94$  cm ( $\geq 90$  cm si d'origine asiatique) chez l'homme ou  $\geq 80$  cm chez la femme et au moins deux des facteurs suivants : une hyperglycémie à jeun ( $>5,5$  mmol/l), une hypertension artérielle (HTA) et/ou une pression artérielle  $>130/85$  mmHg, une hypertriglycémie ( $>1,5$  mmol/l), une baisse du High-Density Lipoprotein (HDL) cholestérol ( $<1,03$  mmol/l chez l'homme et  $<1,29$  mmol/l chez la femme) (73). Il représente donc une constellation des facteurs de risque de la NAFLD (diabète, obésité centrale, dyslipidémie et hypertension). La prévalence de la NAFLD lui est étroitement associée sans qu'il en soit pathognomonique (36). En effet, la prévalence de la NAFLD chez les patients atteints de MetS est estimée à 43% dont 71% serait à un stade de NASH (36,74–77) . L'association NAFLD et MetS pourrait être bidirectionnelle avec

également l'insulino-résistance pour médiateur physiopathologique commun. La NAFLD est donc souvent considérée comme la composante hépatique du MetS (78). L'EASL recommande en conséquence la recherche en routine de la NAFLD chez les personnes en situation d'obésité ou avec un syndrome métabolique (16).

#### d. Insulino-résistance

La stéatose métabolique est une affection dysmétabolique qui évolue dans un contexte d'insulino-résistance (66). L'accumulation des critères du syndrome métabolique et l'insulino-résistance sont associées à la prévalence et à la sévérité de la NAFLD (NASH, fibrose) (79–81). L'interrelation entre la NAFLD et l'insulino-résistance est forte, complexe et la primauté de l'une sur l'autre assez discutée (82–84).

L'insuline est une hormone hypoglycémisante sécrétée par les cellules  $\beta$  pancréatiques. Ses principaux sites d'action sont le foie, le tissu adipeux et le muscle squelettique. Elle assure une fonction hypoglycémisante en facilitant l'absorption du glucose principalement dans les muscles squelettiques, les tissus adipeux et en inhibant la production endogène de glucose par le foie. La liaison de l'insuline sur son récepteur membranaire active la voie de signalisation permettant le transport de glucose via des transporteurs membranaires spécifiques, le stockage des acides gras sous forme de triglycérides et l'inhibition de la lipolyse (84–91). Dans les états d'insulino-résistance, l'activité de l'insuline sur ces organes cibles est altérée. L'obésité (en particulier viscérale), va s'accompagner du développement d'une insulino-résistance et une augmentation de l'activité lipolytique des tissus adipeux et une libération massive d'acides gras libres qui vont affluer dans le foie via le drainage portal (84,92,93). En effet, les adipocytokines (leptine, adiponectine et la résistine) produites principalement par le tissu adipeux sont impliqués dans l'homéostasie énergétique. La leptine, en se fixant sur son récepteur hypothalamique, diminue les prises alimentaires et augmente les dépenses énergétiques induite par la thermogénèse. Elle réduit la lipolyse, diminue la sécrétion d'insuline et la néoglucogenèse interprandiale. L'adiponectine facilite l'utilisation cellulaire du glucose et la diminution de la néoglucogenèse hépatique. Sa sécrétion diminue avec la prise de poids. La résistine est un puissant antagoniste compétitif de l'insuline. En se fixant sur les récepteurs de l'insuline (sur le muscle, le foie et les adipocytes), elle favorise l'insulino-résistance. Sa sécrétion est par ailleurs accrue chez les personnes en situation d'obésité (94–97). Au niveau hépatique, l'inhibition de l'activité de l'insuline (insulino-résistance centrale)

s'accompagne d'une stimulation de la lipogenèse de novo entraînant une stéatose supplémentaire (82,83). L'oxydation des métabolites oxygénés des triglycérides ainsi accumulés va être à l'origine de l'apoptose hépatocytaire, entraînant l'inflammation (production de cytokines pro-inflammatoires IL-6, TNF $\alpha$ , IL-8, IL1 $\beta$ ) et l'activation des cellules étoilées responsables de la production de collagène, puis de la fibrose (53,82,84,98,99). En revanche, l'insulino-résistance centrale ou périphérique peut également être consécutive à une stéatose hépatique (82).

#### e. Hypertension artérielle et les dyslipidémies

La dyslipidémie et l'hypertension artérielle sont des composantes majeures du MetS et des facteurs de risque de la maladie cardiovasculaire. La prévalence de la dyslipidémie chez les personnes atteintes de NAFLD ou de NASH est respectivement estimée à 41-69% et à 72-83%. Environ un patient hypertendu sur deux présente une NAFLD tandis que chez les personnes atteintes de NAFLD, la prévalence de l'hypertension est estimée à 39% (3,27). Peu d'études ont évalué directement le mécanisme reliant ces deux entités. Cependant il semble y avoir un effet bidirectionnel dans lequel la NAFLD et l'HTA s'influencent et s'aggravent réciproquement (100).

#### f. Sarcopénie

La sarcopénie est définie par la perte progressive de la masse et de la force musculaire squelettique (101). Elle est associée à un dysfonctionnement métabolique et, joue potentiellement, un rôle dans la pathogenèse de la NAFLD. Environ 20% des patients atteints de NAFLD, présente une sarcopénie au diagnostic(102). Sa prévalence est par ailleurs, associée à une forte mortalité chez les personnes atteintes de NAFLD (102–105). Le mécanisme qui relie les deux entités est complexe et encore mal caractérisé d'autant qu'elles ont en grande partie un support physiopathologique en commun (dysfonctionnement métabolique, inflammation systémique, résistance à l'insuline, dysrégulation de l'adiponectine etc.) et s'influence réciproquement (106,107). Compte tenu de la complexité et du chevauchement de leur physiopathologie, le rôle de la sarcopénie dans la pathogenèse de la NAFLD continue de faire l'objet d'investigation.

#### g. Hygiène de vie

La composition du régime alimentaire a un effet significatif sur les fonctions métaboliques et endocriniennes ainsi que le bilan énergétique global. Les régimes hypercaloriques, avec un

excès en graisses saturées (abondants dans les graisses animales), en sucres raffinés et en boissons sucrées avec un apport élevé en fructose, sont fréquemment associés à une prévalence élevée de NAFLD (26,108,109) (Figure 3 et Figure 4). En effet, en plus de contribuer à l'expansion du tissu adipeux, source d'insulino-résistance et à une lipolyse, les régimes alimentaires riches en graisses saturées et en sucres raffinés, en boissons sucrées et en fructose peuvent d'une part, réguler positivement l'enzyme hépatique SREBP-1 (Sterol regulatory element-binding proteins 1), entraînant une augmentation de la lipogenèse de novo et d'autre part, affecter le métabolisme mitochondrial, les voies inflammatoires et fibrotiques, favorisant l'inflammation, l'apoptose et les lésions hépatiques, contribuant ainsi au développement et la progression de la maladie (84,108,109). Il a été suggéré que le régime méditerranéen (riche en acides gras monoinsaturés et en oméga-3) améliore la sensibilité à l'insuline chez les personnes insulino-résistantes et réduit la stéatose hépatique (110). Par ailleurs, chez le rat et la souris, le régime pauvre en acide gras oméga-3 s'accompagne d'une augmentation des acides gras oméga-6 et est associé à une incidence élevée de NAFLD (111).

Un effet bénéfique du café sur la NAFLD et sa progression a été documenté dans la littérature. Le mécanisme sous-jacent encore imprécis serait lié à un effet antioxydant, anti-inflammatoire et anti-fibrotique du café (112–115).

La pratique régulière de sport (au moins 2 heures par semaine) aurait des effets bénéfiques. L'exercice physique améliore la résistance à l'insuline (donc le risque de diabète), le stress oxydatif, l'obésité et la dyslipidémie et donc par ricochet le risque de stéatose hépatique (51,116–118). Il est démontré que l'exercice régulier exerce des effets anti-inflammatoires par inhibition de la production de TNF, la libération de catécholamines, l'activation des récepteurs  $\beta$ 2-adrénergiques et de ce fait a un effet bénéfique sur la constitution et la progression de la NAFLD (51,119). L'EASL recommande une évaluation des habitudes alimentaires et de l'activité physique dans le bilan de NAFLD (16).



Figure 3: Facteurs de risque alimentaires de la NAFLD  
 (Source : [1088745634704908288](https://doi.org/10.88745634704908288))

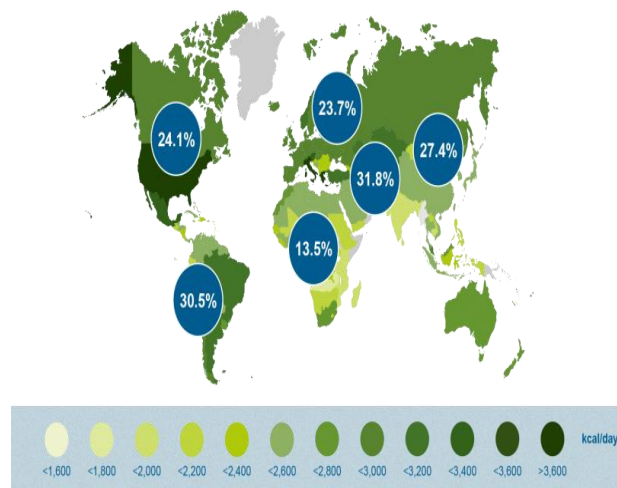


Figure 4: Variation de la prévalence de la NAFLD en fonction des apports caloriques journaliers (kilocalories)  
 (Source : [Rinella M. et al. Hepatology. 2016](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.01.011))

#### h. Age, sexe et « origine » géographique

La prévalence de la NAFLD augmente avec l'âge (120–123). Elle est 2 fois plus fréquente chez l'homme que chez la femme (123–125). Des études ont mis en évidence des cas d'agrégation familiale de NAFLD (126,127). On a pu également observer une grande variabilité géographique et ethnique (3,27) avec notamment une prévalence plus élevée chez les hispaniques (128).

#### i. Génétique

Différents polymorphismes génétiques ont été identifiés et validés comme facteurs prédisposant à la NAFLD et à sa sévérité (129–134) (Table 2). Le gène Patatin-Like Phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3, variant I148M) est la composante génétique associée à la prévalence et à la sévérité de la NAFLD la mieux caractérisée à ce jour (27,129,130,133–136). Le gène Transmembrane 6 Superfamily 2 (TM6SF2, variant E167K) est l'autre variant génétique qui plus récemment s'est révélé associé à la NAFLD et à la cirrhose hépatique (137,138). Divers gènes candidats ont été identifiés et sont à l'étude (130,132,139,140) (Table 2).

Table 2: polymorphismes génétiques associés à la NAFLD et à sa progression

Variant	Gene	Function	Effect	Impact	MAF	Phenotype
rs738409 C>G	<i>PNPLA3</i>	Lipid droplets remodeling	p.I148M	loss	0.267	" NAFLD, NASH, fibrosis, HCC
rs58542926 C>T	<i>TM6SF2</i>	VLDL secretion	p.E167K	loss	0.067	" NAFLD, NASH, fibrosis
rs12137855 C>T	<i>LYPLAL1</i>	TGL catabolism	?	?	0.164	" NAFLD
rs780094 A>G	<i>GCKR</i>	Regulation of <i>de novo</i> lipogenesis	intronic p.P446L	?	0.302	" NAFLD, NASH, fibrosis
rs1260326 C>T					0.293	
Several	<i>APOB</i>	VLDL secretion	Protein change	loss	<0.0001	" NAFLD, NASH, fibrosis, HCC
Several	<i>MTTP</i>	VLDL secretion	Protein change	loss	<0.0001	" NAFLD
rs13412852 C>T	<i>LPIN1</i>	Regulation of lipid metabolism	Intronic	?	0.205	; NASH, fibrosis
rs4880 C>T	<i>SOD2</i>	Mitochondrial antioxidant	p.A16V	loss	0.411	" fibrosis
rs695366 G>A	<i>UCP2</i>	Mitochondrial lipid metabolism OxPhos	—866 promoter variant	gain	0.264	; NASH
rs1044498 A>C	<i>ENPP1</i>	Insulin signalling inhibitor	p.K121Q	gain	0.342	" fibrosis
rs1801278 A>C	<i>IRS1</i>	Insulin signalling	p.G972R	loss	0.053	" fibrosis
rs12979860 C>T	<i>IL28B</i>	Innate immunity	Alternative IFNL3/4 transcription	loss	0.356	; fibrosis
rs3750861 G>A	<i>KLF6</i>	Regulation of <i>de novo</i> lipogenesis; fibrogenesis	Splice variant IVS1-27G	loss	0.068	; fibrosis
rs4374383 G>A	<i>MERTK</i>	Innate immunity, HSCs activation	Non-coding; Linked with sequence regulated by IRF1	loss	0.36	; fibrosis
rs3480 A>G	<i>Irisin</i>	HSCs activation	Non-coding; reduced expression		0.41	; fibrosis

(Source: [Eslam M et al. J Hepatol. 2018](#))<sup>1</sup>

#### j. Epigénétique : la dysfonction mitochondriale

La mitochondrie joue un rôle central dans le métabolisme glucidique. C'est le principal site de l'oxydation des acides gras et de la phosphorylation oxydative. Le dysfonctionnement mitochondrial est désormais admis dans la pathogenèse de la NAFLD (*Figure 5*). Une diminution de la capacité des mitochondries à oxyder les acides gras et une augmentation de l'importation des acides gras libres (AGL) seraient les mécanismes mitochondriaux associés à la physiopathologie de la NAFLD (141–144).

<sup>1</sup>Gain: gain-of-function; HSCs: hepatic stellate cells; IVS: intervening sequence; Loss: loss-of-function; MAF: minor allele frequency; MTTP, microsomal triglyceride transfer protein; OxPhos: oxidative phosphorylation; TGL: triglycerides; VLDL: very low-density lipoproteins.

L'oxydation des acides gras dans le foie se fait principalement dans les situations de jeûne prolongé pour constituer une source alternative d'énergie pour les organes (143). Dans les conditions physiologiques, l'oxydation des acides gras se produit dans trois organites subcellulaires, la  $\beta$ -oxydation dans les mitochondries et les peroxysomes, et la  $\omega$ -oxydation dans le réticulum endoplasmique (143). La  $\beta$ -oxydation mitochondriale est la voie dominante pour l'élimination des acides gras dans les conditions physiologiques (143). L'oxydation mitochondriale du pyruvate et des acides gras se fait essentiellement dans la matrice. Le pyruvate issu de la glycolyse est transformé par les mitochondries en acétyl-CoA. Dans les états d'hyperglycémie, l'acétyl-CoA est converti en citrate dont une partie passe la matrice mitochondriale vers le cytosol où il régénère de l'acétyl-CoA qui va être converti en malonyl-CoA. Le malonyl-CoA joue un rôle important dans l'oxydation des acides gras hépatiques et la synthèse des lipides. A forte concentration, le malonyl-CoA favorise la synthèse hépatique des acides gras (stockage) et supprime leur oxydation (catabolisme). A l'inverse, à jeun, les niveaux hépatiques de malonyl-CoA sont faibles, et propices à une importation mitochondriale des AGLs et des taux élevés d'oxydation (143).

Des anomalies structurales seraient également responsables de l'incapacité des mitochondries à assurer correctement leurs fonctions (145–151). Les anomalies mitochondriales associées à la NAFLD comprennent des lésions et des déformations ultra-structurales, une déplétion de l'ADN mitochondrial (ADNmt), une activité réduite des complexes de la chaîne respiratoire essentielle dans la production d'énergie et des composés de polypeptides codées par l'ADN nucléaire et l'ADNmt (141–146,152–154).

L'ADNmt est situé dans la matrice mitochondriale et extrêmement sensible aux dommages oxydatifs en raison de sa proximité avec la membrane interne, de l'absence d'histones protectrices et de mécanismes de réparation incomplète de l'ADN dans la mitochondrie. D'autres anomalies structurales impliquant le TNF- $\alpha$  sont également décrites. Le TNF- $\alpha$  issue des hépatocytes et des cellules de Kupffer induit un gonflement mitochondrial avec une matrice plus légère et une perte de septa voire un éclatement de la membrane mitochondriale, entraînant une interférence entre les complexes CRM (Chaîne Respiratoire Mitochondriale) (145–151).

Le dysfonctionnement mitochondrial peut non seulement provoquer une accumulation de graisse, mais également conduire à la génération de ROS (« Reactive oxygen species ») et à la



production de cytokines contribuant à la progression de la NAFLD en induisant une inflammation et une fibrose hépatique (143,144). Les ROS sont des molécules chimiques hautement réactives formées en situation de stress oxydatif. Des sous-produits de la peroxydation lipidique des ROS, peuvent inhiber la cytochrome-c-oxydase mitochondriale et induire un épuisement de l'ADNmt qui peut réduire considérablement le nombre et la fonction des mitochondries et entraîner une stéatose et des lésions hépatiques (144,154).

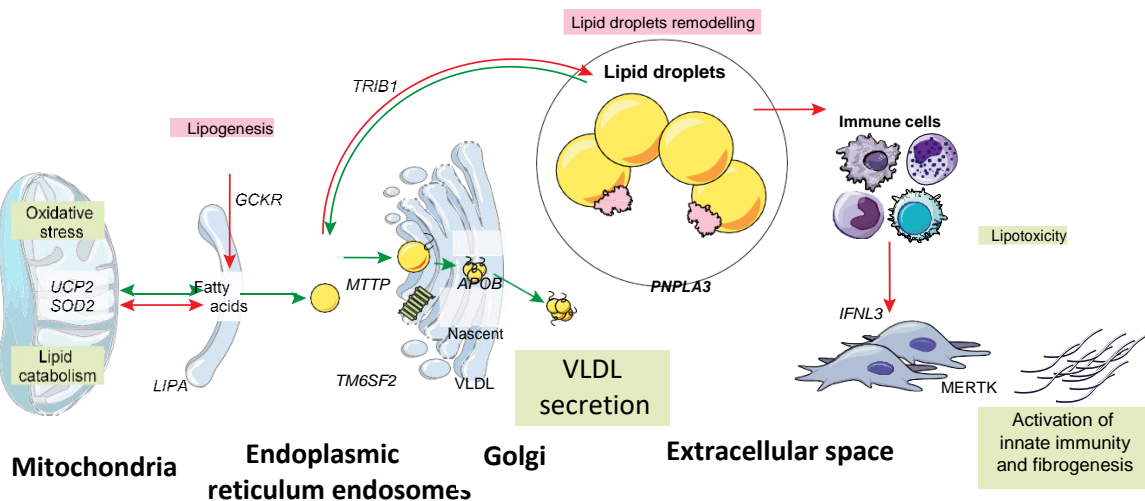


Figure 5: Principales voies impliquées dans la susceptibilité à la NAFLD et les polymorphismes génétiques fortement associés au développement et à la progression de la maladie. (Source : Eslam M et al. J Hepatol. 2018)<sup>2</sup>

#### k. Microbiote intestinal

Le rôle du microbiote dans la pathogénèse de la NAFLD a été progressivement exploré. La dysbiose désigne la perturbation du microbiote intestinal normal. Elle peut résulter de facteurs environnementaux, immunologiques ou de l'hôte ainsi que d'altérations du flux biliaire, du pH gastrique ou de la dysmotilité intestinale (155). Les études récentes suggèrent que la dysbiose joue un rôle non négligeable dans la pathogénèse et la sévérité de la NAFLD indépendamment du régime alimentaire, de l'indice de masse corporelle ou de l'insulino-résistance (156–165).

<sup>2</sup>Apolipoprotein B(APOB); Interferon Lambda 3 (IFNL3); Glucokinase Regulatory Gene (GSKR); Hepatic Stellate Cell (HSC); Lysosomal Acid Lipase (LIPA); Microsomal Triglyceride Transfer Protein (MTTP); Patatin-Like Phospholipase Domain-Containing Protein 3 (PNPLA3); Superoxide Dismutase 2 (SOD2); Transmembrane 6. Superfamily Member 2 (TM6SF2); Tribble-1(TRIB1); Uncoupling Protein 2 (UCP2); Very Low-Density Lipoprotein (VLDL).

La muqueuse intestinale est recouverte d'un mucus protecteur, véritable barrière qui assure une perméabilité sélective pour l'absorption des micronutriments issus de l'alimentation. Elle assure également un rôle fondamental de protection de l'organisme (passage dans la circulation générale) en assurant une étanchéité vis-à-vis des macromolécules alimentaires mal digérées et des organismes pathogènes comme les bactéries, les levures ou les parasites (155). Toute-fois, l'intégrité et/ou l'étanchéité de la barrière intestinale peuvent être compromises par une dysbiose menant à une altération du fonctionnement de l'axe intestin-foie. Il s'en suit une augmentation de la perméabilité intestinale. Cette hyperperméabilité va être à l'origine d'une translocation bactérienne, d'une absorption hépatique accrue des acides gras libres, des métabolites issus de la fermentation de fibres et d'hydrates de carbone dans le côlon et d'une altération du métabolisme des acides biliaires (166–168). Ceci aura pour corolaire la perturbation du métabolisme des lipides hépatiques et une augmentation de l'exposition hépatique aux substances nocives qui augmentent l'inflammation et la fibrose hépatiques (166–168).

Alors qu'il est question de stéato-hépatite non alcoolique (non lié à la consommation à risque d'alcool), certaines études suggèrent que la dysbiose peut s'accompagner d'une production endogène d'éthanol, pouvant contribuer également à l'apparition de la NAFLD en dehors même de toute consommation d'alcool (169).

Dans ce cadre, des études utilisant des antibiotiques, une transplantation de flore, des prébiotiques ou probiotiques, avec des résultats préliminaires très encourageants ont été évalués dans le traitement de la NAFLD/NASH (170).

## **II.Pathogenèse**

La pathogenèse de la NAFLD paraît complexe et n'est pas encore complètement élucidée. Elle implique un déséquilibre entre un afflux important d'acides gras issus de l'alimentation, un déséquilibre de l'axe intestin-foie lié à la dysbiose, la lipolyse des tissus graisseux, la lipogenèse hépatique, et une diminution de l'élimination et de l'oxydation des acides gras. Ce déséquilibre va s'accompagner d'une épargne puis d'une accumulation de lipides sous forme de triglycérides au niveau des hépatocytes suivi dans un deuxième temps, d'une inflammation puis de la fibrose en lien avec un afflux de cytokines (TNF- $\alpha$ , IL6, IL-8, IL1 $\beta$ ) et une augmentation du stress oxydatif (53,54). L'accumulation de triglycérides intrahépatiques va

interférer avec les voies de signalisation intracellulaires de l'insuline et provoquer une résistance à l'insuline et l'effet freinateur de l'insuline sur la production hépatique de glucose et de triglycérides (85,86).

Un autre mécanisme physiopathologique observé dans la NAFLD est la dérégulation de la biogenèse et du fonctionnement de la capacité oxydative des mitochondries participant au développement de la résistance à l'insuline et la stéatogénèse hépatique (84,171,172). La figure ci-dessous (Figure 6) décrit les grandes lignes du processus physiopathologique de la NAFLD.

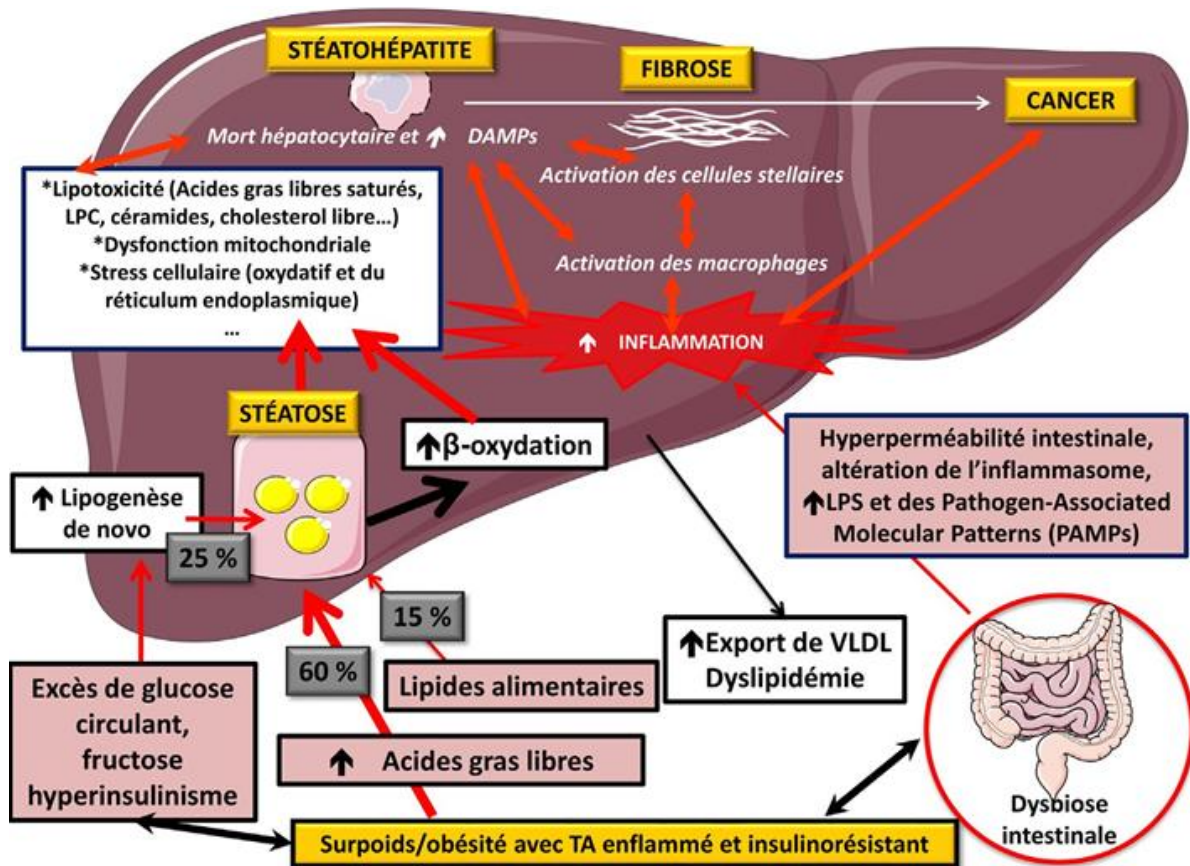


Figure 6: Représentation schématique de l'apparition d'une stéatose et d'une stéatohépatite métabolique (NASH)

(Source : Anty R et al. La Presse Médicale.2019)<sup>3</sup>

<sup>3</sup>La majorité (60%) des lipides hépatiques est issue du flux des acides gras venant d'un relargage du tissu adipeux sous-cutané. Les autres lipides viendraient de l'apport alimentaire sous forme de chylomicrons (15%) et de la lipogenèse 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 ainsi que l'export des VLDL. 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 mécanismes de défenses des anti-oxydants sont dépassés 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 *danger-associated molecular*

### III. Diagnostic et surveillance

#### 1. Circonstances de découverte

Dans la grande majorité des cas, la NAFLD est de découverte fortuite à l'imagerie et/ou au cours d'une cytolyse chronique ou une hyperferritinémie dans un contexte dysmétabolique (obésité, diabète) et d'insulino-résistance (16). En pareilles circonstances, le diagnostic de NAFLD impose au préalable d'éliminer les causes secondaires de stéatose et les autres causes d'hépatopathies chroniques (maladie alcoolique du foie, hépatites virales chroniques, hémochromatose, hépatites auto-immunes...)(16). Cependant la NAFLD peut coexister ou aggraver d'autres maladies chroniques du foie(16,23,24,173).

Bien que la NAFLD soit définie comme un diagnostic d'exclusion, l'EASL et la American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) recommandent de la rechercher chez tout patient ayant une élévation persistante des enzymes hépatiques car elle en est la principale cause, et d'évaluer également les facteurs de risque métaboliques et leur sévérité (syndrome métabolique, obésité, diabète, dyslipidémie ou insulino-résistance) (16,21). Une ferritine sérique légèrement élevée (<1000 µg/l) avec le plus souvent un coefficient de saturation de la transferrine <45% est fréquente chez les personnes atteintes de NAFLD avec un impact sur la progression de la maladie (174). Il impose donc la recherche et l'élimination des autres causes d'hyperferritinémie secondaire (alcoolisme chronique, syndrome inflammatoire, hyperthyroïdie, cancers, hémopathies, hémolyse, myolyse) (174,175). Dans tous les cas, chez un patient suspecté d'être atteint de NAFLD, une biopsie du foie doit être envisagée.

#### 2. Diagnostic

##### a. Histologie de la ponction-biopsie hépatique

L'examen anatomo-pathologique de la ponction-biopsie hépatique reste la méthode de référence pour le diagnostic et l'évaluation histopathologique de la NAFLD (16,176). Les objectifs de l'évaluation histopathologique de la biopsie hépatique chez une personne suspectée d'atteinte par NAFLD comprennent la confirmation ou l'exclusion du diagnostic,

---

*patterns* (DAMPs) 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 macrophages résidents du foie peuvent également être activés par les *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) 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 participeraient à la carcinogénèse

l'évaluation de sa sévérité et la classification nosologique (NAFL, NASH, fibrose, cirrhose) (16,176). Selon la norme de la NASH Clinical Research Network (NASH CRN) (19,177), le rapport histopathologique d'une ponction biopsie hépatique pour l'évaluation de la NAFLD devrait au moins comporter le grade histologique (nécro-inflammatoire, « activité ») et le stade, l'emplacement du dépôt de collagène et le remodelage architectural. Il doit en outre fournir pour la NAFLD les catégories diagnostiques suivantes: pas de NAFLD (stéatose <5%); NAFL mais pas de NASH (stéatose ≥5%, avec ou sans inflammation lobulaire et portale); stéatohépatite borderline zone 3 ou stéatohépatite borderline zone 1 (la plupart, mais pas tous les critères de Stéatohépatite, sont présents, avec une accentuation de la stéatose ou des lésions dans la zone 3 ou la zone 1, respectivement); stéatohépatite certaine (tous les critères sont présents, y compris la stéatose, le ballonnement hépatocellulaire et l'inflammation lobulaire). N'importe laquelle de ces catégories diagnostiques pouvant contenir tout le spectre de la fibrose (absence de fibrose à une fibrose avancée voire la cirrhose). Quant à la fibrose, elle doit être classifiée en cinq stades : F0 (absente), F1 (péri-sinusoïdale ou portale/péri-portale), F2 (péri-sinusoïdale et portale/péri-portale), F3 (septa fibreux) et F4 (cirrhose) (15). La fibrose hépatique avancée est définie par un stade de fibrose F3/4 (19,177). Il existe une autre classification la « Steatosis Activity Fibrosis (SAF) » proposée par la « European Fatty Liver Inhibition of Progression Consortium » que nous n'allons pas détailler ici. Cette classification utilise les mêmes lésions histologiques avec des critères et des objectifs différents (178,179).

La biopsie est un examen invasif, coûteux et nécessite une expertise pour l'interprétation. De ce fait et compte-tenu de la prévalence très élevée de la maladie, la biopsie hépatique ne peut être préconisée en première ligne pour le dépistage ou le diagnostic en population générale (16,176). Elle doit par conséquent être réservée aux patients à risque de formes graves de la maladie. L'AASLD recommande à cet effet que la biopsie hépatique soit réservée aux patients qui présentent un risque accru de NASH et/ou de fibrose avancée et envisagée chez les patients suspectés de NAFLD chez qui les étiologies concurrentes de la NAFLD et la présence et/ou la gravité des autres maladies chroniques du foie coexistantes ne peuvent être exclues sans une biopsie hépatique (176). Des tests diagnostiques (marqueurs non-invasifs) et d'imagerie ont par conséquent été largement développés pour palier la biopsie.

## b. Tests non-invasifs

Les anomalies des enzymes sériques hépatiques sont le plus souvent le premier indice clinique de la maladie chronique du foie (37,180). La NAFLD représente près de 75% des MCF (2,3) et la principale cause de l'élévation des enzymes hépatiques (37,181–185). Les personnes atteintes de NAFLD ont classiquement une fonction hépatique légèrement ou modérément altérées (>5N)<sup>4</sup> avec un rapport ASAT sur ALAT <1 (180,184). Cependant, un taux normal de transaminases peut coexister avec des formes sévères de NAFLD (37,184–187). En effet, 80% des patients atteints de NAFLD ont un taux de transaminases normal et tout le spectre de la maladie peut survenir chez un patient avec un bilan hépatique normal (37,184–187). De ce fait, les tests de la fonction hépatique comme marqueurs diagnostiques ont rapidement été abandonnés pour le diagnostic de la NAFLD du fait de leur manque de sensibilité mais conservent un intérêt dans l'évaluation de la sévérité de la maladie chez les patients déjà diagnostiqués (125,188). Des combinaisons de biomarqueurs ont ensuite été évaluées avec des performances diagnostiques acceptables en comparaison directe avec l'histologie ou l'échographie hépatique (189) (*Table 3*).

L'index du foie gras ou « Fatty Liver Index » (FLI) est le score le plus performant (aire sous la courbe ROC ou Area Under the Curve, AUC =84%, au seuil FLI ≥60) et validé dans le diagnostic de la NAFLD en population générale (190). Il combine l'indice de masse corporelle (IMC), le tour de taille, les taux sériques de triglycérides et de gamma-glutamyltransférase (GGT). Le NAFLD Liver Fat Score (NAFLD LFS) est un des biomarqueurs qui a montré une précision diagnostique assez satisfaisante (AUC =64%) (191). En revanche, la présence du taux d'insuline sérique dans son calcul limite son utilisation, par le fait que son dosage n'est pas pratiqué en routine (192). L'index de stéatose hépatique (Hepatic Steatose Index (HSI)) a été validé avec des performances acceptables (193) mais semble moins bien fonctionner chez les personnes atteintes de diabète (192). Le Visceral adiposity index (VAI) (194) et le Triglyceride/Glucose Index (TGI) (195) sont deux autres biomarqueurs simples de réalisation avec de bonnes performances diagnostiques mais non encore validés pour le diagnostic en routine de la NAFLD. Le dosage des fragments circulants de la cytokératine 18 (CK18) (196) a été également proposé comme une alternative diagnostique (AUC =77%). Il reste très peu utilisé pour deux raisons principalement : sa performance est moindre que le FLI et ces fragments ne sont pas

---

<sup>4</sup> Supérieur à 5 fois la valeur normale

dosés en routine. Malgré leurs capacités diagnostiques satisfaisantes, ces tests ne permettent ni la quantification de la stéatose ni l'évaluation de la sévérité de la maladie (NAFL, NASH, fibrose ou cirrhose).

Le SteatoTest-2 (Biopredictive, Paris, France) (197) et le NASHTest-2 sont deux alternatives (commerciales) dérivées du FibroTest-ActiTest (Biopredictive) (198). Ils résultent d'une combinaison des composants du FibroTest (GGT, cholestérol total, alpha-2-macroglobuline, haptoglobine, ALAT, apolipoprotéine A1, triglycérides, glycémie, âge, sexe). Malgré leurs performances satisfaisantes, ils ne sont pas encore utilisés en routine en population générale. Ces méthodes, bien que non recommandés en première ligne en pratique clinique de routine(199), sont une alternative intéressante à la biopsie hépatique et peuvent être utiles comme méthode diagnostique à grande échelle à côté des techniques d'imagerie qui se sont révélées plus prometteuses.

Table 3: Marqueurs non-invasifs du diagnostic de la NAFLD et de la fibrose avancée

Diagnostic de la NAFLD	Formules	Sensibilité	Spécificité	AUC
<b>Fatty liver index (FLI) (190)</b>	$\frac{(e^{0.953 \times \log(\text{triglycerides}) + 0.139 \times \text{BMI} + 0.718 \times \log(\text{GGT}) + 0.053 \times \text{waist circumference} - 15.745})}{(1 + e^{0.953 \times \log(\text{triglycerides}) + 0.139 \times \text{BMI} + 0.718 \times \log(\text{GGT}) + 0.053 \times \text{waist circumference} - 15.745})} \times 100.$	61	86	84
<b>NAFLD liver fat score (NAFLD LFS) (191)</b>	$-2.89 + 1.18 \times \text{metabolic syndrome (yes = 1/no = 0)} + 0.45 \times \text{type 2 diabetes (yes = 2/no = 0)} + 0.15 \times \text{insulin (mU/L)} + 0.04 \times \text{AST(U/L)} - 0.94 \times \text{AST/ALT}$	86.0	71.0	86.0
<b>Visceral adiposity index (VAI) (194)</b>	Male: $[\text{WC}/39.68 + (1.88 \times \text{BMI})] \times (\text{triglycerides}/1.03) \times (1.31/\text{HDL}$ Female: $[\text{WC}/36.58 + (1.89 \times \text{BMI})] \times (\text{triglycerides}/0.81) \times (1.52/\text{HDL}$	79.0	92.0	92.0
<b>Triglyceride/glucose index(TyGI) (195)</b>	$\text{Log (fasting triglycerides [mg/dL]} \times \text{fasting glucose [mg/dL]}/2)$	96.5	95.0	85.8
<b>Hepatic steatosis index (HIS) (193)</b>	$8 \times (\text{ALT/AST ratio}) + \text{BMI (+2, if female; +2, if diabetes mellitus)}$	91.1	92.4	81.2
<b>Circulating keratin 18 (CK18) (196)</b>	CK18 fragments, measured by M30, M65, M65ED ELISA kit	83	63	77
<b>SteatoTest-2 (Biopredictive, Paris, France) (197)</b>	GGT, cholestérol total, alfa-macroglobuline, haptoglobine, ALT et apolipoprotéine AI taux sériques de, de triglycérides la glycémie l'âge et le sexe	-	-	86.8
<b>Diagnostique de la fibrose</b>		VPP	VPN	AUC
<b>FIB-4 (200,201)</b>	$(\text{Age} \times \text{AST})/(\text{Platelets} \times \log [\text{ALT}])$	51	88.0	80
<b>NAFLD fibrosis score (NFS) (201,202)</b>	$-1.675 + (0.037 \times \text{age [y]}) + (0.094 \times \text{BMI [kg/m}^2]) + (1.13 \times \text{IFG/diabetes [yes = 1, no = 0]}) + (0.99 \times \text{AST/ALT ratio}) - (0.013 \times \text{platelet count [}\times 10^9/\text{L]}) - (0.66 \times \text{albumin [g/dL]})$	51	86	78
<b>BARD score(203)</b>	BMI $\geq 28$ : No = 0, Yes = 1; AST/ALT ratio: $\geq 0.8$ No = 0, Yes = 2; and Diabetes: No = 0, Yes = 1	43	96	81
<b>AST/ALT ratio (201,204)</b>	$\text{AST (IU/L)}/\text{ALT (IU/L)}$	44	80	68



<b>BAAT (205)</b>	AST/ALT ratio: $\geq 0.8 = 2$ points; a BMI: $\geq 28 = 1$ point; and the presence of diabetes: 1 point	-	90	62
<b>APRI (201,206,207)</b>	(AST in IU/L) / (AST Upper Limit of Normal in IU/L) / (Platelets in 109/L)	46	87	76
<b>Forns Index (FI) (208)</b>	$7.811 - 3.131 \times \ln(\text{platelet count}) + 0.781 \times \ln(\text{GGT}) + 3.467 \times \ln(\text{Age}) + 0.014 \times \text{Cholesterol}$	65	90	79
<b>Forns Index(209)</b>		9	99	99
<b>Marqueurs biologiques</b>				
<b>Enhanced liver fibrosis test (ELF)(210)</b>	Le ELF est un panel qui mesure les sous-produits du processus fibrotique qui incluent l'inhibiteur tissulaire de la métalloprotéinase matricielle 1 (TIMP1), l'acide hyaluronique et le peptide aminoterminal du pro-collagène III (PIIINP)	71	94	90
<b>Circulating keratin 18 (CK18) (196)</b>	CK18 fragments, measured by M30, M65, M65ED ELISA kit	83	56	68
<b>Type III procollagen (PRO-C3) (211)</b>	Plasma PRO-C3 levels	74	88	89
<b>Age, diabetes, PRO-C3 and platelet count (ADAPT) (212)</b>	$\exp\left(\log_{10}\left(\frac{\text{Age} * \text{PRO} - \text{C3}}{\sqrt{\text{Platelets}}}\right)\right) + \text{Diabetes}^5$	97	48	86
<b>AGILE 3+ Score(213)</b>	Combinaison du rapport ASAT/ALAT, de la numération plaquettaire, du statut diabétique, du sexe, de l'âge et de la mesure de la rigidité hépatique par élastographie transitoire			88
<b>FibroTest® (214,215)</b>	Test $\alpha 2$ -macroglobulin, apolipoprotein A1, haptoglobin, total bilirubin and $\gamma$ -glutamyl transpeptidase (GGT)	-	98	92
<b>SteatoTest-2(197)</b>	GGT, cholestérol total, alfa-macroglobuline, haptoglobine, ALT et apolipoprotéine A1 taux sériques de, de triglycérides la glycémie l'âge et le sexe			81
<b>NashTest-2 (215)</b>	Alpha-2 macroglobuline, Haptoglobine, Apolipoprotéine A1, Bilirubine Totale, GGT, ALAT, ASAT, Cholesterol, Triglycérides, Glucose, âge et sexe	-	-	60
<b>Hepascore (216)</b>	panel incorporate age and gender, including bilirubin, GGT, hyaluronic acid and $\alpha 2$ -macroglobulin	57	92	80
<b>FibroMeter(217)</b>	serum-based panel that integrates glucose, AST, ALT, ferritin, platelet, body weight and age	88	92	94

<sup>5</sup> Présence du diabète = 1 sinon 0

---

<b>Vibration-controlled transient elastography (VCTE) (218)</b>	59	89	83
---	----	----	----

---

AUC : Area Under the ROC Curve ; VPP : Valeur Prédicative Positive ; VPN : Valeur Prédicative Négative

### c. Imagerie médicale

En raison des limites inhérentes à la biopsie dans le diagnostic de la NAFLD, les techniques d'imagerie ont été largement évaluées et intégrées comme alternatives non-invasives pour le diagnostic et l'évaluation de la stéatose hépatique(70,219) (Table 4). L'échographie, la tomodensitométrie (TDM), l'imagerie par résonance magnétique (IRM), l'élastographie et la spectroscopie ont été validées dans le diagnostic de la NAFLD. Bien que leurs performances restent sous-optimales comparées à la biopsie, elles ont, tout comme les biomarqueurs l'avantage d'être disponibles, relativement accessibles et moins invasives.

L'échographie est la technique de première intention dans le diagnostic de la NAFLD chez les patients présentant une perturbation de la fonction hépatique avec une sensibilité de 60% et une spécificité de 80% (199,220–225). Elle a l'avantage d'être sans rayonnements ionisants, disponible et accessible (226,227). Cependant, en plus d'être opérateur-dépendant, l'échographie a un intérêt diagnostique limité lorsque la stéatose est inférieure à 20% (228,229) et plus particulièrement chez les personnes en situation d'obésité, surtout quand il s'agit de distinguer les différents grades du spectre de la NAFLD (220,221,230–233).

La sonoélastographie ou « Transient Elastography » (FibroScan, EchoSens, Paris, France) permet mesurer la rigidité du foie (234–236). C'est l'une des rares méthodes d'imagerie capable de déterminer et de caractériser la stéatose et la fibrose hépatiques, bien qu'également opérateur-dépendante et d'intérêt limité chez les personnes en situation d'obésité (234–236). La tomodensitométrie a cette particularité d'être capable de faire la distinction entre une stéatose modérée et sévère avec une spécificité de 100% et une sensibilité de 82% mais a l'inconvénient d'être irradiante (237).

L'imagerie par résonance magnétique est une technique basée sur le champ magnétique qui a l'avantage d'être non invasive et exempte de dangers potentiels liés aux rayonnements ionisants avec une évaluation quantitative précise de la stéatose hépatique, mais elle est encore relativement coûteuse et prend beaucoup de temps (199,238–241).

Plus récemment, il a été suggéré que la combinaison entre l'élastographie par résonance magnétique et le FIB-4 avait une excellente valeur prédictive négative pour le diagnostic de la décompensation hépatique(242).

La diversité de méthodes non invasives est une des avancées majeures dans la prise en charge de la NAFLD. Il n’y a cependant, à ce jour, aucune recommandation formelle des sociétés savantes sur la méthode à privilégier en cas de suspicion de NAFLD. Cependant, compte tenu des implications de chaque méthode, le choix de la méthode doit être guidé par la balance bénéfice-risque et adapté à chaque patient.

*Table 4: Méthodes d’imagerie médicale et leurs disponibilité et accessibilité pour l’évaluation de la stéatose hépatique*

Technique	Disponibilité	Risque patient	Durée de la procédure	Difficulté opératoire	Coût de la procédure	Précision dans la détermination de la teneur en lipides hépatiques	Reproductibilité
US	High	None	Low	Low	Low	Low to mild hepatosteatosis	Fair
CT	High	Possible radiation hazard	Fair	Low	Fair	Low to mild hepatosteatosis	Fair
MRI	Fair	None	High	Fair	High	High	High
MRS	Low	None	High	High	High	High	High

US: ultrasonography, CT: computed tomography, MRI: magnetic resonance imaging, MRS: magnetic resonance spectroscopy

(Source : Lăpădat AM et al. *Journal of Medicine and Life*. 2017)

### 3. Évaluation de la sévérité de l’atteinte hépatique

La NAFLD couvre un large spectre lésionnel dont la fibrose hépatique. Le pronostic de la NAFLD (morbi-mortalité hépatique et extra-hépatique) (243) est particulièrement lié à la fibrose avancée (F3/F4 de la classification du NASH CRN) (19). L’histologie hépatique est la méthode de référence pour l’évaluation de la sévérité de l’atteinte hépatique. Cependant, du fait des limites (décrites plus haut), les tests sanguins (*Table 3*) et le Fibroscan ont été jugés acceptables et recommandés par l’EASL pour l’évaluation de la fibrose avancée et de la cirrhose (244).

Comparés à l’histologie hépatique, la NAFLD Fibrosis Score (NFS) et le Fibrosis-4 index (FIB-4) et les deux tests sanguins simples les plus validés dans la NAFLD pour le diagnostic de la fibrose (199). Leurs performances diagnostiques de la fibrose sont acceptables par rapport aux autres tests tels que le BARD, l’APRI et le rapport AST/ALT (16,208,209,245,246). Le Forns Index (voire infra), initialement développé dans le contexte de l’infection par le virus de

l'hépatite C, à montré récemment de bonnes performances pour diagnostiques dans la NAFLD (208,209).

Le AGILE 3+, un score développé récemment et basé sur la combinaison du rapport aspartate aminotransférase/alanine aminotransférase, de la numération plaquettaire, du statut diabétique, du sexe, de l'âge et de la mesure de la rigidité hépatique par élastographie, a montré des performances acceptables pour le diagnostic de la fibrose avancée et pour la prédiction de la survenue d'événements hépatiques chez les patients souffrant de NAFLD (213).

Le Fibrotest, le FibroMètre, l'ELF et l'Hepascore sont des tests spécialisés brevetés et payants en ligne validés par les sociétés savantes dans la NAFLD(199). Le FibroScan (EchoSens, Paris, France) avec une valeur prédictive positive de 67% (247) est la seule méthode d'imagerie recommandée à ce jour dans l'évaluation de la fibrose chez le patient souffrant de NAFLD.

L'EASL propose une confirmation du diagnostic de fibrose avancée et de la cirrhose par une biopsie hépatique ou par une combinaison de tests sanguins en fonction du contexte clinique chez les patients avec des tests sanguins positifs (199) (Figure 7). Il préconise en outre la confirmation du diagnostic par Elastographie et/ou par des tests sériques brevetés chez les patients avec un FIB-4 supérieur à 1,3.

Si un consensus sur l'approche diagnostique semble se dégager, il n'existe pas de données solides permettant d'établir un rythme de suivi des patients souffrant de NAFLD une fois le diagnostic posé.

A côté de ces moyens de diagnostic « classiques », l'intelligence artificielle, semble une option d'avenir dans le diagnostic de la NAFLD (248–250).

## Primary care/diabetology clinic

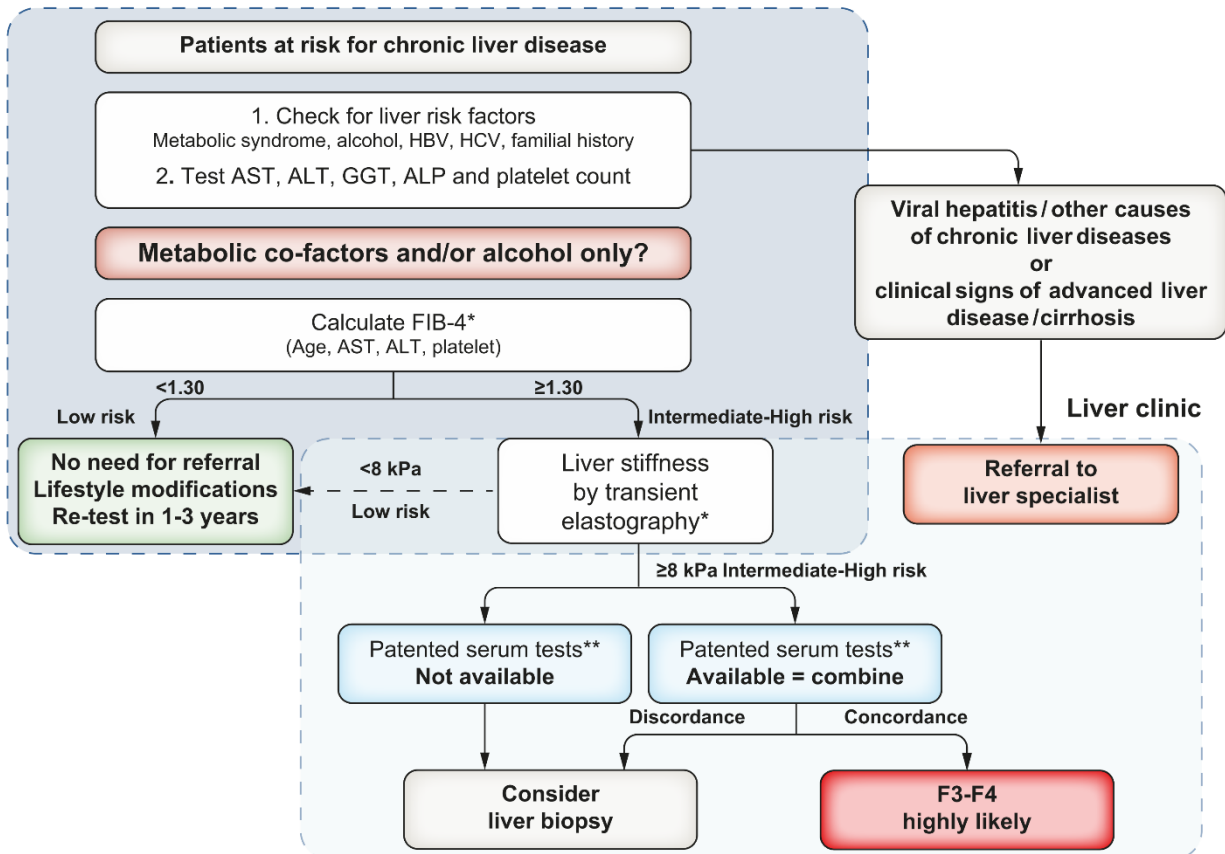


Figure 7 : Algorithme pour le dépistage de la fibrose en soins de santé primaire et hors des services d'hépatologie<sup>6</sup>

(Source : European Association for the Study of the Liver, Journal of Hepatology 2021)

## 4. Surveillance et dépistage

### a. Surveillance hépatique

La NAFLD a une évolution lente. Le pronostic est essentiellement lié à la fibrose hépatique (243). Il est donc nécessaire d'établir des règles pratiques adaptées au profil évolutif de la maladie et éviter en conséquence la répétition d'évaluations inutiles et par ailleurs coûteuses(16). L'EASL propose une surveillance personnalisée basée sur les cofacteurs, les comorbidités et le stade de la maladie par des méthodes non-invasives selon le rythme suivant : tous les deux-trois ans pour les patients ayant une NAFL sans facteur de risque de progression

<sup>6</sup> Proposed use of NITs in patients observed in primary care or outside the liver clinic. As shown, FIB-4 can be used in patients with metabolic co-factors and/or alcoholic liver disease to identify patients requiring referral to the specialist liver clinic. \*Transient elastography or FIB-4 may be performed before or after referral to liver specialist according to local availability and pathways. \*\*Cut-offs to use: ELFTM 9.8 (NAFLD/ALD); FibroMeter 0.45 (NAFLD), Fibrotest 0.48 (NAFLD). ALD, alcohol-related liver disease; ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; ELF, enhanced liver fibrosis; FIB-4, fibrosis-4; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease.

(âge >50 ans, diabète de type 2, syndrome métabolique, hypertension artérielle, cytolysé hépatique), tous les ans pour les patients avec une NASH et/ou une fibrose et de façon semestrielle pour les patients cirrhotiques (16,251) (Table 5). A noter que le dépistage du carcinome hépatocellulaire n'est pas recommandé chez les patients non-cirrhotiques (16).

Table 5: Rythme de surveillance de la NAFLD selon l'EASL

Stade de fibrose évalué par les tests non-invasifs	Facteur de risque de progression de la fibrose hépatique <sup>7</sup>	Rythme de surveillance
F0-F1	Non	Tous les 3 ans
	Oui	Tous les 2 ans
F2	Non	Tous les 1-2 ans
	Oui	Annuel
F3	Oui	Annuel
F4	Oui	Semestriel

(Source : Guha IN et al. *Hepatology*. 2008)

#### b. Surveillance extra-hépatique

Les accidents cardiovasculaires représentent la première cause de morbi-mortalité liée à la NAFLD devant les cancers extra-hépatiques. Les complications hépatiques (cirrhose, carcinome hépatocellulaire) n'occupant que la troisième place (5,18,64,252,253). Les causes de morbi-mortalité diffèrent selon le stade de fibrose. En effet, contrairement aux complications hépatiques majoritaires chez les personnes atteintes de cirrhose, les événements cardiovasculaires et les cancers extra-hépatiques sont les complications majoritaires chez les patients sans cirrhose (254). La NAFLD augmente le risque de diabète de type 2. Inversement la présence d'un diabète de type 2 aggrave le risque de fibrose chez les patients asouffrant de NAFLD (7,63,64,74). L'EASL recommande une évaluation du risque cardiovasculaire et un dépistage du diabète de type 2 chez les personnes atteintes de NAFLD (16).

### 5. Dépistage systématique

La prévalence et le risque évolutif de la NAFLD sont particulièrement associés à des profils cliniques dits à haut risque (diabète, obésité). Des cas d'agrégation familiale (avec plus de 18% de patients avec au moins un parent au premier degré affecté par la NAFLD) ont été rapportés

<sup>7</sup>Âge > 50 ans, diabète de type 2, syndrome métabolique, élévation des transaminases, activité nécroto-inflammatoire importante.

(126,127). On pourrait dès lors faire valoir le principe d'un dépistage systématique dans les familles des personnes atteintes de la NAFLD tout comme dans les groupes dits à haut risque. Cependant, le bénéfice éventuel du dépistage systématique n'est pas démontré. Des données récentes issues de modèles de Markov ne suggèrent par exemple aucun bénéfice au dépistage systématique, même dans les groupes dits à haut risque (255,256). Le dépistage systématique n'est donc pas recommandé en raison des performances sous-optimales des tests de diagnostic, de l'absence de traitement, ainsi que du manque de connaissances sur ses bénéfices à long terme (16). Cependant, chez les personnes atteintes du diabète cumulant d'autres facteurs de risque ou des arguments cliniques en faveur de la NAFLD ou de la NASH, le NFS ou le FIB-4 pourraient être utilisés pour identifier les patients avec ou sans fibrose avancée (176).

#### **IV.Histoire naturelle**

La NAFLD est une maladie multi-systémique à progression globalement lente et dont l'histoire naturelle reste encore mal connue. Elle évolue vers une stéatohépatite non alcoolique (NASH) dans 20 à 30% des cas (3,9). On estime qu'environ 10% des patients atteints de NASH présentent une fibrose au diagnostic (30,31). La NASH représente la forme agressive de la maladie avec un risque plus élevé de progression vers les complications hépatiques. En effet, les séquelles de cicatrisation de la NASH peuvent aboutir à de la fibrose qui peut par la suite progresser vers la cirrhose ou le carcinome hépatocellulaire (3,79,257,258) (*Figure 1*). Le taux de progression vers la fibrose hépatique est estimé à un stade tous les 14 ans chez les patients au stade de NAFL et tous les 7 ans chez les patients au stade de NASH (79). Le taux d'incidence annuel de la fibrose chez les patients atteints de la NASH est estimé à 0,09% et celui du cancer du foie chez les personnes atteintes de NAFLD à 0,44 pour 1000 personnes-années (3). Younossi et al. ont montré dans une étude chez des patients atteints de CHC que 54,9% des cas de CHC étaient liés au VHC, 16,4% à la maladie alcoolique du foie, 14,1% à la NAFLD et 9,5% au virus de l'hépatite B (VHB) (259). Cependant, l'avènement des antiviraux directs et la progression du diabète dans le monde semblent radicalement inverser cette tendance. La NAFLD est dès lors, en passe de devenir la première indication de transplantation hépatique et de carcinome hépatocellulaire (5,8,18).

La mortalité globale due à la NAFLD en 2015 était estimée à 1,27 millions dont 13% par MCV et 2,2% (soit 28 000 patients) par complications hépatiques avec une augmentation constante



attendue (33). On estime à 0,77 pour 1000 personnes-années et 11,77 pour 1000 personnes-années la mortalité spécifique et globale liée à la NAFLD. Les risques relatifs d'incidence quant à eux étaient estimés respectivement à 1,94 et 1,05. Chez les patients au stade de NASH, les taux de mortalité spécifique et globale sont évalués à 15,44 et 25,56 pour 1000 personnes-années, respectivement (3). Cependant, on a très peu de données sur le fardeau de la NAFLD sur la morbi-mortalité en population générale en vie réelle.

## **B. Deuxième partie : Impact de la Stéato-hépatite Non Alcoolique sur la Morbi-mortalité en Population Générale Française (Etude NASHCO)**

### **I.Contexte**

L'épidémiologie de la NAFLD augmente avec celle du diabète et de l'obésité dans le monde. Alors qu'on observe une forte progression de la prévalence du diabète et de l'obésité en Europe, et bien que la NAFLD soit devenue l'une des premières causes des maladies chroniques du foie dans le monde et la deuxième cause de transplantation hépatique, aucune donnée fiable sur l'épidémiologie et le fardeau de la NAFLD sur la morbi-mortalité n'est disponible en population générale en Europe et en France en particulier.

### **II.Objectifs de la thèse**

Le but de cette thèse est d'évaluer, à l'aide de marqueurs non-invasifs simples, l'impact de la stéatose métabolique (NAFLD) sur la morbi-mortalité dans la population générale en France en s'appuyant sur les données de la cohorte Constances qui est un échantillon visant à la représentativité de la population française. Les objectifs étaient i) d'estimer la prévalence et les facteurs de risque de stéatose métabolique et de fibrose hépatique ; ii) d'analyser le fardeau de la NAFLD sur la morbi-mortalité globale, la morbi-mortalité hépatique, cardiovasculaire, par cancer et par insuffisance rénale chronique dans la population générale.

Pour atteindre nos objectifs, nous avons procédé dans un premier temps (chapitre I : analyse transversale), sur la base des données à l'inclusion, à l'évaluation de la prévalence et des comorbidités associés à la NAFLD en population générale, puis dans un second temps (Chapitre II : étude prospectives) à partir des données de suivi, à l'évaluation de la morbi-mortalité liée à la NAFLD en population générale.

### III.Méthodes

#### 1. La Cohorte Constances

Constances (« Cohorte des Consultants des Centres d'Examens de Santé ») est une vaste cohorte épidémiologique prospective « généraliste » constituée d'un échantillon visant à la représentativité de la population générale française âgée de 18 à 69 ans à l'inclusion (260,261). Cette cohorte, labellisée « Infrastructure nationale en biologie et santé » par le programme Investissements d'avenir, est réalisée dans le cadre d'un partenariat avec la Caisse nationale d'assurance maladie des travailleurs salariés (Cnam), la Caisse nationale d'assurance vieillesse (Cnav), l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), l'Université de Paris Cité, l'Université de Versailles Saint-Quentin et la Direction générale de la santé (262–264). C'est une cohorte prospective à usage généraliste, caractérisée par une large couverture des problèmes et déterminants de santé et destinée à servir d'infrastructure de recherche épidémiologique ouverte et accessible à la communauté scientifique pour mener des projets ancillaires sur une variété de questions de recherche. C'est un échantillon représentatif de la population générale française pour le sexe, l'âge et la catégorie sociale. Elle est constituée de volontaires tirés au sort dans le Répertoire national inter-régimes de l'assurance-maladie (RNIAM), constituée de l'ensemble des assurés sociaux. La sélection des participants se fait par échantillonnage aléatoire probabiliste et stratifié (sur le lieu de résidence, l'âge, le sexe, la profession et le statut socio-économique) parmi les affiliés de la Cnam actifs et inactifs, au chômage ou retraités âgés de 18 à 69 ans à l'invitation et résidant dans l'un des 21 départements (situés dans différentes régions de France métropolitaine) dont le Centre d'examen de santé (CES) de la sécurité sociale participe au projet Constances (Figure 8). Sont inclus dans Constances les affiliés au Régime Général (RG) de l'Assurance maladie, de la Caisse d'assurance maladie des industries électriques et gazières (Camieg), l'union des Mutuelles issues des Fonctions publiques d'État, Territoriale et Hospitalière (MFP Services) ou la Mutuelle générale de l'éducation nationale (MGEN), des mutuelles étudiantes. La structure de la population des départements d'inclusion a été vérifiée et est identique à celle de l'ensemble des départements de la France métropolitaine (260). Le domaine couvert, (qui exclut les affiliés aux régimes agricoles et des indépendants) représente plus de 85% de la population française (261,264). Deux cohortes complémentaires de volontaires affiliés à la Mutualité sociale agricole (MSA) et au Régime social des indépendants (RSI) sont par ailleurs

mises en place par Santé publique France en coordination avec Constances (<http://www.coset.fr>).

Les personnes tirées au sort reçoivent à domicile un courrier et un coupon-réponse permettant de donner leur accord pour participer à la cohorte. Les personnes ayant donné leur accord sont invitées à remplir des questionnaires auto-administrés (relatifs à leurs caractéristiques sociodémographiques, professionnelles, économiques, leurs habitudes et modes de vie) et invités à se rendre dans les CES de la sécurité sociale, où ils bénéficient d'un examen médical complet (clinique et paraclinique). Un auto-questionnaire (postal ou par Internet) est complété chaque année pour suivre dans le temps l'évolution de l'état de santé, de la situation socioéconomique et professionnelle, de l'environnement familial, social et du lieu de vie, des facteurs de risque personnels et environnementaux (suivi « actif ») (264). Tous les ans (suivi « passif »), le fichier des volontaires qui l'ont spécifiquement autorisé dans leur consentement (98%) est apparié d'une part aux bases de la Cnav, pour les événements socioprofessionnels, et d'autre part au SNDS pour les données de remboursement de santé et d'hospitalisation ; les causes médicales de décès sont également suivies (264).

Les principales données recueillies dans ces différentes sources sont :

- les caractéristiques sociodémographiques: situation professionnelle, niveau d'études, revenus, situation matrimoniale, composition du ménage, statut socioéconomique des parents et du conjoint, conditions de vie matérielles. L'adresse est géocodée et des indices contextuels correspondant à l'adresse (indice de désavantage social, d'accessibilité aux soins, pollution atmosphérique) en sont dérivés ;
- les facteurs professionnels : histoire professionnelle, expositions professionnelles, contraintes posturales, gestuelles et organisationnelles, stress au travail.
- les données de santé: données de l'état de santé déclaratives : antécédents personnels et familiaux, échelles de santé et de qualité de vie, pathologies, problèmes de santé spécifiques des femmes, handicaps, limitations, incapacités ;
- les données d'examen de santé: poids, taille, rapport taille-hanches, tension artérielle, fréquence cardiaque, vision, audition, spirométrie, investigations biologiques. Pour les personnes âgées de 45 ans et plus, tests physiques et cognitifs.

- les données issues du SNDS: affections de longue durée (ALD), hospitalisations, absence au travail, traumatismes, recours aux soins et prises en charge, médicaments, dispositifs médicaux, données de biologie, causes médicales de décès.
- les comportements de santé: tabac, alcool, alimentation, activité physique, cannabis, orientation sexuelle.

Des prélèvements de sang et d'urine ont permis la constitution d'une biobanque pour les participants inclus à partir de 2018. Un contrôle qualité et une validation des événements de santé ainsi que les données paracliniques recueillies dans les CES ont été mis en place (263).

L'inclusion a commencé fin 2012 et près de 220 000 participants sont inclus et suivis. Les participants sont invités à revenir au CES tous les quatre ans pour un suivi périodique où ils bénéficient à nouveau des examens médicaux et de laboratoire (260).

Un plan d'échantillonnage spécifique a été développé à partir de la cohorte Constances pour prendre en compte les biais de sélection, la non-participation à l'inclusion et les attritions éventuelles au cours du suivi longitudinal (260,261). Parmi les personnes tirées au sort, qui n'ont pas accepté un suivi actif et qui ne s'y sont pas opposé, une cohorte de 400 000 personnes suivies dans les bases administratives (SNDS et Cnav) a été mise en place. Cette cohorte de référence permet de pondérer la cohorte de volontaire selon un protocole qui a reçu le Label de qualité statistique du CNIS.

Constances est une cohorte épidémiologique représentative de la population adulte française, donnant accès à une vision panoramique des problèmes de santé de la population générale. Le projet Constances a reçu l'autorisation et l'approbation de la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL) et de la commission d'examen institutionnel de l'Inserm (Numéro d'autorisation 910486) le 3 mars 2011 et le label d'intérêt général et de qualité statistique du Cnis (Conseil national de l'information statistique). Toutes les méthodes utilisées dans Constances sont effectuées conformément aux directives et réglementations en vigueur. Toutes les personnes incluses dans Constances et dans cette étude ont donné leur consentement éclairé. Pour notre projet les volontaires ont été informés via le journal de la cohorte et le site web de constances (<https://www.constances.fr>) et ont eu la possibilité de s'opposer aux traitements de leur données auprès de la responsable de la cohorte.

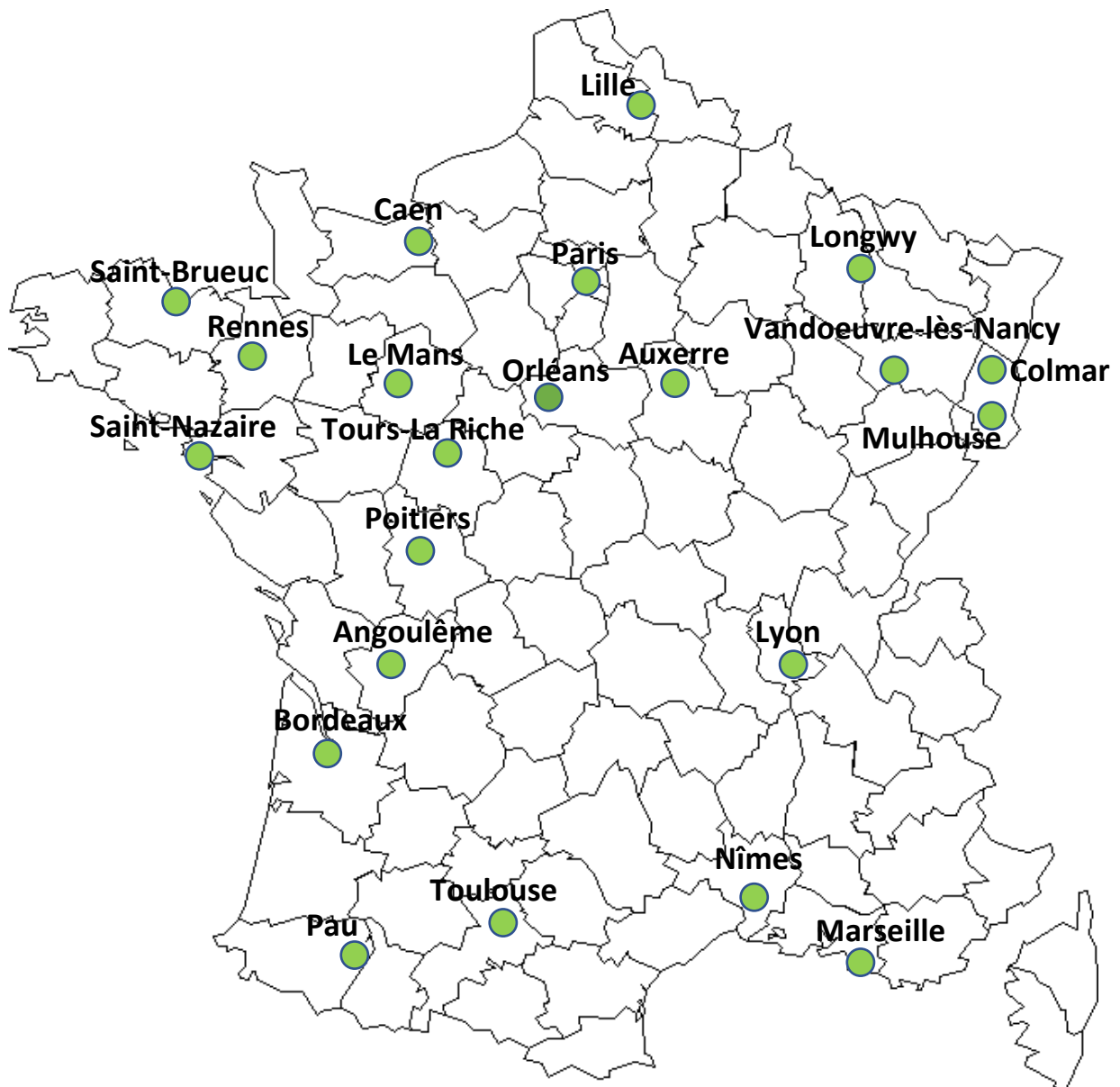


Figure 8: Répartition des Centres d'examens de santé incluant des participants de Constances, France

(Source modifiée : Zins M et al. BEH 35-36. 2016)

## 2. Diagnostic de la NAFLD et de la fibrose

Le but de cette étude était d'évaluer la prévalence de la NAFLD et de la fibrose hépatique ainsi que l'impact de la NAFLD sur la morbi-mortalité dans la population générale française, à l'aide de marqueurs simples et non invasifs combinant des tests de dépistage de la stéatose et de la fibrose, à partir de la cohorte Constances appariée au SNDS.

Différents types de marqueurs non invasifs sont utilisés pour le diagnostic de la NAFLD en population générale (supra). L'échographie conventionnelle est la méthode la plus

couramment utilisée pour évaluer la stéatose hépatique dans la population générale. La spectroscopie par résonance magnétique du foie a également été utilisée pour effectuer des études en population générale, mais elle est moins portable et plus chère que l'échographie (186). Une autre option pour étudier la stéatose hépatique en population générale est l'utilisation de marqueurs sérologiques. Le Fatty Liver Index (FLI), basé sur 4 mesures anthropométriques et biochimiques courantes : l'indice de masse corporelle, le tour de taille, la gamma-glutamyltransférase et les triglycérides, est le marqueur sérologique le plus performant et validé dans la NAFLD (190). Dans une étude en population générale, cet algorithme avait une précision de 0,84 pour détecter la stéatose et a été validé avec succès dans d'autres populations (190,265,266). Les paramètres de calcul du FLI sont disponibles dans la cohorte Constances.

La deuxième étape consistait à identifier parmi les personnes atteintes de NAFLD, ceux à risque de complications. En raison du manque de marqueurs précis de la NASH, le dépistage des patients à risque de complication dans la NAFLD est principalement basé sur des marqueurs non-invasifs de la fibrose qui est le principal facteur de risque de complication et de la mortalité dans la NAFLD (19,243,245). Outre les méthodes d'imagerie, notamment l'élastométrie transitoire, tomographie par résonance magnétique et l'IRM (non applicables dans notre cas de figure), plusieurs marqueurs sérologiques ont été évalués dans la fibrose chez les personnes atteintes de NAFLD (*Table 3*). Le plus précis est le FIB-4 qui est basé sur l'âge, les ASAT et la numération plaquettaire (267–270). Comme recommandé dans les directives européennes, ce test simple est une procédure non invasive acceptable pour exclure les patients à faible risque de fibrose (244). Tout comme le FIB-4, l'essentiel des marqueurs sériques de la fibrose dans la NAFLD inclus dans leur calcul les ASAT ou d'autres paramètres non disponibles dans Constances. La mesure de l'ASAT n'étant pas disponible dans Constances pour le calcul du FIB-4 ainsi que des autres scores, nous nous sommes proposés d'utiliser le Forns Index dont les paramètres (âge, plaquettes, GGT et cholestérol total) sont disponibles dans Constances. Après évaluation de ses performances chez les personnes atteintes de NAFLD prouvée par biopsie, les personnes atteintes de NAFLD avec FI >6,9 ont donc été considérés comme ayant une fibrose avancée (F3/F4) conformément à l'évaluation princeps du FI dans l'hépatite C chronique (271). Dans ce contexte, nous avons évalué la précision du FI pour le diagnostic de la fibrose avancée chez les personnes atteintes de NAFLD

prouvée par biopsie. Des informations détaillées sur la population utilisée pour l'étude diagnostique ont déjà été publiées ailleurs (272). En synthèse, cette population a été obtenue en rassemblant les données de 7 études publiées qui ont évalué les tests de fibrose hépatique non invasifs en utilisant la biopsie hépatique comme référence. Tous les patients inclus avaient une maladie hépatique chronique sans cirrhose décompensée ni carcinome hépatocellulaire. La duplication des patients entre les études a été corrigée pour s'assurer que tous les patients n'étaient inclus qu'une seule fois dans la base de données. Les examens anatomopathologiques des biopsies hépatiques ont été réalisés dans chaque centre par des experts seniors spécialisés en anathomopathologie et en aveugle. La fibrose hépatique a été évaluée selon le stade du réseau de recherche clinique sur la stéatohépatite non alcoolique (NASH CRN): F0 = pas de fibrose, F1 = fibrose périsinusoïdale ou portale/périportale, F2 = fibrose périsinusoïdale et portale/périportale, F3 = fibrose en pont ou sévère et F4 = cirrhose (19). La fibrose avancée a été définie comme NASH CRN F  $\geq$ 3. Des échantillons de sang à jeun avaient été prélevés le jour ou dans les 3 mois précédants ou suivants la biopsie hépatique dans ces études. Le FI a été calculé selon la formule publiée (271). Les seuils utilisés pour exclure ou affirmer une fibrose avancée avec le FI étaient ceux précédemment publiés, respectivement  $<4,2$  et  $>6,9$  (271). Les tests sanguins de fibrose Fibrose-4 (FIB4) (200) et Aspartate Aminotransferase to Platelet Ratio Index (APRI) (207) ont également été calculés et utilisés comme comparateurs. La classification de la fibrose sur la biopsie hépatique et les 3 tests sanguins (APRI, FIB-4 et FI) étaient disponibles pour 1557 patients atteints de NAFLD prouvée par biopsie. Les caractéristiques de ces patients atteints de NAFLD prouvée par biopsie sont décrites dans l'étude de Boursier J et al. (272). La répartition de la fibrose était la suivante : F0/F2 =70,3%, F3 =20,9% et cirrhose =8,7%. Bien qu'elle soit légèrement inférieure à celle du FIB4 (AUC = $0,785 \pm 0,013$  vs  $0,807 \pm 0,012$ ,  $p =0,007$ ), le FI avait une pertinence clinique satisfaisante pour le diagnostic de fibrose avancée. Les AUC du FI et de la FIB4 n'étaient par ailleurs pas significativement différents pour le diagnostic de cirrhose. Utilisé avec son seuil bas ( $<4,2$ ), le FI exclut une fibrose avancée avec une valeur prédictive négative de 90,2% et une sensibilité de 87,4%, tandis que le seuil haut ( $>6,9$ ) exclut une fibrose avancée avec une valeur prédictive positive de 65,2% et une spécificité de 90,9%. Plus récemment, Hagström H et al. (209) ont montré dans une étude que le Forns Index avait de bonnes performances pour diagnostiquer et prédire l'incidence des complications hépatiques à court terme (Figure 9).

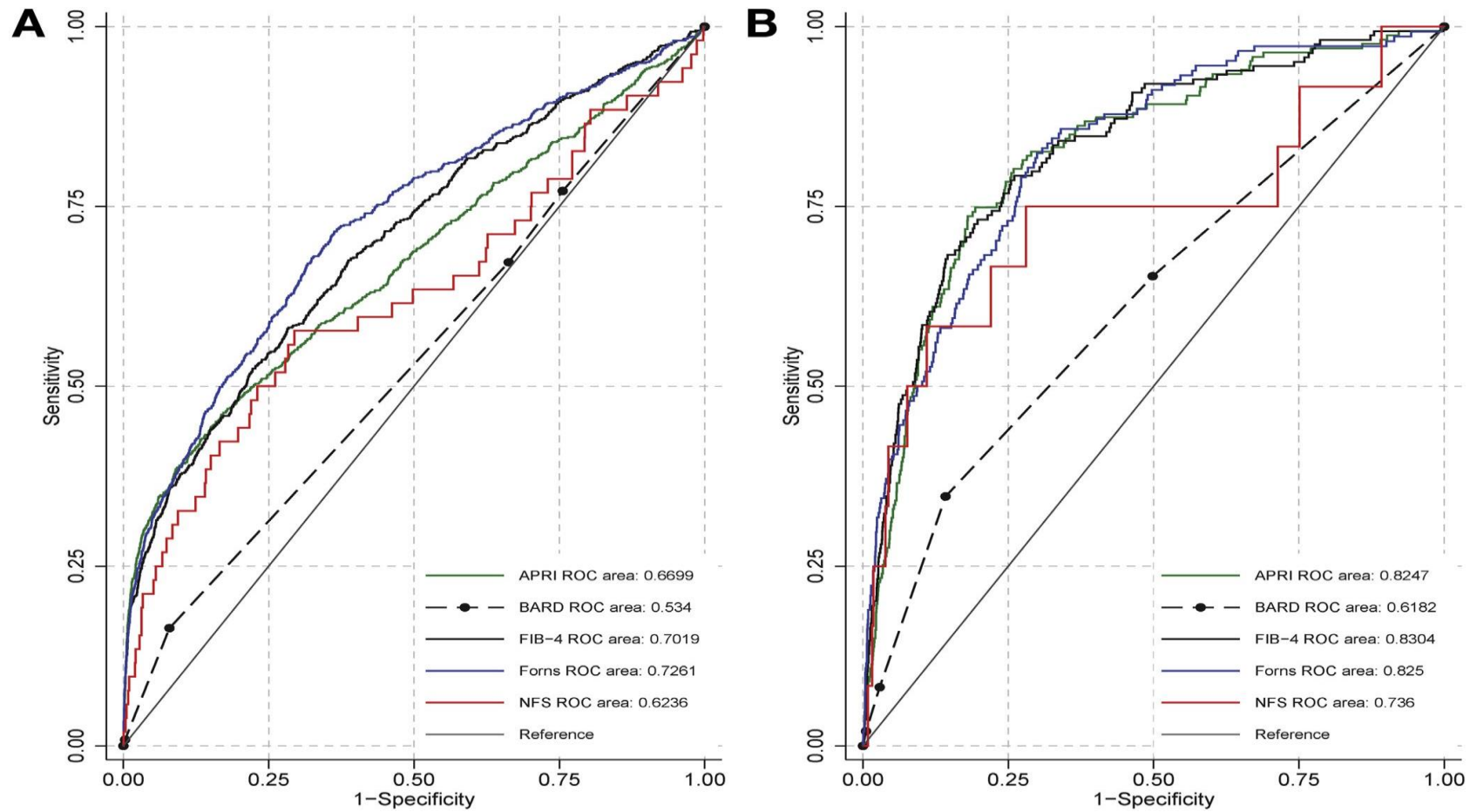


Figure 9: Courbe ROC et AUC à l'inclusion pour la prédiction de complications hépatiques sévères à 10 ans (Source modifiée : Hagström H et al. *Gastroenterology*.2020)<sup>8</sup>.

<sup>8</sup> (A) Dans toute la population de l'étude ; (B) Chez les personnes avec ALT élevées.



### 3. Méthodes statistiques

Selon les objectifs et les contraintes rencontrées lors des différentes analyses, nous avons employé différentes approches statistiques pour répondre aux exigences méthodologiques et à nos objectifs lors de nos analyses statistiques.

La première partie de ce travail de thèse visait à évaluer la prévalence et l'association entre la NAFLD et la prévalence des comorbidités ainsi que les facteurs de risque qui en étaient respectivement associés. Les prévalences ont été obtenues en pondérant les prévalences brutes aux poids de sondages fournis par Constances pour les rendre représentatives de la population cible. Des modèles de regressions logistiques (univariés et multivariés) ont été employés pour respectivement identifier les facteurs de risque associés à la prévalence de la NAFLD et la fibrose avancée chez les personnes atteintes de NAFLD ainsi que leur (NAFLD et finbrose chez les personnes atteintes de NAFLD) association avec la prévalence des comorbidités (cardiovasculaires, cancers extra-hépatiques et maladie rénale chronique).

Dans la deuxième partie, nous avons effectué une analyse longitudinale pour évaluer le fardeau de la NAFLD sur la morbi-mortalité. L'impact de la NAFLD sur la mortalité et les événements cliniques d'intérêt (hépatiques, cardiovasculaires, cancers et maladie rénale chronique) a été respectivement analysé à l'aide de modèles de Cox standards et de Fine-Gray (273), avec le décès dans ce dernier cas, comme l'évènement concurrent aux événements cliniques d'intérêt. Des fonctions d'incidences cumulées ont été estimées pour les différents événements cliniques d'intérêt, et le test de Gray a été utilisé pour tester les fonctions d'incidences cumulées entre les groupes. Des courbes de Kaplan-Meier standard ont été estimées pour la mortalité. En raison de contraintes méthodologiques (sur-ajustement pour les modèles multivariés classiques) (274,275), liées aux très grands nombres de facteurs de confusion et compte tenu parfois, du faible nombre d'évènements d'intérêt, une approche par inférence causale selon la méthode par pondération à la probabilité inverse (IPW) (275–277) a été privilégiée pour prendre en compte les facteurs de confusion. Finalement, la pondération des poids IPW et les poids issus du modèle de Fine et Gray comme le suggère Hernán et al. (278), ont permis la prise en compte de la confusion et la censure liée au décès (évènement concurrent) lors des analyses des événements cliniques d'intérêt (hépatiques, cardiovasculaires, cancers et maladie rénale chronique). Des modèles de Cox cause-spécifique

pondérés par les poids IPW ont été utilisés pour estimer les rapports de risque spécifiques pour la mortalité toutes causes confondues.

#### **IV. Chapitre I : Études transversales**

##### **« Évaluation de la prévalence et des facteurs de risque »**

Le travail présenté dans cette partie constitue le premier volet de l'étude « Evaluation de l'épidémiologie et des déterminants de la NAFLD dans la population générale en France. » (Ci-après dénommée « NASHCO-STUDY »).

##### **Présentation des deux études**

Dans les articles présentés dans cette partie, publiés en 2020 et en 2021, nous avons cherché à estimer dans un premier temps, la prévalence de la NAFLD en population française et à identifier les facteurs de risque associés à cette prévalence. Puis dans un second temps, à évaluer son rapport avec l'état de santé de la population, notamment les comorbidités extra-hépatiques (maladies cardiovasculaires, cancers extra-hépatiques et insuffisance rénale grade III) et d'identifier les principaux groupes à risque susceptibles de bénéficier d'un suivi particulier.

Ces travaux ont permis de mettre en évidence une prévalence particulièrement élevée de NAFLD (un français sur cinq ne présentant pas de consommation à risque d'alcool ou d'infection hépatique virale chronique, soit environ 8,431 millions de personnes) et de la fibrose avancée (2,6% de la population atteinte par la NAFLD). Avec deux patients souffrant de diabète sur trois atteints, la population atteinte de diabète était particulièrement à risque de cette affection. Alors que l'obésité et le diabète restent les deux signes d'appel majeurs au dépistage et au diagnostic de la NAFLD, il ressort de nos analyses que l'âge, le sexe masculin (sexe ratio de 2) et les troubles métaboliques (hypertension artérielle, dyslipidémie et les ALAT élevés) restaient des facteurs fortement associés à la prévalence et à la sévérité de la NAFLD indépendamment du diabète et de l'obésité. On a pu, en outre, observer une forte association (proportionnelle à la sévérité de la fibrose) entre la NAFLD et la prévalence des maladies cardiovasculaires, des cancers extra-hépatiques, des maladies rénales chroniques, soulignant l'impact extra-hépatique des stéatopathies. Cependant, des zones d'ombre quant aux facteurs de risque génétiques persistent, en l'absence de données recueillies dans cette cohorte. Ceux-ci méritant de faire l'objet d'investigations ultérieures.

Ces travaux nous ont permis de découvrir l'ampleur et l'impact sur la santé de la population et la complexité de la pathogenèse de la NAFLD et la nécessité d'une approche prospective dans la compréhension et sa prise en charge.

### **Discussion générale aux deux études**

Malgré la complexité de la physiopathologie de la NAFLD, les recommandations des sociétés savantes sur le diagnostic, l'évaluation, la surveillance restent principalement centrées sur la présence du diabète et de l'obésité. Cependant des données de la littérature rapportent des cas de NAFLD en absence d'obésité faisant craindre un sous diagnostic et une sous-évaluation avec un risque de perte de chance dans ce contexte. Une analyse stratifiée sur la présence d'obésité nous a permis de mettre en évidence une forte prévalence et les facteurs de risque associés à la NAFLD en absence d'obésité, suggérant en toute vraisemblance, la nécessité d'une relecture des critères d'orientation diagnostic de la NAFLD en pratique clinique.

Les résultats de nos analyses fournissent des éléments qui permettent d'appréhender, non seulement l'ampleur et le positionnement de la NAFLD comme problème majeur de santé dans la population française, mais encore des indices et des faisceaux d'arguments clairs permettant d'identifier les groupes de population les plus à risque (diabète, troubles métaboliques, hypertension artérielle avec ou sans obésité, cytolysé hépatique) et qui éventuellement devraient faire l'objet d'attentions particulières en pratique clinique de routine, voire d'un dépistage systématique. Ces résultats suggèrent en particulier la nécessité d'une relecture et un élargissement (à l'ensemble des facteurs de risque sus-cités) des recommandations des sociétés savantes sur les conditions de dépistage et de surveillance de la NAFLD et une évaluation métabolique globale de tous les patients avec une NAFLD indépendamment de la présence du diabète et/ou de l'obésité.

Ces deux études mettent en outre en lumière différents types de limites : certaines sont liées au manque de données inhérentes aux études rétrospectives et d'autres à nos choix méthodologiques. La qualité des données représente une limite récurrente des études observationnelles en population générale. Certaines données de santé et de mode de vie ont été collectées de manière déclarative, ce qui pourrait conduire à des biais de mémoire.

Des questions se posent également quant à la gestion des données manquantes, pouvant faire l'objet d'imputations ou d'une analyse des observations complètes uniquement. Le pourcentage de données manquantes en particulier, sur les critères de jugement et les

caractéristiques générales des personnes, était faible (<3,7%). De plus, les caractéristiques des personnes avec des données manquantes n'étaient pas différentes de celles de personnes dont les données étaient disponibles. Nous avons en conséquence opté pour l'exclusion des personnes avec des données manquantes de nos analyses.

L'histologie hépatique est la méthode de référence dans l'évaluation de la NAFLD et de la fibrose, cependant, elle n'est pas recommandée en population générale. Nous avons donc eu recours à des méthodes non invasives (le Fatty Liver Index, pour la stéatose et le Forns Index, pour la fibrose). Leur performance est certes moins bonne que pour la biopsie mais restent très satisfaisantes et ont été validées en population générale. Cette étude, à partir de données issues d'enquêtes par sondage, vise à être inférée à la population générale. Cependant, les enquêtes par sondage comportent souvent des problèmes de représentativité de la population cible (faible participation ou non réponse ou erreur de couverture etc.). Il est alors recommandé des méthodes de redressement des estimateurs issus de ce type d'étude pour inférer les résultats à la population cible, ce qui est bien prise en compte dans Constances et appliquée aux estimateurs de nos analyses.

La nature transversale de ces études ne permet pas de conclure à une relation de temporalité entre les facteurs de risque et la NAFLD, d'une part, et entre les antécédents de comorbidité et la NAFLD, d'autre part. Par exemple, nous ne pouvons pas exclure que la NAFLD puisse survenir après un événement cardio-vasculaire ou un cancer. L'évaluation d'une éventuelle relation entre la NAFLD et les comorbidités pourrait être plus pertinente dans une étude longitudinale avant d'aboutir à des conclusions.

Ces quelques limites n'affectent en rien la qualité et la portée scientifique de nos résultats. Notre étude est d'ailleurs une première du genre en France, voire en Europe (de par sa taille) et qui présente un intérêt de santé publique majeur. En effet, la plupart des études menées aujourd'hui en Europe sur la problématique de la NAFLD sont essentiellement hospitalières ou tout au plus à partir de très petits échantillons issus parfois de populations très sélectionnées. La transposition de ces résultats à l'ensemble de la population générale reste peu recommandable. Notre étude a le mérite d'inclure un large échantillon de la population générale et prend en compte l'ensemble de la population dans ses différentes composantes sociales et culturelles. En revanche, l'absence de marqueurs génétiques ou de données sur le

microbiote intestinal dans notre étude, ne nous a pas permis de déterminer si une prédisposition génétique (et éventuellement quels polymorphismes) ou une dysbiose pourraient être considérés dans la prévalence voire la sévérité de la NAFLD, quand bien même d'autres études le montrent bien comme décrit plus haut.

Par ailleurs, étant donné la nature de notre étude, nos résultats ne permettent pas non plus de donner une indication quant à l'impact de la NAFLD sur la morbi-mortalité qui pourraient particulièrement justifier des mesures d'intervention en santé ou de priorisation des interventions en santé, voire de mettre en place un programme de dépistage en population générale. Le manque de données sur le devenir des patients et éventuellement de l'efficacité d'un dépistage limite en partie la valeur ajoutée de cette étude.

Dans un contexte d'application parfait, il serait indiqué et pour lever tout équivoque, un essai contrôlé randomisé pour répondre à ces types de questions. Compte-tenu de la nature de la maladie et des moyens à notre disposition, cette approche reste inaccessible pour nous et peu éthique. L'alternative serait, par conséquent, une étude observationnelle, à partir des données de suivi longitudinal des patients afin d'évaluer son impact sur la morbi-mortalité.

# 1. Article 1: “Prevalence and Risk Factors of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Advanced Fibrosis in General Population: the French Nationwide NASH-CO Study”

Gastroenterology 2020;159:791–793

## Prevalence and Risk Factors of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Advanced Fibrosis in General Population: the French Nationwide NASH-CO Study



BRIEF COMMUNICATIONS

Oumarou Nabi,<sup>1,\*</sup> Karine Lacombe,<sup>1,2,\*</sup> Jérôme Boursier,<sup>3,4</sup> Philippe Mathurin,<sup>5</sup> Marie Zins,<sup>6,7</sup> and Lawrence Serfaty<sup>8</sup>

<sup>1</sup>Inserm UMR-S1136, IPLESP, Sorbonne Université, Paris, France; <sup>2</sup>Infectious Diseases Department, Hôpital Saint-Antoine, APHP, Paris, France; <sup>3</sup>HepatoGastroenterology Department, Anger University Hospital, Angers France; <sup>4</sup>HIFIH Laboratory, UPRES EA3859, SFR 4208, Angers University, Angers, France; <sup>5</sup>Liver Unit, CHU Lille, Lille, France; <sup>6</sup>UMS 11 Inserm, Versailles-Saint Quentin University, Versailles, France; <sup>7</sup>Paris University, Paris, France; and <sup>8</sup>Hepatogastroenterology Service, Hôpital de Haute-pierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

**Keywords:** Obesity; Type 2 Diabetes; Fatty Liver Index; Forns Index.

The burden of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and advanced fibrosis has not been reported so far at a nationwide level in Europe. According to a meta-analysis, the prevalence of NAFLD in European countries ranged from 4% to 50%, reflecting the heterogeneity of study populations.<sup>1</sup> The French CONSTANCES population-based cohort was designed as a large representative sample for age, gender, and socioeconomic status of the French adult population.<sup>2</sup> The present study was aimed to assess the prevalence of NAFLD and advanced fibrosis in the CONSTANCES cohort by using noninvasive markers, and to examine risk factors associated with these conditions.

### Materials and Methods

We conducted a cross-sectional study on data at baseline collected from participants included in the CONSTANCES cohort between 2012 and 2018. CONSTANCES is a “generalist” epidemiological cohort designed to be representative of the general French population consisting of a sample of more than 200,000 adults aged 18 years and older at baseline, and residing in 21 departments that hold a Health Screening Center (HSC) in France<sup>2</sup> (Supplementary Methods). At inclusion, the selected subjects were invited to complete a health and lifestyle questionnaire and to attend an HSC for a comprehensive health examination. Venous blood samples were taken after a 12-hour fast and analyses were performed in the HSC laboratories according to standards common to all.

The fatty liver index (FLI) was chosen as a surrogate marker of NAFLD. According to the literature, subjects with FLI >60 were considered as having NAFLD.<sup>3</sup> The Forns Index (FI) was chosen for liver fibrosis evaluation. After validation in patients with biopsy-proven NAFLD (Supplementary Methods), subjects with NAFLD with FI >6.9 were considered as having advanced fibrosis (F3/F4).

Details of the statistical analysis are available in the Supplementary Methods.

### Results

At the time of analysis, 163,426 subjects had responded to the invitation letter and data were available in 119,150 participants. Sociodemographic characteristics were similar between participants and the overall responders (data not shown). After excluding subjects who had withdrawn their consent, had a history of excessive alcohol consumption defined by daily consumption more than 30 g/d in men and 20 g/d in women (n = 11,618), or chronic viral hepatitis (1108 hepatitis B virus, 560 hepatitis C virus) or other causes of liver diseases, 102,344 were retained in the final analysis and defined as the overall population (Supplementary Figure 1).

Characteristics of the overall population are shown in Table 1. According to FLI >60, the adjusted prevalence of NAFLD was 18.2% (95% confidence interval [CI] 17.9–18.4), which corresponds to 8.491 (95% CI 8.392–8.585) million adult people when extrapolated to the general population in metropolitan France. The prevalence of NAFLD was substantially higher among men compared with women (25.8%, 95% CI 25.4–26.2 vs 11.4%, 95% CI 11.1–11.6), and increased with age across gender, from 4% in women aged 18 to 27 years to 44.2% in men aged 68 to 78 years (Figure 1A). According to risk groups, the prevalence of NAFLD reached 79.1% (95% CI 78.3–79.8) in obese subjects, 62.4% (95% CI 60.8–64.1) in type 2 diabetic subjects, and 51.6% (95% CI 50.6–52.5) in those with elevated alanine aminotransferase (ALT). When considering the combination of obesity, diabetes, and/or elevated ALT as risk factors, the NAFLD rate increased from 5% in patients having no risk factor to 96.9% in those having all 3 risk factors (Figure 1B). Geographic distribution of NAFLD in France showed a decrease in a North-South gradient.

\*Authors share co-first authorship.

**Abbreviations used in this paper:** ALT, alanine aminotransferase; CI, confidence interval; FI, Forns Index; FLI, Fatty Liver Index; HSC, Health Screening Center; NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease; OR, odds ratio.

Most current article

© 2020 by the AGA Institute  
0016-5085/\$36.00

<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.04.048>

**Table 1.** General Characteristics of Overall Population, Subjects With NAFLD (Defined by a Fatty Liver Index >60) and Subjects With NAFLD with Advanced Fibrosis (Defined by a Forns Index >6.9)

	Overall population n = 102,344	Subjects with NAFLD n = 16,273	Subjects with NAFLD with advanced fibrosis n = 422
Age, yrs, mean (SD)	47.2 (13.6)	52.9 (11.7)	65 (4.9)
Male gender, % (95% CI)	45.4 (45.1–45.7)	66.8 (66.1–67.5)	92.9 (90.5–95.4)
Waist circumference, cm, mean (SD)	84.6 (12.9)	103.7 (9.2)	107.3 (9.5)
Overweight, % (95% CI)	30.0 (30.3–30.6)	36.9 (36.2–37.6)	36.4 (31.8–40.9)
Obesity, % (95% CI)	12.3 (12.1–12.5)	61.2 (60.4–61.4)	59.9 (55.2–64.5)
Diabetes mellitus, % (95% CI)	3.7 (3.7–3.9)	13.6 (13.2–14.2)	47.2 (42.5–52)
High blood pressure, % (95% CI)	11.6 (11.4–11.8)	28.6 (27.9–29.3)	56.4 (51.7–61.2)
Hypertriglyceridemia, % (95% CI)	12.5 (12.3–12.7)	44.9 (44.1–45.7)	42.6 (37.9–47.3)
Hypercholesterolemia, % (95% CI)	8.1 (8.0–8.3)	20.6 (19.9–21.2)	53.3 (48.5–58)
Metabolic syndrome, % (95% CI)	13.4 (13.2–13.6)	59.8 (59–60.6)	80.8 (77–84.5)
GGT>N, % (95% CI)	15.3 (15.1–15.5)	48 (47.2–48.8)	66.8 (63.4–70.2)
ALT>N, % (95% CI)	11.1 (10.9–11.3)	33.9 (33.2–34.6)	57.7 (53–62.4)

NOTE. All comparisons among the 3 groups had a *P* value < .05, except overweight, obesity, and hypertriglyceridemia prevalence between NAFLD and NAFLD with advanced fibrosis groups. Obesity was defined as body mass index (BMI)  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>, or  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup> if Asian ethnicity, and overweight as BMI 25–29.9, or 23–24.9 if Asian ethnicity. Abdominal obesity was defined according to the waist circumference  $\geq 94$  cm for men ( $\geq 90$  cm if Asian ethnicity) and  $\geq 80$  cm for women. Diabetes mellitus was defined by a blood glucose greater than 6.9 mmol/L after 12 hours fasting according to the World Health Organization definition and/or antidiabetic therapy. High blood pressure was defined either on the basis of self-reporting and/or antihypertensive therapy and/or systolic blood pressure  $\geq 140$  mm Hg and/or diastolic  $\geq 90$  mm Hg. Metabolic syndrome was defined according to the International Diabetes Federation. GGT, gamma-glutamyl transpeptidase.

General characteristics of subjects with NAFLD are shown in Table 1. When adjusted on socioeconomic status, independent parameters associated with NAFLD in obese and nonobese subjects were age (odds ratio [OR] 1.02, 95% CI 1.01–1.03 and 1.02, 1.01–1.04, respectively), male gender (OR 5.7, 95% CI 5.0–6.6 and 7.5, 7.0–8.1), type 2 diabetes (OR 4, 95% CI 3.1–5.3 and 3.6, 3.2–4.1), high blood pressure (OR 1.7, 95% CI 1.5–2.0 and 2.1, 2.0–2.3), hypercholesterolemia (OR 1.5, 95% CI 1.4–1.6 and 1.7, 1.6–1.7) and ALT above the normal threshold (OR 4.1, 95% CI 3.4–5.0 and 6.5, 6.2–7.0). In nonobese subjects, North African (OR 1.8, 95% CI 1.6–2.1) and Asian origins (OR 0.6, 95% CI 0.4–0.9) were also independently associated with NAFLD.

FI was available in 16,212 subjects with NAFLD (99%). According to FI >6.9, the prevalence of advanced fibrosis among subjects with NAFLD was 2.6% (95% CI 2.4–2.8), which corresponds to 220,776 (95% CI 203,793–237,758) adult individuals when extrapolated to the general population of metropolitan France. Among risk groups with NAFLD, the rate of advanced fibrosis was 2.5% (95% CI 2.2–2.8) in obese subjects, 7.6% (95% CI 6.5–8.7) in type 2 diabetic subjects and 3.8% (95% CI 3.3–4.3) in those with elevated ALT. When considering the combination of obesity, diabetes, and ALT >N as risk factors, the prevalence of advanced fibrosis increased from 0.3% in patients with NAFLD having no risk factor to 13.6% in those having all 3 risk factors. Characteristics of subjects with NAFLD with advanced fibrosis are shown in Table 1. Independent risk factors of advanced fibrosis in subjects with NAFLD were age, male gender, obesity,

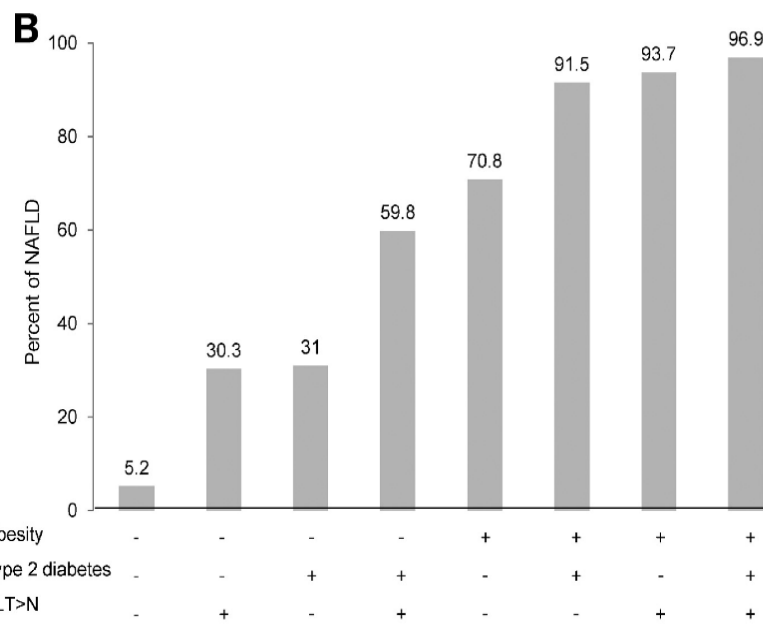
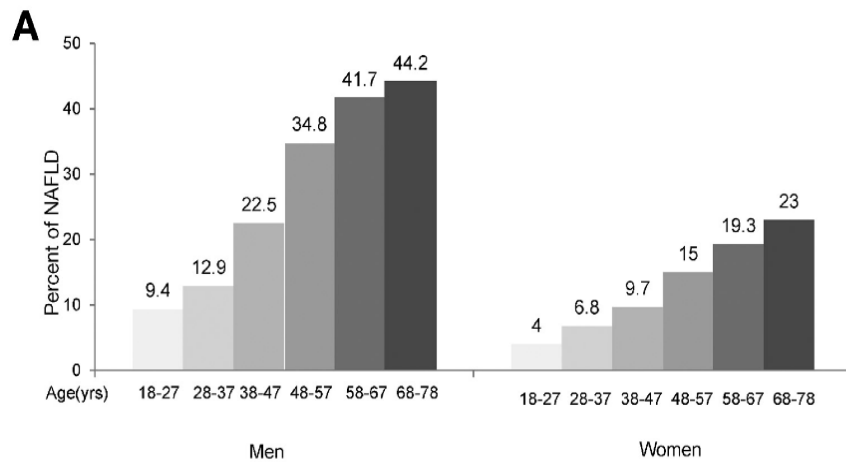
diabetes, high blood pressure, elevated ALT, and smoking (Supplementary Table 1).

## Discussion

NAFLD affects almost one-fifth of a large French adult population-based cohort with no excessive alcohol consumption or chronic viral hepatitis. To our knowledge, this is the largest European survey evaluating NAFLD and advanced fibrosis in the general population. The CONSTANCES population-based cohort is a very large and representative survey of French general security regime (RG) affiliates aged 18 and older, representing approximately 50 million people.<sup>2</sup> The lower than expected prevalence of obesity or diabetes in our study population<sup>4</sup> was mainly explained by the exclusion of subjects with excessive alcohol consumption or viral hepatitis. NAFLD and advanced fibrosis were assessed by using validated noninvasive biomarkers<sup>5</sup> (Supplementary Methods).

As previously reported in the National Health and Nutrition Examination Survey cohort, NAFLD prevalence was more than twice as high among men compared with women, increased with age, was strongly related to metabolic disorders or abnormal ALT, and was lower in Asian subjects.<sup>6,7</sup> The prevalence of advanced fibrosis was 3 times higher among subjects with NAFLD with type 2 diabetes compared with other groups, confirming that diabetes is a major driver of fibrosis.<sup>8</sup>

These data highlight that screening for NAFLD should be implemented in populations at risk, especially in subjects with diabetes. Preventive and therapeutic measures should



**Figure 1.** (A) Distribution of NAFLD according to age and gender. (B) Prevalence of NAFLD according to the presence of obesity, type 2 diabetes, and/or ALT >N.

be taken to reduce the impact of the disease in the population.

**Supplementary Material**

Note: To access the supplementary material accompanying this article, visit the online version of *Gastroenterology* at [www.gastrojournal.org](http://www.gastrojournal.org), and at <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.04.048>.

**References**

1. Younossi ZM, et al. *Hepatology* 2016;64:73–84.
2. Zins M, et al. *Eur J Epidemiol* 2015;30:1317–1328.
3. Bedogni G, et al. *BMC Gastroenterol* 2006;6:33.
4. Matta J, et al. *Presse Med* 2018;47:434–438.
5. Koehler EM, et al. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013; 11:1201–1204.
6. Younossi ZM, et al. *Gut* 2020;69:564–568.
7. Golabi P, et al. *Liver Int* 2019;39:748–757.
8. Koehler EM, et al. *Hepatology* 2016;63:138–147.

Received December 9, 2019. Accepted April 23, 2020.

**Correspondence**

Address correspondence to Lawrence Serfaty, MD, Hôpital Hautepierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67000, Strasbourg, France. e-mail: [lawrence.serfaty@chru-strasbourg.fr](mailto:lawrence.serfaty@chru-strasbourg.fr).

**CRedit Authorship Contributions**

Oumarou Nabi, PhD (Formal analysis: Lead; Methodology: Equal; Writing – original draft: Supporting). Karine Lacombe, MD, PhD (Conceptualization: Equal; Formal analysis: Lead; Methodology: Equal; Writing – original draft: Equal). Jerome Boursier, MD, PhD (Methodology: Supporting; Writing – original draft: Supporting; Writing – review & editing: Equal). Philippe Mathurin, MD, PhD (Writing – original draft: Equal; Writing – review & editing: Equal). Marie Zins, PhD (Writing – review & editing: Supporting). Lawrence Serfaty, MD (Conceptualization: Lead; Formal analysis: Supporting; Methodology: Equal; Writing – original draft: Lead).

**Conflicts of interest**

The authors disclose no conflicts.

**Funding**

The Constances Cohort Study is supported and funded by the Caisse nationale d'assurance maladie (CNAM). The Constances Cohort Study is an "Infrastructure nationale en Biologie et Santé" and benefits from a grant from ANR (ANR-11-INBS-0002) and from the Ministry of Research. Constances is also partly funded by MSD, AstraZeneca and Lundbeck.

BRIEF COMMUNICATIONS



## Supplementary Methods

### *The CONSTANCES cohort*

CONSTANCES is a large population-based cohort with the overarching objective of contributing to the development of epidemiological research. It was designed as a general-purpose prospective cohort characterized by a broad coverage of health problems and health determinants, intended to serve as an open epidemiological research infrastructure accessible to the scientific community for conducting ancillary projects on a variety of research questions. One of its main objectives is to provide useful public health information to the public health authorities and health care regulatory bodies to contribute to a better knowledge of the health and health care resource utilization of the French population. CONSTANCES was designed as a randomly selected representative sample of French adults aged 18 to 69 years at inception.<sup>1</sup> Inclusion began at the end of 2012 and more than 200,000 were already included by June 2019. At inclusion, the selected subjects are invited to complete questionnaires and to attend a health screening center (HSC) for a comprehensive health examination. The follow-up includes a yearly self-administered questionnaire, and a periodic visit to a CES. Social and health data are collected from French national administrative databases. Data collected for participants include social and demographic characteristics, socioeconomic status, life events, behaviors, and occupational factors. The health data cover a wide spectrum: self-reported health scales, reported prevalent and incident diseases, long-term chronic diseases and hospitalizations, sick-leaves, handicaps, limitations, disabilities and injuries, health care utilization and services provided, and causes of death. A specific sampling scheme was developed to take into account selection effect, the nonparticipation at inclusion, and attrition throughout the longitudinal follow-up.<sup>1</sup> Thus, CONSTANCES is a broad epidemiological representative cohort of the French adult population, including persons living and working in diverse settings, from large cities to small villages in different regions of France, with a broad range of socioeconomic status and trades, which allows a better understanding of health problems in the general population.

### *Performance of Forns Index for the Diagnosis of Fibrosis in NAFLD*

The Forns Index (FI) has been validated as a surrogate marker of fibrosis in chronic hepatitis C. In this setting, we assessed the accuracy of FI for the diagnosis of advanced fibrosis among patients with biopsy-proven NAFLD. Detailed information about the population used for the diagnostic study has been already published elsewhere.<sup>2</sup> Briefly, this population was obtained by pooling the data of 7 published studies that evaluated noninvasive liver fibrosis tests using liver biopsy as reference. All included patients had chronic liver disease without decompensated cirrhosis or hepatocellular carcinoma. Patient duplication

between studies was corrected to ensure that all patients were included only once in the database. For the present analysis, we focused on the subgroup of patients with NAFLD. Pathological examinations of liver biopsies were performed in each center by senior experts specialized in hepatology and blinded for patient data. Liver fibrosis was evaluated according to the Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network (NASH CRN) staging: F0 = no fibrosis, F1 = perisinusoidal or portal/periportal fibrosis, F2 = perisinusoidal and portal/periportal fibrosis, F3 = bridging fibrosis, and F4 = cirrhosis.<sup>3</sup> Advanced fibrosis was defined as NASH CRN F $\geq$ 3. Fasting blood samples were taken the day of or within the 3 months before or after liver biopsy. The FI was calculated according to the published formula<sup>4</sup>:  $7.811 - 3.131 \cdot \ln(\text{platelet count, G/L}) + 0.781 \cdot \ln(\text{gamma glutamyl-transferase [GGT], IU/L}) + 3.467 \cdot \ln(\text{age, years}) - 0.014(\text{cholesterol, mg/dL})$ . Thresholds used to exclude or affirm advanced fibrosis with the FI were those previously published, respectively  $<4.2$  and  $>6.9$ .<sup>4</sup> The blood fibrosis tests Fibrosis-4 (FIB4)<sup>5</sup> and Aspartate Aminotransferase to Platelet Ratio Index (APRI)<sup>6</sup> were also calculated and used as comparators vs the FI.

Fibrosis staging on liver biopsy and 3 blood tests (ie, APRI, FIB4, and FI) were available in a dataset including 1557 patients with NAFLD. Characteristics of the 1557 patients with biopsy-proven NAFLD included in the diagnostic study are detailed elsewhere.<sup>2</sup> Distribution of fibrosis was as follows: F0–F2 70.3%, F3 20.9%, and cirrhosis 8.7%. Although it was slightly lower than that of FIB4 ( $0.785 \pm 0.013$  vs  $0.807 \pm 0.012$ ,  $P = .007$ ), the area under the receiver operating characteristic curve (AUROC) of FI reached clinical relevance for the diagnosis of advanced fibrosis. AUROCs of FI and FIB4 were not significantly different for the diagnosis of cirrhosis. Used with its low threshold ( $<4.2$ ), the FI ruled out advanced fibrosis with 90.2% negative predictive value and 87.4% sensitivity, whereas the high threshold ( $>6.9$ ) ruled-in advanced fibrosis with 65.2% positive predictive value and 90.9% specificity.

### *Statistical Analysis*

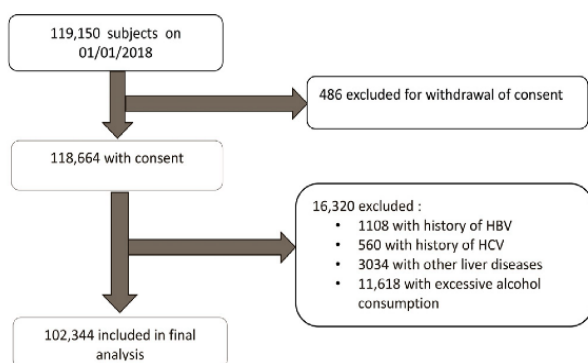
To take into account nonresponse and to make the prevalence representative of the French general population, crude prevalences were weighted by the product of the inverse of the participation probabilities estimated by logistic regression based on the data from the national administrative databases available both for participants and nonparticipants.<sup>1</sup> To estimate the absolute numbers of the French population with NAFLD and NAFLD with advanced fibrosis, we reported their weighted prevalence in our sample to the total number of adults aged 18 to 79 in metropolitan areas in France on January 1, 2019, after exclusion of subjects with known liver disease and/or excessive alcohol consumption from the estimates of the National Institute of Statistics and Economics. Logistics regression models were built to identify risk factors for NAFLD and risk factors for advanced fibrosis in patients with NAFLD. Then full models containing risk

factors with a  $P \leq .10$  in univariate analysis were constructed in a backward-stepwise way for each dependent variable. Because body mass index and waist circumference are part of The Fatty Liver Index calculation, analysis of NAFLD risk factors was performed separately in obese and nonobese subjects. For the same reasons, triglycerides and GGT were not included in the analysis of NAFLD risk factors. Triglycerides, cholesterol, and GGT, as a part for calculation of the FI, were not included in the analysis of fibrosis risk factors in subjects with NAFLD. A  $P$  value less than .05 was considered statistically

significant. The software package used for analysis was R (version 3.4.3).

### Supplementary References

1. Zins M, et al. *Eur J Epidemiol* 2015;30:1317–1328.
2. Boursier J, et al. *J Hepatol* 2017;66:1158–1165.
3. Kleiner DE, et al. *Hepatology* 2005;41:1313–1321.
4. Forns X, et al. *Hepatology* 2002;36:986–992.
5. Sterling RK, et al. *Hepatology* 2006;43:1317–1325.
6. Wai CT, et al. *Hepatology* 2003;38:518–526.



**Supplementary Figure 1.** Flow chart. HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus.

**Supplementary Table 1.** Univariate and Multivariate Analysis of Factors Associated With Advanced Fibrosis Among Subjects With NAFLD

	Univariate			Multivariate		
	OR	95% CI	P	OR	95% CI	P
Age	4.2	4.1–4.2	<.0001	3.8	3.5–4.2	<.0001
Male sex	7.6	5.3–11.5	<.0001	6.2	4.1–9.6	<.0001
Obesity	0.8	0.7–1.0	.1153	1.3	1.2–1.5	.0040
Type 2 diabetes	4.5	3.5–5.2	<.0001	2.1	1.6–2.6	<.0001
High blood pressure	3.5	2.9–4.3	<.0001	1.5	1.2–1.9	.0004
ALT>N	1.9	1.6–2.3	.0041	2.7	2.2–3.4	<.0001
Tobacco	2.2	1.8–2.8	<.0001	1.5	1.2–1.9	.0010

## 2. Article 2: “Comorbidities are Associated with Fibrosis in NAFLD Subjects: A Nationwide Study (NASH-CO Study)”

Digestive Diseases and Sciences  
<https://doi.org/10.1007/s10620-021-07032-z>

ORIGINAL ARTICLE



# Comorbidities Are Associated with Fibrosis in NAFLD Subjects: A Nationwide Study (NASH-CO Study)

Oumarou Nabi<sup>1</sup> · Jerome Boursier<sup>2,3</sup> · Karine Lacombe<sup>1,4</sup> · Philippe Mathurin<sup>5</sup> · Victor de Ledinghen<sup>6,7</sup> · Marcel Goldberg<sup>8,9</sup> · Marie Zins<sup>8,9</sup> · Lawrence Serfaty<sup>10,11</sup>

Received: 6 November 2020 / Accepted: 28 April 2021  
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

### Abstract

**Background** The relationship between the severity of NAFLD and extra-hepatic events such as cardiovascular disease (CVD), extra-hepatic cancer (EHC) or chronic kidney diseases (CKD) has not been clearly investigated in the general population.

**Aims** The aim of this study was to assess whether the severity of fibrosis in NAFLD subjects was associated with extra-hepatic diseases based on noninvasive markers in a large population-based cohort.

**Methods** The study population included a cohort of 118,664 participants from the nationwide CONSTANCES cohort. After excluding individuals with excessive alcohol consumption and other causes of liver disease, 102,344 were included. The noninvasive diagnosis of NAFLD and fibrosis was performed using a combination of the Fatty Liver Index (FLI) and the Forns Index. The history of CVD or EHC was recorded by a physician, and CKD was defined by a glomerular filtration rate < 60 ml/mn.

**Results** The prevalence of NAFLD (FLI > 60) was 18.2%, 10% with mild fibrosis (Forns Index < 4.2), 7.7% with intermediate fibrosis (Forns Index 4.2–6.9), and 0.4% with advanced fibrosis (Forns Index > 6.9). The prevalence of CVD, EHC, or CKD increased significantly with the severity of fibrosis ( $p < 0.0001$ ). When adjusted for demographic, metabolic risk factors, and smoking, NAFLD with intermediate or advanced fibrosis remained associated with CVD (OR 1.36,  $p < 0.0001$  and OR 3.07,  $p < 0.0001$ , respectively), EHC (OR 1.24,  $p = 0.001$  and OR 1.64,  $p = 0.004$ , respectively), and CKD (OR 1.18,  $p = 0.03$  and OR 2.09,  $p < 0.0001$ , respectively).

**Conclusions** In a large adult population-based cohort, there is a dose-dependent relationship between the severity of fibrosis and CVD, EHC, or CKD in NAFLD subjects.

**Keywords** Cardiovascular disease · Cancer · Colorectal cancer · Chronic kidney disease · Fatty Liver Index · Forns Index

✉ Lawrence Serfaty  
lawrence.serfaty@chru-strasbourg.fr

<sup>1</sup> Inserm UMR-S1136, IPLESP, Sorbonne Université, Paris, France

<sup>2</sup> HepatoGastroenterology Department, Anger University Hospital, Angers, France

<sup>3</sup> HIFIH Laboratory, UPRES EA3859, SFR 4208, Angers University, Angers, France

<sup>4</sup> Infectious Diseases Department, Hôpital Saint-Antoine, APHP, Paris, France

<sup>5</sup> Liver Unit, CHRU Lille, Lille, France

<sup>6</sup> Hepatology Unit, Bordeaux University Hospital, Bordeaux, France

<sup>7</sup> INSERM U1053, Bordeaux University, Bordeaux, France

<sup>8</sup> UMS 11 Inserm, Versailles-Saint Quentin University, Versailles, France

<sup>9</sup> Paris University, Paris, France

<sup>10</sup> Hepatogastroenterology Service, Hôpital Hautepierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France

<sup>11</sup> INSERM UMR\_S938, Sorbonne Université, Paris, France

Published online: 24 May 2021

Springer

Content courtesy of Springer Nature, terms of use apply. Rights reserved.

## Introduction

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) which is associated with the epidemic of obesity, type 2 diabetes, and metabolic syndrome, is the most common cause of chronic liver disease [1]. NAFLD is a clinico-pathological syndrome that ranges from simple steatosis to nonalcoholic steatohepatitis (NASH) with varying amounts of fibrosis and cirrhosis [2]. Long-term cohort studies have reported that the severity of liver fibrosis was the best predictor of liver-related as well as overall mortality in patients with biopsy-proven NAFLD [3]. In addition to liver-related complications, it has been suggested that NAFLD could promote cardiovascular disease, cancer, and chronic kidney disease [4–6]. However, few studies have investigated the relationship between comorbidities and NAFLD, or the role of fibrosis in the general population.

The French CONSTANCES population-based cohort was designed to be a large sample of the French adult population aged 18–69, and representative of gender and socioeconomic status including more than 200 000 subjects between 2012 and 2018 [7]. This is an ideal cohort to assess the epidemiology of NAFLD and advanced fibrosis in the French general adult population. The aim of the present study was to assess the relationship between NAFLD, fibrosis and comorbidities such as cardiovascular disease, extra-hepatic cancer or chronic kidney disease using non-invasive markers.

## Methods

### Study Population

This cross-sectional study was performed in data collected at baseline from participants included in the CONSTANCES cohort between 2012 and 2018. This cohort was previously described [8]. Briefly, CONSTANCES is a “general purpose” epidemiological cohort designed to be representative of the French general population including more than 200 000 adults aged 18 years and over at baseline, and living in 21 departments which have a Health Screening Center (HSC) in France [7, 9], affiliated with the national healthcare system, representing approximately 50 million people. Subjects recruited in CONSTANCES were included in the present analysis if they were at least 18 years old, with no history of excess alcohol consumption defined by a daily consumption > 30 g per day in men and 20 g per day in women, no history of chronic hepatitis virus infection, or history of other liver diseases excepted NAFLD. The study was approved by the “Commission

Nationale Informatique et Libertés (CNIL),” and ethical approval was obtained from the Institutional Review Board of the French National Institute of Health (INSERM). All participants provided written informed consent for the use of personal data for research.

### Data Collection

Socio-demographic and lifestyle data were obtained from a standardized self-administered questionnaire at home. Socio-demographic data included age, gender, occupation and employment status, education, and geographic origin. Alcohol consumption was assessed on the AUDIT questionnaire [10]. The number of glasses per day was converted into the number of grams of alcohol per day (1 glass = 10 g of alcohol). To estimate the impact of smoking, we considered tobacco ever- versus never-use. Sport practice was also recorded and considered as less or more than 2 h a week.

Health and morbidity data were recorded by a physician in HSC. This included a history of cancer (colon, breast, prostate, lung, thyroid, ovary, uterus), high blood pressure, cardiovascular events (arteritis of lower limbs, myocardial infarction, stroke, angina pectoris), and diabetes. The Body Mass Index (BMI) was calculated as the ratio of weight to height squared. Subjects were considered to be obese when the BMI  $\geq 30$  kg / m<sup>2</sup>, or  $\geq 25$  kg / m<sup>2</sup> if Asian ethnicity, and overweight when the BMI [25–29.9], or [23–24.9] if Asian ethnicity. Abdominal obesity was defined according to the waist circumference  $\geq 94$  cm for men ( $\geq 90$  cm if Asian ethnicity) and  $\geq 80$  cm for women. Blood samples were taken from a venous blood sample after a 12-h fast, and analyses were performed in the HSC laboratories according to common standards. Biological data included blood glucose, serum creatinine, gamma glutamyl transferase (GGT), alanine aminotransferases (ALT), total cholesterol, HDL-cholesterol, triglyceride (TGs), and platelets. ALT was considered to be elevated at a threshold of 40 IU/L, and GGT at a threshold of 55 IU/L in men and 45 IU/L in women. Diabetes was defined by a blood glucose > 6.9 mmol/L after a 12-h fast according to the WHO definition and/or antidiabetic therapy. High blood pressure (HBP) was defined on the basis of self-reporting, antihypertensive therapy, measured systolic blood pressure  $\geq 140$  mmHg and/or diastolic  $\geq 90$  mmHg. Hypercholesterolemia was defined by a blood cholesterol > 5.5 mmol/L and/or use of a lipid-lowering drugs. Hypertriglyceridemia was defined by blood triglyceride > 1.7 mmol/L or the use of lipid-lowering drugs. The metabolic syndrome was defined according to the international diabetes federation [11]. Chronic kidney disease (CKD) was defined according to a glomerular filtration rate < 60 ml/mn/1.73m<sup>2</sup> which was calculated with the CKD-EPI equation (Chronic Kidney Disease-Epidemiology Collaboration).

## Definition of NAFLD and Liver Fibrosis

The fatty liver index (FLI) was chosen as a surrogate marker of NAFLD. This is based on 4 common anthropometric and biochemical measures: body mass index, waist circumference, gamma-glutamyl-transferase, and triglycerides [12]. This score has an accuracy of 0.84 (95% CI 0.81–0.87) for detecting steatosis in the general population and has been successfully cross-validated in external populations [13, 14]. According to the literature, subjects with FLI > 60 were considered to have NAFLD. The Forns Index could be determined to evaluate liver fibrosis with data available from the CONSTANCES cohort (age, gamma-GT, platelets, and cholesterol). The Forns Index was previously validated as a marker of fibrosis in a cohort of 1557 patients with biopsy-proven NAFLD [8]. This score had an accuracy of  $0.785 \pm 0.013$  for detecting advanced fibrosis. The score was calculated according to the published formula [15] and applied to subjects with NAFLD defined as FLI > 60. Thresholds to rule-out or rule-in advanced fibrosis (F3/F4), were < 4.2 and > 6.9, respectively, as previously published. Thus, subjects were classified as follows: non-NAFLD, FLI < 30, indeterminate FLI, FLI 30–60, NAFLD with mild fibrosis, FLI > 60 and Forns Index < 4.2, NAFLD with intermediate fibrosis, FLI > 60 and Forns Index 4.2–6.9 and NAFLD with advanced fibrosis, FLI > 60 and Forns Index > 6.9.

## Statistical Analysis

A complex probability sampling plan was used to select participants from CONSTANCES. The complex design of the survey and non-response to the survey were then weighted by modeling the socio-demographic characteristics of patients from medico-administrative databases. To take into account a non-response and to estimate representatives of the French general population, crude prevalences were weighted by modeling socio-demographic characteristics and health status of patients from administrative databases [16].

Continuous variables were expressed as means  $\pm$  standard deviation (SD) and qualitative variables as percentages and their 95% confidence intervals (CI 95%). Categorical variables were compared using the Chi-square test or the Fisher's exact test. Continuous variables were compared using the Student *t* test. No variables had more than 5% of missing data; thus, missing data were not calculated. The prevalence was estimated as the ratio of subjects with available results to the total number of subjects included, with their 95% confidence intervals (CI 95%). Multivariate logistic regression models containing the covariates of interest (age, gender, BMI class, diabetes, blood hypertension, hypertriglyceridemia, hypercholesterolemia, ALT,

sports practice, and smoking) were constructed for each dependent variable. Full models containing risk factors were adjusted to estimate odds ratios (OR) of various risk-factors and their 95% confidence intervals (CI). Non-NAFLD subjects (FLI < 30) were the reference group for all analyzes.

To confirm the relationship between NAFLD and comorbidities, we performed sensitivity analyses using a propensity score. The propensity score was calculated by multivariate logistic regression to estimate the probabilities of patients having NAFLD (FLI > 60) or not (FLI < 30). Variables included in the model were age, sex, BMI, and smoking. Assessment of the probability of having NAFLD according to these covariates before weighting by the propensity score is shown in Fig. 1a Suppinfo. The standardized means differences (SMD) of pre-weighting and post-weighting were used to assess and compare the balance of characteristics between the risk groups. An absolute post-weighting SMD < 0.10 was considered to be a significant imbalance of characteristics (Fig. 1b Suppinfo). We then performed a one-to-four (1:4) matching by the Greedy matching method. A total of 13,418 NAFLD subjects were matched to 53,672 non-NAFLD subjects. The relationship between NAFLD and comorbidities was then estimated using logistic regression with patients matched on the propensity score.

Due to a mean prevalence of NAFLD reported in cohorts from the general population of 20 to 40%, to be able to detect an increase in the risk of NAFLD associated with various risk factors as low as 10% (OR of 1.10) in a population with a prevalence of NAFLD as low as 20%, the required sample size was 28,374 subjects for a level of significance of 0.05 with a power > 0.90.

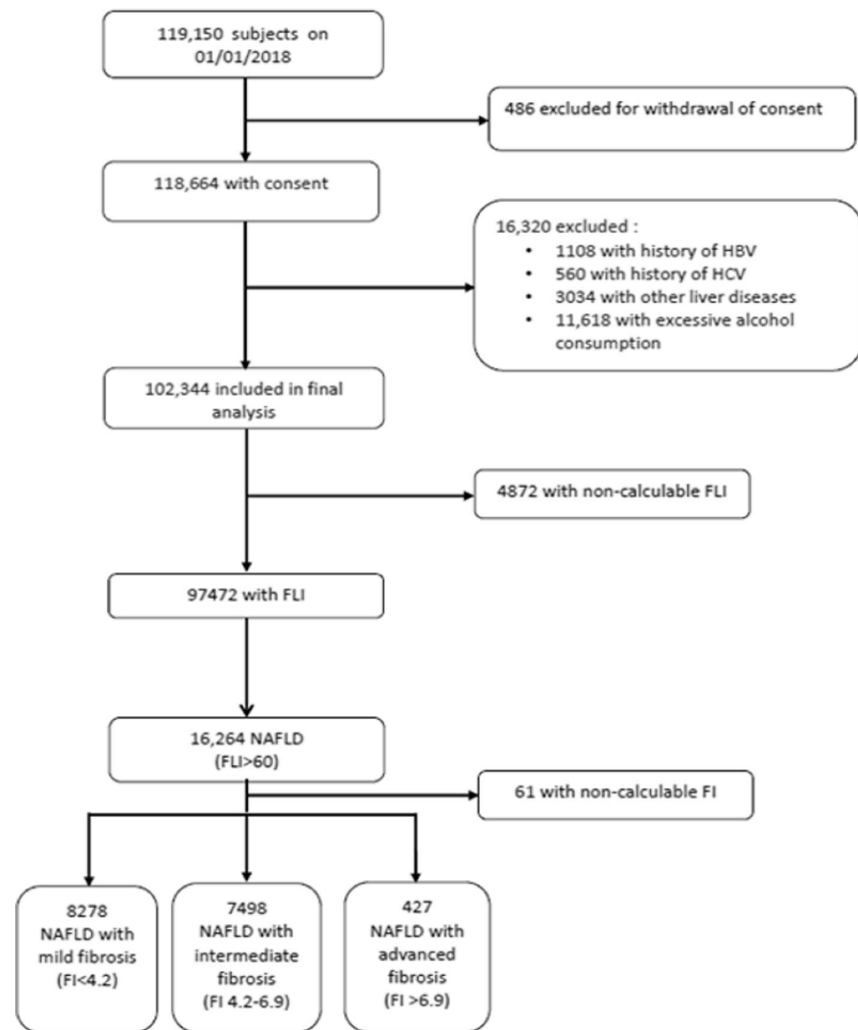
A *p* value < 0.05 was considered to be statistically significant. The R software package was used for analysis (3.4.3 version).

## Results

At the time of analysis, data were available for 119,150 participants. After excluding subjects who withdrew consent and had a history of excessive alcohol consumption, chronic viral hepatitis or other causes of liver diseases, 102,344 were included in the final analysis as representative of the overall population (Fig. 1).

The general characteristics of the overall population are shown in Table 1. A history of cardiovascular disease (CVD) or extra-hepatic cancer (EHC) was present in 6893 (7.1%, CI95% 7–7.3) and 5134 (4.5%, 95% CI 4.3–4.6) subjects, respectively, and chronic kidney disease (CKD) was present in 3078 (3.1%, 95% CI 3–3.2) subjects.

Fig. 1 Flow chart



### NAFLD and Fibrosis in Overall Population

FLI could be estimated in 97,472 subjects (Fig. 1). The characteristics of subjects with or without an FLI were similar (data not shown). For  $FLI > 60$ , the adjusted prevalence of NAFLD was 18.2% (95% CI 17.9–18.4) in the overall population. The adjusted prevalence of NAFLD with mild, intermediate, or advanced fibrosis according to the Forns Index was 10% (95% CI 9.8–10.2), 7.7% (95% CI 7.5–7.8), and 0.4% (95% CI 0.3–0.5), respectively. The general characteristics of subjects in relation to the presence of NAFLD and fibrosis are shown in Table 2. Subjects with NAFLD were older than subjects without NAFLD and more frequently male, with more prevalent metabolic disorders and smoking. The severity of fibrosis in NAFLD subjects was related to age, male gender, waist circumference, diabetes, high blood

pressure, metabolic syndrome, and smoking (Table 2). The characteristics of subjects with indeterminate NAFLD were in-between NAFLD and non-NAFLD subjects.

### Prevalence of Comorbidities According to NAFLD and the Severity of Fibrosis

The prevalence of comorbidities in subjects with NAFLD increased significantly according to the grade of fibrosis as shown in Fig. 2. The prevalence of CVD in subjects without NAFLD, in NAFLD subjects with mild, intermediate or advanced fibrosis was, respectively, 5 (95% CI 4.8–5.2) versus 7.4 (95% CI 6.8–7.9) versus 19.2 (95% CI 18.3–20.1) versus 33% (95% CI 28.5–37.5) ( $p < 0.0001$ ). The prevalence of EHC in subjects without NAFLD, in NAFLD subjects with mild, intermediate, or advanced fibrosis was,

**Table 1** General characteristics of overall population with no excessive alcohol consumption or chronic viral hepatitis

Variables	Overall population (N= 102,344)
Age, yrs, mean (SD)	47.2 (13.6)
Male gender, % (95% CI)	45.4 (45.1–45.7)
Waist circumference, cm, mean (SD)	84.6 (12.9)
Overweight, % (95% CI)	30.0 (30.3–30.6)
Obesity, % (95% CI)	12.3 (12.1–12.5)
Diabetes mellitus, % (95% CI)	3.7 (3.7–3.9)
High blood pressure,% (95% CI)	11.6 (11.4–11.8)
Hypertriglyceridemia,% (95% CI)	12.5 (12.3–12.7)
Hypercholesterolemia,% (95% CI)	8.1 (8.0–8.3)
Low HDL-cholesterol, % (95% CI)	5.9 (5.5–6.3)
Metabolic syndrome <sup>a</sup> , % (95% CI)	13.4 (13.2–13.6)
Smoking % (95% CI)	45.6 (45.2–45.9)
History of cardiovascular disease,% (95% CI)	7.1 (7.0–7.3)
History of extrahepatic cancer,% (95% CI)	4.5 (4.3–4.6)
Chronic kidney disease,% (95% CI)	3.1 (3.0–3.2)

SD standard deviation, CI confidence interval

<sup>a</sup>Abdominal obesity with at least 2 following components: diabetes mellitus, high blood pressure, hypertriglyceridemia, low HDL-cholesterol

respectively, 3.9 (95% CI 3.8–4.1) versus 3.5 (95% CI 95% CI 3.1–3.8) versus 7.3 (95% CI 6.7–7.9) versus 17.1% (95% CI 13.5–20.8) ( $p < 0.0001$ ). The prevalence of CKD in subjects without NAFLD, in NAFLD subjects with mild, intermediate, or advanced fibrosis was, respectively, 2.9

(95% CI 2.8–3.1) versus 3.4 (95% CI 95% CI 3.0–3.8) versus 4.5 (95% CI 4.0–5.0) versus 7.6% (95% CI 5.1–10.1) ( $p < 0.0001$ ).

**Multivariate Analysis of the Association Between the Severity of NAFLD and Comorbidities**

We first analyzed the relationship between comorbidities and NAFLD status, with patients without NAFLD as a reference group (Table 3). After adjustment for age, gender, overweight/obesity, diabetes, high blood pressure, hypercholesterolemia, and smoking, both indeterminate FLI and NAFLD remained associated with CVD (OR 1.15, 95% CI 1.05–1.25,  $p = 0.002$  and OR 1.25, 95% CI 1.12–1.41,  $p = 0.0001$ , respectively) and EHC (OR 1.12, 95% CI 1.01–1.24,  $p = 0.02$  and OR 1.37, 95% CI 1.20–1.58,  $p < 0.0001$ , respectively). After adjustment for the same risk factors, CKD was no longer associated with NAFLD, although there was a trend (OR 1.16, 95% CI 0.98–1.37,  $p = 0.07$ ). We then analyzed the relationship between the severity of NAFLD and comorbidities (Table 4). When adjusted for age, gender, overweight/obesity, diabetes, high blood pressure, hypercholesterolemia, and smoking, there was a dose-dependent effect of the severity of fibrosis, i.e., mild, intermediate and advanced, in NAFLD subjects for the risk of CVD (OR 0.93, 95% CI 0.81–1.06,  $p > 0.05$ , OR 1.36, 95% CI 1.21–1.53,  $p < 0.0001$ , and OR 3.07, 95% CI 2.36–3.98,  $p < 0.0001$ , respectively), EHC (OR 1.13, 95% CI 0.97–1.31,  $p > 0.05$ , OR 1.24, 95% CI 1.08–1.41,  $p = 0.001$ , and OR 1.64, 95% CI 1.15–2.29,  $p = 0.004$ , respectively) and CKD (OR 1.03, 95% CI 0.87–1.22,  $p > 0.05$ , OR 1.18, 95%

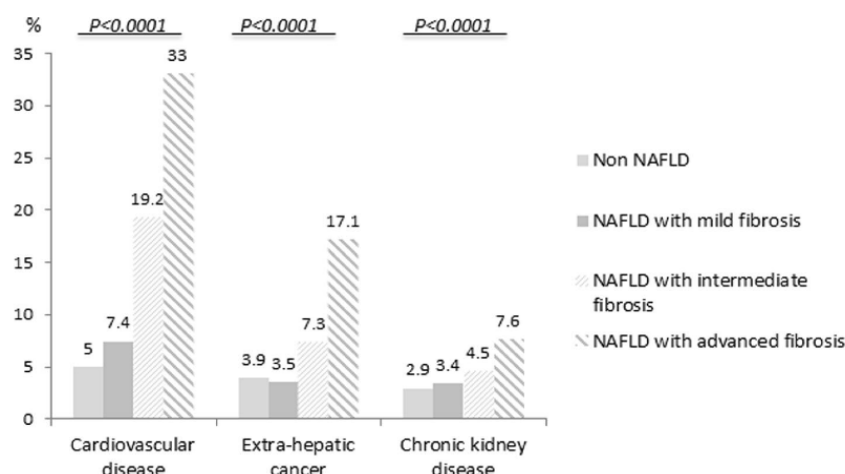
**Table 2** Characteristics of subjects according to NAFLD and fibrosis

Variables	No NAFLD (n=62,444)	Indeterminate FLI (n=18,764)	NAFLD with mild fibrosis (n=8278)	NAFLD with intermediate fibrosis (n=7498)	NAFLD with advanced fibrosis (n=427)
Age, yrs, mean (SD)	41.5 (12.9)	48.3 (12.7)	44.9 (11.5)	58.4 (7.8)	65 (4.9)
Male gender, % (95% CI)	36.7 (36.4–37.1)	63.5 (62.8–64.1)	58.4 (57.3–59.5)	76.9 (75.9–77.8)	92.9 (90.5–95.4)
Waist circumf., cm, mean (SD)	77.3 (7.8)	91.6 (6.1)	103.7 (9.8)	105.1 (10.0)	107.3 (9.5)
Overweight, % (95% CI)	17.9 (17.6–18.2)	64.5 (63.8–65.2)	34.3 (33.3–35.3)	40.3 (39.2–41.4)	36.4 (31.8–40.9)
Obesity, % (95% CI)	0.6 (0.5–0.7)	13.4 (12.9–13.8)	64.1 (63.1–65.2)	57.3 (56.2–58.5)	59.9 (55.2–64.5)
Diabetes mellitus, % (95% CI)	1.4 (1.3–1.5)	5.4 (5.1–5.8)	9.6 (8.9–10.3)	27.6 (26.5–28.7)	47.2 (42.5–52)
High blood pressure,% (95% CI)	3.8 (3.6–3.9)	11.5 (11.0–11.9)	12.0 (11.3–12.7)	31.1 (30–32.1)	56.4 (51.7–61.2)
Hypertriglyceridemia,% (95% CI)	2.5 (2.4–2.7)	20.5 (19.9–21.0)	49.3 (48.2–50.3)	43.4 (42.3–44.5)	42.6 (37.9–47.3)
Hypercholesterolemia,% (95% CI)	3.7 (3.5–3.9)	10.7 (10.2–11.1)	70.3 (69.4–71.3)	66.6 (65.6–67.7)	53.3 (48.5–58)
Metabolic syndrome,% (95% CI)	1.3 (1.2–1.4)	18.8 (18.1–19.4)	60.1 (58.8–61.4)	72.7 (71.5–73.9)	80.8 (77–84.5)
Smoking % (95% CI)	42.5 (42.1–42.9)	47.8 (47.0–48.5)	50.5 (49.3–51.7)	57.7 (56.5–58.9)	76.7 (72.2–81.1)

No NAFLD: FLI < 30; indeterminate FLI: FLI 30–60; NAFLD with mild fibrosis: FLI > 60 and Forns Index < 4.2; NAFLD with intermediate fibrosis: FLI > 60 and Forns Index 4.2–6.9; NAFLD with advanced fibrosis: FLI > 60 and Forns Index > 6.9

SD standard deviation, CI confidence interval

**Fig. 2** Prevalence of cardiovascular disease, extrahepatic cancer and chronic kidney among NAFLD subjects according to grade of fibrosis. No NAFLD: FLI < 30; NAFLD with mild fibrosis: FLI > 60 and Forns Index < 4.2; NAFLD with intermediate fibrosis: FLI > 60 and Forns Index 4.2–6.9; NAFLD with advanced fibrosis: FLI > 60 and Forns Index > 6.9. All prevalence is significantly different, excepted extra-hepatic cancer prevalence between non-NAFLD and NAFLD subjects with mild fibrosis. P value according to Chi2



**Table 3** Association between NAFLD and cardiovascular disease, extra-hepatic cancer or chronic kidney disease

Class	Cardiovascular disease		Extra-hepatic cancer		Chronic kidney disease	
	OR (95% CI)	P value*	OR (95% CI)	P value*	OR (95% CI)	P value*
No NAFLD	Reference	–	Reference	–	Reference	–
Indeterminate FLI	1.15 (1.05–1.25)	0.002	1.12 (1.01–1.24)	0.02	1.03 (0.91–1.16)	ns
NAFLD	1.25 (1.12–1.41)	0.0001	1.37 (1.20–1.58)	<0.0001	1.16 (0.98–1.37)	ns

No NAFLD: FLI < 30; indeterminate FLI: FLI 30–60; NAFLD: FLI > 60

\*Adjusted on age, gender, overweight/obesity, diabetes, high blood pressure, hypertriglyceridemia, hypercholesterolemia, smoking, and sport practice. OR: odds ratio, CI: confidence interval

ns = P > 0.05

**Table 4** Association between the severity of NAFLD and cardiovascular disease, extra-hepatic cancer, or chronic kidney disease

Class	Cardiovascular disease		Extra-hepatic cancer		Chronic kidney disease	
	OR (95% CI)	P value*	OR (95% CI)	P value*	OR (95% CI)	P value*
No NAFLD	Reference	–	Reference	–	Reference	–
Indeterminate FLI	1.16 (1.06–1.27)	0.001	1.10 (0.99–1.21)	ns	1.06 (0.94–1.20)	ns
NAFLD with mild fibrosis	0.93 (0.81–1.06)	ns	1.13 (0.97–1.31)	ns	1.03 (0.87–1.22)	ns
NAFLD with intermediate fibrosis	1.36 (1.21–1.53)	<0.0001	1.24 (1.08–1.41)	0.001	1.18 (1.01–1.39)	0.03
NAFLD with advanced fibrosis	3.07 (2.36–3.98)	<0.0001	1.64 (1.15–2.29)	0.004	2.09 (1.42–2.98)	<0.0001

OR, odds ratio; CI, confidence interval

\*Adjusted on age, gender, overweight/obesity, diabetes, high blood pressure, hypertriglyceridemia, hypercholesterolemia, smoking, and sport practice

ns = P > 0.05

CI 1.01–1.39, p = 0.03, and OR 2.09, 95% CI 1.42–2.98, p < 0.0001, respectively). Only the risk of CVD was significantly increased in subjects with indeterminate NAFLD (OR 1.16, 95% CI 1.06–1.27, p = 0.001).

### Multivariate Analysis of the Risk and Type of Extra Hepatic Cancer According to NAFLD and Fibrosis

Multivariate analysis of the relationship between NAFLD/fibrosis and the type of extra-hepatic cancer in men and women is shown in Table 5. When adjusted for age, gender, overweight/obesity, diabetes, high blood pressure, hypercholesterolemia, and smoking, NAFLD remained



**Table 5** Risk and type of extra-hepatic cancer in overall NAFLD subjects and according to the severity of fibrosis

	Overall NAFLD		NAFLD with mild fibrosis		NAFLD with intermediate fibrosis		NAFLD with advanced fibrosis	
	OR (CI 95%)	<i>P</i> value*	OR (CI 95%)	<i>P</i> value*	OR (CI 95%)	<i>P</i> value*	OR (CI 95%)	<i>P</i> value*
<i>Extra hepatic cancer in men</i>	1.24 (1.06–1.44)	0.007	1.21(0.93–1.57)	<i>ns</i>	1.28 (1.04–1.58)	0.02	1.77 (1.19–2.59)	0.004
Prostate	1.38 (1.07–1.79)	0.01	1.60 (1.13–2.28)	0.008	1.91 (1.18–3.10)	0.008	2.13 (1.19–3.80)	0.01
Lung	2.61 (0.83–8.28)	<i>ns</i>	1.49 (0.15–14.54)	<i>ns</i>	3.52 (0.73–17.10)	<i>ns</i>	3.30 (0.98–3.77)	<i>ns</i>
Colon	1.16 (1.12–1.19)	<0.0001	1.03 (0.36–2.97)	<i>ns</i>	1.46 (0.71–3.04)	<i>ns</i>	2.19 (1.07–6.54)	0.01
Thyroid	1.16 (0.48–2.80)	<i>ns</i>	0.81 (0.40–1.86)	<i>ns</i>	1.24 (0.40–3.87)	<i>ns</i>	1.98 (0.23–17.07)	<i>ns</i>
<i>Extra hepatic cancer in women</i>	1.27 (1.06–1.51)	0.008	1.13 (0.98–1.29)	<i>ns</i>	1.30 (1.03–1.63)	0.02	1.47 (1.16–1.84)	0.001
Ovarian	0.90 (0.70–1.34)	<i>ns</i>	0.45 (0.15–1.37)	<i>ns</i>	1.78 (0.50–6.37)	<i>ns</i>	2.87 (0.78–10.60)	<i>ns</i>
Uterus	0.99 (0.61–1.62)	<i>ns</i>	0.91 (0.64–1.36)	<i>ns</i>	0.61 (0.31–1.20)	<i>ns</i>	0.99 (0.51–1.91)	<i>ns</i>
Breast	1.09 (1.08–1.09)	<0.0001	1.08 (0.88–1.32)	<i>ns</i>	1.03 (0.73–1.44)	<i>ns</i>	1.49 (1.08–2.04)	0.01
Colon	1.44 (0.84–2.49)	<i>ns</i>	1.25 (0.47–3.35)	<i>ns</i>	1.07 (0.73–4.30)	<i>ns</i>	1.15 (1.12–1.18)	<0.0001
Lung	1.12 (1.06–1.17)	<0.0001	0.87 (0.49–1.03)	<i>ns</i>	1.05 (0.88–1.77)	<i>ns</i>	1.15 (0.86–2.99)	<i>ns</i>
Thyroid	1.55 (0.91–2.66)	<i>ns</i>	1.01 (0.43–2.36)	<i>ns</i>	1.23 (0.76–2.02)	<i>ns</i>	1.97 (0.96–4.06)	<i>ns</i>

\*Adjusted on age, gender, overweight/obesity, diabetes, high blood pressure, hypercholesterolemia, and smoking. Reference group is non-NAFLD (FLI < 30)

OR odds ratio, CI confidence interval

*ns* =  $P > 0.05$

associated with extra-hepatic cancer with a dose-dependent effect of fibrosis in both men and women (Table 5). After adjustment for the same risk factors, extra-hepatic malignancies associated with NAFLD in men were prostate (OR = 1.38, 95% CI 1.07–1.79,  $p = 0.01$ ) and colon cancer (OR = 1.16, 95% CI 1.12–1.19,  $p < 0.0001$ ). There was a significant severity-dependent effect of fibrosis for prostate cancer, i.e., mild, intermediate, and advanced (OR 1.6, CI95% 1.13–2.28,  $p = 0.008$ , OR 1.91, 95% CI 1.18–3.10,  $p = 0.008$ , and OR 2.13, 95% CI 1.19–3.8,  $p = 0.01$ , respectively), while the risk of colon cancer was only significantly increased in NAFLD subjects with advanced fibrosis (OR 2.19, 95% CI 1.07–6.54,  $p = 0.01$ ). When adjusted for the same risk factors in women, extra-hepatic malignancies associated with NAFLD were breast (OR 1.09, 95% CI 1.08–1.09,  $p < 0.0001$ ) and lung cancer (OR 1.12, 95% CI 1.06–1.17,  $p < 0.0001$ ). The risk of breast cancer was only significantly increased in NAFLD subjects with advanced fibrosis (OR 1.49, 95% CI 1.08–2.04,  $p = 0.01$ ), while there was no significant association between lung cancer and the severity of fibrosis. Colon cancer was only associated with NAFLD in subjects with advanced fibrosis (OR 1.15, 95% CI 1.12–1.18,  $p < 0.0001$ ).

### Propensity Analysis of the Risk of Comorbidities in NAFLD Subjects

NAFLD subjects were matched with non-NAFLD subjects according to age, gender, BMI, and smoking using a propensity score. NAFLD remained significantly associated with CVD (OR 1.02, 95% CI 1.01–1.02,  $p < 0.0001$ ), EHC (OR 1.01, 95% CI 1.01–1.02,  $p < 0.0001$ ), and CKD (OR 1.01, 95% CI 1.01–1.03,  $p < 0.0001$ ) in these subjects.

### Discussion

This study in a large sample of subjects, representative of the adult French population with no excessive alcohol consumption or chronic viral hepatitis, suggests that the relationship between NAFLD and comorbidities such as cardiovascular disease (CVD), extra-hepatic cancer (EHC), and chronic kidney disease (CKD), mainly depends on the severity of liver fibrosis. NAFLD with intermediate or advanced fibrosis was associated with a high prevalence of CVD, EHC, and CKD and remained associated with these comorbidities when adjusted for age, sex, metabolic disorders, and smoking. Malignancies associated with NAFLD and fibrosis were prostate and colon cancer in men, and breast and lung cancer in women.

The CONSTANCES population-based cohort is a large, representative sample of the French general population aged 18 and over [7]. The lower prevalence of obesity or diabetes than expected in our study population [17] is mainly due to the exclusion of subjects with excessive alcohol consumption or viral hepatitis. In this selected population, the relatively low mean age, i.e., 47.2 years, may impact the prevalence of comorbidities. However, our study population was adjusted on socio-demographic characteristics and health status of patients from administrative databases, in order to be representative of the French adult population [16]. Scores for noninvasive markers such as the Fatty Liver Index (FLI) and Forns Index were determined with prospective data. The FLI has been validated in several studies as a marker of NAFLD in the general population and has been shown to be highly accurate in detecting fatty liver [12–14]. Moreover, a high FLI score has been associated with an increased risk of coronary heart disease [18]. The Forns Index has already been shown to have a relatively good performance as a marker of fibrosis in NAFLD in several studies [8, 19–21]. It was also recently shown to be accurate in the prediction of the development of severe liver disease in patients at risk of NAFLD [22]. In this study, the Forns Index was only used in subjects with NAFLD based on an FLI > 60, and we identified NAFLD subjects with minimal or advanced fibrosis. NAFLD subjects with an intermediate Forns Index score, in the “gray zone,” were considered to have intermediate fibrosis. The significant increase in the prevalence of usual risk factors in NAFLD subjects with mild, intermediate, and advanced fibrosis in our population supports the accuracy of this classification in this study.

We found a significant and dose-dependent relationship between subjects with NAFLD and intermediate or advanced fibrosis and a history of CVD, EHC, or CKD after adjustment for other known risk factors, but no association in subjects with NAFLD and minimal fibrosis. Although BMI is a factor in the calculation of the FLI, NAFLD remained associated with an increased risk of CVD, EHC, and CKD when NAFLD and non-NAFLD subjects were matched for age, gender, BMI, and smoking. NAFLD has been linked to an increased risk of CVD in a number of cross-sectional and longitudinal surveys [4]. Few studies have investigated the role of the severity of NAFLD on the risk of CVD in the general population. Two studies in patients with biopsy-proven NAFLD have reported a positive, graded relationship between carotid-artery intimal medial thickness and the histological severity of NAFLD, including the stage of fibrosis [23, 24]. In another study that was conducted in biopsy-proven NAFLD, the 10-year cardiovascular event risk was higher in the  $\geq$ F2 NAFLD population [25]. A metaanalysis has shown that the risk of developing fatal and non-fatal CVD events was higher in patients with severe NAFLD [26].

Finally, CVD was the main cause of death in longitudinal studies performed in patients with biopsy-proven NAFLD, and baseline fibrosis was the strongest predictive factor [3]. Some of the mechanisms that may increase the risk of CVD in NAFLD are systemic inflammation, endothelial dysfunction, hepatic insulin resistance, oxidative stress, and altered lipid metabolism [4]. The second most frequent cause of death after CVD in patients with NAFLD is malignancy [3]. Besides HCC and colorectal cancer, little attention has been paid to the association between the severity of NAFLD and other type of cancers. In our study, after adjustment for the usual risk factors, NAFLD and fibrosis remained associated with prostate and colon cancer in men, and breast and lung cancer in women. In a large cohort of subjects from South Korea, the development of colon cancer in men and breast cancer in women was associated with NAFLD, when adjusted for the usual risk factors [27]. Interestingly, high values of noninvasive fibrosis markers were strongly associated with the development of all cancers. In another study from China in patients with biopsy-proven NAFLD, colon adenoma or advanced neoplasms were associated with NASH but not with simple steatosis [28]. In a large German case–control study, NAFLD was associated with increased risk of breast cancer in women, genital cancer in men, and skin cancer [29]. The mechanisms of the association between NAFLD and extra-hepatic malignancies are not fully understood. It has been suggested that hyperinsulinemia and the proinflammatory state that is associated with hypoadiponectinemia could promote carcinogenesis in NAFLD patients, both conditions which are worsened in advanced liver disease [5]. We also evaluated chronic kidney disease (CKD) in our population, defined by a glomerular filtration rate < 60 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>. CKD was associated with NAFLD and advanced fibrosis, after adjustment for other risk factors such as diabetes and HBP. In a meta-analysis using the same definition of CKD, the presence and severity of NAFLD were associated with an increased risk of CKD [6].

Our study has several limitations. The causality and temporality between the comorbidities and NAFLD could not be confirmed due to the cross-sectional design. For example, we cannot exclude that NAFLD could occur after a cardiovascular event. The influence of NAFLD on cardiovascular and cancer events should be evaluated in our cohort in a longitudinal study before drawing any conclusions. Our study was also limited because we could not evaluate the influence of NASH on the relationship between NAFLD and comorbidities. Unfortunately, there are no validated noninvasive markers for the diagnosis of NASH, which can still only be confirmed by liver biopsy. However, a number of longitudinal studies in patients with biopsy-proven NAFLD have demonstrated that fibrosis rather than NASH injury was the best predictor of overall mortality.

In conclusion, this large adult population-based cohort study confirms that NAFLD may be associated with a high prevalence of CVD, EHC, and CKD, and that this association mainly depends on the grade of liver fibrosis when adjusted for the usual risk factors. It is still not known whether NAFLD plays a direct pathogenic role in the development of CVD, EHC, or CKD, or whether it is a surrogate marker of these events perhaps by the worsening of the metabolic syndrome. Nevertheless, screening for CVD, extra-hepatic cancers such as colon and prostate cancer in men and breast and lung cancer in women, or CKD should be performed in NAFLD subjects, especially those with advanced fibrosis. Specific treatments of NAFLD should evaluate whether interventional strategies influence the occurrence or the severity of extra-hepatic complications.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s10620-021-07032-z>.

## Declarations

**Conflict of interest** All authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Rinella ME. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. *JAMA* 2015;313:2263–2273.
- Serfaty L, Lemoine M. Definition and natural history of metabolic steatosis: clinical aspects of NAFLD, NASH and cirrhosis. *Diabetes Metab* 2008;34:634–637.
- Dulai PS, Singh S, Patel J, Soni M, Prokop LJ, Younossi Z et al. Increased risk of mortality by fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease: systematic review and meta-analysis. *Hepatology* 2017;65:1557–1565.
- Francque SM, van der Graaf D, Kwanten WJ. Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk: pathophysiological mechanisms and implications. *J Hepatol* 2016;65:425–443.
- Sanna C, Rosso C, Marietti M, Bugianesi E. Non-alcoholic fatty liver disease and extra-hepatic cancers. *Int. J. Mol. Sci.* 2016;17:717.
- Mantovani A, Petracca G, Beatrice G, Csermely A, Lonardo A, Schattenberg JM et al. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident chronic kidney disease: an updated meta-analysis. *Gut*. 2020. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-323082>.
- Zins M, Goldberg M. CONSTANCES team. The French CONSTANCES population-based cohort: design, inclusion and follow-up. *Eur J Epidemiol* 2015;30:1317–28.
- Nabi O, Lacombe K, Boursier J, Mathurin P, Zins M, Serfaty L. Risk factors of nonalcoholic fatty liver disease and advanced fibrosis in general population: the French nationwide NASH-CO study. *Gastroenterology* 2020;159:791–793.
- Ruiz F, Goldberg M, Lemonnier S, Ozguler A, Boos E, Brigrand A et al. High quality standards for a large-scale prospective population-based observational cohort: constances. *BMC Public Health* 2016;16:877.
- Gache P, Michaud P, Landry U, Accietto C, Arfaoui S, Wenger O et al. The alcohol use disorders Identification test (AUDIT) as a screening tool for excessive drinking in primary care: reliability and validity of a French version. *Alcohol Clin Exp Res* 2005;29:2001–2007.
- Alberti KGMM, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome—a new world-wide definition. A consensus statement from the international diabetes federation. *Diabet Med* 2006;23:469–80.
- Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, Masutti F, Passalacqua M, Castiglione A et al. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol* 2006;6:33.
- Zelber-Sagi S, Webb M, Assy N, Blendis L, Yeshua H, Leshno M et al. Comparison of fatty liver index with noninvasive methods for steatosis detection and quantification. *World J Gastroenterol*. 2013;19:57–64.
- Koehler EM, Schouten JNL, Hansen BE, Hofman A, Stricker BH, Janssen HLA. External validation of the fatty liver index for identifying nonalcoholic fatty liver disease in a population-based study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013;11:1201–1204.
- Forns X, Ampurdanès S, Llovet JM, Aponte J, Quintó L, Martínez-Bauer E et al. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology* 2002;36:986–992.
- Goldberg M, Carton M, Descatha A, Leclerc A, Roquelaure Y, Santin G et al. CONSTANCES: a general prospective population-based cohort for occupational and environmental epidemiology: cohort profile. *Occup Environ Med* 2017;74:66–71.
- Matta J, Carette C, Rives Lange C, Czernichow S. French and worldwide epidemiology of obesity. *Presse Med* 2018;47:434–438.
- Gastaldelli A, Kozakova M, Højlund K, Flyvbjerg A, Favuzzi A, Mitrakou A et al. Fatty liver is associated with insulin resistance, risk of coronary heart disease, and early atherosclerosis in a large European population. *Hepatology* 2009;49:1537–1544.
- Nones RB, Ivantes CP, Pedroso MLA. Can FIB4 and NAFLD fibrosis scores help endocrinologists refer patients with non-alcoholic fat liver disease to a hepatologist? *Arch Endocrinol Metab*. 2017;61:276–281.
- Yang HR, Kim HR, Kim MJ, Ko JS, Seo JK. Noninvasive Parameters and hepatic fibrosis scores in children with nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2012;18:1525–1530.
- Yang M, Jiang L, Wang Y, Li X, Zou Z, Han T et al. Nan. Step layered combination of noninvasive fibrosis models improves diagnostic accuracy of advanced fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastrointest Liver Dis* 2019;28:289–296.
- Hagström H, Talbäck M, Andreasson A, Walldius G, Hammar N, Hagström H et al. Ability of noninvasive scoring systems to identify individuals in the population at risk for severe liver disease. *Gastroenterology* 2020;158:200–214.
- Targher G, Bertolini L, Padovani R, Rodella S, Zoppini G, Zenari L et al. Relations between carotid artery wall thickness and liver histology in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Diabet Care* 2006;29:1325–1330.
- Colak Y, Senates E, Yesil A, Yilmaz Y, Ozturk O, Doganay L et al. Assessment of endothelial function in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Endocrine* 2013;43:100–107.
- Labenz C, Prochaska JH, Huber Y, Nagel M, Straub BK, Wild P et al. Cardiovascular risk categories in patients with nonalcoholic fatty liver disease and the role of low-density lipoprotein cholesterol. *Hepatol Commun* 2019;3:1472–1481.
- Targher G, Byrne CD, Lonardo A, Zoppini G, Barbui C. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident cardiovascular disease: a meta-analysis. *J Hepatol* 2016;65:589–600.
- Kim GA, Lee HC, Choe J, Kim MJ, Lee MJ, Chang HS et al. Association between non-alcoholic fatty liver disease and cancer incidence rate. *J Hepatol* 2018;68:40–146.

28. Wong VW, Wong GL, Tsang SW, Fan T, Chu WC, Woo J et al. High prevalence of colorectal neoplasm in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2011;60:829–836.
29. Huber Y, Labenz C, Michel M, Wörns MA, Galle PR, Kostev K et al. Tumor incidence in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Dtsch Arztebl Int* 2020;117:719–724.

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## **V.Chapitre II : Études Longitudinales :« Impact de la NAFLD sur la morbi-mortalité en population générale »**

Le travail présenté dans cette partie constitue le deuxième volet de l'étude « Évaluation de l'impact de la NAFLD sur la morbi-mortalité en population générale ».

### **A. Impact de la NAFLD sur la morbi-mortalité en population générale (Ci-après dénommée « NASHCO-STUDY »)**

#### **Présentation de l'étude**

L'article présenté dans cette partie, en cours de publication, a été initié dans le contexte d'une forte incidence de la cirrhose due à la NASH comme indication de transplantation hépatique. Cette indication est passée de 1,2% de toutes les transplantations hépatiques aux États-Unis en 2001 à 17,4% en 2014 (279,280) et y est devenue la deuxième étiologie sur les listes d'attente de greffe de foie (281). En Europe, 35% des CHC ont été observés chez des patients atteints de NASH (282). En outre, alors que l'indication de transplantations simultanées de foie-rein réalisées pour le VHC et la maladie alcoolique du foie a diminué de 52% à 40% entre 2002 et 2011, cette indication connaissait une forte croissance pour la NAFLD, passant de 8,2% à 22% pour la même période (283). Les patients atteints de NAFLD cumulent plusieurs facteurs de risque métaboliques (syndrome métabolique et ses composants) et ont tendance à être plus âgés (5,284). Ces éléments, par ailleurs facteurs de risque de maladies d'autres systèmes et d'organes, les rendent plus susceptibles aux cardiopathies, aux cancers et aux maladies rénales que les personnes avec une infection virale (VHC et VHB) ou une consommation à risque d'alcool (5,285). D'autres études issues de cohortes hospitalières suggèrent que la NAFLD est associée à un sur-risque de morbi-mortalité hépatique et globale. Les accidents cardiovasculaires seraient en outre la première cause de décès chez les personnes atteintes par la NAFLD en milieu hospitalier. Toute fois, très peu d'études ont comparé les patients NAFLD à ceux ayant d'autres maladies chroniques du foie et particulièrement en population générale. On peut alors s'interroger sur l'extrapolation éventuelle des observations dans les cohortes hospitalières sur l'ensemble des personnes atteintes de NAFLD en particulier en population générale. Autrement dit, un patient dont l'état de santé l'a amené jusqu'à l'hôpital pour une demande de soins pourrait-il être représentatif de l'ensemble de la population qui aurait une même "comorbidité" que lui mais qui n'est pas en situation de demande de soins par ce que son état ou ses moyens lui permettent difficilement une telle démarche ? Peut-on

transposer la population hospitalière ou ce qui se passe à l'hôpital à la population générale ? Sinon, peut-on entreprendre efficacement des actions ou des interventions de santé en population pour un facteur de risque dont on ne maîtrise pas réellement l'ampleur et l'effet sur l'état de santé de cette population ? Il convient pour répondre aux interrogations précédentes, de se soustraire des contextes particuliers pour fournir des éléments de réponses précis à la problématique de l'impact de la NAFLD sur l'état de santé de la population.

C'est dans ce contexte que nous avons entrepris cette analyse qui évalue la part de la NAFLD sur la morbi-mortalité en se soustrayant du biais du contexte hospitalier.

Dans cet article, nous avons cherché à évaluer le fardeau de la NAFLD sur l'incidence de la morbi-mortalité notamment hépatique, cardiovasculaire, liée aux cancers et à la maladie rénale chronique, ainsi que sur la mortalité globale en population générale française.

Cette étude a d'une part, confirmé la forte morbi-mortalité liée à la NAFLD, corrélée à la sévérité de la fibrose hépatique. D'autre part, par rapport à la consommation à risque d'alcool et aux infections par les virus de l'hépatite (VHB et VHC), la NAFLD était la cause de morbidité hépatique à la croissance la plus rapide, bien les personnes atteintes par le VHC restent actuellement les plus à risque de complications hépatiques. En revanche, la NAFLD était la cause principale et la plus fréquente de morbidités extra-hépatiques, telles que les maladies cardiovasculaires et les maladies rénales chroniques, et de mortalité globale. La prévalence des troubles métaboliques (diabète, obésité, hyperlipidémie, hypertension artérielle) était significativement plus élevée chez les personnes atteintes de NAFLD que dans les autres groupes à risque. De plus, les personnes atteintes de NAFLD semblaient avoir une hygiène de vie moins favorable (tabagisme, sédentarité). Ces résultats montrent, et compte tenu de la prévalence croissante de l'obésité, du diabète et leur impact sur la sévérité de la maladie, que la NAFLD pourrait, devenir à très court terme et si rien n'est fait pour freiner la dynamique, un problème majeur de santé publique mondiale, en particulier dans les pays occidentaux.

Cependant, des interrogations persistent quant au bénéfice d'un dépistage systématique et à la définition d'éventuels groupes de populations à cibler pour réduire l'impact de la NAFLD sur la morbi-mortalité, étant donnée l'absence de données et de traitement disponible. En conséquence, l'identification des groupes de population et le bénéfice d'intervention

systematiques (dépistage) devraient faire, dans la mesure du possible, l'objet d'investigations ultérieures.

### **Discussion générale de l'article**

Le mérite de cette étude a été particulièrement de pouvoir évaluer le fardeau de la NAFLD sur la santé de la population et, dans la même veine, évaluer son positionnement en tant que problème de santé par rapport aux autres problèmes de santé à tropisme hépatique historiques tels les hépatites virales et la consommation à risque d'alcool. Ce travail nous a permis de confirmer l'ampleur de l'impact de la NAFLD sur l'état de santé de la population, abstraction faite du contexte, et la nécessité plus qu'urgente d'action de santé en particulier sur la prévention et le traitement des troubles métaboliques afin de réduire voire de freiner le fléau de la NAFLD. En effet, les personnes atteintes de NAFLD cumulaient plus de facteurs de risque cardiométaboliques (syndrome métabolique et ses composants, tabagisme, sédentarité). Ces éléments, par ailleurs facteurs de risque de maladies d'autres systèmes et d'organes, les rendent plus susceptibles aux cardiopathies, aux cancers et aux maladies rénales que les personnes avec une infection virale (VHC et VHB) ou une consommation à risque d'alcool.

Ces résultats alertent en particulier, sur et au risque de noyer les bénéfices (sur la morbi-mortalité) des énormes efforts et sacrifices consentis ces dernières décennies dans la prévention et la prise en charge de la consommation à risque d'alcool, des virus de l'hépatite et les effets attendus des antiviraux à action directe, la nécessité plus qu'urgente d'actions et de politiques vigoureuses de santé publique dans la prévention et la prise en charge des pathologies métaboliques (diabète, obésité, HTA, dyslipidémie etc.) en forte croissance dans le monde et dans les pays occidentaux en particulier.

Cette étude comporte quelques limites qu'il convient de souligner : certaines sont liées à l'attrition de patients inhérente aux études observationnelles (en particulier en population) et d'autres à nos choix méthodologiques. Certains patients ont été perdus de vue ou n'ont pas pu être retrouvés lors du chaînage avec les bases de données médico-administratives (SNDS). Cela pourrait induire des biais d'attrition si la cause de leur attrition n'est pas indépendante de leur état de santé. Aussi, la NAFLD et certaines comorbidités (cancers par exemple) sont des maladies chroniques, insidieuses et d'installation lente qui nécessite une longue période d'observation, ce qui pourrait interroger sur la temporalité entre la NAFLD et l'initiation du

processus de pathogénèse de ces comorbidités. Cependant, nous disposons dans cette étude d'un assez bon recul (3.75 ans) pour observer la survenue d'un nombre suffisant d'évènements pour obtenir une puissance statistique satisfaisante.

Une autre limite est l'utilisation de biomarqueurs non invasifs pour évaluer la prévalence de la NAFLD et la fibrose. Il convient toutefois de noter que la biopsie hépatique, qui est la méthode de référence pour le diagnostic de la NAFLD et la sévérité de l'atteinte hépatique, ne peut pas être utilisée à grande échelle comme dans la population générale.

Dans ce type d'étude, un autre écueil est relatif aux évènements compétitifs, ce que nous avons pris en compte dans notre approche méthodologique conformément aux recommandations en la matière (273,286).

Ces quelques limites ne s'auraient affecter la qualité et la portée scientifique de nos résultats, qui par ailleurs présentent un intérêt majeur de santé publique dans la mesure où ils supportent l'hypothèse d'un impact de la NAFLD sur la morbi-mortalité et l'intérêt d'actions urgentes. Les résultats de nos analyses fournissent des éléments qui permettent d'appréhender l'ampleur du fléau de la NAFLD sur la morbi-mortalité en population générale et confortent ce qui est observé dans des populations spécifiques, justifiant ainsi la nécessité et l'urgence d'actions fortes pour le contrer.

Étant donné la nature et les objectifs initiaux de notre étude, nos résultats ne permettent pas de trancher la question de l'intérêt du dépistage systématique sur le cours de la NAFLD et éventuellement son impact sur la morbi-mortalité. En pareille situation, et en l'absence de traitement pharmacologique approuvé, la question de l'identification voire du dépistage systématique des sous-groupes particulièrement susceptibles à des formes plus sévères mérite légitimement d'être soulevée. Dans cette optique, nous nous proposons dans la suite de cette étude d'analyser plus finement les sous-populations susceptibles de bénéficier de mesures particulières, le temps qu'un traitement plus efficace puisse être trouvé.



### **Article 3: Hepatitis C and NAFLD as main causes of liver-related morbidity and mortality in the French general population: a Nationwide Study (NASH-CO study)**

Oumarou Nabi,<sup>1</sup> Nathanaël Lapidus,<sup>1</sup> Jerome Boursier,<sup>3,4</sup> Philippe Mathurin,<sup>5</sup> Victor de Ledinghen,<sup>6</sup> Jean-Michel Petit,<sup>7</sup> Sofiane Kab,<sup>2</sup> Adeline Renuy,<sup>2</sup> Marie Zins,<sup>2,8</sup>, Lawrence Serfaty<sup>9,10</sup>, and Karine Lacombe<sup>1,11</sup>

<sup>1</sup> Sorbonne University, Inserm, Pierre Louis Institute of Epidemiology and Public Health (IPLESP), AP-HP, Saint-Antoine Hospital, F75012 Paris, France

<sup>2</sup> Versailles-Saint Quentin University, UMS 11 Inserm, France

<sup>3</sup>HepatoGastroenterology Department, Anger University Hospital, Angers France

<sup>4</sup>HIFIH Laboratory, UPRES EA3859, SFR 4208, Angers University, Angers, France

<sup>5</sup>Liver Unit, Lille University Hospital, France

<sup>6</sup>Bordeaux University Hospital Branch, Bordeaux, France

<sup>7</sup>Department of Endocrinology-Diabetology, Dijon University Hospital, Dijon, France

<sup>8</sup>Université de Paris, France

<sup>9</sup>Hepatogastroenterology Service, Hôpital Hautepierre, Strasbourg University Hospital, France

<sup>10</sup>Sorbonne University, Inserm UMR\_S938, Paris, France

<sup>11</sup> Infectious Diseases Department, Hôpital Saint-Antoine, APHP, Paris, France

Short Title: NAFLD and morbimortality

Number of words : 6533

Number of tables: 4

Number of figures: 3

Corresponding Author :

Oumarou Nabi

Sorbonne Université, INSERM, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique IPLESP

AP-HP, Saint-Antoine Hospital, F75012

Paris, France

Email : [oumarou.nabi@inserm.fr](mailto:oumarou.nabi@inserm.fr)

## Abbreviations

NAFLD : Non-Alcoholic Fatty Liver Disease

NASH : Non-Alcoholic SteatoHepatitis

FLI: Fatty Liver Index

FI: Forns Index

HBP: high blood pressure

ALT: alanine amino-transferase

GGT: gamma glutamyl-transferase

CVD: cardiovascular disease

EHC: extrahepatic cancer

CKD: chronic kidney disease

HBV: Hepatitis B virus

HCV: Hepatitis C virus

**Conflict of interest:** nothing to declare for all authors

**Grant support:** none

### **Author contributions of manuscript**

Oumarou Nabi, Nathanaël Lapidus, Karine Lacombe and Lawrence Serfaty: study concept and design; acquisition of data; analysis and interpretation of data; drafting of the manuscript; critical revision of the manuscript for important intellectual content; statistical analysis.

Jerôme Boursier, Philippe Mathurin and Victor De Ledinghen: analysis and interpretation of data; drafting of the manuscript; critical revision of the manuscript for important intellectual content.

Jean-Michel Petit, Sofiane Kab, Adeline Renuy and Marie Zins: critical revision of the manuscript for important intellectual content.

## **Abstract**

**Background:** The impact of NAFLD on morbidity and mortality has yet to be documented at the general population level. This study aimed to assess whether NAFLD was associated with morbidities and mortality, and to estimate its impact on health status and mortality compared to other liver-related diseases such as chronic hepatitis C or alcohol abuse.

**Methods:** The study population consisted of 154,900 participants from Constances cohort. Non-invasive diagnosis of NAFLD and advanced fibrosis was performed using the fatty liver index and Forns index, respectively. Constances data were linked to hospitalization data to identify liver-related events, cardiovascular diseases (CVD), extrahepatic cancers, and chronic kidney disease (CKD).

**Results:** The prevalence of NAFLD was 18.3% in subjects without other chronic liver diseases, among whom 2.7% had fibrosis. The prevalence of fibrosis was higher in chronic hepatitis C (HCV) and NAFLD subjects (4.7% vs 2.7% vs 1.7% vs 1.6%, respectively, in HCV, NAFLD, heavy drinkers, and subjects with chronic hepatitis B). HCV remains the leading cause of hepatic-related complications (HR 9.75, 95%CI 6.63–14.33) before NAFLD (HR 2.63, 95%CI 1.96–2.87). NAFLD (HR 1.43, 95%CI 1.25–1.65) is the third leading cause of death behind HCV (HR 2.17, 95%CI 1.25–3.76) and binge drinking (HR 4.50, 95%CI 2.95–6.84). However, NAFLD remains the leading cause of CVD (HR 2.33, 95%CI 1.20–2.78) and CKD (HR 1.89, 95%CI 1.48–2.40).

**Conclusion:** This large community-based cohort showed that NAFLD was associated with excess morbidity and mortality and demonstrated the fastest-growing trend. It challenges HCV infection in terms of hepatic morbidity and overall mortality.

**Key words:** NAFLD; advanced fibrosis; Fatty Liver Index; Forns Index; cardiovascular diseases; chronic kidney disease; extrahepatic malignancies, mortality.

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a common cause of chronic liver disease(1). This syndrome ranges from simple steatosis to non-alcoholic steatohepatitis (NASH) with varying amounts of fibrosis and cirrhosis(2) Cohort studies have reported that the severity of liver fibrosis was the best predictor of liver-related mortality, but also of overall mortality in patients with biopsy-proven NAFLD(3). As a major risk factor for cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC), NAFLD is possibly becoming the leading cause of liver transplantation and liver-related mortality(4,5). In addition to liver-related complications, NAFLD may promote cardiovascular disease (CVD), extrahepatic malignancy, or chronic kidney disease (CKD)(6–8).

However, few studies have investigated the burden of NAFLD at a general population level. Furthermore, few studies have directly compared NAFLD and the other chronic liver diseases (HCV, HBV, and heavy alcohol consumption) regarding their impact on morbidity and mortality.

The French Constances population-based cohort was designed as a large sample, representative for age, gender, and socioeconomic status of the French adult population aged 18–69 years, composed of more than 220,000 subjects included between 2012 and 2021(9). Using this cohort, the present study aimed to assess the burden of NAFLD and other chronic liver diseases on liver-related morbidity (hepatic events, CVD, extrahepatic malignancy, and CKD) and overall mortality in the general population.

## **Materials and Methods**

### **Study sample**

We conducted a longitudinal study with data collected at baseline and follow-up from participants included in the Constances cohort between 2012 and 2019. This cohort has been previously described(9,10). Subjects recruited in the Constances cohort were included in the present analysis if they were at least 18 years old and had no history or ongoing chronic hepatic

disease such as autoimmune hepatitis, Wilson's disease, hemochromatosis, alpha-1 antitrypsin deficiency, or known hepatotoxic drug intake (systemic corticosteroid therapy, methotrexate, tamoxifen, amiodarone). Next, the overall sample was split into five groups: (i) non-NAFLD subjects, corresponding to those with no history of hazardous alcohol use defined by daily consumption above 30 grams per day in men and 20 grams per day in women, no history of chronic hepatitis B or C virus infection, and no history of other liver diseases including NAFLD; (ii) NAFLD subjects, corresponding to those with no history of hazardous alcohol use, no history of chronic hepatitis B or C virus infection, and no history of other liver diseases except NAFLD; (iii) subjects with history of chronic hepatitis virus C; (iv) those with a history of chronic hepatitis B virus; and (v) those with hazardous alcohol use (Supplementary Methods). Constances data were combined with the National Healthcare Database (Système National des Données de Santé, SNDS), which provided data on hospitalization and occurrence of death. The study was approved by the Commission Nationale Informatique et Libertés (CNIL), and ethics clearance was obtained from the Institutional Review Board of the French National Institute of Health (Authorization number: 910486). All participants provided written informed consent for the use of personal data for research.

### **Data collection at inclusion**

Socio-demographic, comorbidity, and lifestyle data were obtained through standardized self-administered questionnaires. Socio-demographic data included age, gender, occupation and employment status, education level, and geographic origin. Alcohol consumption was assessed using the AUDIT questionnaire. The number of glasses per day was converted into grams per day of alcohol (1 glass=10 g of alcohol).

The health and morbidity data included history of cancer (colon, breast, prostate, lung, thyroid, ovary, uterus), cardiovascular events (arteritis of lower limbs, myocardial infarction, stroke, angina pectoris), blood hypertension, and diabetes. Body mass index (BMI) was calculated as

the ratio of weight to height squared. Blood samples were made on a venous blood sample after a 12-hour fasting period, and analyses were performed in the Health Screening Center (HSC) laboratories according to standards common to all. Available biological data of interest were blood glucose, serum creatinine, gamma glutamyl transferase (GGT), alanine aminotransferases (ALT), total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, triglycerides (TGs), and platelets. Diabetes was defined by a blood glucose greater than 6.9 mmol/L after 12 hours of fasting according to the World Health Organization definition and/or antidiabetic therapy. The metabolic syndrome was defined according to the international diabetes federation. Chronic kidney disease (CKD) was defined as a glomerular filtration rate  $<60$  mL/min/1.73m<sup>2</sup> calculated according to the CKD-EPI equation (Chronic Kidney Disease-Epidemiology Collaboration) (Supplementary Methods).

### **Definition of NAFLD and liver fibrosis**

The fatty liver index (FLI) was chosen as a surrogate marker of NAFLD(11). It has been successfully cross-validated in external populations(12). Subjects with FLI  $\geq 60$  were considered to have NAFLD based on the literature. The Forns index (FI) was chosen as a surrogate marker of liver fibrosis. It was calculated according to the published formula(13) and has been previously validated as a marker of liver fibrosis in NAFLD(10). The previously published thresholds were used to rule in or rule out advanced fibrosis (F3/F4),  $<4.2$  and  $>6.9$ , respectively. Subjects were classified as follows: non-NAFLD (FLI  $<60$ ), NAFLD (FLI  $\geq 60$ ), NAFLD with mild fibrosis (FLI  $\geq 60$  and Forns index  $<4.2$ ), NAFLD with intermediate fibrosis (FLI  $\geq 60$  and Forns index 4.2–6.9), and NAFLD with advanced fibrosis (FLI  $\geq 60$  and Forns index  $>6.9$ ).

### **Follow-up study**

Constances data were combined with the SNDS to collect data on hospitalization and death from January 1, 2012, to December 31, 2019(14). SNDS data were available during this period

for 169,303 Constances participants. The follow-up period for each study participant was the time elapsed between the Constances baseline inclusion and December 31, 2019, the date of death, or the last date of follow-up, whichever occurred first. The International Classification of Diseases (ICD-10) code was used to define liver-related events according to the recent expert panel consensus statement (compensated cirrhosis, hepatocellular carcinoma, decompensated cirrhosis)(15), CVD (arteritis of lower limbs, myocardial infarction, stroke, angina pectoris), EHC (colon, breast, prostate, lung, thyroid, ovary, uterus), CKD (chronic kidney disease, diabetic nephropathy, hypertensive nephropathy, kidney failure) (Supplementary Table 1), and overall mortality. Subjects with histories of cirrhosis-related complications or hepatocellular carcinoma, CVD, or EHC, or subjects with glomerular filtration rate (GFR)  $<60$  mL/min/1.73 m<sup>2</sup> at baseline were excluded in the calculation of each category of incident events.

### **Statistical analysis**

Continuous and categorical variables were expressed as means  $\pm$  standard deviation (SD) and percentages and compared using Student's t test and the  $\chi^2$  test, respectively (Supplementary Methods). We performed a longitudinal analysis to estimate the association of NAFLD and other chronic liver diseases with morbidities and overall mortality in the general population. In an initial set of analyses aimed at studying the prognosis associated with NAFLD and with fibrosis in NAFLD subjects, we excluded subjects with chronic hepatitis B and C, chronic liver diseases other than NAFLD, and those with hazardous alcohol use. This sample was split (i) into two groups: participants without NAFLD (FLI  $<60$ ) and those with NAFLD (FLI  $\geq 60$ ); then (ii) into four groups: participants without NAFLD (FLI  $<60$ ), those with NAFLD and mild (FLI  $\geq 60$  and FI  $<4.2$ ), intermediate (FLI  $\geq 60$  and FI 4.2–6.9), and advanced fibrosis (FLI  $\geq 60$  and FI  $>6.9$ ).

In a second set of analyses, NAFLD subjects were compared to those with other chronic liver conditions. The overall study sample was split into five groups: non-NAFLD (FLI  $<60$ ) and no

other chronic liver condition, NAFLD (FLI $\geq$ 60), HCV infection, HBV infection, and hazardous alcohol use.

Mortality was studied with the standard Cox proportional hazard models and other clinical outcomes with the Fine-Gray model, including all-cause mortality as a competing event. The cumulative incidence function was estimated for each clinical outcome, and Gray's test was used to estimate the differences in the cumulative incidence functions between the groups. Standard Kaplan-Meier estimators were calculated for the all-cause mortality rate.

Propensity-score-based stabilized inverse-probability of treatment weighting (IPTW) was applied to handle confounding. Logistic and multinomial propensity scores for belonging to either one of the compared groups were derived from potential confounding factors such as socio-demographic characteristics (age, sex, geographic origin, education level), clinical and anthropometric variables (high blood pressure, diabetes, metabolic syndrome and BMI, waist circumference), lifestyle (smoking, soft drink, coffee intake, and regular exercise), and biological data (TGs, cholesterol, and ALT). The positivity assumption was graphically checked. We used the standardized mean difference to assess the balance of covariates before and after weighting. An absolute standardized mean difference less than 0.10 was deemed satisfactory. Fine and Gray models weighted by IPTW were used to estimate hazard ratios of liver-related events, CVD, EHC, and CKD with regards to the competing risk of death; and Cox proportional hazard models weighted by IPTW were used to estimate hazard ratios for overall mortality. Subjects presenting the studied clinical event in the 6 months following inclusion were excluded, so that they could not be attributed to a too recent change in the status of chronic liver conditions. Finally, in order to assess the trend of clinical outcomes and overall mortality in the risk groups over time, we tested the interaction between the study period and the risk groups in the previous models. A p value <0.05 was considered to be statistically significant. Analyses were performed using R Statistical Software version 4.1.0.



## **Results**

At the time of analysis, baseline data were available for 199,341 participants. After excluding subjects who withdrew their consent, had other causes of liver diseases, or missing data for NAFLD assessment, and participants whose data were not available in the SNDS, 154,900 were included in the final analysis and defined the overall sample (Figure 1). Their baseline characteristics were not different from those of the excluded participants (data not shown, available on request). A total of 25,753 had NAFLD, which corresponded to 18.3% (95% CI 18.2–18.4) of the general population without HCV, HBV, hazardous alcohol use, and other chronic liver diseases, and 16.7% of the entire population including those with HCV, HBV, and hazardous alcohol use. Overall, 669 (0.4%, 95% CI 0.3–0.5) subjects had a history of HCV, 1311 (0.9%, 95% CI 0.8–1.0) had a history of HBV, and 15,714 (10.1%, 95% CI 10.0–10.2) had hazardous alcohol use. The baseline characteristics of the study sample are reported in Table 1.

### **Clinical outcomes and overall mortality according to the presence of NAFLD in subjects without HCV, HBV, and hazardous alcohol use**

Data for the analysis of clinical outcomes and overall mortality were available in 137,206 participants. Among them, 25,753 (18.3%, 95% CI 18.2–18.4) had NAFLD (Figure 1). After a median follow-up of 3.62 years (range 0.07–7.95), 682 subjects developed a hepatic event (including 122 with HCC), 2050 had an incident cardiovascular event, 471 evolved towards CKD, 1954 were diagnosed with an extrahepatic malignancy, and 1166 died. The cumulative incidence of liver-related events, CVD, CKD, and overall mortality were significantly associated with the presence of NAFLD compared to those without NAFLD (Figure 2 and Supplementary Figures 1 and 2). Raw and IPTW-weighted analyses for the risk of clinical outcomes and overall mortality according to the presence of NAFLD are shown in Table 2 (and Supplementary Table 2). The presence of NAFLD compared to subjects without NAFLD after

IPTW remained associated with an increased risk of liver-related events (HR 2.63, 95% CI 1.96–2.87), CVD (HR 2.33, 95% CI 1.20–2.78), CKD (HR 1.89, 95% CI 1.48–2.40), and overall mortality (HR 1.43, 95% CI 1.25–1.65). The risk of extrahepatic malignancies was not associated with the NAFLD status. Liver-related and extrahepatic clinical outcomes as well as overall mortality in NAFLD subjects according to the fibrosis degree are shown in Figure 2 (and Supplementary Figure 3). The grade of fibrosis was associated with risks of hepatic events, CVD, extrahepatic malignancy, CKD, and overall mortality (Table 3).

### **Clinical outcomes and overall mortality according to the presence of chronic liver diseases**

To estimate and compare the impact of various chronic liver diseases on the incidence of morbidities and mortality, we split the entire study sample (previous sample plus those with hazardous alcohol use or HCV and HBV disease) into five groups: 111,453 subjects without NAFLD (FLI <60), 25,753 subjects with NAFLD, 669 with HCV, 1311 with HBV, and 15,714 with hazardous alcohol use (Figure 1). Baseline characteristics of subjects according to chronic liver conditions are shown in Table 1.

The NAFLD subjects had significantly more metabolic disorders and a higher prevalence of ALT above the normal threshold compared to the other groups (Table 1). The prevalence of advanced fibrosis among subjects with NAFLD was 2.7% (95% CI 2.5–2.9). The chronic liver condition with the highest prevalence of fibrosis was HCV (4.9%, 95% CI 4.6–5.2) (Table 1). After a median follow-up of 3.60 years (range 0.06–7.86), 885 subjects developed a hepatic event (including 135 with HCC). The other observed events were 2560 CVD, 560 CKD, 2273 extrahepatic malignancies, 21 liver transplantations, and 1382 deaths. The risk of clinical outcomes and overall mortality were significantly associated with chronic liver diseases compared to those without NAFLD and other chronic liver diseases (Figure 3 and Supplementary Figure 4).

Raw and IPTW-weighted analyses of the risk of clinical outcomes and overall mortality according to the presence of chronic liver disease are shown in Table 4 (and Supplementary Table 3). Compared to subjects without NAFLD, HCV chronic hepatitis remained the leading cause of liver-related events (HR 9.75, 95% CI 6.63–14.33), followed, respectively, by NAFLD (HR 2.63, 95% CI 1.96–2.87), hazardous alcohol use (HR 1.57, 95% CI 1.23–2.32), and HBV chronic hepatitis (HR 1.47, 95% CI 1.21–3.54). When each chronic liver disease is compared in NAFLD subjects (Supplementary Tables 4 and 5 and Supplementary Figures 5 and 5 bis), HCV chronic hepatitis remained the leading cause of liver-related events followed by NAFLD. However, in the trend analysis over the study period of inclusion, NAFLD was the fastest-growing cause of hepatic events (interaction HR 1.40, 95% CI 1.05–1.85 per year) (Supplementary Table 6). NAFLD was also the only condition with an increasing association over the study period regarding CVD (HR 1.06, 95% CI 1.02–1.10), CKD (HR 1.15, 95% CI 1.05–1.27), and death (HR 1.41, 95% CI 1.33–1.49) (Supplementary Table 6).

## **Discussion**

To our knowledge, this study is the first European survey to prospectively evaluate the burden of NAFLD and to compare NAFLD to other chronic liver diseases (HCV, HVB) and heavy alcohol consumption in terms of clinical outcomes and mortality in a community setting. Compared to non-NAFLD subjects and those with other chronic liver diseases, those with NAFLD were older, mostly males, and had more metabolic disorders and liver injuries, such as ALT above the normal threshold and liver fibrosis. Our study showed that: 1) NAFLD, regardless of the severity of histological features, was associated with liver-related events, extrahepatic clinical outcomes, and overall mortality; 2) there was a dose-dependent relationship between the severity of liver fibrosis and the occurrence of clinical outcomes and overall mortality; 3) compared to hazardous alcohol use and hepatitis virus infections, NAFLD was the fastest-growing cause of liver-related morbidity, although HCV currently remains the

leading cause of death; and, lastly, 4) compared to hepatitis virus infections and hazardous alcohol use, NAFLD was the leading and the most common cause of extrahepatic morbidities, such as CVD and CKD, and overall mortality.

Findings from community-based studies are conflicting and continue to fuel controversy. Several prospective Asian community-based studies have shown conflicting results. Indeed, contrary to Lee et al. who demonstrated from a Korean population-based cohort that NAFLD was associated with a higher risk of digestive and esophageal malignancies(16), Zhou et al. reported from a Chinese cohort that patients with NAFLD had a benign prognosis(17). Lazo et al. found no association between non-alcoholic fatty liver disease or non-alcoholic steatohepatitis and all-cause mortality, CVD, cancer, or liver disease in the US general population(18). Our results showed a strong association of clinical outcomes such as liver-related complications or extrahepatic clinical outcomes (CVD, CKD) and all-cause mortality. As in previous studies in biopsy-proven NAFLD patients(3,16,19,20), we found a dose-response relationship between the grade of fibrosis and the incidence of clinical outcomes or all-cause mortality. Our results support that NAFLD is associated with an increased risk of hepatic and extrahepatic clinical outcomes and worse long-term prognosis.

Our results are particularly relevant for patient management and the improvement of monitoring. Indeed, it is usually claimed that advanced fibrosis, but not simple steatosis is the best predictor of long-term prognosis. However, our results suggest that this dictum is not entirely true. We found that whatever the level of fibrosis, all NAFLD patients remain particularly at risk of dying or developing hepatic or extrahepatic complications. HCV and heavy alcohol consumption were once considered the first and second cause of chronic liver disease, respectively, ahead of HBV, which ranked third(21,22). Our results suggest that NAFLD is now the leading cause of all-cause mortality and extrahepatic morbidities, such as CVD and CKD, and the fastest-growing cause for liver-related morbidity compared to chronic

hepatitis virus infections (HCV and HBV) and hazardous alcohol use. Previous studies have demonstrated the increasing trend in NAFLD-related hepatic complications and liver transplants worldwide(4,5). In the US, although HCV remained the leading etiology of chronic liver disease among new liver transplant waitlist registrations, NASH demonstrated the greatest increase from 2004 to 2013 and had already become the second leading etiology of liver transplantation in 2013(4). This tendency had already been observed since 2011 from the US National Health and Nutrition Examination Surveys collected from 1988 to 2008. Those surveys showed that the main causes of chronic liver diseases remained stable during the study period, except NAFLD, which increased steadily(23). Since 2011, the landscape of HCV treatment has evolved rapidly, with the approval of direct-acting antiviral (DAA) agents. In 2017, Goldberg et al.(21) have theorized that the burden of active HCV infection on cirrhosis and HCC (compensated or decompensated) has decreased since the introduction of highly efficacious DAA therapy. The rising prevalence of NAFLD coupled with the stabilization and expected decline in HCV-related clinical outcomes due to DAA therapy will soon result in NAFLD overtaking HCV as the leading etiology of chronic liver disease. Another potential explanation for these observations might be etiology-specific differences in disease progression. In our study, the prevalence of metabolic disorders (such as diabetes or hyperlipidemia) was significantly higher in NAFLD subjects than in other chronic liver diseases. In our study population, as in several other studies(24,25), NAFLD subjects seem to have more metabolic disorders and a poorer lifestyle (high prevalence of smoking and alcohol consumption in the NAFLD subjects). Although these associations with the prevalence of NAFLD are not new, it has been demonstrated that metabolic disorders such as diabetes, high blood pressure, dyslipidemia, smoking, and lack of regular exercise contribute to disease progression and NAFLD-related mortality(24–27). On top of liver-related complications and mortality, several previous studies(24,28) have demonstrated that extrahepatic clinical

outcomes, such as CVD, extrahepatic malignancies, and CKD, and their related mortality were strongly influenced by metabolic disorders and amplified in the presence of NAFLD. Thus, due to the rising prevalence of obesity, diabetes, and metabolic syndrome in the last two decades, we could observe a high incidence of NAFLD and resulting complications(29,30). These results underscore the need for a comprehensive approach to NAFLD patient management and suggest the need to reinforce and focus efforts on preventing and treating metabolic disorders, and to advise patients to reduce and maintain appropriate body weight and to optimize lifestyle regardless of the level of fibrosis.

Our study has several limitations. The non-invasive biomarkers we used to assess the prevalence of NAFLD or advanced fibrosis may lead to a (probably non-differential) misclassification bias and decrease the power of our analyses to identify associations with clinical outcomes or mortality. However, the performance of imaging methods such as ultrasound or elastometry, which have been used for the screening of NAFLD and fibrosis, also have such limitations. MRI or liver biopsy, which are the gold standards for NAFLD diagnosis and measuring liver injuries, cannot be used on a large scale, such as in the general population. In conclusion, this large general population-based cohort showed that NAFLD was associated with excess morbidity and mortality and demonstrated the fastest-growing trend. It challenges HCV infection in terms of hepatic morbidity and overall mortality. In addition, given the increasing rates of obesity and diabetes, NAFLD may soon become the first cause of the burden of hepatic and extrahepatic morbidities and mortality in western countries.

## References

1. Rinella ME. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. *JAMA, The Journal of the American Medical Association*. 2015;13(22):2263.
2. Serfaty L, Lemoine M. Definition and natural history of metabolic steatosis: clinical aspects of NAFLD, NASH and cirrhosis. *Diabetes Metab*. 2008;34(6 Pt 2):634-7.
3. Dulai PS, Singh S, Patel J, Soni M, Prokop LJ, Younossi Z, et al. Increased risk of mortality by fibrosis stage in non-alcoholic fatty liver disease: Systematic Review and Meta-analysis. *Hepatology*. 2017;65(5):1557-65.
4. Holmer M, Melum E, Isoniemi H, Ericzon BG, Castedal M, Nordin A, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is an increasing indication for liver transplantation in the Nordic countries. *Liver Int*. 2018;38(11):2082-90.
5. Wong RJ, Aguilar M, Cheung R, Perumpail RB, Harrison SA, Younossi ZM, et al. Nonalcoholic steatohepatitis is the second leading etiology of liver disease among adults awaiting liver transplantation in the United States. *Gastroenterology*. 2015;148(3):547-55.
6. Francque SM, van der Graaff D, Kwanten WJ. Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk: Pathophysiological mechanisms and implications. *J Hepatol*. 2016;65(2):425-43.
7. Mantovani A, Petracca G, Beatrice G, Csermely A, Lonardo A, Schattenberg JM, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident chronic kidney disease: an updated meta-analysis. *Gut*. 2020;71(1):156-62.
8. Sanna C, Rosso C, Marietti M, Bugianesi E. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Extra-Hepatic Cancers. *Int J Mol Sci*. 2016;17(5):717.
9. Zins M, Goldberg M, CONSTANCES team. The French CONSTANCES population-based cohort: design, inclusion and follow-up. *Eur J Epidemiol*. 2015;30(12):1317-28.
10. Nabi O, Lacombe K, Boursier J, Mathurin P, Zins M, Serfaty L. Prevalence and Risk Factors of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Advanced Fibrosis in General Population: the French Nationwide NASH-CO Study. *Gastroenterology*. 2020;159(2):791-793.e2.
11. Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, Masutti F, Passalacqua M, Castiglione A, et al. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol*. 2006;6:33.
12. Koehler EM, Schouten JNL, Hansen BE, Hofman A, Stricker BH, Janssen HLA. External validation of the fatty liver index for identifying nonalcoholic fatty liver disease in a population-based study. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013;11(9):1201-4.
13. Fornis X, Ampurdanès S, Llovet JM, Aponte J, Quintó L, Martínez-Bauer E, et al. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology*. 2002;36(4 Pt 1):986-92.
14. SNDS : Système National des Données de Santé | CNIL [Internet]. Disponible sur: <https://www.cnil.fr/fr/snds-systeme-national-des-donnees-de-sante>

15. Hagström H, Adams LA, Allen AM, Byrne CD, Chang Y, Grønbaek H, et al. Administrative coding in electronic health care record-based research of NAFLD: an expert panel consensus statement. *Hepatology* (Baltimore, Md). 2021;74(1):474-82.
16. Lee JM, Park YM, Yun JS, Ahn YB, Lee KM, Kim DB, et al. The association between nonalcoholic fatty liver disease and esophageal, stomach, or colorectal cancer: National population-based cohort study. *PLoS One*. 2020;15(1):e0226351.
17. Zhou YJ, Li YY, Nie YQ, Huang CM, Cao CY. Natural course of nonalcoholic fatty liver disease in southern China: a prospective cohort study. *J Dig Dis*. 2012;13(3):153-60.
18. Lazo M, Hernaez R, Bonekamp S, Kamel IR, Brancati FL, Guallar E, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and mortality among US adults: prospective cohort study. *BMJ*. 2011;343:d6891.
19. Ekstedt M, Hagström H, Nasr P, Fredrikson M, Stål P, Kechagias S, et al. Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatology*. 2015;61(5):1547-54.
20. Angulo P, Kleiner DE, Dam-Larsen S, Adams LA, Bjornsson ES, Charatcharoenwitthaya P, et al. Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2015;149(2):389-397.e10.
21. Goldberg D, Ditah IC, Saeian K, Lalehzari M, Aronsohn A, Gorospe EC, et al. Changes in the Prevalence of Hepatitis C Virus Infection, Nonalcoholic Steatohepatitis, and Alcoholic Liver Disease Among Patients With Cirrhosis or Liver Failure on the Waitlist for Liver Transplantation. *Gastroenterology*. 2017;152(5):1090-1099.e1.
22. Al-Hamoudi W, Elsiey H, Bendahmash A, Al-Masri N, Ali S, Allam N, et al. Liver transplantation for hepatitis B virus: Decreasing indication and changing trends. *World J Gastroenterol*. 2015;21(26):8140-7.
23. Younossi ZM, Stepanova M, Afendy M, Fang Y, Younossi Y, Mir H, et al. Changes in the Prevalence of the Most Common Causes of Chronic Liver Diseases in the United States From 1988 to 2008. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2011;9(6):524-530.e1.
24. Wild SH, Walker JJ, Morling JR, McAllister DA, Colhoun HM, Farran B, et al. Cardiovascular Disease, Cancer, and Mortality Among People With Type 2 Diabetes and Alcoholic or Nonalcoholic Fatty Liver Disease Hospital Admission. *Diabetes Care*. 2018;41(2):341-7.
25. Mallat A, Lotersztajn S. Cigarette smoke exposure: a novel cofactor of NAFLD progression? *J Hepatol*. 2009;51(3):430-2.
26. Stepanova M, Clement S, Wong R, Saab S, Ahmed A, Younossi ZM. Patients With Diabetes and Chronic Liver Disease Are at Increased Risk for Overall Mortality: A Population Study From the United States. *Clin Diabetes*. 2017;35(2):79-83.
27. Barrera F, George J. The Role of Diet and Nutritional Intervention for the Management of Patients with NAFLD. *Clinics in Liver Disease*. 2014;18(1):91-112.
28. Peng D, Han Y, Ding H, Wei L. Hepatic steatosis in chronic hepatitis B patients is associated with metabolic factors more than viral factors. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008;23(7 Pt 1):1082-8.



29. Flegal KM, Carroll MD, Kit BK, Ogden CL. Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999-2010. *JAMA*. 2012;307(5):491-7.
30. Zhou B, Lu Y, Hajifathalian K, Bentham J, Di Cesare M, Danaei G, et al. Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4·4 million participants. *The Lancet*. 2016;387(10027):1513-30.

**Table 1: General characteristics of study sample and according to chronic liver diseases**

	Overall sample N=154,900	Non-NAFLD (FLI <60) N=111,453	NAFLD (FLI ≥60) N= 25,753	Hazardous alcohol use N=15,714	HCV N=669	HBV N=1311
Age (years), mean [SD]	47.0 [13.3]	45.6 [13.2]	52.4 [11.8]	48.0 [14.2]	55.8 [9.1]	54.5 [11.2]
Male sex, n (%)	71,510 (47.1)	46,895 (41.4)	15,328 (66.9)	9063 (60.0)	315 (54.4)	579 (50.7)
BMI (kg/m <sup>2</sup> ), n (%)	18,628 (12.3)	3341 (3.0)	13,287 (58.0)	1796 (12.5)	97 (17.4)	166 (15.4)
HBP, n (%)	16,795 (11.3)	8370 (7.6)	6115 (27.3)	2138 (14.5)	116 (20.0)	213 (18.8)
Waist circumference (cm), mean [SD]	84.94 [12.9]	80.8 [9.5]	103.9 [9.5]	87.3 [13.3]	88.5 [13.3]	87.3 [13.1]
Diabetes, n (%)	7733 (5.2)	2473 (2.2)	3946 (15.6)	807 (5.5)	41 (7.1)	76 (6.7)
hypercholesterolemia, n (%)	11,801 (8.0)	5991 (5.4)	4103 (18.5)	1573 (10.7)	61 (10.6)	147 (13.0)
ALT>N, n (%)	17,907 (11.8)	7404 (6.5)	8006 (35.0)	2321 (16.1)	129 (23.3)	130 (11.9)
GGT>N, n (%)	16,839 (11.1)	6232 (5.5)	7558 (33.0)	2877 (19.9)	113 (20.5)	148 (13.5)
FLI, n (%)	1115 (0.7)	305 (0.3)	517 (2.7)	249 (1.7)	27 (4.9)	17 (1.6)
Geographic origin, n (%)						
European	142,541 (93.9)	105,612 (94.2)	20,978 (92.7)	14,325 (95.3)	474 (84.2)	850 (76.4)
Overseas France	1326 (0.9)	978 (0.9)	228 (1.0)	99 (0.7)	7 (1.2)	16 (1.4)
Asian	1075 (0.7)	844 (0.8)	117 (0.5)	73 (0.5)	4 (0.7)	43 (3.9)
Sub-Saharan African	1595 (1.1)	1119 (1.0)	263 (1.2)	99 (0.7)	27 (4.8)	115 (10.3)
North African	3648 (2.4)	2490 (2.2)	828 (3.7)	244 (1.6)	44 (7.8)	60 (5.4)
Other	1508 (1.0)	1087 (1.0)	219 (1.0)	178 (1.2)	7 (1.2)	29 (2.6)
Education level (years), n (%)						
≤8	4657 (3.1)	2788 (2.5)	1354 (5.9)	459 (3.0)	40 (6.9)	56 (4.9)
9–15	97,896 (64.5)	70,863 (62.6)	17,098 (74.6)	9479 (62.8)	414 (71.5)	755 (66.2)
≥16	49,140 (32.4)	39,491 (34.9)	4458 (19.5)	5156 (34.2)	125 (21.6)	330 (28.9)
Tobacco >10 pack/year, n (%)	57,177 (37.7)	38,870 (34.4)	9519 (41.5)	8822 (57.8)	270 (46.6)	428 (37.5)
Soft drink ≥1/d, n (%)	31,265 (20.6)	23,801 (21.0)	4294 (18.7)	3091 (20.5)	101 (17.4)	192 (16.8)
Exercise ≥2h/w, n (%)	52,658 (34.7)	41,950 (37.5)	5632 (25.1)	4920 (32.9)	165 (29.4)	391 (35.0)
Coffee ≥1 cup/d, n (%)	12,799 (8.4)	9046 (8.2)	2350 (10.5)	1344 (9.0)	55 (9.9)	106 (9.6)

**Table 2: Raw (unweighted) and IPTW-weighted associations between clinical outcomes and presence of NAFLD**

	Unweighted		IPTW-weighted	
	NAFLD (FLI ≥60) N=25,753		NAFLD (FLI ≥60) N=25,753	
	IIR (95% CI)	p	IIR (95% CI)	p
Hepatic events	2.85 (2.43–3.34)	<0.001	2.63 (1.96–2.87)	<0.001
Cardiovascular diseases	2.73 (2.49–2.99)	<0.001	2.33 (1.20–2.78)	<0.001
Extrahepatic malignancies	1.42 (1.28–1.58)	<0.001	1.09 (0.90–1.23)	0.894
Chronic kidney disease	3.22 (2.65–3.91)	<0.001	1.89 (1.48–2.40)	<0.001
Death	1.93 (1.70–2.19)	<0.001	1.43 (1.25–1.65)	<0.001

Reference group: subjects without NAFLD (FLI <60)

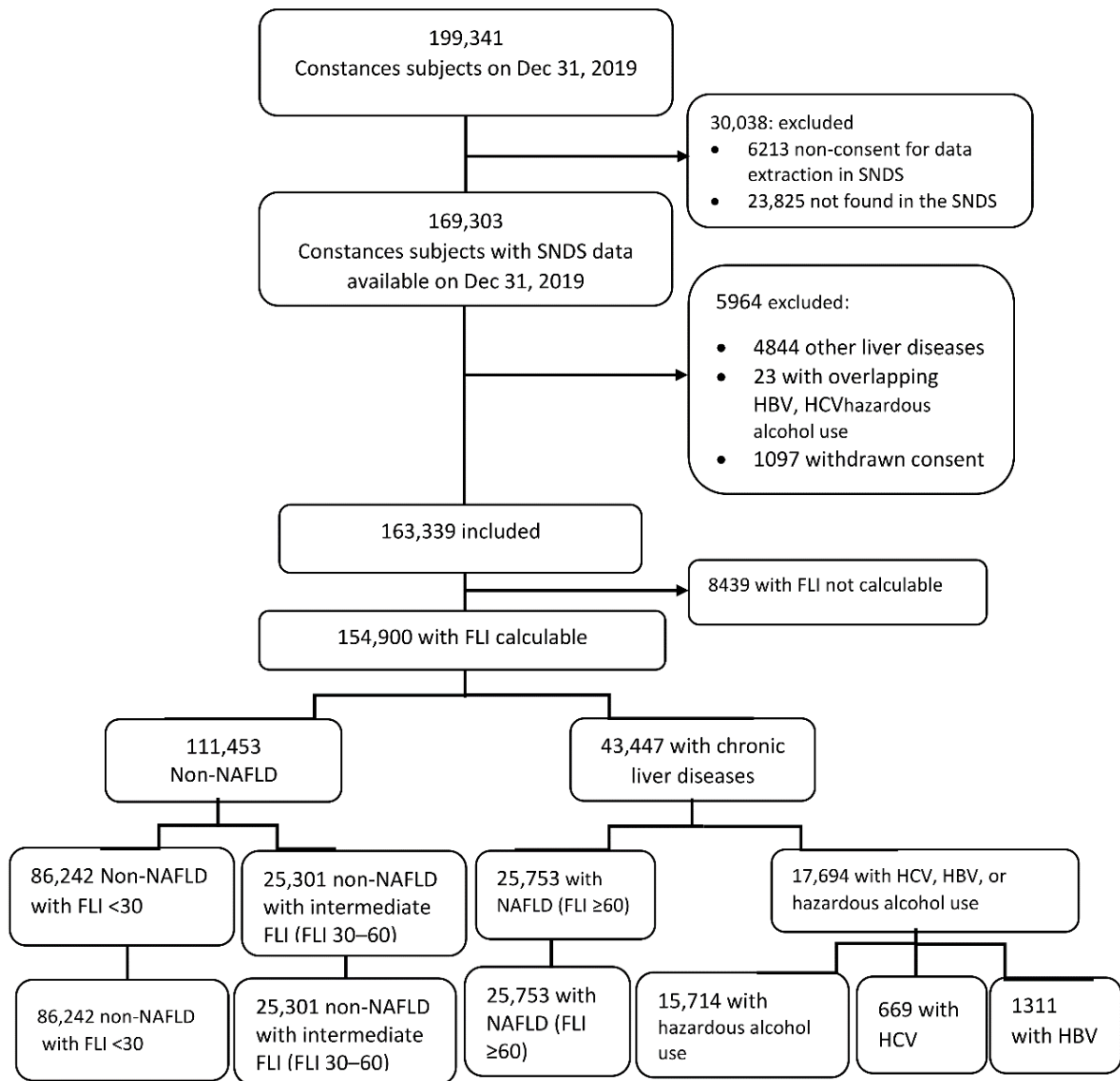
**Table 3: Raw (unweighted) and IPTW-weighted associations between grade of fibrosis and clinical events or overall mortality in NAFLD subjects**

	Unweighted				IPTW-weighted			
	NAFLD and advanced fibrosis (FLI ≥60 and FI >6.9)		NAFLD and intermediate fibrosis (FLI ≥60 and FI 4.2–6.9)		NAFLD and advanced fibrosis (FLI ≥60 and FI >6.9)		NAFLD and intermediate fibrosis (FLI ≥60 and FI 4.2–6.9)	
	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p
Hepatic events	11.1 (7.84–15.7)	<0.001	1.19 (0.91–1.57)	0.212	8.61 (5.04–14.7)	<0.001	1.11 (0.77–1.61)	0.563
Cardiovascular diseases	5.02 (3.57–7.06)	<0.001	1.30 (0.97–2.69)	0.086	2.38 (1.92–3.08)	0.012	1.01 (0.83–1.24)	0.897
Extrahepatic malignancies	5.79 (3.92–8.56)	<0.001	2.56 (2.09–3.14)	<0.001	1.88 (1.16–3.06)	0.011	1.19 (0.92–1.55)	0.188
Chronic kidney disease	4.76 (2.63–8.62)	<0.001	1.63 (1.19–2.22)	0.002	2.80 (1.66–3.71)	<0.001	1.01 (0.73–1.33)	0.939
Death	5.39 (3.68–7.88)	<0.001	1.49 (1.19–1.87)	<0.001	2.97 (1.94–4.56)	<0.001	1.06 (0.82–1.38)	0.637

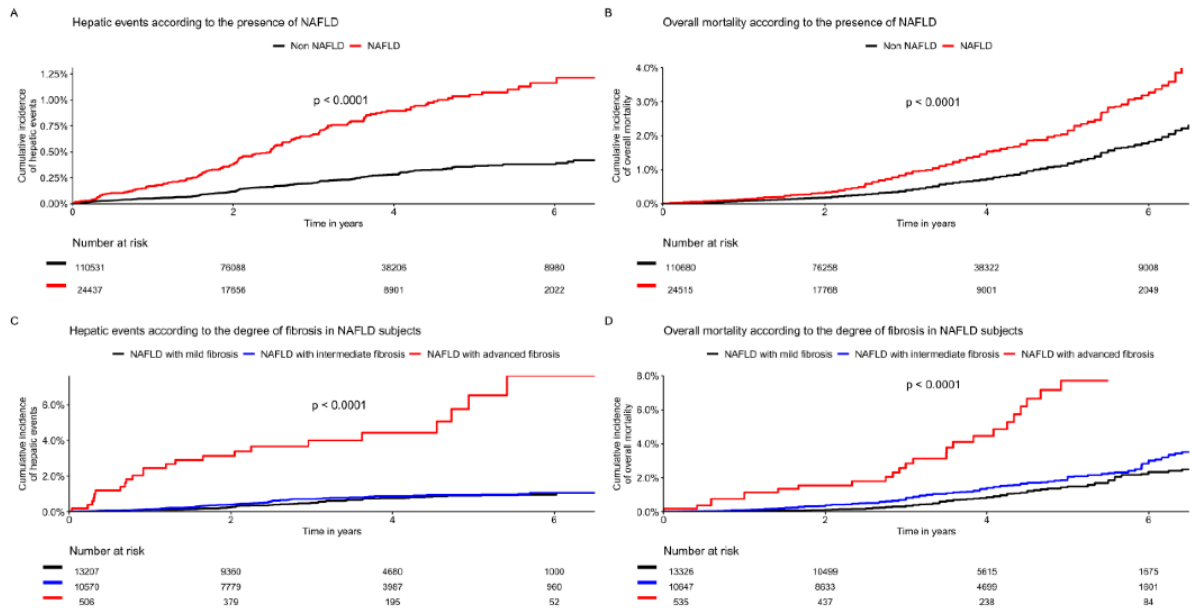
Reference group: NAFLD with mild fibrosis (FLI ≥60 and FI <4.2)

**Table 4: IPTW-weighted analysis of clinical outcomes risks according to the presence of chronic liver diseases and in hazardous alcohol use (reference group = non-NAFLD, FLI <60)**

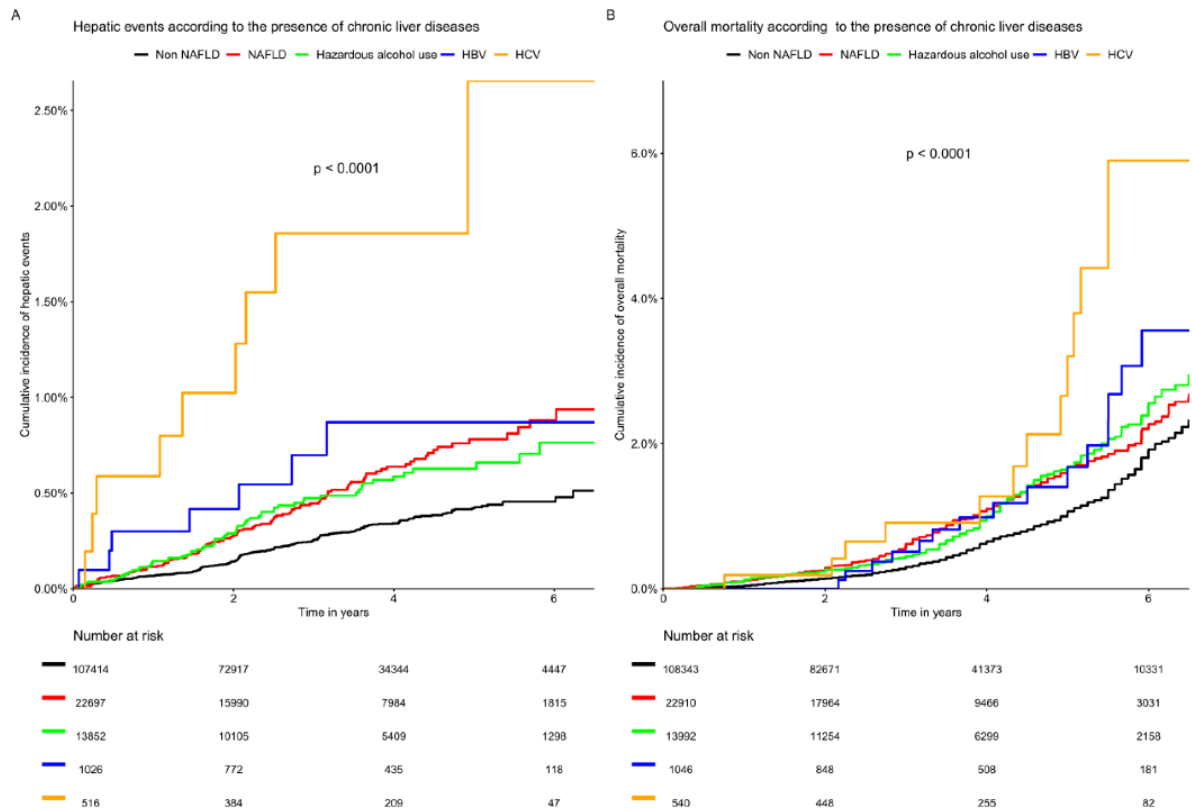
	NAFLD (FLI $\geq$ 60)		Hazardous alcohol use		HBV		HCV	
	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p
Hepatic events	2.63 (1.96–2.87)	<0.001	1.57 (1.23–2.32)	<0.001	1.47 (1.21–3.54)	<0.001	9.75 (6.63–14.33)	<0.001
Cardiovascular diseases	2.33 (1.20–2.78)	<0.001	1.21 (1.07–2.20)	<0.027	1.74 (1.25–2.43)	0.001	1.80 (1.13–2.88)	0.013
Extrahepatic malignancies	1.09 (0.90–1.23)	0.894	1.59 (0.88–2.89)	0.126	1.09 (0.74–1.63)	0.657	1.11 (0.63–1.96)	0.728
Chronic kidney disease	1.89 (1.48–2.40)	<0.001	1.69 (1.02–3.25)	0.015	0.76 (0.24–2.38)	0.633	0.50 (0.07–3.54)	0.484
Death	1.43 (1.25–1.65)	<0.001	4.50 (2.95–6.84)	<0.001	1.23 (0.74–2.05)	0.432	2.17 (1.25–3.76)	0.006



**Figure 1: Flowchart**



**Figure 2: Cumulative incidence of hepatic events and overall mortality according to the presence of NAFLD and the grade of fibrosis in NAFLD subjects**



**Figure 3: Cumulative incidence of hepatic events and overall mortality according to the presence of chronic liver diseases and in hazardous alcohol use**

Supplementary, Table 1: Unweighted and IPTW weighted analysis of clinical events and overall mortality according to FLI cut-off

	Unweighted (reference group = non-NAFLD, FLI <30)				IPTW weighted (reference group = non-NAFLD, FLI <30)			
	NAFLD (FLI ≥60)		Intermediate NAFLD (FLI 30-60)		NAFLD (FLI ≥60)		Intermediate NAFLD (FLI 30-60)	
	HR (95%CI)	p	HR (95%CI)	p	HR (95%CI)	p	HR (95%CI)	p
<b>Hepatic events</b>	<b>2.87 (2.42-3.39)</b>	<b>&lt;0.001</b>	1.03 (0.81-1.30)	0.801	<b>2.55 (1.07-3.16)</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.98 (0.76-1.27)	0.911
<b>Cardiovascular diseases</b>	<b>3.66 (3.30-4.06)</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>2.49 (2.22-2.79)</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>1.44 (1.27-1.64)</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>1.18 (1.04-1.34)</b>	<b>0.008</b>
<b>Extrahepatic malignancies</b>	<b>1.59 (1.42-1.77)</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>1.49 (1.33-1.67)</b>	<b>0.001</b>	1.10 (0.98-1.24)	0.101	1.05 (0.93-1.20)	0.400
<b>Chronic kidney disease</b>	<b>3.63 (2.94-4.49)</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>1.56 (1.19-2.04)</b>	<b>0.001</b>	<b>1.90 (1.44-2.50)</b>	<b>&lt;0.001</b>	1.02 (0.75-1.38)	0.923
<b>Death</b>	<b>2.12 (1.85-2.42)</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>1.41 (1.21-1.65)</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>1.51 (1.28-1.79)</b>	<b>&lt;0.001</b>	1.09 (0.92-1.30)	0.343

Supplementary, Table 2: Unweighted analysis of clinical outcomes risk according to the presence of chronic liver diseases and hazardous alcohol use (reference group = non-NAFLD, FLI <60)

	NAFLD (FLI ≥60)		hazardous alcohol use		HBV		HCV	
	HR (95%CI)	p	HR (95%CI)	p	HR (95%CI)	p	HR (95%CI)	p
<b>Hepatic events</b>	<b>2.85 (2.43-3.34)</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>1.65 (1.33-2.05)</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>1.98 (1.52-3.30)</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>13.6 (9.49-19.4)</b>	<b>&lt;0.001</b>
<b>Cardiovascular diseases</b>	<b>2.73 (2.49-2.99)</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>2.00 (1.77-2.26)</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>3.13 (2.29-4.29)</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>3.44 (2.26-5.25)</b>	<b>&lt;0.001</b>
<b>Extrahepatic malignancies</b>	<b>1.42 (1.28-1.58)</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>1.44 (1.26-1.63)</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>1.81 (1.23-2.64)</b>	<b>0.002</b>	1.76 (1.00-2.98)	0.050
<b>Chronic kidney disease</b>	<b>3.22 (2.65-3.91)</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>1.60 (1.21-2.13)</b>	<b>0.001</b>	1.07 (0.34-3.34)	0.901	1.41 (0.35-5.67)	0.635
<b>Death</b>	<b>1.93 (1.70-2.19)</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>1.55 (1.32-1.74)</b>	<b>&lt;0.001</b>	1.54 (0.92-2.57)	0.119	<b>3.10 (1.86-5.16)</b>	<b>&lt;0.001</b>

Supplementary, Table 3: Unweighted analysis of clinical outcomes and mortality risk of NAFLD subject compared to HCV, HBV and hazardous alcohol use (two by two comparisons)

<i>reference group</i>	NAFLD (FLI ≥60)									
	Hepatic events		Cardiovascular diseases		Extra-hepatic malignancies		Chronic kidney disease		Death	
	HR (95%CI)	p	HR (95%CI)	p	HR (95%CI)	p	HR (95%CI)	p	HR (95%CI)	p
<b>HCV</b>	<b>0·31 (0·16-0·61)</b>	<b>&lt;0·001</b>	0·79 (0·50-1·26)	0·315	0·71(0·40-1·26)	0·236	1·69 (0·42-6·82)	0·463	<b>0·47 (0·28-0·80)</b>	<b>0·005</b>
<b>HBV</b>	0·70 (0·34-1·44)	0·342	0·93 (0·65-1·32)	0·718	0·70(0·46-1·06)	0·092	<b>3·30 (1·82-13·33)</b>	<b>0·009</b>	0·96 (0·57-1·61)	0·908
<b>Hazardous alcohol use</b>	1·13 (0·83-1·53)	0·409	<b>1·50 (1·30-1·74)</b>	<b>&lt;0·001</b>	0·91(0·77-1·07)	0·337	<b>1·68 (1·21-2·13)</b>	<b>0·002</b>	0·98 (0·81-1·19)	0·932

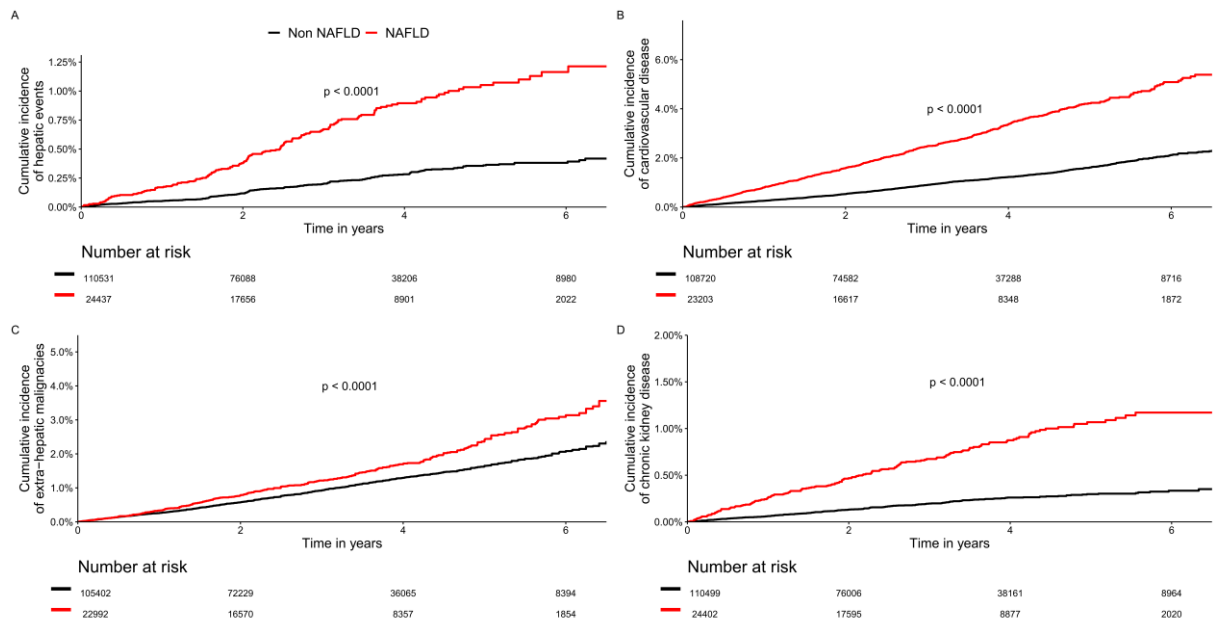
Supplementary, Table 4: IPTW weighted analysis of clinical outcomes and mortality risk of NAFLD subject compared to HCV, HBV and excessive alcohol consumption (two by two comparisons)

<i>reference group</i>	NAFLD (FLI ≥60)									
	Hepatic events		Cardiovascular diseases		Extra-hepatic malignancies		Chronic kidney disease		Death	
	HR (95%CI)	p	HR (95%CI)	p	HR (95%CI)	p	HR (95%CI)	p	HR (95%CI)	p
<b>HCV</b>	0·39 (0·15-1·06)	0·064	0·96 (0·47-1·96)	0·914	0·90 (0·42-1·94)	0·789	<b>1·55 (1·19-2·02)</b>	<b>0·001</b>	0·55 (0·27-1·13)	0·130
<b>HBV</b>	1·80 (0·44-7·38)	0·414	0·78 (0·48-1·23)	0·326	0·93 (0·55-1·60)	0·802	<b>2·48 (1·36-5·16)</b>	<b>0·007</b>	1·00 (0·51-1·98)	0·992
<b>Hazardous alcohol use</b>	1·19 (0·85-1·68)	0·124	<b>1·58 (1·32-1·89)</b>	<b>&lt;0·001</b>	0·81 (0·36-1·83)	0·609	<b>1·55 (1·19-2·22)</b>	<b>0·001</b>	1·08 (0·89-1·31)	0·517

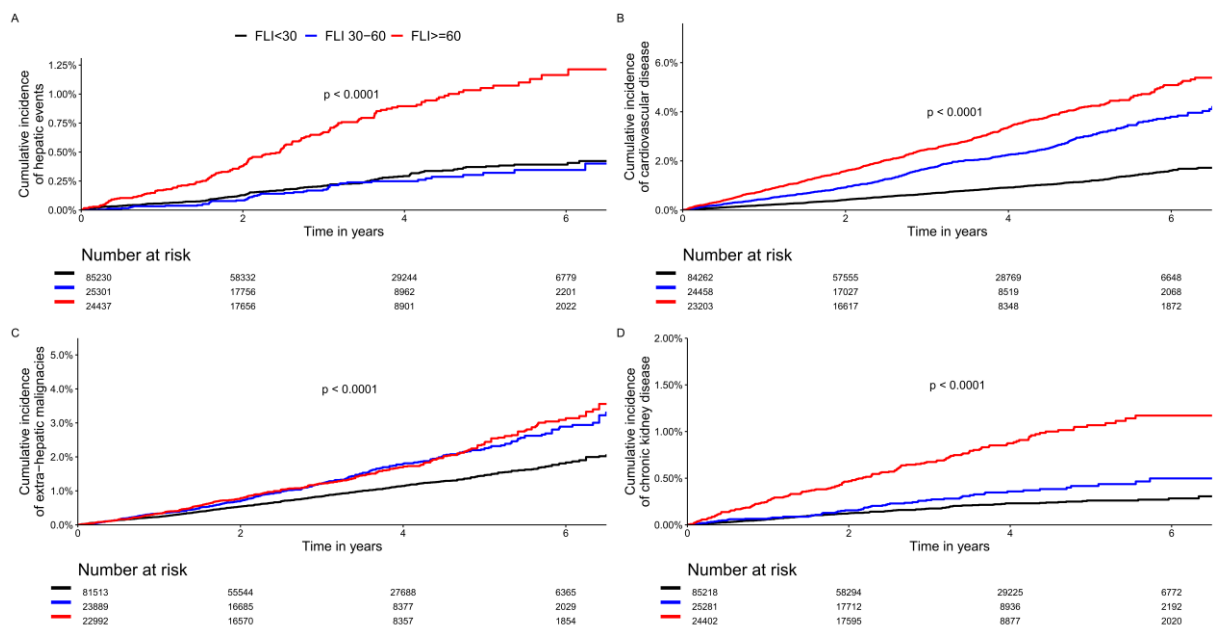


Supplementary, Table 5: Time-dependent risk of clinical outcomes and mortality according to the presence of chronic liver diseases and hazardous alcohol use (reference group = non-NAFLD, FLI <60)

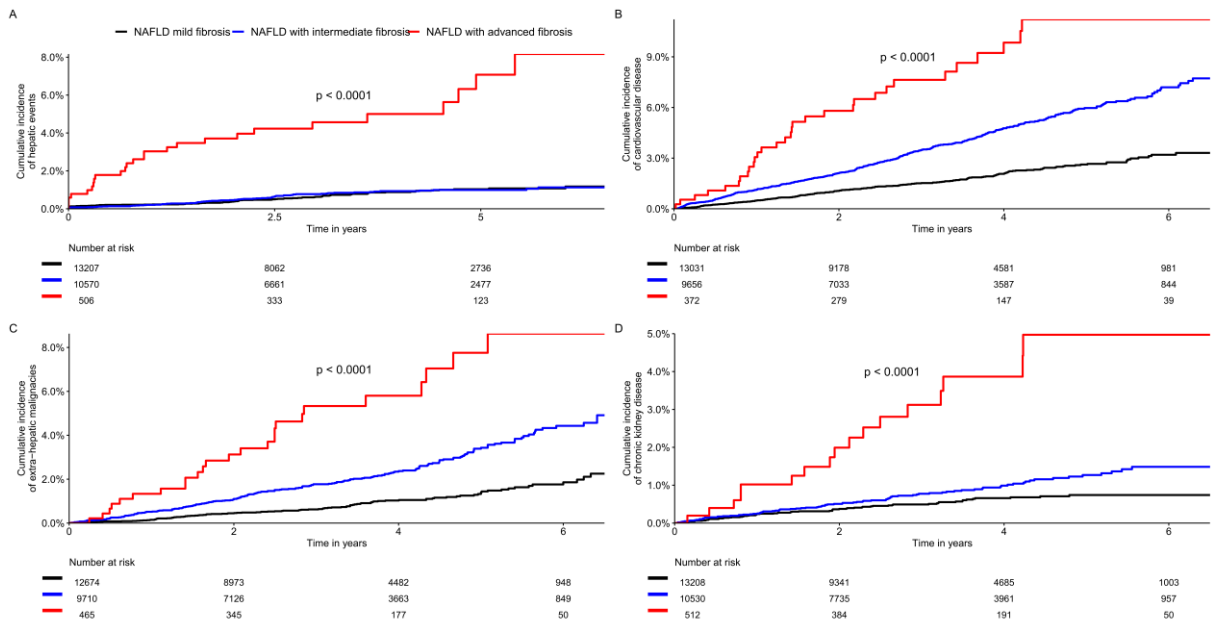
	<b>NAFLD (FLI ≥60)</b>		<b>Hazardous alcohol use</b>		<b>HBV</b>		<b>HCV</b>	
	HR (95%CI)	p	HR (95%CI)	p	HR (95%CI)	p	HR (95%CI)	p
<b>Hepatic events</b>	<b>1.40 (1.05-1.85)</b>	<b>0.022</b>	0.93 (0.80-1.07)	0.322	0.96 (0.85-1.09)	0.643	<b>0.69 (0.50-0.95)</b>	<b>0.024</b>
<b>Cardiovascular diseases</b>	<b>1.06 (1.02-1.10)</b>	<b>0.030</b>	1.01 (0.92-1.11)	0.909	0.97 (0.76-1.25)	0.829	<b>0.54 (0.34-0.85)</b>	<b>0.007</b>
<b>Extra-hepatic malignancies</b>	<b>1.02 (0.92-1.06)</b>	<b>0.810</b>	1.03 (0.85-1.11)	0.084	0.98 (0.75-1.28)	0.917	0.97 (0.70-1.25)	0.627
<b>Chronic kidney disease</b>	<b>1.15 (1.05-1.27)</b>	<b>0.008</b>	0.91 (0.78-1.07)	0.308	1.09 (0.83-2.06)	0.215	1.06 (0.49-2.06)	0.518
<b>Death</b>	<b>1.41 (1.33-1.49)</b>	<b>&lt;0.001</b>	1.03 (0.75-1.40)	0.942	0.89 (0.81-1.02)	0.327	1.05 (0.77-1.42)	0.803



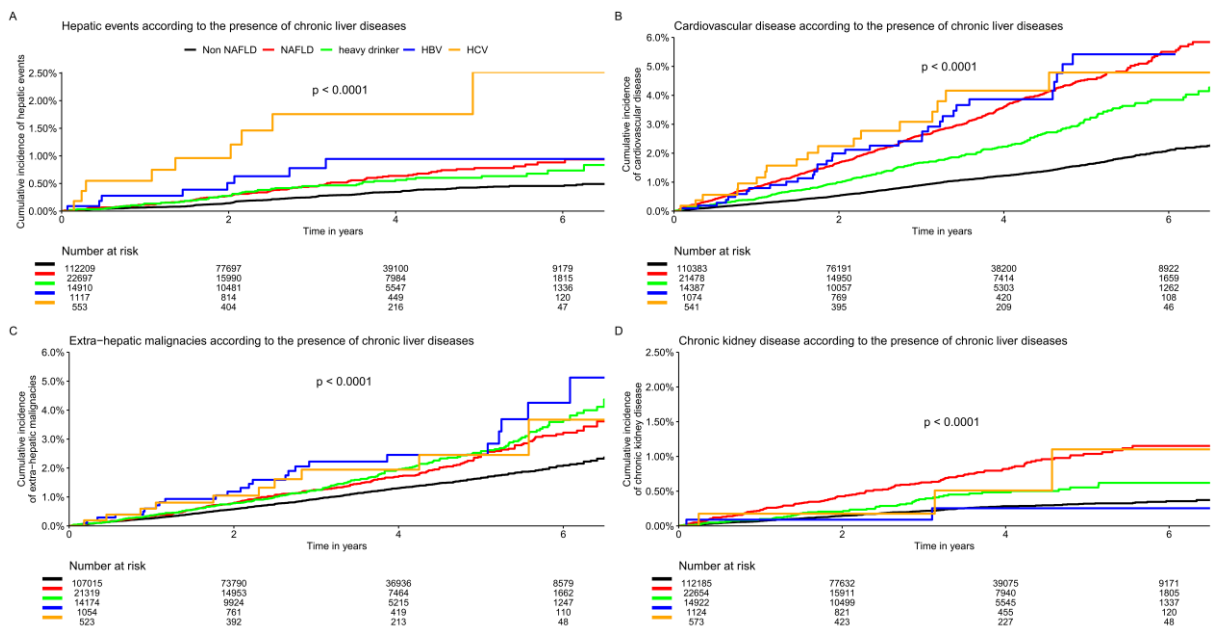
Supplementary, Figure 1: Cumulative incidence of cardiovascular disease, extra-hepatic cancer and chronic kidney according to the presence of NAFLD.



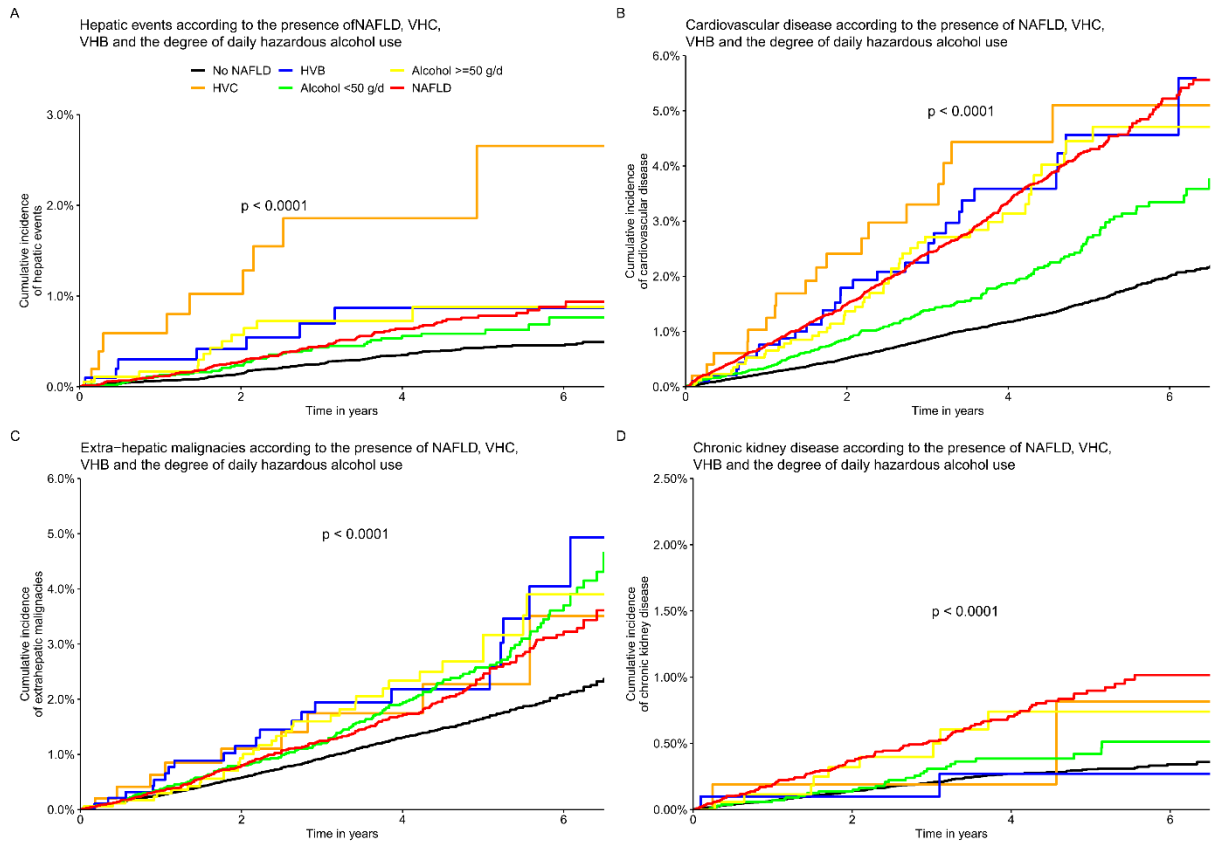
Supplementary, Figure 2: Cumulative incidence of cardiovascular disease, extrahepatic cancer and chronic kidney according to the FLI cut-off (FLI < 30 vs FLI 30-60 vs FLI ≥ 60).



Supplementary, Figure 3: Cumulative incidence of cardiovascular disease, extrahepatic cancer and chronic kidney according to the grade of fibrosis in NAFLD subjects.

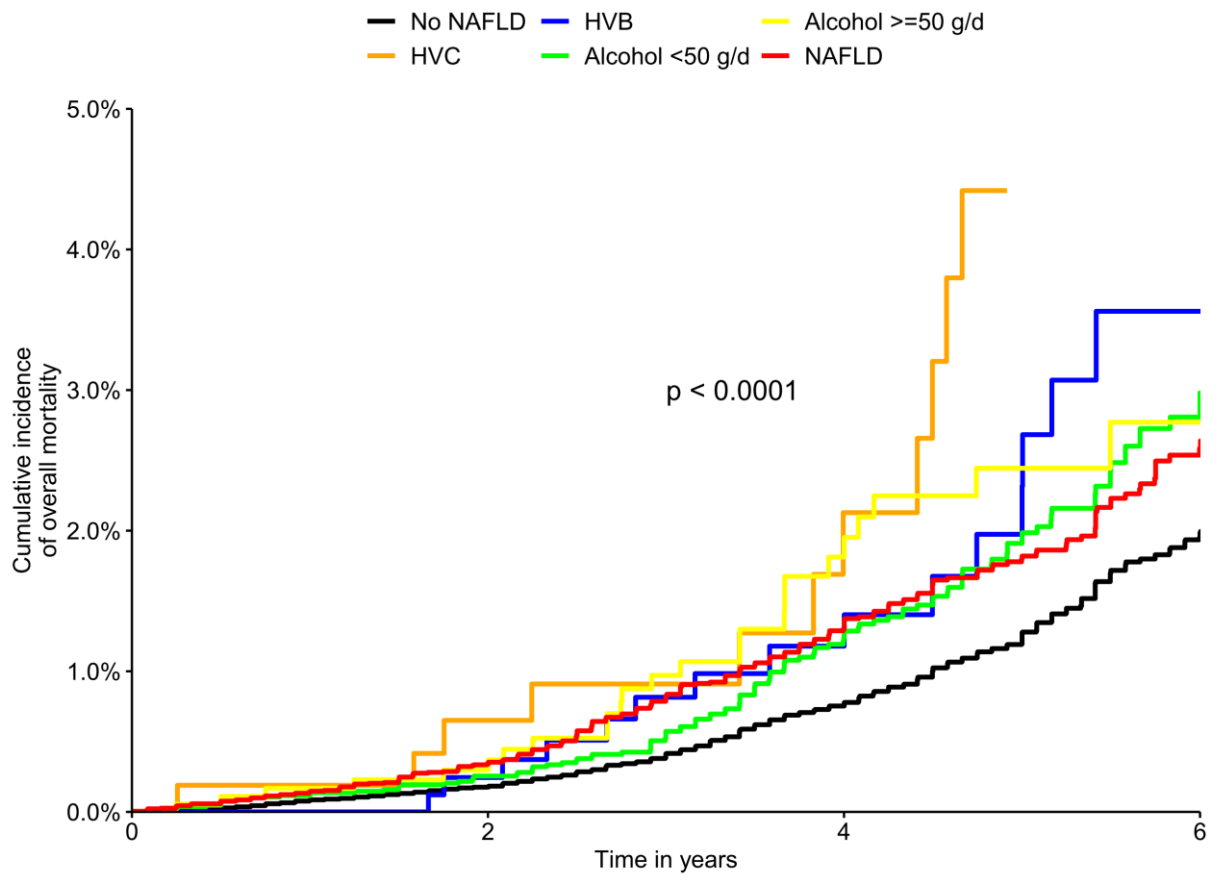


Supplementary, Figure 4: Cumulative incidence of cardiovascular disease, extra-hepatic cancer and chronic kidney according to the presence of chronic liver diseases.



Supplementary Figure 5: Cumulative incidence of clinical events according to the presence of chronic liver diseases and the degree of daily alcohol consumption

Overall mortality according to the presence of NAFLD, VHC, VHB and the degree of daily hazardous alcohol use



**Supplementary Figure 5 bis: Cumulative incidence of mortality according to the presence of chronic liver diseases and the degree of daily alcohol consumption**

## **B. La NAFLD chez les personnes atteintes de diabète : quel impact sur la santé ? (« NASHCO-STUDY »)**

### **Présentation de l'étude**

La NAFLD est une affection dysmétabolique dont le diabète de type 2 est un des facteurs de risque majeurs. Environ 70% des personnes atteintes de diabète sont atteints de NAFLD au diagnostic (61–63,65). Le diabète chez les personnes atteintes de NAFLD est associé à des formes plus sévères de la maladie (63). Des études avec biopsies hépatiques montrent que 80% des personnes atteintes de diabète avec NAFLD présentent une NASH et une fibrose avancée dans 17% à 40% des cas respectivement (61,63,66–70). Inversement, la présence d'une NAFLD augmente de 2 à 5 fois le risque de développer un diabète de type 2 (62,63,71,72,287). L'interrelation entre la NAFLD et le diabète est complexe et la primauté de l'un sur l'autre assez discutée(82–84). Les données disponibles sur l'impact de la NAFLD et du diabète sur la morbi-mortalité sont très limitées (288–290). La plupart des études disponibles sont principalement issues de très petites cohortes hospitalières et portent essentiellement sur les effets unidirectionnels du diabète de type 2 sur la NAFLD en termes de morbi-mortalité hépatique (cirrhose et carcinome hépatocellulaire). Il a été également suggéré à partir de ces études que la NAFLD est associée à un risque accru de complications liées au diabète telles que les maladies cardiovasculaires ou la maladie rénale chronique (64,291,292). Les quelques rares études qui ont évalué l'impact de la NAFLD chez les personnes atteintes de diabète rapportent un risque accru de progression vers la cirrhose et la mortalité en présence de la NAFLD (293–295). Cependant, le contexte (hospitalier) de ces études suggère une patientèle très sélectionnée et pose la question de l'extrapolabilité de ces résultats à la population générale des personnes atteintes de diabète. En effet, les patients souffrant de diabète suivis en milieu hospitalier peuvent avoir une maladie plus avancée, voire d'autres comorbidités susceptibles d'interférer avec leur état de santé alors que la plupart des personnes atteintes de diabète sont suivis par des médecins généralistes. On peut alors légitimement se poser dans un premier temps la question du pronostic de ces patients pris hors contexte hospitalier. Dans un second temps, on pourrait s'interroger sur l'intérêt éventuel de mesure spécifique à leur endroit.

Nos résultats confirment la très forte prévalence de la NAFLD chez les personnes atteintes du diabète (2 personnes atteintes du diabète sur trois). Le diabète augmentait le risque de NAFLD

de 6 fois et le risque de fibrose avancée de 3,76 fois chez les personnes atteintes de NAFLD indépendamment de tout autre facteur de risque. Les principaux facteurs prédictifs de fibrose avancée chez les personnes atteintes du diabète avec NAFLD étaient l'élévation de l'ALAT et la sévérité du diabète, indépendamment des facteurs de risque métaboliques supplémentaires, de la consommation résiduelle d'alcool ou du tabagisme. La présence de la NAFLD chez les personnes atteintes du diabète était associée à un risque accru de morbidité hépatique, de complications liées au diabète telles que les maladies cardiovasculaires et de la mortalité globale. Parmi les personnes atteintes du diabète avec NAFLD, le degré de fibrose était un puissant prédicteur de la morbidité et de la mortalité globale, avec un risque d'événements hépatiques, de maladies cardiovasculaires et de décès chez les personnes atteintes de fibrose avancée multiplier par 3 à 5. Ces résultats suggèrent en outre un impact réciproque entre le diabète et la NAFLD sur leur histoire naturelle

### **Discussion générale de l'article**

Nos résultats sont issus d'une large cohorte en population générale et reflètent la situation de l'ensemble des personnes atteintes du diabète. Cette étude utilisant des marqueurs diagnostic simples, disponibles et accessibles, fournit des preuves concrètes du risque de NAFLD et de fibrose avancée chez les personnes atteintes de diabète et inversement, et de leur impact réciproque sur la morbi-mortalité. Cette étude fournie des arguments tangibles (diagnostic précoce, équilibre du diabète sur la prévalence et la sévérité de la NAFLD et sur la morbi-mortalité) qui militent en faveur d'un changement de paradigme dans la prise en charge des personnes atteintes de diabète et peuvent être utiles pour définir des stratégies préventives notamment, de dépistage et de contrôle du diabète ainsi qu'une évaluation métabolique globale systématique en pratique clinique de routine et en médecine de ville en particulier. En outre, ces données pourraient servir à estimer l'intérêt médico-économique et clinique du dépistage systématique de la NAFLD chez les personnes atteintes de diabète et inversement.

Il convient cependant de relever quelques limites qui en toute vraisemblance ne sauraient remettre en cause la qualité et la portée scientifique de ces résultats. La temporalité entre le diabète et la NAFLD n'ont pas pu être confirmées en raison de la conception transversale du diagnostic. L'évaluation de la sévérité du diabète, a été limitée à la glycémie et à l'insulino-requérance, ce qui n'est pas gage de l'existence de complications macro ou microvasculaires

ni neurologiques. Les données de l'hémoglobine glyquée disponibles étaient assez parcellaires et ne nous permettaient pas des analyses qui puissent être interprétables et généralisables. L'utilisation de biomarqueurs sériques pour évaluer la NAFLD et la fibrose constitue une autre limite (comme discuté plus haut). L'histologie hépatique qui constitue la méthode de référence ainsi que les méthodes d'imagerie, comme l'échographie qui ont une meilleure précision que les biomarqueurs pour la détection de la NAFLD et de la fibrose, sont difficilement applicables à grande échelle, comme dans la population générale. Les ASAT ne sont pas disponibles dans les données biologiques recueillies dans la cohorte Constances, de ce fait il ne nous a pas été possible de confirmer l'évaluation de la fibrose avec d'autres biomarqueurs de fibrose tels que le FIB-4 ou le NAFLD fibrosis score. Enfin, nous n'avons pas pu évaluer l'impact de la NASH dans notre population d'étude, la biopsie hépatique étant la méthode recommandée pour cette évaluation.



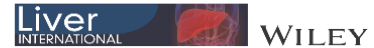
# Article 4: “The Burden of NAFLD in Type 2 Diabetic Subjects: a Population-Based Follow-Up Study (NASHCO)”



Received: 1 July 2021 | Revised: 19 November 2021 | Accepted: 29 November 2021

DOI: 10.1111/liv.15171

ORIGINAL ARTICLE



## The burden of NAFLD in type 2 diabetic subjects from the general population: A Nationwide population-based follow-up study (NASHCO)

Oumarou Nabi<sup>1,2</sup> | Jerome Boursier<sup>3,4</sup> | Nathanaël Lapidus<sup>1</sup> | Philippe Mathurin<sup>5</sup> | Victor de Ledinghen<sup>6</sup> | Jean-Michel Petit<sup>7</sup> | Marcel Goldberg<sup>2,8</sup> | Marie Zins<sup>2,8</sup> | Karine Lacombe<sup>1,9</sup> | Lawrence Serfaty<sup>10,11</sup>

<sup>1</sup>Sorbonne Université, INSERM, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique IPLESP, AP-HP, Public Health Department, Saint-Antoine Hospital, Paris, France

<sup>2</sup>UMS 11 Inserm, Université Paris Saclay, Université de Paris, Versailles-Saint Quentin University, Versailles, France

<sup>3</sup>HepatoGastroenterology Department, Anger University Hospital, Angers, France

<sup>4</sup>HIFIH Laboratory, UPRES EA3859, SFR 4208, Angers University, Angers, France

<sup>5</sup>Liver Unit, CHU, Lille, France

<sup>6</sup>Bordeaux University Hospital Branch, Bordeaux, France

<sup>7</sup>Department of Endocrinology-Diabetology, CHU Dijon, Dijon, France

<sup>8</sup>Université de Paris, Paris, France

<sup>9</sup>Infectious Diseases Department, Hôpital Saint-Antoine, APHP, Paris, France

<sup>10</sup>Hepatogastroenterology Service, Hôpital Hautepierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>11</sup>INSERM UMR\_S938, Université Paris-Sorbonne, Paris, France

### Correspondence

Lawrence Serfaty, Hôpital Hautepierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67000, Strasbourg, France.  
Email: lawrence.serfaty@chru-strasbourg.fr

Handling Editor: Luca Valenti

### Abstract

**Background:** The epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in diabetes have been mainly investigated in the hospital setting. The goal of this study was to evaluate the characteristics of NAFLD and its impact on morbidity and mortality in type 2 diabetic subjects in a community setting.

**Method:** This study included 199 341 participants in the nationwide Constances cohort. After patients with excessive alcohol consumption, viral hepatitis or other causes of liver disease were excluded, 164 285 were analysed and 8386 (5.3%) were considered to have type 2 diabetes. The non-invasive diagnosis of NAFLD and advanced fibrosis was made using a combination of the fatty liver index and Forns index. Median follow-up was 2.5 years.

**Results:** Diabetes increased the risk of NAFLD by sixfold (adjusted OR 6.05, 95% CI 5.68-6.45) and the risk of advanced fibrosis by 3.76-fold (aOR 3.76, 95% CI 2.87-4.91) in NAFLD subjects. After controlling for confounders, the presence of NAFLD in diabetic subjects was associated with an increased risk of severe liver-related events (aHR 2.53, 95% CI 1.36-4.69), cardiovascular disease (CVD, aHR 2.71, 95% CI 1.72-4.26) and overall mortality (aHR 2.91, 95% CI 1.53-5.53). The risk of hepatic and extrahepatic complications in diabetic subjects with NAFLD significantly increased with the severity of fibrosis ( $P < .05$ ).

**Conclusion:** This prospective, longitudinal study in a large community-based cohort provides real-world evidence of the risk for NAFLD and advanced fibrosis in diabetes, and its impact on liver disease progression, diabetes-related complications such as CVD, and overall mortality. These data could be used to estimate real clinical and economic burden of NAFLD in diabetic subjects.

**Abbreviations:** ALT, alanine aminotransferase; CKD, chronic kidney disease; CVD, cardiovascular disease; EHC, extrahepatic cancer; FI, Forns index; FLI, fatty Liver Index; GGT, gamma-glutamyl transferase; HBP, high blood pressure; HR, hazard ratio; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; NASH, non-alcoholic steatohepatitis.

© 2022 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd

Liver International. 2022;00:1–12.

wileyonlinelibrary.com/journal/liv | 1

## KEYWORDS

advanced fibrosis, cardiovascular disease, chronic kidney disease, extrahepatic malignancy mortality, fatty liver index, Forns index, obesity, type 2 diabetes

## 1 | INTRODUCTION

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common cause of chronic liver disease with an estimated worldwide prevalence ranging from 25% to 45%, concomitantly with the epidemic of obesity, type 2 diabetes and metabolic syndrome.<sup>1,2</sup> Around 20% of patients with NAFLD have non-alcoholic steatohepatitis (NASH), the active form of NAFLD which may progress to cirrhosis, end-stage liver disease and hepatocellular carcinoma.<sup>3</sup> In addition to liver-related complications, it has been suggested that NAFLD could promote cardiovascular disease (CVD), extra-hepatic cancer (EHC) and chronic kidney disease (CKD).<sup>4-6</sup>

Type 2 diabetes (T2D) is a major risk factor of NAFLD and a driver of disease progression. A recent meta-analysis has reported high global prevalence rates of NAFLD, NASH and advanced fibrosis in diabetic patients.<sup>7</sup> It has also been suggested that NAFLD is associated with an increased risk of diabetes-related complications such as CVD or CKD.<sup>8-10</sup> However, the epidemiology and natural history of NAFLD in type 2 diabetes, as well as the link between NAFLD and the complications of diabetes have mainly been evaluated in patients consulting in clinics, which is not representative of the overall population of diabetic subjects.<sup>7-13</sup> Indeed, diabetic patients followed in hospitals may have more advanced disease, while most diabetic subjects are followed by general practitioners. Moreover, the longitudinal data on the burden of NAFLD on diabetes-related complications are limited, and results are conflicting.<sup>9,13</sup> Finally, mortality in NAFLD diabetic patients has only been reported in two relatively small retrospective studies.<sup>14,15</sup>

The French Constances population-based cohort was designed as a large representative sample of the French adult population aged 18-69 years old, representative of gender and socioeconomic status including more than 200000 subjects between 2012 and 2020.<sup>16</sup> This cohort is ideal for prospectively assessing longitudinal data in the general population and estimating the risk of death while eliminating the bias of a hospitalized cohort with a more severe natural history of disease. The goal of the present study was to assess in unselected diabetic subjects (1) the prevalence of NAFLD and advanced fibrosis and examine risk factors associated with these conditions; and (2) the impact of NAFLD on liver-related outcomes, diabetes-related complications such as CVD, CKD or extrahepatic malignancies and mortality.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Study population

This longitudinal study was performed in data collected at baseline and follow-up from participants included in the Constances cohort between 2012 and 2020. This cohort was previously described.<sup>16,17</sup>

Briefly, Constances is a 'general purpose' epidemiological cohort designed to be representative of the French general population including more than 200000 adults aged 18 years and over at baseline and living in 21 departments in France that have a Health Screening Center (HSC)<sup>16,18</sup> affiliated with the national healthcare system, which represents approximately 50 million people. Subjects recruited in Constances were included in the present analysis if they were at least 18 years old, with no history of excess alcohol consumption defined by a daily consumption >30 g per day in men and >20 g per day in women, no history of chronic HBV or HCV infection, or history of other liver diseases excepted NAFLD. This study was approved by the 'Commission Nationale Informatique et Libertés' (CNIL), and ethical approval was obtained from the Institutional Review Board of the French National Institute of Health (INSERM). All participants provided written informed consent for the use of personal data for research.

### 2.2 | Data collection at baseline

Selected subjects were invited to complete questionnaires and to attend a HSC for a comprehensive health examination.<sup>16</sup> Socio-demographic and lifestyle data were obtained by a standardized self-administered questionnaire at home. Socio-demographic data included age, gender, occupation and employment status, education and geographical origin. Alcohol consumption was assessed using the AUDIT questionnaire.<sup>19</sup> The number of glasses per day was converted into the amount of grams per day of alcohol (1 glass = 10 g of alcohol). To estimate the impact of smoking, we considered tobacco ever vs never use.

Health and morbidity data were recorded by a physician in the HSC. This included histories of high blood pressure, diabetes, CVD (arteritis of lower limbs, myocardial infarction, stroke, angina pectoris), cancer (colon, breast, prostate, lung, thyroid, ovary, uterus) and CKD. Subjects were considered to be obese with a body mass index (BMI)  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>, or  $\geq 27$  kg/m<sup>2</sup> if Asian ethnicity, and as overweight with a BMI [25-29.9], or [23-27] if Asian ethnicity. Abdominal obesity was defined by a waist circumference  $\geq 94$  cm for men ( $\geq 90$  cm if Asian ethnicity) and  $\geq 80$  cm for women. Blood samples were taken from a venous blood sample after a 12-hour fast and analyses were performed in the HSC laboratories according to common standards. Biological data included blood glucose, serum creatinine, gamma-glutamyl transferase (GGT), alanine aminotransferases (ALT), total cholesterol, HDL cholesterol, triglyceride (TGs) and platelets. ALT was considered to be elevated at a threshold of 40 IU/L in men and 31 IU/L in women,<sup>20</sup> and GGT at 55 IU/L in men and 45 IU/L in women. Diabetes was defined either on the basis of self-reporting and/or blood glucose >6.9 mmol/L

and/or antidiabetic therapy. High blood pressure (HBP) was defined either on the basis of self-reporting, antihypertensive therapy, measured systolic blood pressure  $\geq 140$  mmHg and/or diastolic  $\geq 90$  mmHg. Hypercholesterolaemia was defined by a blood cholesterol  $> 5.5$  mm/L and/or lipid-lowering drugs. Hypertriglyceridaemia was defined by a blood triglyceride  $> 1.7$  mm/L or a lipid-lowering drug. The metabolic syndrome was defined according to the international diabetes federation.<sup>21</sup> CKD was defined according to a glomerular filtration rate  $< 60$  ml/mn/1.73 m<sup>2</sup> calculated according to the CKD-EPI equation (Chronic Kidney Disease-Epidemiology Collaboration).

### 2.3 | Definition of NAFLD and liver fibrosis

The fatty liver index (FLI) was chosen as a surrogate marker of NAFLD. It is based on four common anthropometric and biochemical measures: BMI, waist circumference, GGT and triglycerides.<sup>22</sup> This score has been shown to have an accuracy (area under the receiver operating characteristic) of 0.84 (95%CI 0.81-0.87) for detecting steatosis in the general population, and has been successfully cross-validated in external populations.<sup>23,24</sup> Subjects with FLI  $> 60$  were considered to have NAFLD according to the literature. The score was calculated according to the formula<sup>22</sup>:

$$(e^{0.953 \times \log(\text{triglycerides})} + 0.139 \times \text{BMI} + 0.718 \times \log(\text{GGT}) + 0.053 \times \text{waist circumference} - 15.745) / (1 + e^{0.953 \times \log(\text{triglycerides})} + 0.139 \times \text{BMI} + 0.718 \times \log(\text{GGT}) + 0.053 \times \text{waist circumference} - 15.745) \times 100.$$

The calculation of the Forns index (FI) for the evaluation of liver fibrosis was possible using data available in the Constances cohort. The FI was validated as a marker of liver fibrosis in NAFLD in a cohort of 1557 biopsy-proven NAFLD patients.<sup>17</sup> The score was calculated according to the published formula<sup>25</sup>:

$$(7.811 - 3.131 \times \ln(\text{platelets count}) + 0.781 \times \ln(\text{GGT})) + 3.467 \times \ln(\text{age}) - 0.014 \times (\text{cholesterol}),$$

and applied to subjects with NAFLD defined by FLI  $> 60$ . The previously published thresholds were used to rule out or rule in advanced fibrosis (F3/F4),  $< 4.2$  and  $> 6.9$  respectively. Subjects were classified as follows: non-NAFLD (FLI  $< 30$ ), NAFLD (FLI  $> 60$ ), NAFLD with mild fibrosis (FLI  $> 60$  and FI  $< 4.2$ ), NAFLD with intermediate fibrosis (FLI  $> 60$  and FI between 4.2 and 6.9) and NAFLD with advanced fibrosis (FLI  $> 60$  and FI  $> 6.9$ ).

### 2.4 | Follow-up study

Constances data were linked to hospitalization data and death which was recorded in the Systeme National des données de Santé (SNDS) from 2012 to 31 December 2017.<sup>26</sup> SNDS data were available during this period in 127291 Constances' participants. Exclusion criteria were as follows: excessive alcohol consumption, HBV or HCV infection, other chronic liver diseases. The follow-up period for each study participant was the length of time between the Constances baseline inclusion and 31 December 2017, the date of death or the

last date of follow-up. International Classification of Diseases (ICD-10) codes were used to define liver-related events according to the recent expert panel consensus statement (compensated cirrhosis, hepatocellular carcinoma, decompensated cirrhosis),<sup>27</sup> cardiovascular disease (arteritis of lower limbs, myocardial infarction, stroke, angina pectoris), extrahepatic cancer (colon, breast, prostate, lung, thyroid, ovary, uterus), chronic kidney disease (chronic kidney disease, diabetic nephropathy, hypertensive nephropathy, kidney failure) and overall mortality. Subjects with histories of cirrhosis-related complications or hepatocellular carcinoma, cardiovascular disease, extrahepatic cancer or subjects with GFR  $< 60$  ml/mn/1.73 m<sup>2</sup> at baseline were excluded in the calculation of each category of incident events.

### 2.5 | Statistical analysis

Constances uses a complex probability sampling design to select participants. Sampling weights were estimated in relation to this complex design and non-responses were estimated by modeling sociodemographic characteristics of patients from medico-administrative databases.

Baseline distributions were expressed as means with their 95% confidence intervals (CI 95%). for continuous variables and percentages for categorical variables. Continuous variables were compared by the Student's *t* test. Categorical variables were compared by using the chi-squared test or Fisher's exact test. None of the variables had more than 5% of missing data therefore no missing data were imputed. Prevalences were estimated as the ratio of subjects with available results to the total number of included subjects, with their 95% confidence intervals (CI 95%). Logistic regression models were built to identify risk factors associated with NAFLD, advanced fibrosis and comorbidities from the baseline data in diabetic subjects. Multivariate models included the usual clinically relevant risk factors for each dependent variable (NAFLD, diabetes, advanced fibrosis). Because BMI and triglycerides are part of the FLI calculation, they were not included in the analysis of NAFLD risk factors, while age and cholesterol, which are part of the FI calculation, were not included in the analysis of advanced fibrosis risk factors.

In a second set of analyses, we performed a longitudinal analysis to assess the impact of NAFLD at baseline on clinical outcomes and overall mortality. The overall follow-up population was split into three groups: diabetes with NAFLD, diabetes without NAFLD and no diabetes. Mortality was studied with the standard Cox proportional hazards models and other clinical outcomes with the Fine-Grey model, including all-cause mortality as a competing event. The cumulative incidence function was estimated for each clinical outcome, and the Grey's test was used to estimate the differences in the cumulative incidence functions between the groups. A standard Kaplan-Meier curve was estimated for the all-cause mortality rate. As the number of clinical events per variable considered for adjustment was sometimes too low to build multivariate models with a limited risk of overfitting, confounding

was handled with stabilized inverse-probability weighting (IPW). A multinomial propensity score for belonging to the three compared groups was derived by multinomial regression models, from potential confounding factors such as socio-demographic characteristics (age, sex, geographical origin, level of education), clinical and anthropometric variables (BPH, metabolic syndrome and BMI), lifestyle (alcohol consumption, smoking), biological data (triglyceride, cholesterol and ALT) and antidiabetic use in diabetic subjects. The positivity assumption was graphically checked by looking at the overlap of the propensity score distributions between the groups and their common support. In order to avoid bias induced by extreme weights, we truncated extreme weights ( $>0.99$ ) by shrinking them to 0.99. We used the standardized mean difference to assess the balance of covariates before and after weighting to ensure that weighting leads to comparable between the groups, with respect to the measured covariates. Standardized mean differences were used to assess the balance of covariates. An absolute standardized mean difference less than 0.10 indicates a balance of covariates (data available in Figure S1). Fine and Grey models weighted by the IPTW to estimate competing risk hazard ratios of liver-related events, CVD, extrahepatic malignancy, CKD and Cox proportional hazards models weighted by the IPTW to estimate the cause specific hazard ratios for overall mortality. A 6-month latency period since inclusion was imposed so that the incidence of a clinical event could be attributed to the presence of diabetes and/or NAFLD. Thus, to avoid an immortal time bias, the follow-up of subjects began 6 months after the collection of baseline NAFLD status. The associations of fibrosis with clinical outcomes according to the presence of NAFLD were studied in diabetic and non-diabetic subjects by splitting each population into four groups: NAFLD with advanced fibrosis, NAFLD with intermediate fibrosis, NAFLD with minimal fibrosis and no NAFLD). Multivariate analysis was performed using the standard Cox model containing confounding factors such as age, gender, obesity, diabetes, HBP, ALT and smoking. A value of  $P < .05$  was considered to be statistically significant. Analyses were performed using R Statistical Software version 4.0.3.

### 3 | RESULTS

At the time of analysis, baseline data were available for 199 341 participants. After excluding subjects who withdrew their consent, had a history of excessive alcohol consumption, chronic viral hepatitis, other causes of liver disease, or missing data for assessment of diabetes, 164 285 were included in the final analysis and defined as the overall population (Figure 1). A total of 8386 (5.3%, 95%CI 5.2-5.4) of these subjects were considered to have type 2 diabetes, 7138 (80.7%) had been previously diagnosed and 6204 (77.8%) were receiving antidiabetic drugs (oral treatment in 6039 and insulin requirement in 165). The baseline characteristics of the overall population and subjects with or without diabetes are shown in Table 1.

#### 3.1 | The prevalence of NAFLD in diabetic subjects

The FLI could be estimated in 159 203 subjects, including 7189 with type 2 diabetes (Figure 1). The characteristics of subjects with or without an available FLI were similar (data not shown). With a FLI  $> 60$ , the prevalence of NAFLD was 61.1% (95% CI 60-62.2) in diabetic and 15.2% (95% CI 15-15.3) in non-diabetic subjects. On multivariate analysis diabetes remained associated with NAFLD independently from age, gender, BMI, HBP, hypertriglyceridaemia, hypercholesterolaemia, elevated ALT and lifestyle such as tobacco use and moderate alcohol consumption (OR 6.05, 95%CI 5.68-6.45) (Table S1). In diabetic subjects, the prevalence of NAFLD was higher in men than in women (65.6%, 95% CI 64.1-67.1 vs 55.6%, 95%CI 53.9-57.3), and increased with age and gender from 28.7% in women aged 18-27 years old to 74.5% in men aged older than 68 (Table S1 and (Figure S2). In diabetic subjects, the prevalence of NAFLD according to BMI was 77.6% (95% CI 77.2-78.03) in obese subjects, 58.9% (95% CI 58.13-59.63) in overweight subjects and 20.9% (95% CI 19.84-22.1) in lean diabetic subjects. The prevalence of NAFLD was 85.4% (95% CI 83.1-87.7) and 57.4% (95% CI 56.2-58.6) in those with or without elevated ALT (Table S1) respectively.

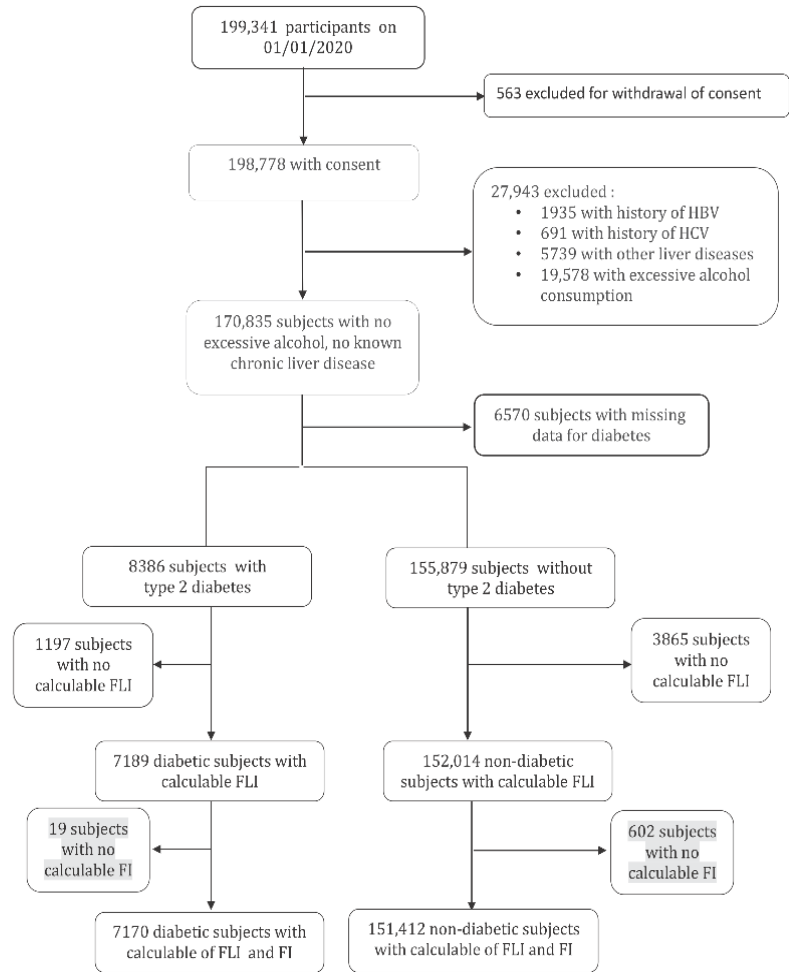
#### 3.2 | Factors associated with NAFLD in diabetic subjects

The general characteristics of diabetic subjects with or without NAFLD are shown in Table 2. Diabetic subjects with NAFLD were older and more often men than those without NAFLD, and had significantly more metabolic disorders, a significantly higher level of serum glucose and a higher prevalence of ALT above the normal threshold. The proportion of subjects receiving antidiabetic treatment was significantly lower in NAFLD than in the non-NAFLD group (37.6%, 95% CI 36.1-39.0 vs 94.1%, 95% CI 93-95.2). In multivariate analysis adjusted for antidiabetic treatment the independent parameters associated with NAFLD were age (OR 1.02, 95% CI 1.01-1.04), male gender (OR 2.1, 95% CI 1.72-2.57), high blood pressure (1.63, 95% CI 1.28-2.08), hypercholesterolaemia (OR 4.5, 95% CI 3.63-5.86), serum glucose  $>1.5$  g/L (OR 1.23, 95% CI 1.01-1.51) and ALT above the normal threshold (OR 15.35, 95% CI 11.11-21.64) (Table S2). Because part of FLI calculation, obesity and hypertriglyceridaemia were not included in the multivariate analysis. A history of CVD, extrahepatic malignancy and CKD were significantly more prevalent comorbidities in diabetic subjects with NAFLD than in those without (Table 2).

#### 3.3 | Prevalence and risk factors of advanced fibrosis in diabetic subjects with NAFLD

The FI could be estimated in 25607 subjects with NAFLD (99.8%), including 4034 subjects with diabetes. According to a FI  $>6.9$ , the prevalence of advanced fibrosis in diabetic subjects with NAFLD was

FIGURE 1 Flow chart



4.8% (Table 2). The characteristics of NAFLD diabetic subjects according to the presence of advanced fibrosis are shown in Table S3. The independent parameters associated with advanced fibrosis in NAFLD diabetic subjects on multivariate analysis were male gender (OR = 16.68, 95% CI 7.81-39.15), HBP (OR = 2.25, 95% CI 1.0-5.01), elevated ALT (OR = 15.36, 95% CI 8.24-29.93), insulin requirement (OR = 8.55, 95% CI 4.31-17.63), diabetes-related vascular complications (OR = 13.46, 95% CI 6.66-28.38) and moderate alcohol consumption (OR = 2.03, 95% CI 1.02-3.99) (Figure 2).

The prevalence of advanced fibrosis in NAFLD subjects without diabetes was 1.2% (vs diabetic NAFLD,  $P < .0001$ ). On multivariate analysis diabetes remained associated with advanced fibrosis independently from age, gender, HBP, elevated ALT, tobacco use and moderate alcohol consumption (OR 3.76, 95% CI 2.87-4.91). The rate of advanced fibrosis in diabetic subjects with NAFLD increased to 10.0% in obese vs 2.8% in non-obese subjects, 10.1% in hypertensive vs 3.6% in non-hypertensive subjects, 9.0% and 0% of subjects with and without metabolic syndrome, respectively and 9.7% and 2.7% in subjects with and without elevated ALT respectively. In terms of the severity of diabetes, the following parameters were associated with a significantly higher prevalence of advanced fibrosis: antidiabetic treatment (7.3% vs 1.5%,  $P < .0001$ ), insulin therapy

(13.9% vs 1.9%,  $P < .0001$ ), plasma glucose level  $>1.5$  g/L (13% vs 2.8%,  $P < .0001$ ) or a history of diabetes-related complications such as cardiovascular and/or CKDs (6.1% vs 3.9%,  $P < .0001$ ) (Figure S3).

### 3.4 | Clinical outcomes and mortality in diabetic subjects according to the presence of NAFLD

Data for the analysis of clinical outcomes and mortality (follow-up population) were available in 102 509 participants who were included between 2012 and 2017 and who had no excessive alcohol consumption or known chronic liver disease (Figure S4). Their baseline characteristics were not significantly different from those of the overall study population (data not shown). These subjects were divided into three groups: 2825 patients with diabetes and NAFLD, 1976 with diabetes without NAFLD and 97708 non-diabetic subjects (Figure S4). After a median follow-up of 2.5 years (0.51-5.91), 402 subjects developed liver-related events, including 92 HCC, 783 CVD, 350 CKD, 767 extrahepatic malignancies, 11 were transplanted and 785 died. The cumulative incidence of liver-related events, CVD, extrahepatic malignancies, CKD and death was significantly influenced by the presence of NAFLD and diabetes

TABLE 1 General characteristics at baseline of the overall population, type 2 diabetic and non-diabetic subjects with no excessive alcohol consumption nor HBV/HCV infection

	Overall population (n = 164 265)	Non-diabetic subjects (n = 155 879)	Type 2 diabetic subjects (n = 8386)	P value <sup>a</sup>
Age (years), mean (95% CI)	48.5 (48.4-48.6)	48.0 (47.9-48.1)	56.2 (55.9-56.5)	<.0001
Male gender (%) (95% CI)	43.5 (43.3-43.7)	42.8 (42.7-42.9)	55.5 (54.4-56.5)	<.0001
Obesity (%) (95% CI)	11.9 (11.7-12.0)	9.8 (9.7-9.9)	49.5 (48.4-50.6)	<.0001
BMI (kg/m <sup>2</sup> ), mean (95% CI)	24.9 (24.9-24.9)	24.7 (24.6-24.8)	29.8 (29.7-29.9)	<.001
Waist circumference (cm), mean (95%CI)	85.1 (85.0-85.2)	84.3 (84.2-84.4)	99.7 (99.4-100.0)	<.0001
Hypertriglyceridaemia (%) (95% CI)	12.3 (12.2-12.5)	10.5 (10.4-10.6)	45.8 (44.7-46.9)	<.0001
Hypercholesterolaemia (%) (95% CI)	11.6 (11.4-11.8)	9.7 (9.5-9.9)	48.2 (46.7-49.6)	<.0001
High blood pressure (%) (95% CI)	12.1 (11.9-12.3)	11.8 (11.1-12.5)	20.5 (19.6-21.4)	<.0001
Metabolic syndrome (%) (95% CI)	15.5 (15.3-15.7)	12.9 (12.8-13.0)	66.1 (64.9-67.3)	<.0001
ALT>N (%) (95% CI)	10.0 (9.9-10.2)	9.8 (9.7-9.9)	13.5 (12.8-14.3)	.001
GGT > N (%) (95% CI)	12.6 (12.4-12.8)	12.0 (11.9-12.1)	23.6 (22.7-24.5)	<.0001
History of: Cardiovascular disease (%) (95% CI)	10.0 (9.8-10.1)	9.0 (8.9-9.1)	27.2 (26.3-28.2)	<.0001
Extrahepatic cancer (%) (95% CI)	3.6 (3.5-3.7)	3.3 (3.2-3.4)	5.0 (4.5-5.4)	.001
Chronic kidney disease (%) (95% CI)	3.5 (3.3-3.7)	3.5 (3.4-3.6)	5.6 (5.2-60.0)	.04
Antidiabetic drug (%) (95% CI)	3.1 (3.0-3.2)	–	74.1 (74.0-74.2)	
Metformin (%) (95% CI)	2.1 (2.0-2.2)	–	56.5 (56.2-56.7)	
Sulfamid (%) (95% CI)	0.21 (0.18-0.24)	–	4.1 (3.0-5.2)	
DPP4 inhibitor (%) (95% CI)	0.20 (0.13-0.23)	–	3.5 (2.4-4.6)	
GLP1 inhibitor (%) (95% CI)	0.11 (0.08-0.14)	–	2.2 (1.2-3.1)	
Insulin (%) (95% CI)	0.1 (0.1-0.2)	–	2.0 (1.6-2.3)	
Lipid-lowering drug (%) (95% CI)	9.7 (9.6-9.8)	8.6 (8.5-8.7)	10.3 (10.0-10.6)	<.001
Statin (%) (95% CI)	7.1 (6.7-7.6)	6.6 (6.4-6.8)	7.6 (6.5-8.6)	ns
Fibrate (%) (95% CI)	1.8 (1.0-2.7)	1.4 (0.9-1.9)	2.3 (1.3-3.3)	ns
HMG CoA inhibitors (%) (95% CI)	0.6 (0.1-1.1)	0.6 (0.1-1.1)	0.4 (0.2-0.6)	ns
Antihypertensive drug (%) (95% CI)	11.3 (11.2-11.4)	8.3 (8.2-8.4)	16.6 (16.4-16.8)	<.001
Angiotensin II inhibitor (%) (95% CI)	4.4 (3.9-4.8)	3.3 (2.9-3.8)	6.6 (6.3-7.0)	<.001
Conversion enzyme inhibitor (%) (95% CI)	2.8 (2.3-3.2)	1.5 (1.3-2.3)	3.1 (2.5-3.6)	.0013
Beta blockers (%) (95% CI)	2.4 (1.9-2.8)	1.4 (0.9-1.9)	3.8 (3.0-4.7)	.0093
Calcic inhibitor (%) (95% CI)	1.8 (1.3-2.3)	1.1 (0.6-1.6)	2.1 (1.6-2.6)	.061
Diuretic (%) (95% CI)	1.1 (0.6-1.5)	1.1 (0.6-1.6)	1.0 (0.4-1.9)	ns

Abbreviations: CI: confidence interval, GGT: gamma-glutamyl transferase, ALT: alanine aminotransferase.

<sup>a</sup>Non-diabetic vs diabetic subjects.

(Figure 3 and Figure S5). The probability of death at 2 and 5 years in diabetic subjects with and without NAFLD and non-diabetic subjects was 0.4% (95% IC 0.16-0.64), 0.4% (0.11-0.69) and 0.2% (0.17-0.23), respectively and 1.9% (1.23-2.57), 0.8% (0.18-1.42) and 0.6% (0.54-0.66) respectively ( $P < .0001$ ). Unadjusted and adjusted analysis for the risk of clinical outcomes and death according to the presence of NAFLD in diabetic subjects are shown in Table 3. The presence of NAFLD after adjustment for age, gender, geographical origin, educational level, BMI, HBP, hypercholesterolaemia, ALT,

smoking, alcohol consumption and antidiabetic treatment, was associated with an increased risk of liver-related events (aHR 2.53, 95%CI 1.36-4.69). The risk of CVD was significantly increased by the presence of NAFLD after adjustment (aHR 2.71, 95% CI 1.72-4.26). The risk of extrahepatic cancer or CKD was not significantly influenced by the presence of NAFLD in diabetic subjects (Table 3). For overall mortality, the risk of death was significantly increased by the presence of NAFLD in diabetic subjects after adjustment (aHR 2.91, 95% CI 1.53-5.53).

**TABLE 2** General characteristics, advanced fibrosis and history of comorbidities according to the presence of NAFLD in diabetic subjects. The presence or absence of NAFLD was defined as FLI > 60 or < 30 respectively

	Diabetic w/o NAFLD (n = 1838)	Diabetic with NAFLD (n = 4278)	P value
Age (years), mean (95%CI)	52.7 (52.6-52.8)	58.1 (58.1-58.1)	<.001
Male gender (%) (95% CI)	43.2 (40.9-45.5)	60.6 (59.1-62.0)	<.001
Obesity (%) (95% CI)	30.6 (28.4-32.7)	66.7 (65.2-68.1)	<.001
Hypertriglyceridaemia (%) (95% CI)	9.9(8.5-11.3)	73.8 (72.5-75.2)	<.001
High blood pressure (%) (95% CI)	18.9 (16.8-21.0)	89.4 (88.5-90.4)	<.001
Hypercholesterolaemia (%) (95% CI)	13.6 (12.1-15.2)	71.2 (69.5-72.8)	<.001
Glucose (mmol/L), mean (95% CI)	7.5 (7.5-7.5)	8.3 (8.2-8.4)	<.001
Antidiabetic drugs (%) (95% CI)	94.1 (93-95.2)	37.6 (36.1-39.0)	<.001
Metabolic syndrome (%) (95% CI)	10.9 (9.1-12.7)	96.4 (96.4-97.5)	<.001
ALT>N (%) (95% CI)	4.7 (3.8-5.7)	25.1 (24.5-25.6)	<.001
Advanced fibrosis (%) (95% CI)	ND	4.8 (4.2-5.4)	—
History of: Cardiovascular disease (%) (95% CI)	10.8 (9.4-12.2)	37.5 (36.0-38.9)	<.001
Extrahepatic cancer (%) (95% CI)	5.6 (4.5-6.7)	7.8 (7.0-8.6)	.025
Chronic kidney disease (%) (95% CI)	3.9 (3.6-4.2)	6.0 (5.1-6.9)	.02

Abbreviations: CI, confidence interval; ALT, alanine aminotransferase.

### 3.5 | Clinical outcomes and mortality in diabetic subjects with NAFLD according to the grade of fibrosis

Of the 4801 diabetic participants who had available data on mortality, 2825 had NAFLD and were divided according to the grade of fibrosis: minimal fibrosis in 2567 (FI <4.2), intermediate in 91 (FI 4.2-6.9) and advanced in 159 (FI >6.9). The cumulative incidence of liver-related events, CVD, extrahepatic malignancy and death, but not CKD, was significantly different in this group according to the grade of fibrosis (data not shown). Table 4 shows univariate and multivariate analysis for the risk of clinical outcomes and death according to the grade of fibrosis in diabetic subjects with NAFLD, with diabetic subjects without NAFLD as the reference group. In univariate analysis, there was a positive relationship between the grade of fibrosis and the risk of hepatic events and CVD. After adjustment for age, gender, obesity, diabetes, HBP, ALT and smoking, multivariate analysis showed that the risk of hepatic events and CVD was significantly increased in those with advanced fibrosis (HR = 5.43, 95% CI 2.49-14.54 and HR = 3.78, 95% CI 1.94-6.25 respectively) There was a dose effect of fibrosis on the risk of death in univariate analysis (Table 4). In multivariate analysis, the risk of death was significantly increased in diabetic NAFLD subjects with advanced fibrosis (HR = 5.14, 95% CI 2.24-9.32). Table S4 shows univariate and multivariate analysis for the risk of clinical outcomes and death according to the grade of fibrosis in non-diabetic subjects with NAFLD. Compared with NAFLD diabetic subjects, the risk was globally lower

among NAFLD non-diabetic subjects. Only the risk of death was positively related with the grade of fibrosis.

## 4 | DISCUSSION

To our knowledge, this is the largest European survey to prospectively evaluate the burden of NAFLD on clinical outcomes and mortality in diabetic subjects in a community setting. Around 20% of our diabetic population was undiagnosed at inclusion. Our results confirm the high prevalence of NAFLD and the lower rate of advanced fibrosis in this unselected population compared to hospital cohorts. After controlling for confounders, diabetes increased the risk of NAFLD by six-fold and the risk of advanced fibrosis by 3.76-fold in NAFLD subjects. The main predictors of advanced fibrosis in NAFLD diabetic subjects were elevated ALT and the severity of diabetes, independent from additional metabolic risk factors, alcohol or smoking. The presence of NAFLD in diabetic subjects was associated with an increased risk of liver-related events, diabetes-related complication such as CVD, and overall mortality, after controlling for the usual risk factors. Among NAFLD diabetic subjects, the grade of fibrosis was a strong predictor of morbidity and overall mortality, with a three- to fivefold increase in risk of liver-related events, CVD and death in those with advanced fibrosis.

Our results reflect the situation of diabetic subjects in the community setting. The CONSTANCES is a large population-based cohort representative of the French general population aged 18 and

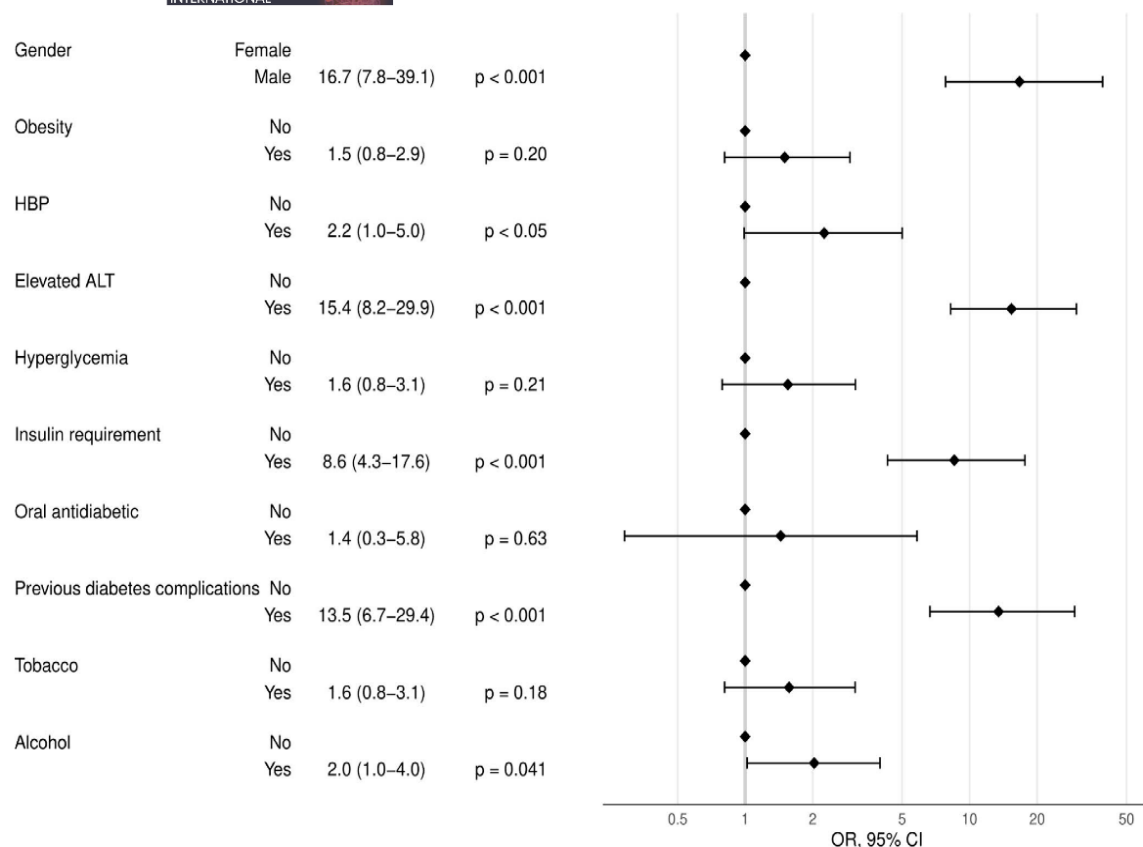


FIGURE 2 Multivariate analysis of risk factors associated with advanced fibrosis (Forns index >6.9) among diabetic subjects with NAFLD. The reference group is diabetic subjects with NAFLD and no fibrosis (Forns index <4.2)

over.<sup>16</sup> Scores for non-invasive markers such as the fatty liver index (FLI) and Forns index (FI) were determined with prospective data. The FLI has been validated in several studies as a marker of NAFLD in the general population and has been shown to be highly accurate in detecting fatty liver.<sup>23-25</sup> The performance of the FI has already been shown to be relatively good as a marker of fibrosis in NAFLD in several studies.<sup>17,28,29</sup> It was also shown to be accurate in the prediction of the development of severe liver disease in patients at risk of NAFLD.<sup>30</sup>

Our study confirms the high prevalence of NAFLD in subjects with type 2 diabetes, that is, 61%, which was close to that reported in European diabetic patients and which increased with age.<sup>7</sup> The highest prevalence of NAFLD reached 85% and was found in subjects with diabetes and elevated ALT, a high-risk population that requires screening. On the other hand, only 25% of NAFLD subjects with diabetes had elevated ALT, confirming the low diagnostic sensitivity of transaminases for the former. Interestingly, compared to diabetic subjects without NAFLD, those with NAFLD had higher levels of serum glucose and were less frequently treated with antidiabetic drugs, suggesting the importance of diabetes control to prevent NAFLD.

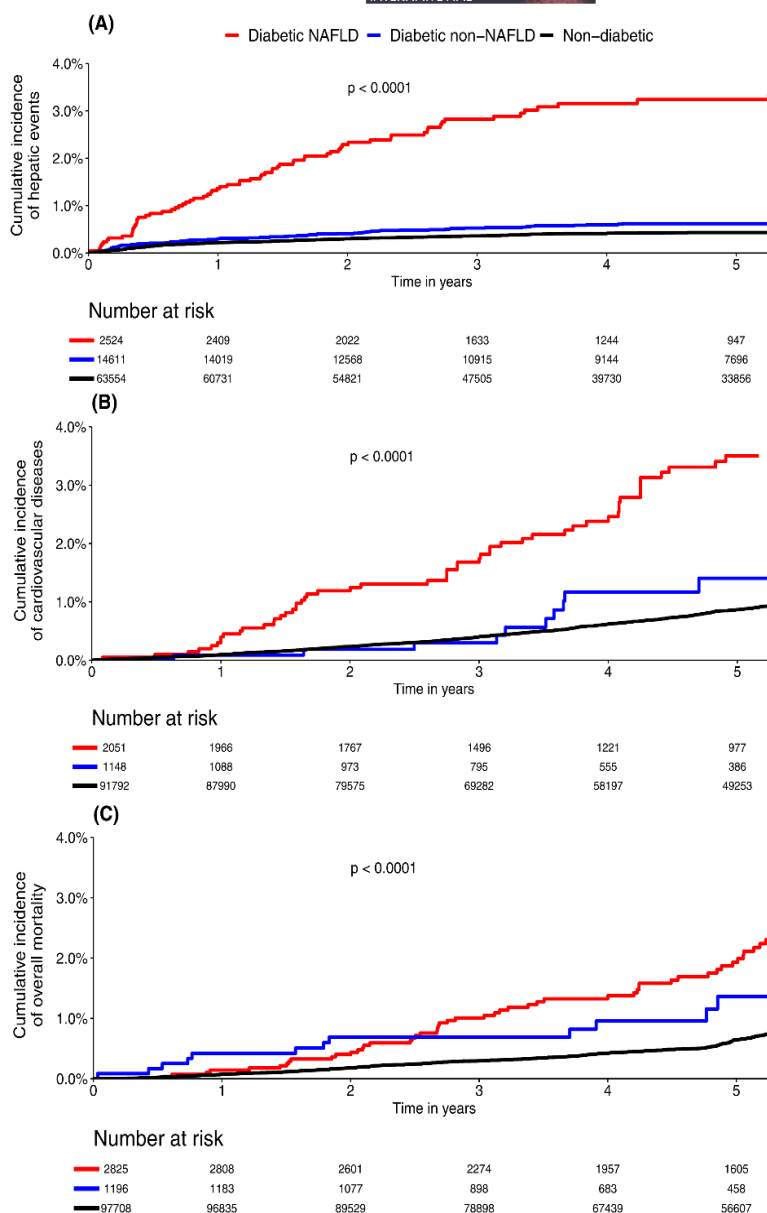
The impact of diabetes as a driver of fibrogenesis in NAFLD patients has been extensively investigated. One meta-analysis in selected diabetic patients with biopsy-proven NAFLD reported a 17%

rate of advanced fibrosis.<sup>7</sup> The screening of a large cohort of diabetic patients from Hong Kong with FibroScan reported a prevalence of extensive fibrosis, defined by liver stiffness >9.6 kPa, of around 18%.<sup>11</sup> However, this study population included patients followed at a hospital clinic who probably had more severe diabetes than the general population of diabetic subjects. The prevalence of advanced fibrosis in NAFLD diabetic subjects in our study was 4.8%, which is close to that reported in two small community-based studies using FibroScan or MRE in diabetic subjects.<sup>31,32</sup> The prevalence of advanced fibrosis increased to around 10% in NAFLD diabetic subjects with additional metabolic factors, and around 13% in those with advanced diabetes assessed by a high serum level of glucose or the need for insulin therapy. The link between the severity of diabetes and fibrosis may be explained by the worsening of hepatic insulin resistance and the release of multiple pro-inflammatory mediators and pro-diabetogenic hepatokines in patients with NASH and fibrosis, thus promoting diabetes.<sup>33</sup> As previously shown in an ageing population from Rotterdam, we confirmed that the combination of diabetes and NAFLD was associated with a significantly higher rate of advanced fibrosis than NAFLD alone with our data on NAFLD status in the overall population.<sup>34</sup>

It is difficult to assess whether diabetes promotes NAFLD and its progression or whether NAFLD patients are at risk of developing



**FIGURE 3** Curves of cumulative incidence of liver-related events (A), cardiovascular events (B) and death (C) according to the presence of NAFLD and diabetes



**TABLE 3** Unadjusted an adjusted cause specific Hazard ratio in diabetic subjects according to the presence of NAFLD

	Unadjusted analysis		IPTW adjusted analysis	
	Diabetic with NAFLD (vs diabetic without NAFLD)		Diabetic with NAFLD (vs diabetic without NAFLD)	
	HR (95% CI)	P	aHR (95% CI)	P <sup>a</sup>
Hepatic events	3.70 (2.01-6.81)	<.001	2.53 (1.36-4.69)	.003
Cardiovascular disease	2.82 (1.79-4.44)	<.001	2.71 (1.72-4.26)	<.001
Extrahepatic cancer	1.38 (0.80-2.36)	Ns	1.31 (0.76-2.24)	NS
Chronic kidney disease	1.77 (0.91-3.43)	NS	1.71 (0.90-3.26)	NS
Death	2.73 (1.46-5.10)	.002	2.91 (1.53-5.53)	.001

Abbreviations: HR: hazard ratio, aHR: adjusted hazard ratio, CI: confidence interval.

TABLE 4 Univariate and multivariate analysis of outcome risk according to fibrosis (Forns index <4.2: No fibrosis; FI 4.2–6.9: Intermediate fibrosis, FI > 6.9: Advanced fibrosis) in diabetic subjects with NAFLD. The reference group is diabetic subjects without NAFLD (FI < 30)

	Univariate analysis		Multivariate analysis <sup>a</sup>					
	NAFLD w/o fibrosis (n = 2567)	HR (95% CI)	NAFLD with intermediate fibrosis (n = 91)	HR (95% CI)	NAFLD with intermediate fibrosis (n = 91)	HR (95% CI)	NAFLD with advanced fibrosis (n = 159)	HR (95% CI)
Hepatic events	1.63 (1.01–2.61)*		2.16 (1.31–3.57)*		1.34 (0.82–2.17)		5.43 (2.49–14.54)*	
Cardiovascular disease	1.40 (0.66–3.01)		3.71 (2.94–5.60)*		1.20 (0.52–2.77)		3.78 (1.94–6.25)*	
Extrahepatic cancer	1.04 (0.46–2.74)		1.43 (0.69–2.93)		1.06 (0.65–1.73)		1.41 (0.8–6.01)	
Chronic kidney disease	1.31 (0.55–3.09)		1.93 (0.68–3.95)		2.01 (0.99–3.89)		1.01 (0.2–5.11)	
Death	1.46 (0.78–2.71)		2.39 (1.07–3.19)*		2.01 (0.99–3.89)		5.14 (2.24–9.32)*	

\*P < .05.

type 2 diabetes using a cross-sectional design.<sup>35</sup> Several longitudinal studies in large cohorts have reported an increased risk of NAFLD, cirrhosis, HCC or cirrhosis-related death in diabetic patients.<sup>36–38</sup> There are only a few longitudinal studies of the progression of liver disease in diabetic patients with NAFLD, as well as on the impact of NAFLD on diabetes-related complications, and these are mostly in hospital cohorts.<sup>9,13,14,15</sup> In one of these studies, steatosis was assessed in 2343 diabetic patients who underwent CT scan for other indications and was not predictive of liver or cardiovascular complications.<sup>13</sup> However, a similar study in 2103 diabetic patients attending clinics showed that NAFLD increased the risk of cardiovascular events by 1.87-fold after adjusting for confounders.<sup>9</sup> Moreover, in a small study including 132 patients with biopsy-proven NAFLD, diabetes was associated with greater risk of the occurrence of cirrhosis or liver-related death.<sup>15</sup> In the NHANES cohort, the combination of diabetes and chronic liver disease was associated with an increased risk of mortality compared to each condition on its own.<sup>39</sup> The impact of NAFLD on mortality in diabetic patients was assessed in a small community-based cohort and showed an increased risk of overall death in diabetics with NAFLD after 10.1 years of follow-up, independent from other risk factors.<sup>14</sup>

Our large community-based cohort confirms that NAFLD is associated with adverse liver-related events, including the occurrence of HCC, in diabetic subjects with a hazard ratio of 2.5 (95% CI 1.36–4.69) after adjustment for a large number of confounding factors. Liver-related events were assessed according to the recent expert statement which provided a reference standard to code compensated cirrhosis, HCC and decompensated cirrhosis.<sup>27</sup> The risk of incident CVD was also found to be increased in NAFLD diabetic subjects with an adjusted HR of 2.71 (95% CI 1.72–4.26). Our results were adjusted for antidiabetic treatment but not statins, which may influence the risk of CVD. While the risk of incident CKD was increased in diabetic subjects, it was not significantly influenced by the presence of NAFLD. This result may be partly explained by the use of ICD-10 coding rather than eGFR changes, which is a more sensitive method to diagnose CKD events. Both NAFLD and type 2 diabetes are known to be associated with an increased incidence of many cancers.<sup>5,40</sup> We found that there was a significantly higher frequency of incident extrahepatic malignancies in diabetic than in non-diabetic subjects. However, despite this tendency, the presence of NAFLD did not significantly increase the risk of incident cancer. Longer follow-up is probably needed. Finally, in our study overall mortality was significantly influenced by the presence of NAFLD in diabetic subjects with an adjusted HR of 2.91 (95% CI 1.53–5.53), which is similar to that (2.2, 95% CI 1.1–4.2) in a previous study.<sup>14</sup> However, the probability of death in diabetics with NAFLD was lower in our unselected population, that is, 1.9% at 5 years, compared to the probability of death reported in two previous studies, that is, 11.9% at 10 years.<sup>7,14,15</sup> Poorer outcomes in the latter studies may be explained by the design as both were retrospective analyses of selected diabetic patients who mainly underwent liver biopsy for the diagnosis of NAFLD. Like in previous studies in biopsy-proven

NAFLD patients, we found a dose-dependent effect between the grade of fibrosis and clinical outcomes or overall mortality.<sup>41</sup> Diabetic subjects with NAFLD and advanced fibrosis had not only the highest significant risk of liver-related event, but also the highest risk of CVD and all cause death.

Our study has several limitations. The causality and temporality between metabolic risk factors or comorbidities and NAFLD could not be confirmed because of the cross-sectional design. For example, we cannot exclude that diabetes is a consequence rather than a cause of NAFLD. Regarding the severity of diabetes, we used rough surrogates such as glucose levels or insulin need. Unfortunately, glycated haemoglobin which is the gold standard was not available in our study population. Another limitation is the use of non-invasive serum biomarkers to assess the presence of NAFLD and advanced fibrosis. Imaging methods, such as US or Fibroscan which have a better accuracy than biomarkers for the detection of NAFLD and fibrosis, are difficult to apply on a large scale such as in the general population. Because AST measurement was not performed in subjects of CONSTANCES cohort, we were not able to confirm our data with other fibrosis biomarkers such as FIB4 or NAFLD fibrosis score. Finally, we were not able to assess the impact of NASH in our study population, liver biopsy being the gold standard for this diagnosis.

In conclusion, this large, prospective community-based cohort provides real-world evidence that diabetes and NAFLD have an additive effect on liver injury, clinical outcomes and mortality. Advanced fibrosis should be mainly screened in diabetic NAFLD subjects with elevated ALT and/or severe diabetes. Patients with NAFLD, especially when it is associated with significant fibrosis, should be closely monitored for diabetes-related complications such as CVD. Overall, the long-term impact of interventional strategies based on specific treatment of NAFLD in diabetic subjects requires further studies.

#### CONFLICT OF INTEREST

Nothing to declare for all authors.

#### DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

#### ORCID

Victor de Ledinghen  <https://orcid.org/0000-0001-6414-1951>

Lawrence Serfaty  <https://orcid.org/0000-0003-3055-5579>

#### ENDNOTES

- a Cox model, adjusted for age, gender, obesity, diabetes, HBP, ALT and smoking.
- a Covariates of PS model: age, gender, BMI, HBP, ALT, TGs, cholesterol, tobacco use, alcohol consumption, schooling, geographical origin and antidiabetic treatment.

#### REFERENCES

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. Rinella ME. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. *JAMA*. 2015;313:2263-2273.
3. Serfaty L, Lemoine M. Definition and natural history of metabolic steatosis: clinical aspects of NAFLD, NASH and cirrhosis. *Diabetes Metab*. 2008;34:634-637.
4. 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.
5. Sanna C, Rosso C, Marietti M, Bugianesi E. Non-alcoholic fatty liver disease and extra-hepatic cancers. *Int J Mol Sci*. 2016;17:717.
6. Musso G, Gambino R, Tabibian JH, et al. Association of non-alcoholic fatty liver disease with chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med*. 2014;11:e1001680.
7. Younossi ZM, Golabi P, de Avila L, et al. The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol*. 2019;71:793-801.
8. Targher G, Bertolini L, Padovani R, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2007;30:1212-1218.
9. Targher G, Bertolini L, Rodella S, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is independently associated with an increased incidence of cardiovascular events in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2007;30:2119-2121.
10. Targher G, Bertolini L, Rodella S, et al. Non-alcoholic fatty liver disease is independently associated with an increased prevalence of chronic kidney disease and proliferative/laser-treated retinopathy in type 2 diabetic patients. *Diabetologia*. 2008;51:444-450.
11. Kwok R, Choi KC, Wong GL, et al. Screening diabetic patients for non-alcoholic fatty liver disease with controlled attenuation parameter and liver stiffness measurements: a prospective cohort study. *Gut*. 2016;65:1359-1368.
12. Casey SP, Kemp WW, McLean CA, Topliss DJ, Adams LA, Roberts SK. A prospective evaluation of the role of transient elastography for the detection of hepatic fibrosis in type 2 diabetes without overt liver disease. *Scand J Gastroenterol*. 2012;47:836-841.
13. Dunn MA, Behari J, Rogal SS, et al. Hepatic steatosis in diabetic patients does not predict adverse liver-related or cardiovascular outcomes. *Liver Int*. 2013;33:1575-1582.
14. Adams LA, Harnsen S, St Sauver JL, et al. Nonalcoholic fatty liver disease increases risk of death among patients with diabetes: a community-based cohort study. *Am J Gastroenterol*. 2010;105:1567-1573.
15. Younossi ZM, Gramlich T, Matteoni CA, Boparai N, McCullough A. Nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2004;2:262-265.
16. Zins M, Goldberg M, CONSTANCES team. The French CONSTANCES population-based cohort: design, inclusion and follow-up. *Eur J Epidemiol*. 2015;30:1317-1328.
17. Nabi O, Lacombe K, Boursier J, Mathurin P, Zins M, Serfaty L. Risk factors of nonalcoholic fatty liver disease and advanced fibrosis in general population: the French nationwide NASH-CO study. *Gastroenterology*. 2020;159:791-793.
18. Ruiz F, Goldberg M, Lemonnier S, et al. High quality standards for a large-scale prospective population-based observational cohort: Constances. *BMC Public Health*. 2016;16(1):877.
19. Gache P, Michaud P, Landry U, et al. The alcohol use disorders identification test (AUDIT) as a screening tool for excessive drinking in primary care: reliability and validity of a French version. *Alcohol Clin Exp Res*. 2005;29:2001-2007.
20. Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am J Gastroenterol*. 2003;98:960-967.
21. Alberti KGMM, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome—a new world-wide definition. A consensus statement from the international diabetes federation. *Diabetes Med*. 2006;23:469-480.

22. Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, et al. The fatty liver index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol.* 2006;6:33.
23. Zelber-Sagi S, Webb M, Assy N, et al. Comparison of fatty liver index with noninvasive methods for steatosis detection and quantification. *World J Gastroenterol.* 2013;19:57-64.
24. Koehler EM, Schouten JNL, Hansen BE, Hofman A, Stricker BH, Janssen HLA. External validation of the fatty liver index for identifying nonalcoholic fatty liver disease in a population-based study. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2013;11:1201-1204.
25. Fornis X, Ampurdanès S, Llovet JM, et al. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology.* 2002;36:986-992.
26. SNDS: Système National des Données de Santé | CNIL. <https://www.cnil.fr/fr/snds-systeme-national-des-donnees-de-sante>
27. Hagström H, Adams LA, Allen AM, et al. Administrative coding in electronic health care record-based research of NAFLD: an expert panel consensus statement. *Hepatology.* 2021;74:474-482.
28. Nones RB, Istantes CP, Pedrosa MLA. Can FIB4 and NAFLD fibrosis scores help endocrinologists refer patients with non-alcoholic fat liver disease to a hepatologist? *Arch Endocrinol Metab.* 2017;61:276-281.
29. Yang M, Jiang L, Wang Y, et al. Step layered combination of noninvasive fibrosis models improves diagnostic accuracy of advanced fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastrointest Liver Dis.* 2019;28:289-296.
30. Hagström H, Tallbäck M, Andreasson A, et al. Ability of noninvasive scoring systems to identify individuals in the population at risk for severe liver disease. *Gastroenterology.* 2020;158:200-214.
31. Roulot D, Roudot-Thoraval FN, Kontchou G, et al. Concomitant screening for liver fibrosis and steatosis in French type 2 diabetic patients using Fibroscan. *Liver Int.* 2017;37:1897-1906.
32. Doycheva J, Cui J, Nguyen P, et al. Non-invasive screening of diabetics in primary care for NAFLD and advanced fibrosis by MRI and MRE. *Aliment Pharmacol Ther.* 2016;43:83-95.
33. Meex RCR, Watt MJ. Hepatokines: linking nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol.* 2017;13:509-520.
34. Koehler EM, Plompen EPC, Schouten JNL, et al. Presence of diabetes mellitus and steatosis is associated with liver stiffness in a general population: the Rotterdam study. *Hepatology.* 2016;63:138-147.
35. Mantovani A, Byrne CD, Bonora E, Targher G, Mantovani A, et al. Nonalcoholic fatty liver disease and risk of incident type 2 diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care.* 2018;41:372-382.
36. De Marco R, Locatelli F, Zoppini G, Verlato G, Bonora E, Muggeo M. Cause-specific mortality in type 2 diabetes. The Verona Diabetes Study. *Diabetes Care.* 1999;22:756-761.
37. El-Serag HB, Tran T, Everhart JE. Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2004;126:460-468.
38. Pang Y, Kartsonaki C, Turnbull I, et al. Diabetes, plasma glucose, and incidence of fatty liver, cirrhosis, and liver cancer: a prospective study of 0.5 million people. *Hepatology.* 2018;68:1308-1318.
39. Stepanova M, Clement S, Wong R, Saab S, Ahmed A, Younossi ZM. Patients with diabetes and chronic liver disease are at increased risk for overall mortality: a population study from the United States. *Clin Diabet.* 2017;35:79-83.
40. Shlomain G, Neel B, LeRoith D, Gallagher EJ, Shlomain G, et al. Type 2 diabetes mellitus and cancer: the role of pharmacotherapy. *J Clin Oncol.* 2016;34:4261-4269.
41. 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.

#### SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of the article at the publisher's website.

**How to cite this article:** Nabi O, Boursier J, Lapidus N, . The burden of NAFLD in type 2 diabetic subjects from the general population: A Nationwide population-based follow-up study (NASHCO). *Liver Int.* 2022;00:1-12. doi: [10.1111/liv.15171](https://doi.org/10.1111/liv.15171)

Supplementary, Table 1: Univariate and multivariate analysis of the prevalence of NAFLD according to risk factors among overall population, diabetic and non-diabetic subjects

		Overall population n=170,355				Diabetic subjects n=7189				Non-diabetic subjects n= 152,014			
Risk factors		NAFLD % (95%CI)	P	OR (95%CI)	P*	NAFLD % (95%CI)	P	OR (95%CI)	P*	NAFLD % (95%CI)	P	OR (95%CI)	p*
Age (yrs)	18-28	6.2 (5.8-6.6)	<0.001	1.02 (1.01-1.02)	<0.001	50.7 (42.5-58.9)	<0.001	1.02 (1.01-1.03)	<0.001	5.8(5.4-6.2)	0.001	1.02(1.02-1.02)	<0.001
	29-38	11.5 (11.1-11.9)				49.3 (45.9-52.7)				10.4(10.0-10.8)			
	39-48	17.0 (16.6-17.3)				55.9 (53.1-58.7)				14.1(13.8-14.5)			
	49-58	15.2 (14.9-15.5)				60.6 (58.0-63.2)				13.5(13.2-13.8)			
	59-68	26.4 (25.9-26.9)				61.4 (59.5-63.3)				23.4(23.0-23.8)			
	>68	35.4 (34.2-36.6)				72.5 (69.8-75.1)				23.5(22.4-24.6)			
Gender	Female	10.9 (10.7-11.1)	<0.001	1	<0.001	55.6 (53.9-57.3)	<0.001	1	<0.001	8.5(8.3-8.7)		1	<0.001
	Male	26.7 (26.4-27.1)		2.83 (2.73-2.93)		65.6 (64.1-67.1)		1.76 (1.46-2.12)		24.1(23.8-24.4)		2.98(2.87-3.09)	
BMI	Lean	5.0 (4.9-5.1)	<0.001	NA	-	20.9 (19.8-22.1)	<0.001	NA	-	4.4(4.3-4.5)	<0.001	NA	-
	Overweigh	22.7 (22.4-23.0)				58.0 (58.1-59.6)				21.3(20.9-21.7)			
	Obese	63.5 (62.8-64.2)				75.6 (77.2-78.0)				58.8(58.0-59.6)			
Diabetes	No	15.2 (15.0-15.3)	<0.001	1	<0.001	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-
	Yes	61.1 (60.0-62.2)		6.05 (5.68-6.45)		NA		NA		NA			
HBP	No	10.6 (10.4-10.8)	<0.001	1	<0.001	25.2 (23.3-27.1)	<0.001	1	<0.001	10.0(9.8-10.2)	<0.001	1	<0.001
	Yes	42.9 (42.3-43.5)		3.16 (3.03-3.54)		87.4 (86.3-88.5)		5.91 (4.87-7.16)		33.8(33.2-34.4)		3.01(2.89-3.13)	
Hypertri-glyceridemia	No	13.8 (13.6-14.0)	<0.001	NA	-	32.4 (30.9-33.9)	<0.001	NA	-	12.7(12.5-12.9)	<0.001	NA	-
	Yes	49.3 (48.6-50.0)				89.7				39.6(38.8-40.4)			
Hypercholes-terolemia	No	14.1 (13.9-14.3)	<0.001	1	<0.001	32.9 (31.4-34.4)	<0.001	1	<0.001	13.1(12.9-13.2)	<0.001	1	<0.001

	Yes	47.5 (46.8-48.2)		6.23 (5.76-6.80)		89.0 (80.0-90.0)		3.81 (1.01-11.78)		36.9(36.1-37.7)		4.26(3.99-4.54)	
Elevated ALT	No	15.1 (14.9-15.2)	<0.001	1	<0.001	57.4 (56.2-58.6)	<0.001	1	<0.001	12.6(12.4-12.8)	<0.001	1	<0.001
	Yes	42.0 (41.2-42.8)		3.34 (3.15-3.54)		85.4 (83.1-87.7)		15.5 (10.83-22.68)		38.0(37.2-38.8)		3.21(3.03-3.41)	

\* Logistic regression. Because BMI and triglycerides are part of FLI calculation, their OR was not provided (NA). Age was considered as continuous variable in the analysis.

OR: odds ratio, CI: confidence interval, ALT: alanine amino transferase, HBP: high blood pressure; NA: non-applicable

Supplementary, Table 2: Univariate and multivariate analysis of risk factors of NAFLD among diabetic subjects

		Univariate analysis			Multi variate analysis		
		% NAFLD	95%CI	P value	OR	95%CI	P value *
<b>Age (yrs)</b>	18-28	36.1	31.0-41.2	<0.0001	1.02	1.01-1.04	0.040
	29-38	55.8	54.7-56.9				
	39-48	62.6	61.1-64.1				
	49-58	76.8	75.5-78.1				
	59-68	76.9	75.6-78.1				
	>68	67.8	65.9-69.8				
<b>Gender</b>	Female	61.0	58.8-63.2	<0.0001	1.00	1.72-2.57	<0.001
	Male	78.6	76.8-80.3		2.10		
<b>HBP</b>	No	67.8	66.1-69.5	<0.0001	1.00	1.28-2.08	<0.001
	Yes	78.6	76.0-81.3		1.63		
<b>Hypercholest.</b>	No	40.1	37.8-42.4	<0.0001	1.00	3.63-5.86	<0.001
	Yes	95.5	94.6-96.4		4.5		
<b>Glucose&gt;1.5g/L</b>	No	9.4	8.9-10.0	<0.0001	1.00	1.01-1.51	0.048
	Yes	75.6	73.8-77.3		1.23		
<b>Elevated ALT</b>	No	66.8	65.2-68.4	<0.0001	1.00	11.11-21.64	<0.001
	Yes	91.6	89.3-93.9		15.35		
<b>Hypertriglyc.</b>	No	39.7	37.4-42.0	<0.0001	ND		
	Yes	95.4	94.5-96.3		ND		
<b>Obesity</b>	No	54.6	52.4-56.8	<0.0001	ND		
	Yes	84.7	83.1-86.2		ND		

\*Logistic regression adjusted for anti-diabetic treatment. Because part of FLI calculation, obesity and hyper-triglyceridemia were not included in multivariate analysis.

OR: odds ratio, CI: confidence interval, ALT: alanine amino transferase

Supplementary, Table 3: Characteristics of diabetic subjects with NAFLD according to the presence of advanced fibrosis. Presence or absence of fibrosis was defined according to Forns Index >6.9 or < 4.2.

	Diabetic NAFLD w/o fibrosis n=1283	Diabetic NAFLD with advanced fibrosis n=168	P Value
<b>Age, yrs, mean (95%CI)</b>	52 (51.5-52.5)	64 (63.4-64.6)	<0.0001
<b>Male gender, % (95%CI)</b>	55.5 (51.4-59.5)	95.1 (91.6-98.6)	0.0001
<b>Obesity, % (95%CI)</b>	64.5 (60.6-68.4)	69.2 (61.7-76.7)	ns
<b>Hypertriglyceridemia, % (95%CI)</b>	49 (37.5-53.9)	64.6 (60.7-68.5)	ns
<b>High Blood Pressure, % (95%CI)</b>	24.2 (20.6-27.7)	45.7 (53-57.2)	0.03
<b>Glucose &gt; 1.5g/l, % (95%CI)</b>	4.7 (1.5-7.8)	9.8 (8.9 - 10.7)	<0.001
<b>Insulin therapy, % (95%CI)</b>	2.8 (1.4-3.0)	4.1 (1.1-7)	ns
<b>Diabetes-related complications*, % (95%CI)</b>	25.9 (24.6 - 27.3)	42.0 (34.5-49.5)	<0.0001
<b>ALT&gt;N, % (95%CI)</b>	25.5 (21.9-29)	68.6 (61-76.2)	<0.0001
<b>Smoking, % (95%CI)</b>	59.2 (54.8-63.3)	92.3 (87.5-97.2)	0.0002

CI: confidence interval, ALT: alanine amino transferase

\*History of cardiovascular disease and or chronic kidney disease

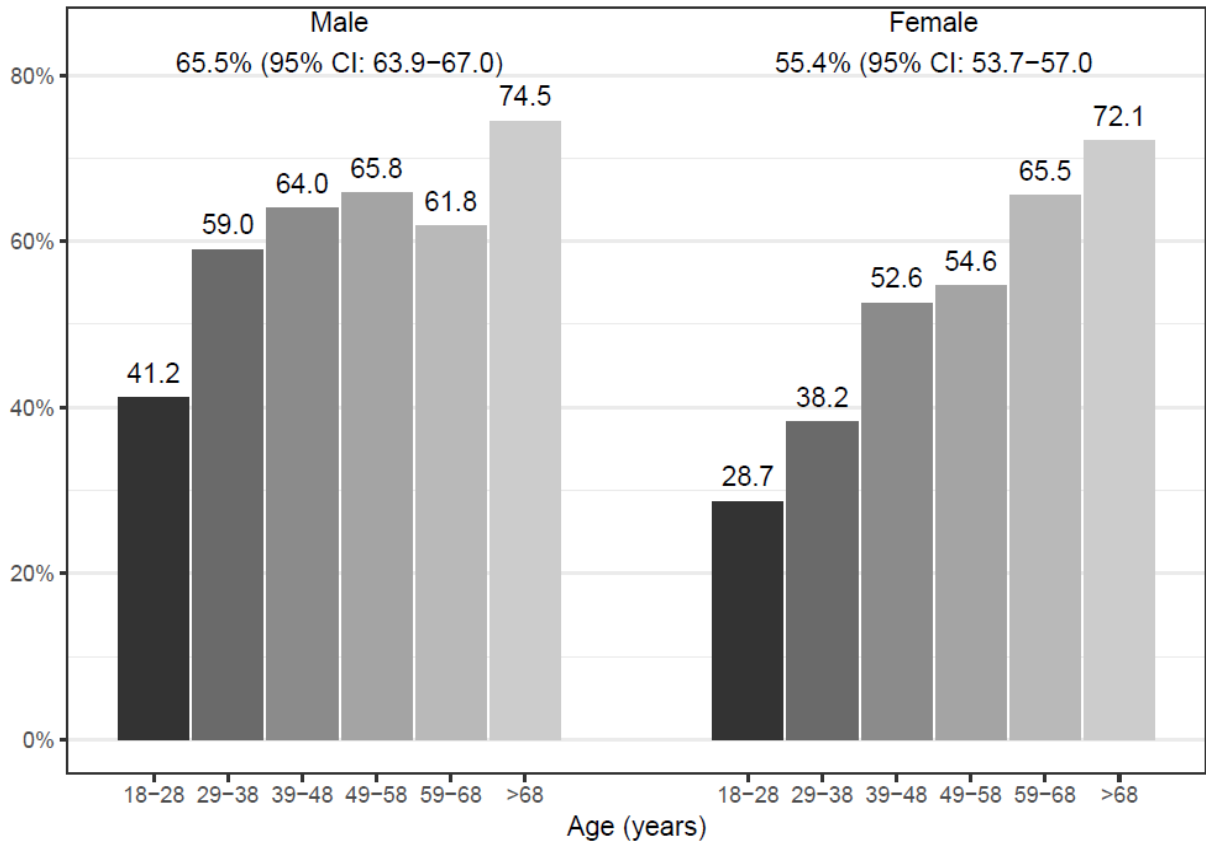
Supplementary, Table 4: Univariate and multivariate analysis of outcome risk according to the grade of fibrosis (Forns Index <4.2: no fibrosis; FI 4.2-6.9: intermediate fibrosis, FI>6.9: advanced fibrosis) in non-diabetic subjects with NAFLD. The reference group is non-diabetic subjects without NAFLD (FLI<30)

	Univariate analysis (reference group= non-Diabetic non-NAFLD, n=83346)			Multivariate analysis * (reference group= non-Diabetic non-NAFLD, n=83346)		
	NAFLD with advanced fibrosis n= 156	NAFLD with intermediate fibrosis n= 7028	NAFLD w/o fibrosis n= 7161	NAFLD with advanced fibrosis n= 156	NAFLD with intermediate fibrosis n= 7028	NAFLD w/o fibrosis n= 7161
	HR (95%CI)	HR (95%CI)	HR (95%CI)	HR (95%CI)	HR (95%CI)	HR (95%CI)
<b>Hepatic events</b>	1.62 (1.17-2.24) <sup>§</sup>	1.07 (0.83-1.37)	1.23 (0.86-1.78)	1.53 (1.07-2.18) <sup>§</sup>	1.02 (1.01-1.03) <sup>§</sup>	1.23 (0.84-1.80)
<b>Cardiovascular disease</b>	1.40 (0.20-9.94)	0.66 (0.45-0.96) <sup>§</sup>	0.95 (0.70-1.27)	1.16 (0.17-8.16)	0.55 (0.38-0.81) <sup>§</sup>	0.80 (0.59-1.07)
<b>Extra-hepatic cancer</b>	1.45 (0.36-5.80)	0.85 (0.66-1.11)	0.75 (0.57-0.99) <sup>§</sup>	1.43 (0.35-5.76)	0.85 (0.66-1.10)	0.76 (0.57-1.00) <sup>§</sup>
<b>Chronic kidney disease</b>	5.09 (1.27-20.47) <sup>§</sup>	1.11 (0.71-1.73)	1.24 (0.79-1.95)	3.64 (0.90-14.66)	0.77 (0.49-1.19)	(0.47-1.16)
<b>Death</b>	1.50 (1.17-1.92) <sup>§</sup>	1.49 (1.16-1.91) <sup>§</sup>	1.26 (0.18-8.93)	1.45 (1.12-1.87) <sup>§</sup>	1.43 (1.10-1.85) <sup>§</sup>	1.19 (0.17-8.51)

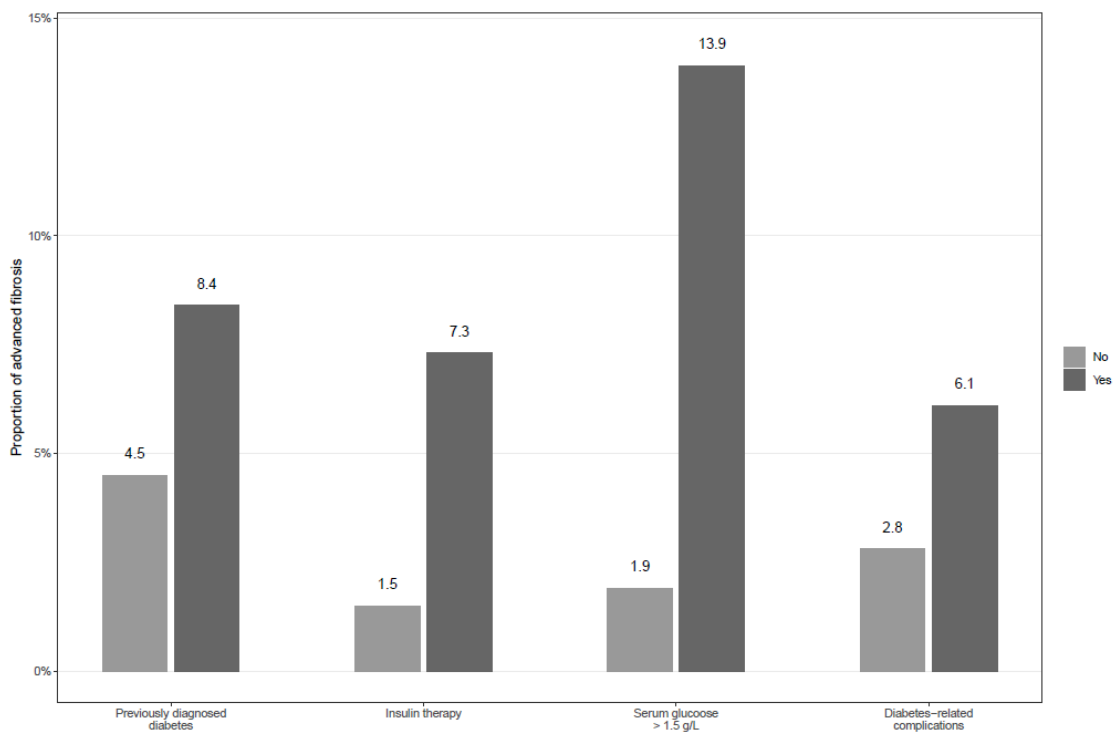
\*Cox model, adjusted for age, gender, obesity, diabetes, HBP, ALT and smoking.

<sup>§</sup> P<0.05

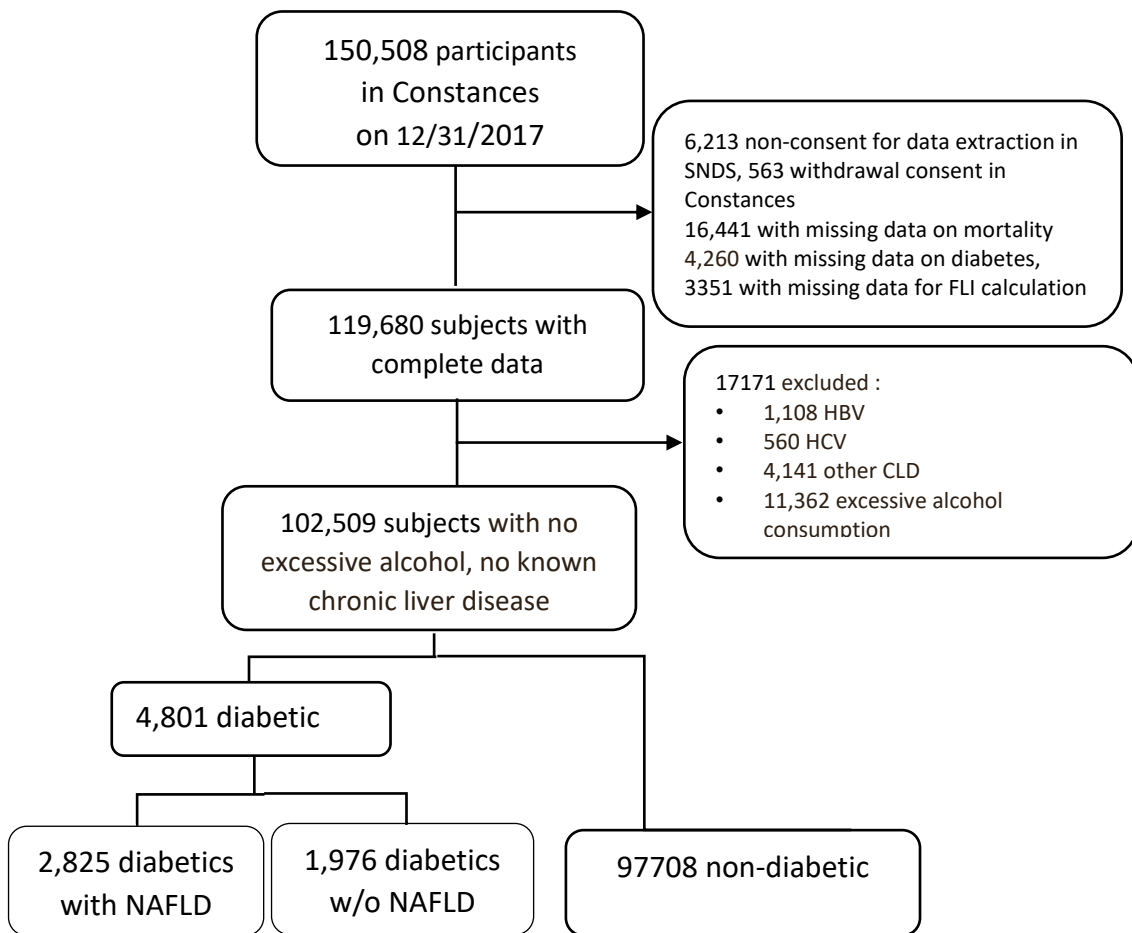




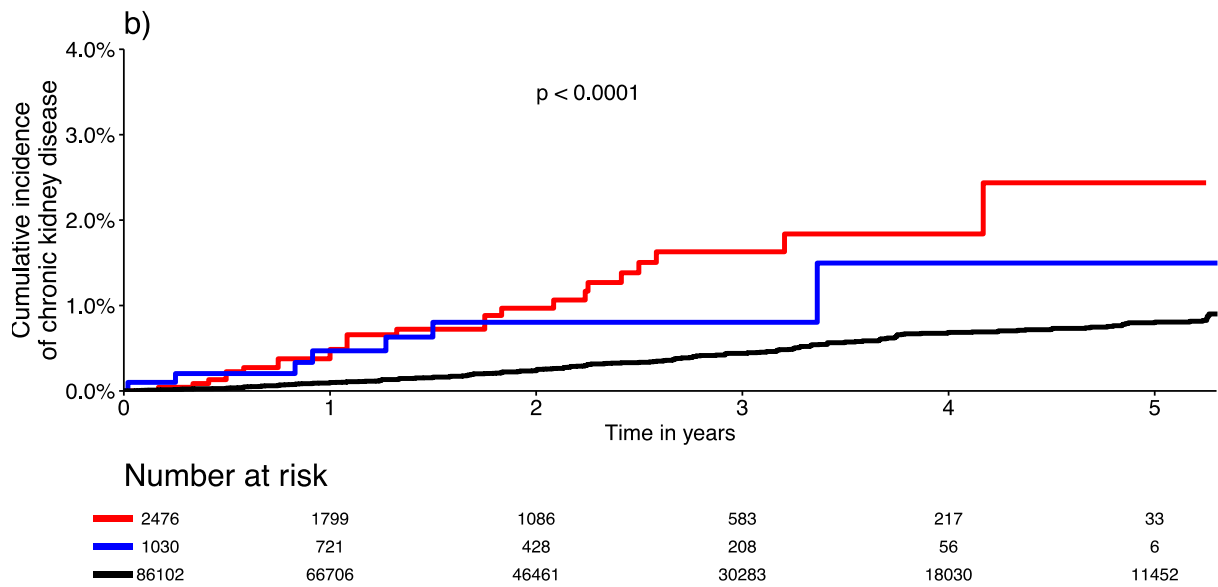
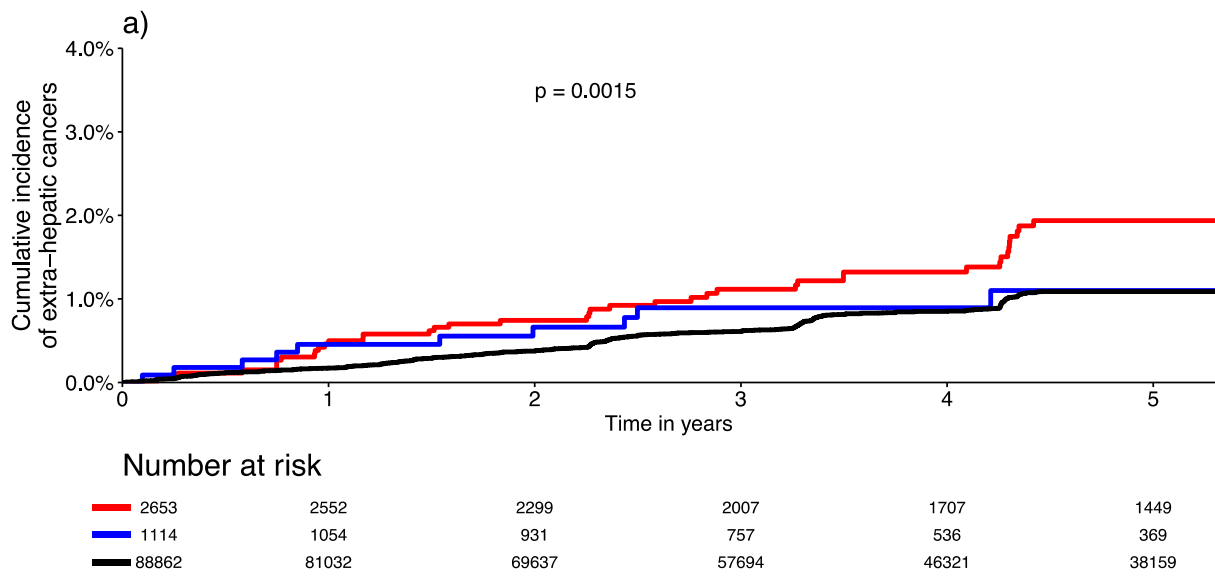
Supplementary, Figure 2: Distribution of NAFLD according to age and gender in diabetic subjects



Supplementary, Figure 3: Prevalence of advanced fibrosis according to the severity of diabetes in NAFLD diabetic subjects. Diabetes complications: history of cardiovascular disease and/or chronic kidney disease.



Supplementary, Figure 4: Flow-chart of patients included in the follow-up study



Supplementary, Figure 5: Cumulative incidence of a) extra hepatic malignancy and b) chronic kidney disease according to the presence of NAFLD and diabetes.

---

## Synthèse

---

### A. Partie I : La NAFLD, quelle prévalence, quel risque ?

Les données épidémiologiques sur la stéatose métabolique en population générale font cruellement défaut, particulièrement en Europe (13). En effet, les données épidémiologiques n'ont jusqu'à présent pas été évaluées en population générale à l'échelle nationale en Europe (13). Alors que sa prévalence mondiale était estimée entre 25% et 45% (3,4), une méta-analyse (3) estimait entre 4% à 50% la prévalence de la NAFLD dans les pays européens reflétant l'hétérogénéité de la population étudiée. Les résultats obtenus dans l'estimation de la prévalence et des facteurs de risque en population générale dans notre étude confirment la forte prévalence attendue issue des données de modélisation (13,14). Les données concernant l'impact de la NAFLD sur la prévalence des comorbidités (cardiovasculaires, de cancers extra-hépatiques et de maladies rénales chroniques) restent quant à elles encore parcellaires. Au moment de la publication des résultats de l'étude NASH-CO Study, en 2021, des études essentiellement hospitalières suggéraient que la NAFLD pourrait favoriser la survenue de maladies cardiovasculaires, de cancers extra-hépatiques et de maladies rénales chroniques (10–12). Par ailleurs, les accidents cardiovasculaires représentaient la première cause de décès lié à la NAFLD. Les complications hépatiques (cirrhose, carcinome hépatocellulaire) n'en étaient que la troisième derrière les cancers extra-hépatiques (252). Ces études étaient pour la grande majorité de faible taille et réalisées chez des patients suivis en milieu hospitalier donc potentiellement plus graves avec d'autres comorbidités, ce qui posait le problème de l'extrapolabilité de ces résultats à l'ensemble de la population cible. Ce point était d'autant plus prégnant qu'elles concluaient que seule la fibrose avancée était associée à une augmentation du risque de morbi-mortalité (80,243,254,296). L'évaluation de la prévalence et l'association entre les comorbidités et la NAFLD en population générale, abstraction faite du contexte hospitalier, restait donc encore à documenter pour donner un ordre d'idée du fardeau de la NAFLD sur les indicateurs de santé en population générale. Ceci nous a amenés à estimer la prévalence de la NAFLD ainsi que son interaction (selon le degré de fibrose) avec les antécédents de comorbidités extra-hépatiques, dont les résultats ont été précédemment présentés. Ces résultats, quoi que très intéressants, ne permettaient pas, de par leur nature transversale, de tirer des conclusions sur un lien de temporalité, devant

l'impossibilité de situer la primauté entre ces comorbidités et la NAFLD, d'où la mise en œuvre de l'étude longitudinale.

## **B. Partie II : La NAFLD en population générale, quels impacts sur la santé ?**

Si la problématique de l'épidémiologie de la NAFLD, en particulier sa prévalence et ses facteurs de risque, reste un sujet d'intérêt, l'évaluation de son impact sur la morbi-mortalité et la consommation de soins reste l'élément fondamental, qui permet d'appréhender la place à lui accorder en tant que problème de santé publique d'intérêt. Il apparaît que l'étude portant sur les comorbidités que nous avons menée et présentée plus haut y apporte quelques éléments de réponse sans toutefois permettre d'y répondre pleinement. La première étape dans l'évaluation de l'impact de la NAFLD sur l'état de santé de la population passe, en conséquence, par l'évaluation de son influence sur la morbi-mortalité globale et spécifique, notamment hépatique (cirrhoses, CHC, transplantation hépatique) et extra-hépatique (cardiovasculaires, cancer et maladie rénale chronique). La deuxième étape, portant l'hypothèse de son impact sur la santé publique, passe par la mise en perspective de sa place relative en tant que maladie chronique du foie par rapport aux autres problèmes de santé déjà existants, en particulier les autres pathologies à tropisme hépatique (VHB, VHC, maladie alcoolique du foie) sur la morbi-mortalité.

Nos résultats montrent non seulement que la NAFLD était associée à une forte morbi-mortalité hépatique et extra-hépatique, mais également que la tendance est telle que, cette pathologie est en passe de devenir la première cause de morbi-mortalité hépatique devant le VHC et l'alcool. En effet, avec l'avènement des antiviraux directs très efficaces, on peut s'attendre à une inflexion de la courbe de la morbi-mortalité hépatique lié au VHC, qui reste par ailleurs la première cause d'évènements hépatiques. De plus, compte tenu de la prévalence croissante de l'obésité et du diabète et leur impact sur la sévérité de la maladie, la NAFLD pourrait, en toute vraisemblance et si rien n'est fait, devenir très prochainement la première cause de mortalité globale et hépatique, en particulier dans les pays occidentaux. Cette hypothèse est par ailleurs déjà ressentie et récemment rapportée par certains registres des listes d'attente des transplantations hépatiques (281,297).

Les données issues des files actives des patients NAFLD suivis à l'hôpital, montrent que seule la fibrose avancée était associée à une augmentation de la morbi-mortalité (hépatique et

extra-hépatique) (243,298). Nos résultats montrent que, le risque de morbi-mortalité augmentait avec le degré de la fibrose, mais également que tous les malades avec NAFLD restaient particulièrement vulnérables et à risque de complications quel que soit la sévérité de l'atteinte hépatique. Nos résultats suggèrent l'extension à l'ensemble de la population à risque, des recommandations des sociétés savantes (européenne et américaine), notamment le dépistage et l'évaluation systématique des risques extra-hépatiques (cardiovasculaire, de cancer ou rénal) qui du reste sont, pour l'instant, réservés aux patients avec un risque hépatique ou avec des facteurs de risque de gravité, en raison du manque de preuves d'un éventuel bénéfice. En attendant les preuves des bénéfices cliniques et médico-économiques d'une telle démarche, il conviendrait de travailler à identifier les patients les plus à risque de progression et de complications et qui pourraient en toute hypothèse bénéficier d'un suivi adapté à leur situation.

Comme cela a été précisé dans la partie II, plusieurs limites de nos estimations font que ces résultats sont à interpréter avec précaution. Ils permettent néanmoins de mettre en lumière qu'en l'absence de mesures de prévention adaptées, il est vraisemblable que la NAFLD dans un avenir très proche, devienne l'un des problèmes majeurs de santé publique mondiale et risque de noyer les efforts consentis et les acquis de ces dernières décennies dans la lutte contre d'autres fléaux tels que les hépatites virales. Ce constat pose alors la question des programmes et actions de santé publique urgents à mettre en œuvre tout particulièrement dans les pays du Nord face à l'épidémie croissante du diabète et de l'obésité.

### **C. Partie III : Diabète et NAFLD quel risque ?**

La NAFLD est une pathologie qui évolue à bas bruit et dont la prévalence augmente parallèlement à celle de l'obésité et du diabète de type 2(3,4). A ce jour, il n'existe aucun traitement pharmacologique validé. Les stades précoces de la maladie (NAFL et NASH) restent potentiellement réversibles s'ils bénéficient d'une prise en charge adaptée (116–118). De ce fait, un diagnostic précoce de la maladie pourrait être la clé de la prise en charge. Cela passe par l'identification et le dépistage des personnes, en particulier celles à risque de formes agressives. En pratique clinique, un challenge pour les médecins est de pouvoir identifier, parmi la très grande population de patients, le sous-groupe qui pourrait faire l'objet d'un dépistage, voire d'une prise en charge hépatique spécialisée.

Au vu de la forte influence réciproque entre le diabète et la stéatopathie métabolique en termes de prévalence (et incidence) et de sévérité (14,299,300), l'EASL recommande (244) la recherche systématique de la NAFLD chez les personnes atteintes du diabète et inversement. De plus, il s'avère que certains médicaments anti-diabétiques améliorent la sensibilité à l'insuline et également l'évolution de la NASH (301). Cependant, du fait que ces observations sont principalement issues du contexte hospitalier, il ne serait pas prudent de les extrapoler à l'ensemble des personnes atteintes du diabète, dont la grande majorité est suivie en ville. Nous avons montré dans ce travail l'intérêt de l'extension des recommandations à l'ensemble des personnes atteintes du diabète y compris ceux qui sont nouvellement diagnostiqués et/ou suivis en ville. Le défi ici reste l'appropriation de ces recommandations par les médecins de ville, ce d'autant que la NAFLD reste une pathologie méconnue et/ou sous-diagnostiquée dans ce contexte (15). Par ailleurs, non seulement l'identification des patients les plus à risque permet le diagnostic et une prise en charge précoce de la maladie, mais également une remise en question des schémas de recherche thérapeutique. Ces aspects seront abordés plus en détail dans la partie discussion et perspectives.

---

## Discussion et perspectives

---

Dans cette thèse, nous avons abordé la problématique de l'épidémiologie et du fardeau de la NAFLD sur les indicateurs de santé en population générale à travers celle de sa prévalence, ses facteurs de risque et son impact sur la morbi-mortalité. Les réponses que nous avons pu apporter à la problématique de l'épidémiologie de la NAFLD reposent essentiellement sur des données cliniques (facteurs de risque et de gravité). Les données qui étaient à notre disposition pour examiner la question des facteurs de risque et de gravité de NAFLD ne couvrent qu'une partie des dimensions susceptibles d'être analysées. Nous allons donc tenter de détailler ici certaines de ces autres dimensions pouvant impacter l'épidémiologie et la morbi-mortalité liée à la NAFLD. Par ailleurs, nos résultats soulèvent certaines questions d'ordre méthodologique ou systémique pouvant s'appliquer à l'évaluation des problèmes de santé à large échelle en population générale. Sans prétendre être exhaustifs, nous tenterons de développer ces questions, ainsi que leurs implications en termes de recherche.

### **A. La NAFLD en population générale : au-delà de sa prévalence**

#### **1. La NAFLD en population générale : prévalence et facteurs de risque ?**

La stéatose hépatique non alcoolique est devenue la maladie chronique du foie la plus répandue dans le monde. Elle englobe un large spectre lésionnel allant de la simple stéatose, à la fibrose, la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire, en passant par la stéatohépatite non alcoolique. La physiopathologie de la NAFLD est très complexe avec une variabilité interindividuelle et dans son histoire naturelle. Très peu de données sont disponibles sur sa prévalence en population générale en Europe et en France, en particulier (13). De plus, les données sur ses facteurs de risque de même que son impact sur l'état de santé de la population restent partielles malgré les acquis de ces dernières années, et méritent une meilleure caractérisation.

Les résultats présentés dans le chapitre I de la première partie de ce travail montrent une forte prévalence de NAFLD (18,2%) et de fibrose liée à la NAFLD dans la population générale française. Cette prévalence est par ailleurs fortement associée, outre l'âge et le sexe, aux facteurs de risque cardio-métaboliques tels que l'obésité, le diabète, l'hypertension artérielle et le syndrome métabolique, dont la prévalence est en nette augmentation dans les pays occidentaux.



Au regard de la tendance actuelle de l'incidence des facteurs de risque métabolique (notamment le diabète et l'obésité) en particulier dans les pays du Nord, et au vu des prévisions issues des données de modélisation, si rien n'est fait, la stéatose métabolique pourrait devenir à court ou moyen terme un des problèmes majeurs de santé publique (s'il ne l'est déjà).

Malgré la forte prévalence de la NAFLD en population générale, elle reste mal connue et sous-diagnostiquée (15). Cela pourrait en partie s'expliquer par la connaissance et/ou la sensibilité parcellaires des médecins généralistes sur la problématique de la NAFLD. Ainsi, même en présence de signes d'appel hépatiques, les étiologies des hépatopathies traditionnelles (VHC, VHB, alcool, etc.) sont de loin les plus évoquées et recherchées. De plus, du fait du contexte dysmétabolique, les médecins sont d'avantage préoccupés par la prévention et la prise en charge des complications cardio-métaboliques reléguant au second plan la stéatose métabolique. Cela peut, en toute hypothèse retarder le diagnostic de NAFLD d'autant plus que, jusqu'à très récemment, il n'y avait aucune recommandation précise sur le dépistage dans ce contexte (244). Ainsi, parallèlement à la mise en œuvre d'actions de santé publique de prévention, il serait nécessaire d'envisager, des campagnes de plaidoyer et d'information et la mise en place de recommandations par la Haute Autorité de Santé à l'endroit des médecins généralistes sur cette problématique et la nécessité de dépistage. Mais quel est l'impact de la NAFLD sur l'état de santé ? Autrement dit, cette forte prévalence impacte-t-elle l'état de santé de la population au point de s'en préoccuper ? Les réponses à ces questions permettront probablement de mettre tous les acteurs d'accord sur la considération de la problématique de la NAFLD en tant que problème (émergent) de santé, et de la nécessité d'une mobilisation prioritaire autour de la question comme problème prioritaire de santé.

## **2. La NAFLD : un problème de santé ?**

Malgré l'intérêt croissant ces dernières années envers l'impact de la NAFLD sur la morbi-mortalité, très peu d'études ont abordé la question à l'échelle de la population générale, en particulier en Europe. Dans ces conditions, entreprendre des actions prioritaires de santé sur la base de données de modélisation (13,33) ou des phénomènes hospitaliers (253,302) extrapolés systématiquement à la population générale, pourraient s'avérer problématique et particulièrement inefficace. Si l'on ajoute à cela les incertitudes méthodologiques et les différences structurelles des populations et des systèmes de soins dans les pays où les

données en population générale sont en partie disponibles (USA en particulier) (303), la question de l'inférence des résultats de ces études et de la nature des conclusions pouvant en être tirées dans le contexte des pays européens se posent.

Les études sur la morbi-mortalité liée à NAFLD en population générale avaient pour objectifs de se donner une idée précise sur la place de la NAFLD comme problème de santé et de dégager des pistes d'action pour freiner le phénomène. À ce titre, ces études peuvent servir à améliorer la compréhension de la maladie, son histoire naturelle, et à identifier les sous-groupes de population devant faire l'objet d'une attention ou d'actions prioritaires en santé, en limitant les biais contextuels pouvant influencer les décideurs.

Dans le cadre de la prise en charge de tout processus pathologique, en particulier des maladies chroniques à plusieurs phases d'évolution comme la NAFLD dont les stades précoces restent réversibles, il serait assez osé de vouloir rappeler le bénéfice indéniable d'une prise en charge précoce et adaptée. Les études visant à identifier les populations qui pourraient particulièrement profiter d'un diagnostic précoce en raison du profil plus agressif et plus défavorable dans ces catégories peuvent donc représenter un puissant outil d'orientation de politique de santé, bien que les éventuels bénéfices d'un dépistage systématique ne soient pas évidents (244). Par ailleurs, les facteurs de gravité sont de plusieurs natures (en particulier métaboliques, génétiques etc.), ce qui rajoute une difficulté supplémentaire à l'identification de l'ensemble des populations à risque d'une progression rapide, en plus de l'hétérogénéité phénotypique de la maladie et de sa possible coexistence avec d'autres problèmes de santé historiques (VHC, VHB, alcool). Bien que rationnelle, il convient de relever quelques limites d'une approche qui se baserait seulement sur quelques facteurs de risque identifiés dans la NAFLD, d'autant que son mécanisme physiopathologique est complexe et encore mal compris. Le risque ultime serait une perte de chance pour les patients jugés non prioritaires alors que rien ne permet à ce jour, d'exclure un potentiel risque évolutif pour ces patients. A titre d'exemple, les recommandations des sociétés savantes pour l'évaluation du risque, la surveillance hépatique et extra-hépatique est conditionnée par la présence de facteurs de risque tel que le diabète et l'obésité. Dans le même temps, des données s'accumulent pour suggérer, par exemple, que les personnes minces avec la NAFLD ont un risque de complications plus élevé que les personnes en situation d'obésité (60,304,305). Il est donc nécessaire de poursuivre la réflexion non seulement sur le bénéfice et l'opportunité du

dépistage systématique, mais également sur la recherche et la compréhension des mécanismes des facteurs de risque et de gravité (235).

En outre, les acteurs politiques se focalisent souvent sur les problèmes de santé bruyants et médiatisés au détriment des pathologies lancinantes, et en l'espèce, la priorité serait aux problématiques des infections virales (VHC, VHB) et aux hépatopathies alcooliques qui occupent déjà largement le devant de la scène dans le cadre des problèmes de santé à tropisme hépatique. De plus, lorsque la question porte sur la NAFLD, l'atteinte hépatique semble l'emporter sur les autres complications (extra-hépatiques), alors qu'en termes de mortalité, l'ensemble des données disponibles s'accordent sur le fait que les accidents cardiovasculaires, les cancers extra-hépatiques sont de loin les premières causes de décès devant la mortalité hépatique liée à la NAFLD (252).

Étant donné l'impact espéré des antiviraux directs sur la morbi-mortalité liée au VHC et du fait de la forte croissance attendue de la NAFLD et de ses facteurs de gravité (13,27,29,306), on peut s'attendre, dans un avenir très proche, à un chamboulement dans l'ordre des priorités et des politiques de santé en faveur de la NAFLD.

Enfin, il est important de noter que les changements nosologiques introduits plus récemment (Metabolic Associated Fatty Liver Disease, MAFLD) (25) pourraient ajouter de la confusion dans l'identification des patients et la compréhension de la physiopathologie de la NAFLD, dans la mesure où on pourrait avoir du mal à faire la part des choses entre le mécanisme sous-jacent lié à la NAFLD et les autres facteurs de risque traditionnels (VHC, VHB, alcool) (307).

## **B. Limites méthodologiques dans l'estimation de la prévalence, facteurs de risque et de la NAFLD comme problème de santé publique**

Les points développés dans ce travail ne constituent pas une image exhaustive de la problématique de la NAFLD comme problème de santé. Ils permettent cependant, de fournir aux acteurs de la santé une idée sur l'ampleur et l'impact sur la santé de la population. Au-delà du sous-diagnostic, la complexité de la physiopathologie et l'absence de traitement pharmacologique sont autant de limites à des actions de santé publique dans la NAFLD. Il apparaît également que les pathologies métaboliques traditionnelles (diabète, HTA) et celles à tropisme hépatique (VHC, VHB, alcool) concentrent encore sur elles l'attention des décideurs politiques et une partie du monde médical et scientifique et constituent en partie

un obstacle dans le financement de la recherche sur la NAFLD en Europe et en France, en particulier.

L'évaluation de l'épidémiologie (prévalence et facteurs de risque) réalisée dans ce travail de thèse illustre certaines difficultés souvent rencontrées lors de la conduite d'études épidémiologiques en population générale, en particulier basées sur des cohortes généralistes : le fort taux de non-répondants lors de l'invitation et de perdus de vue (même si dans le cas de la cohorte Constances, un travail méthodologique avec des poids de sondage et de redressement permettent de s'affranchir en partie de ces limites). De plus, l'interaction entre la NAFLD et certains facteurs de risque comme le diabète est telle que nous ne sommes pas en mesure de trancher de la primauté de l'un sur l'autre. Les facteurs de risque liés au mode de vie, étant de nature déclarative et basés sur les antécédents, ne sont pas non plus exempts de biais de mémoire. L'absence de données génétiques, épigénétiques et du microbiote reste une des limites dans l'évaluation des facteurs de risque étant donné le rôle rapporté dans la littérature dans la prévalence et la progression de la maladie (130,142,164,308). Une biobanque est désormais disponible au sein de la cohorte Constances et pourrait dorénavant permettre la mise en place d'études génétiques. L'utilisation de marqueurs non invasifs peut, en partie, poser problème dans la mesure où l'histologie reste la méthode de référence. Cependant, du fait de son caractère invasif, de son coût et de la nécessité d'une expertise pour son interprétation, elle n'est pas recommandée à large échelle.

Les causes de décès n'étaient pas disponibles pour la période de notre étude au moment de nos analyses, ce qui ne nous a pas permis de faire une cartographie et une appréciation objective et précise de la part de NAFLD dans la mortalité.

---

## Conclusion

---

La NAFLD est en passe de devenir un problème majeur de santé mondiale. L'une des raisons principales à cela réside dans la forte prévalence du diabète et de l'obésité, en particulier dans les pays du Nord où la prévalence de la NAFLD est particulièrement préoccupante. À l'issue des travaux de cette thèse, il apparaît que la problématique de la NAFLD devrait désormais relever du champ des questions prioritaires de santé mondiale, dans les pays du Nord en particulier.

La NAFLD est en passe de devenir la première cause des maladies chroniques du foie (cirrhose, CHC) et de greffe du foie dans le monde. Outre la morbi-mortalité hépatique, le syndrome dysmétabolique qui accompagne la NAFLD fait qu'elle est associée à une forte morbi-mortalité extra-hépatique. A ce jour, il n'y a pas de recommandations précises concernant le dépistage des complications extra-hépatiques (accidents cardiovasculaires, cancers, maladie rénale chronique) chez les patients avec stéatopathie métabolique alors que les accidents cardiovasculaires et les cancers extra-hépatiques représentent respectivement la première et la deuxième cause de mortalité chez les patients avec stéatopathie métabolique, loin devant les causes hépatiques. Une évaluation « métabolique » globale est donc souhaitable chez les patients avec stéatopathie métabolique pour diminuer la morbidité et la mortalité. En pratique clinique, un challenge pour les médecins est d'identifier, dans la très grande population de patients, non seulement ceux susceptibles d'être atteints de la stéatopathie métabolique, mais encore le sous-groupe à risque de complications qui nécessite une prise en charge hépatique spécialisée. En attendant une meilleure compréhension de sa physiopathologie et un traitement pharmacologique efficace, des actions énergétiques de santé publique axées en particulier sur la prévention et la prise en charge de l'obésité et du diabète, pourraient permettre de freiner non seulement l'incidence de la NAFLD mais surtout sa charge sur la morbi-mortalité.

En outre, alors que des marqueurs diagnostiques simples sont disponibles et accessibles, il ressort des études précédentes que la NAFLD reste une pathologie sous-diagnostiquée, ce qui pourrait faire perdre des chances à certains patients d'autant que les données scientifiques disponibles semblent démontrer que les stades précoces de la maladie restent réversibles sous réserve d'une prise en charge adéquate. S'inspirer des approches utilisées dans d'autres

pathologies (diabète, HTA etc.) telles que l'élaboration de recommandations par la Haute Autorité de Santé, complétées des recommandations des sociétés savantes à l'attention des médecins de ville pourraient en toute hypothèse impacter positivement l'épidémiologie de la NAFLD. En effet, bien qu'aucun traitement pharmacologique ne soit disponible, plusieurs études montrent le bénéfice des mesures hygiéno-diététiques et la perte de poids sur la progression de la maladie dans ses stades précoces.

## Références

1. Perumpail BJ, Khan MA, Yoo ER, Cholankeril G, Kim D, Ahmed A. Clinical epidemiology and disease burden of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2017;23(47):8263-76.
2. Younossi ZM, Stepanova M, Afendy M, Fang Y, Younossi Y, Mir H, et al. Changes in the Prevalence of the Most Common Causes of Chronic Liver Diseases in the United States From 1988 to 2008. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2011;9(6):524-530.e1.
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*. juill 2016;64(1):73-84.
4. Rinella ME. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. *JAMA, The Journal of the American Medical Association*. 2015;13(22):2263.
5. Wong RJ, Aguilar M, Cheung R, Perumpail RB, Harrison SA, Younossi ZM, et al. Nonalcoholic steatohepatitis is the second leading etiology of liver disease among adults awaiting liver transplantation in the United States. *Gastroenterology*. 2015;148(3):547-55.
6. Patel YA, Berg CL, Moylan CA. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Key Considerations Before and After Liver Transplantation. *Dig Dis Sci*. 2016;61(5):1406-16.
7. Dyson J, Jaques B, Chattopadyhay D, Lochan R, Graham J, Das D, et al. Hepatocellular cancer: the impact of obesity, type 2 diabetes and a multidisciplinary team. *J Hepatol*. 2014;60(1):110-7.
8. Goldberg D, Ditah IC, Saeian K, Lalehzari M, Aronsohn A, Gorospe EC, et al. Changes in the Prevalence of Hepatitis C Virus Infection, Nonalcoholic Steatohepatitis, and Alcoholic Liver Disease Among Patients With Cirrhosis or Liver Failure on the Waitlist for Liver Transplantation. *Gastroenterology*. 2017;152(5):1090-1099.e1.
9. Serfaty L, Lemoine M. Definition and natural history of metabolic steatosis: clinical aspects of NAFLD, NASH and cirrhosis. *Diabetes Metab*. 2008;34(6 Pt 2):634-7.
10. Francque SM, van der Graaff D, Kwanten WJ. Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk: Pathophysiological mechanisms and implications. *J Hepatol*. 2016;65(2):425-43.
11. Wong VWS, Wong GLH, Tsang SWC, Fan T, Chu WCW, Woo J, et al. High prevalence of colorectal neoplasm in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Gut*. 2011;60(6):829-36.
12. Musso G, Gambino R, Tabibian JH, Ekstedt M, Kechagias S, Hamaguchi M, et al. Association of non-alcoholic fatty liver disease with chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *PLoS medicine*. 2014;11(7):e1001680.
13. Estes C, Anstee QM, Arias-Loste MT, Bantel H, Bellentani S, Caballeria J, et al. Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016–2030. *Journal of Hepatology*. 2018;69(4):896-904.

14. Younossi ZM, Blissett D, Blissett R, Henry L, Stepanova M, Younossi Y, et al. The economic and clinical burden of nonalcoholic fatty liver disease in the United States and Europe. *Hepatology*. 2016;64(5):1577-86.
15. Blais P, Husain N, Kramer JR, Kowalkowski M, El-Serag H, Kanwal F. Nonalcoholic Fatty Liver Disease is Underrecognized in the Primary Care Setting. *American Journal of Gastroenterology (Springer Nature)*. 2015;110(1):10-4.
16. EASL–EASD–EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*. 2016;64(6):1388-402.
17. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc*. 1980;55(7):434-8.
18. Ahmed A, Wong RJ, Harrison SA. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Review: Diagnosis, Treatment, and Outcomes. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2015;13(12):2062-70.
19. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;41(6):1313-21.
20. Ratziu V, Bellentani S, Cortez-Pinto H, Day C, Marchesini G. A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. *J Hepatol*. 2010;53(2):372-84.
21. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology*. 2012;55(6):2005-23.
22. Åberg F, Helenius-Hietala J, Puukka P, Färkkilä M, Jula A. Interaction between alcohol consumption and metabolic syndrome in predicting severe liver disease in the general population. *Hepatology*. 2018;67(6):2141-9.
23. Peng D, Han Y, Ding H, Wei L. Hepatic steatosis in chronic hepatitis B patients is associated with metabolic factors more than viral factors. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008;23(7 Pt 1):1082-8.
24. Tsochatzis E, Papatheodoridis GV, Manesis EK, Chrysanthos N, Kafiri G, Archimandritis AJ. Hepatic steatosis in chronic hepatitis B develops due to host metabolic factors: a comparative approach with genotype 1 chronic hepatitis C. *Dig Liver Dis*. 2007;39(10):936-42.
25. Eslam M, Sanyal AJ, George J, International Consensus Panel. MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2020;158(7):1999-2014.e1.
26. Rinella M, Charlton M. The globalization of nonalcoholic fatty liver disease: Prevalence and impact on world health. *Hepatology*. 2016;64(1):19-22.
27. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018;15(1):11-20.



28. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011;34(3):274-85.
29. Sherif ZA, Saeed A, Ghavimi S, Nouraie SM, Laiyemo AO, Brim H, et al. Global Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Perspectives on US Minority Populations. *Dig Dis Sci.* 2016;61(5):1214-25.
30. Pelusi S, Cespiati A, Rametta R, Pennisi G, Mannisto V, Rosso C, et al. Prevalence and Risk Factors of Significant Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Without Steatohepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2019;17(11):2310-2319.e6.
31. Luger M, Kruschitz R, Kienbacher C, Traussnigg S, Langer FB, Schindler K, et al. Prevalence of Liver Fibrosis and its Association with Non-invasive Fibrosis and Metabolic Markers in Morbidly Obese Patients with Vitamin D Deficiency. *OBES SURG.* 2016;26(10):2425-32.
32. Mittal S, El-Serag HB, Sada YH, Kanwal F, Duan Z, Temple S, et al. Hepatocellular Carcinoma in the Absence of Cirrhosis in United States Veterans is Associated With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2016;14(1):124-131.e1.
33. Estes C, Razavi H, Loomba R, Younossi Z, Sanyal AJ. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology.* 2018;67(1):123-33.
34. Tsuneto A, Hida A, Sera N, Imaizumi M, Ichimaru S, Nakashima E, et al. Fatty liver incidence and predictive variables. *Hypertens Res.* 2010;33(6):638-43.
35. Chang Y, Jung HS, Cho J, Zhang Y, Yun KE, Lazo M, et al. Metabolically Healthy Obesity and the Development of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Am J Gastroenterol.* 2016;111(8):1133-40.
36. Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, Nakagawa T, Taniguchi H, Fujii K, et al. The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Intern Med.* 2005;143(10):722-8.
37. Suzuki A, Angulo P, Lymp J, St Sauver J, Muto A, Okada T, et al. Chronological development of elevated aminotransferases in a nonalcoholic population. *Hepatology.* 2005;41(1):64-71.
38. Wong VWS, Wong GLH, Yeung DKW, Lau TKT, Chan CKM, Chim AML, et al. Incidence of non-alcoholic fatty liver disease in Hong Kong: a population study with paired proton-magnetic resonance spectroscopy. *J Hepatol.* 2015;62(1):182-9.
39. Sung KC, Wild SH, Byrne CD. Development of new fatty liver, or resolution of existing fatty liver, over five years of follow-up, and risk of incident hypertension. *J Hepatol.* 2014;60(5):1040-5.
40. Zhou YJ, Li YY, Nie YQ, Huang CM, Cao CY. Natural course of nonalcoholic fatty liver disease in southern China: a prospective cohort study. *J Dig Dis.* 2012;13(3):153-60.
41. Zelber-Sagi S, Lotan R, Shlomai A, Webb M, Harrari G, Buch A, et al. Predictors for incidence and remission of NAFLD in the general population during a seven-year prospective follow-up. *J Hepatol.* 2012;56(5):1145-51.

42. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest.* 2005;115(5):1111-9.
43. Colicchio P, Tarantino G, del Genio F, Sorrentino P, Saldalamacchia G, Finelli C, et al. Non-alcoholic fatty liver disease in young adult severely obese non-diabetic patients in South Italy. *Ann Nutr Metab.* 2005;49(5):289-95.
44. Ong JP, Elariny H, Collantes R, Younoszai A, Chandhoke V, Reines HD, et al. Predictors of nonalcoholic steatohepatitis and advanced fibrosis in morbidly obese patients. *Obes Surg.* 2005;15(3):310-5.
45. Beymer C, Kowdley KV, Larson A, Edmonson P, Dellinger EP, Flum DR. Prevalence and predictors of asymptomatic liver disease in patients undergoing gastric bypass surgery. *Arch Surg.* 2003;138(11):1240-4.
46. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology.* 2005;42(1):44-52.
47. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Castiglione A, Crocè LS, Tiribelli C, et al. Incidence and natural course of fatty liver in the general population: the Dionysos study. *Hepatology.* 2007;46(5):1387-91.
48. Machado M, Marques-Vidal P, Cortez-Pinto H. Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery. *J Hepatol.* 2006;45(4):600-6.
49. Liu B, Balkwill A, Reeves G, Beral V. Body mass index and risk of liver cirrhosis in middle aged UK women: prospective study. *BMJ.* 2010;340:c912.
50. Loomis AK, Kabadi S, Preiss D, Hyde C, Bonato V, St Louis M, et al. Body Mass Index and Risk of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Two Electronic Health Record Prospective Studies. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(3):945-52.
51. Dimitrov S, Hulteng E, Hong S. Inflammation and exercise: Inhibition of monocytic intracellular TNF production by acute exercise via  $\beta$ 2-adrenergic activation. *Brain, Behavior, and Immunity.* 2017;61:60-8.
52. Weiss R, Caprio S. The metabolic consequences of childhood obesity. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2005;19(3):405-19.
53. Cassard-Doulcier AM, Perlemuter G. Inflammation hépatique liée à l'obésité (NASH). *OCL.* 2011;18(1):21-6.
54. Aleksandrova K, Boeing H, Nöthlings U, Jenab M, Fedirko V, Kaaks R, et al. Inflammatory and metabolic biomarkers and risk of liver and biliary tract cancer. *Hepatology.* 2014;60(3):858-71.
55. Fracanzani AL, Petta S, Lombardi R, Pisano G, Russello M, Consonni D, et al. Liver and Cardiovascular Damage in Patients With Lean Nonalcoholic Fatty Liver Disease, and Association With Visceral Obesity. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2017;15(10):1604-1611.e1.
56. Lum JHM, Cheah MCC, Leow WQ, Wan WK, Lim TKH, Chow WC, et al. Clinical profile of non-alcoholic fatty liver disease in nonobese patients. *Journal of Gastroenterology and Hepatology.* 2021;61(1):257-61.

57. Lu FB, Zheng KI, Rios RS, Targher G, Byrne CD, Zheng MH. Global epidemiology of lean non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2020;35(12):2041-50.
58. Ye Q, Zou B, Yeo YH, Li J, Huang DQ, Wu Y, et al. Global prevalence, incidence, and outcomes of non-obese or lean non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*. 2020;5(8):739-52.
59. Leung JCF, Loong TCW, Wei JL, Wong GLH, Chan AWH, Choi PCL, et al. Histological severity and clinical outcomes of nonalcoholic fatty liver disease in nonobese patients. *Hepatology*. 2017;65(1):54-64.
60. Kumar R, Mohan S. Non-alcoholic Fatty Liver Disease in Lean Subjects: Characteristics and Implications. *Journal of clinical and translational hepatology*. 2017;5(3):216-23.
61. Kwok R, Choi KC, Wong GLH, Zhang Y, Chan HLY, Luk AOY, et al. Screening diabetic patients for non-alcoholic fatty liver disease with controlled attenuation parameter and liver stiffness measurements: a prospective cohort study. *Gut*. 2016;65(8):1359-68.
62. Bril F, Cusi K. Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Patients With Type 2 Diabetes: A Call to Action. *Diabetes Care*. 2017;40(3):419-30.
63. Bazick J, Donithan M, Neuschwander-Tetri BA, Kleiner D, Brunt EM, Wilson L, et al. Clinical Model for NASH and Advanced Fibrosis in Adult Patients With Diabetes and NAFLD: Guidelines for Referral in NAFLD. *Diabetes Care*. 2015;38(7):1347-55.
64. Targher G, Bertolini L, Rodella S, Tessari R, Zenari L, Lippi G, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is independently associated with an increased incidence of cardiovascular events in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2007;30(8):2119-21.
65. Xia MF, Bian H, Gao X. NAFLD and Diabetes: Two Sides of the Same Coin? Rationale for Gene-Based Personalized NAFLD Treatment. *Front Pharmacol*. 2019;10:877.
66. Adams LA, Lymp JF, Sauver JS, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, et al. The Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Population-Based Cohort Study. *Gastroenterology*. 2005;129(1):113-21.
67. Lazo M, Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: A global perspective. *Seminars in liver disease*. 2008;28(4):339-50.
68. Portillo-Sanchez P, Bril F, Maximos M, Lomonaco R, Biernacki D, Orsak B, et al. High Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Normal Plasma Aminotransferase Levels. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(6):2231-8.
69. Koehler EM, Plompen EPC, Schouten JNL, Hansen BE, Darwish Murad S, Taimr P, et al. Presence of diabetes mellitus and steatosis is associated with liver stiffness in a general population: The Rotterdam study. *Hepatology*. 2016;63(1):138-47.
70. Doycheva I, Cui J, Nguyen P, Costa EA, Hooker J, Hofflich H, et al. Non-invasive screening of diabetics in primary care for NAFLD and advanced fibrosis by MRI and MRE. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2016;43(1):83-95.

71. Loomba R, Abraham M, Tech B, Unalp A, Wilson L, Lavine J, et al. Association between diabetes, family history of diabetes and risk of nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis. *Hepatology*. 2012;56(3):943-51.
72. Armstrong MJ, Adams LA, Canbay A, Syn WK. Extrahepatic complications of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2014;59(3):1174-97.
73. Eckel RH, Alberti KGMM, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet*. 2010;375(9710):181-3.
74. Ballestri S, Zona S, Targher G, Romagnoli D, Baldelli E, Nascimbeni F, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with an almost twofold increased risk of incident type 2 diabetes and metabolic syndrome. Evidence from a systematic review and meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2016;31(5):936-44.
75. Hachemi M, Benmakhlouf S, Prost P, Santolaria N, Tchenio X, Sedillot N, et al. La Non Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) et la Non Alcoholic Steato-Hepatitis (NASH) des pathologies de système : revue pour le réanimateur: Non Alcoholic Fatty Liver Disease and Non Alcoholic Steato-Hepatitis are multisystemic diseases: Review for intensivists. *Médecine Intensive Réanimation*. 2017;26(1):63-74.
76. Hobeika C, Ronot M, Beaufrere A, Paradis V, Soubrane O, Cauchy F. Syndrome métabolique et chirurgie hépatique. *Journal de Chirurgie Viscérale*. 2020;157(3):235-43.
77. Rosmorduc O, Fartoux L. [Metabolic syndrome, non alcoholic hepatic steatopathy and hepatocellular carcinoma: so dangerous liaisons]. *Bull Acad Natl Med*. 2014;198(9):1653-63; discussion 1663-1664.
78. Ratziu V. Novel Pharmacotherapy Options for NASH. *Dig Dis Sci*. 2016;61(5):1398-405.
79. Singh S, Allen AM, Wang Z, Prokop LJ, Murad MH, Loomba R. Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver vs nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2015;13(4):643-654.e1-9; quiz e39-40.
80. Ekstedt M, Hagström H, Nasr P, Fredrikson M, Stål P, Kechagias S, et al. Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatology*. 2015;61(5):1547-54.
81. Younossi ZM, Stepanova M, Rafiq N, Makhlouf H, Younoszai Z, Agrawal R, et al. Pathologic criteria for nonalcoholic steatohepatitis: interprotocol agreement and ability to predict liver-related mortality. *Hepatology*. 2011;53(6):1874-82.
82. Utzschneider KM, Kahn SE. The Role of Insulin Resistance in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2006;91(12):4753-61.
83. Kahn SE. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2003;46(1):3-19.
84. Jornayvaz FR, Samuel VT, Shulman GI. The role of muscle insulin resistance in the pathogenesis of atherogenic dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease associated with the metabolic syndrome. *Annu Rev Nutr*. 2010;30:273-90.

85. Yamauchi T, Tobe K, Tamemoto H, Ueki K, Kaburagi Y, Yamamoto-Honda R, et al. Insulin signalling and insulin actions in the muscles and livers of insulin-resistant, insulin receptor substrate 1-deficient mice. *Mol Cell Biol*. 1996;16(6):3074-84.
86. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001;414(6865):799-806.
87. Khan AH, Pessin JE. Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia*. 2002;45(11):1475-83.
88. Krook A, Roth RA, Jiang XJ, Zierath JR, Wallberg-Henriksson H. Insulin-stimulated Akt kinase activity is reduced in skeletal muscle from NIDDM subjects. *Diabetes*. 1998;47(8):1281-6.
89. Hill MM, Andjelkovic M, Brazil DP, Ferrari S, Fabbro D, Hemmings BA. Insulin-stimulated protein kinase B phosphorylation on Ser-473 is independent of its activity and occurs through a staurosporine-insensitive kinase. *J Biol Chem*. 2001;276(28):25643-6.
90. Bernard L, Christin-Maître S, Basille C, Chabbert-Buffet N. Insulinorésistance et syndrome des ovaires polykystiques. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*. 2003;31(2):109-16.
91. Summers SA, Kao AW, Kohn AD, Backus GS, Roth RA, Pessin JE, et al. The role of glycogen synthase kinase 3beta in insulin-stimulated glucose metabolism. *J Biol Chem*. 1999;274(25):17934-40.
92. Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2000;106(4):473-81.
93. Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, et al. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature*. 2003;423(6939):550-5.
94. Finelli C, Tarantino G. What is the role of adiponectin in obesity related non-alcoholic fatty liver disease? *World J Gastroenterol*. 2013;19(6):802-12.
95. Colica C, Abenavoli L. Resistin Levels in Non-alcoholic Fatty Liver Disease Pathogenesis. *J Transl Int Med*. 2018;6(1):52-3.
96. Moon B, Kwan JJM, Duddy N, Sweeney G, Begum N. Resistin inhibits glucose uptake in L6 cells independently of changes in insulin signaling and GLUT4 translocation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003;285(1):E106-115.
97. Stumvoll M, Häring H. Resistin and adiponectin--of mice and men. *Obes Res*. 2002;10(11):1197-9.
98. Bugianesi E, Gastaldelli A, Vanni E, Gambino R, Cassader M, Baldi S, et al. Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. *Diabetologia*. 2005;48(4):634-42.
99. Bugianesi E, Moscatiello S, Ciaravella MF, Marchesini G. Insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Pharm Des*. 2010;16(17):1941-51.
100. Lonardo A, Nascimbeni F, Mantovani A, Targher G. Hypertension, diabetes, atherosclerosis and NASH: Cause or consequence? *J Hepatol*. 2018;68(2):335-52.

101. Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, Boirie Y, Cederholm T, Landi F, et al. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing*. 2010;39(4):412-23.
102. Hong HC, Hwang SY, Choi HY, Yoo HJ, Seo JA, Kim SG, et al. Relationship between sarcopenia and nonalcoholic fatty liver disease: the Korean Sarcopenic Obesity Study. *Hepatology*. 2014;59(5):1772-8.
103. Kuchay MS, Martínez-Montoro JI, Kaur P, Fernández-García JC, Ramos-Molina B. Non-alcoholic fatty liver disease-related fibrosis and sarcopenia: An altered liver-muscle crosstalk leading to increased mortality risk. *Ageing Res Rev*. 2022;80:101696.
104. Moon JH, Koo BK, Kim W. Non-alcoholic fatty liver disease and sarcopenia additively increase mortality: a Korean nationwide survey. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2021;12(4):964-72.
105. Zambon Azevedo V, Silaghi CA, Maurel T, Silaghi H, Ratziu V, Pais R. Impact of Sarcopenia on the Severity of the Liver Damage in Patients With Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Front Nutr*. 2021;8:774030.
106. Li AA, Kim D, Ahmed A. Association of Sarcopenia and NAFLD: An Overview. *Clin Liver Dis (Hoboken)*. 4 sept 2020;16(2):73-6.
107. Lee Y ho, Kim SU, Song K, Park JY, Kim DY, Ahn SH, et al. Sarcopenia is associated with significant liver fibrosis independently of obesity and insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease: Nationwide surveys (KNHANES 2008-2011). *Hepatology*. mars 2016;63(3):776-86.
108. Barrera F, George J. The Role of Diet and Nutritional Intervention for the Management of Patients with NAFLD. *Clinics in Liver Disease*. 2014;18(1):91-112.
109. Yu J, Marsh S, Hu J, Feng W, Wu C. The Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Interplay between Diet, Gut Microbiota, and Genetic Background. *Gastroenterol Res Pract*. 2016;2016:2862173.
110. Ryan MC, Itsiopoulos C, Thodis T, Ward G, Trost N, Hofferberth S, et al. The Mediterranean diet improves hepatic steatosis and insulin sensitivity in individuals with non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*. 2013;59(1):138-43.
111. Ahmed IA, Mikail MA, bin Ibrahim M, bin Hazali N, Rasad MSBA, Ghani RA, et al. Antioxidant activity and phenolic profile of various morphological parts of underutilised *Baccaurea angulata* fruit. *Food Chemistry*. 2015;172:778-87.
112. Kennedy OJ, Roderick P, Poole R, Parkes J. Coffee, caffeine and non-alcoholic fatty liver disease? *Therap Adv Gastroenterol*. 2016;9(3):417-8.
113. Marventano S, Salomone F, Godos J, Pluchinotta F, Del Rio D, Mistretta A, et al. Coffee and tea consumption in relation with non-alcoholic fatty liver and metabolic syndrome: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Clin Nutr*. 2016;35(6):1269-81.
114. Chen S, Teoh NC, Chitturi S, Farrell GC. Coffee and non-alcoholic fatty liver disease: brewing evidence for hepatoprotection? *J Gastroenterol Hepatol*. 2014;29(3):435-41.

115. Molloy JW, Calcagno CJ, Williams CD, Jones FJ, Torres DM, Harrison SA. Association of coffee and caffeine consumption with fatty liver disease, nonalcoholic steatohepatitis, and degree of hepatic fibrosis. *Hepatology*. 2012;55(2):429-36.
116. Çevik Saldıran T, Mutluay FK, Yağcı İ, Yılmaz Y. Impact of aerobic training with and without whole-body vibration training on metabolic features and quality of life in non-alcoholic fatty liver disease patients. *Annales d'endocrinologie*. 2020;81(5):493-9.
117. Huh JY, Mougios V, Skraparlis A, Kabasakalis A, Mantzoros CS. Irisin in response to acute and chronic whole-body vibration exercise in humans. *Metabolism*. 2014;63(7):918-21.
118. Heijden GJ van der, Wang ZJ, Chu ZD, Sauer PJJ, Haymond MW, Rodriguez LM, et al. A 12-Week Aerobic Exercise Program Reduces Hepatic Fat Accumulation and Insulin Resistance in Obese, Hispanic Adolescents. *Obesity*. 2010;18(2):384-90.
119. Ok DP, Ko K, Bae JY. Exercise without dietary changes alleviates nonalcoholic fatty liver disease without weight loss benefits. *Lipids Health Dis*. 2018;17(1):207.
120. Frith J, Day CP, Henderson E, Burt AD, Newton JL. Non-alcoholic fatty liver disease in older people. *Gerontology*. 2009;55(6):607-13.
121. Kagansky N, Levy S, Keter D, Rimon E, Taiba Z, Fridman Z, et al. Non-alcoholic fatty liver disease--a common and benign finding in octogenarian patients. *Liver Int*. 2004;24(6):588-94.
122. Koehler EM, Schouten JNL, Hansen BE, van Rooij FJA, Hofman A, Stricker BH, et al. Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease in the elderly: results from the Rotterdam study. *J Hepatol*. 2012;57(6):1305-11.
123. Park KS, Lee YS, Park HW, Seo SH, Jang BG, Hwang JY, et al. Factors associated or related to with pathological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Korean J Intern Med*. 2004;19(1):19-26.
124. Fattahi MR, Niknam R, Safarpour A, Sepehrimanesh M, Lotfi M. The Prevalence of Metabolic Syndrome In Non-alcoholic Fatty Liver Disease; A Population-Based Study. *Middle East J Dig Dis*. 2016;8(2):131-7.
125. Zelber-Sagi S, Nitzan-Kaluski D, Halpern Z, Oren R. Prevalence of primary non-alcoholic fatty liver disease in a population-based study and its association with biochemical and anthropometric measures. *Liver International*. 2006;26(7):856-63.
126. Wagenknecht LE, Scherzinger AL, Stamm ER, Hanley AJG, Norris JM, Chen YDI, et al. Correlates and heritability of nonalcoholic fatty liver disease in a minority cohort. *Obesity (Silver Spring)*. 2009;17(6):1240-6.
127. Abdelmalek MF, Liu C, Shuster J, Nelson DR, Asal NR. Familial aggregation of insulin resistance in first-degree relatives of patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006;4(9):1162-9.
128. Masuoka HC, Chalasani N. Nonalcoholic fatty liver disease: an emerging threat to obese and diabetic individuals. *Ann N Y Acad Sci*. 2013;1281(1):106-22.
129. Day CP. Genetic and environmental susceptibility to non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis*. 2010;28(1):255-60.

130. Eslam M, Valenti L, Romeo S. Genetics and epigenetics of NAFLD and NASH: Clinical impact. *J Hepatol.* 2018;68(2):268-79.
131. Carlsson B, Lindén D, Brolén G, Liljeblad M, Bjursell M, Romeo S, et al. Review article: the emerging role of genetics in precision medicine for patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2020;51(12):1305-20.
132. Anstee QM, Day CP. The Genetics of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Spotlight on PNPLA3 and TM6SF2. *Semin Liver Dis.* 2015;35(3):270-90.
133. Scott E, Anstee QM. Genetics of alcoholic liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Med (Lond).* 2018;18(Suppl 2):s54-9.
134. Choudhary NS, Duseja A. Genetic and epigenetic disease modifiers: non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and alcoholic liver disease (ALD). *Transl Gastroenterol Hepatol.* 2021;6:2.
135. Valenti L, Al-Serri A, Daly AK, Galmozzi E, Rametta R, Dongiovanni P, et al. Homozygosity for the patatin-like phospholipase-3/adiponutrin I148M polymorphism influences liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2010;51(4):1209-17.
136. Liu YL, Patman GL, Leathart JBS, Pigué AC, Burt AD, Dufour JF, 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(1):75-81.
137. Smagris E, Gilyard S, BasuRay S, Cohen JC, Hobbs HH. Inactivation of Tm6sf2, a Gene Defective in Fatty Liver Disease, Impairs Lipidation but Not Secretion of Very Low Density Lipoproteins. *J Biol Chem.* 2016;291(20):10659-76.
138. Dongiovanni P, Romeo S, Valenti L. Genetic Factors in the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver and Steatohepatitis. *Biomed Res Int.* 2015;2015:460190.
139. Liu YL, Reeves HL, Burt AD, Tiniakos D, McPherson S, Leathart JBS, et al. TM6SF2 rs58542926 influences hepatic fibrosis progression in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nat Commun.* 2014;5:4309.
140. Nobili V, Alisi A, Valenti L, Miele L, Feldstein AE, Alkhoury N. NAFLD in children: new genes, new diagnostic modalities and new drugs. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019;16(9):517-30.
141. Caldwell SH, Swerdlow RH, Khan EM, Iezzoni JC, Hespenheide EE, Parks JK, et al. Mitochondrial abnormalities in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol.* 1999;31(3):430-4.
142. Pessayre D, Fromenty B. NASH: a mitochondrial disease. *J Hepatol.* 2005;42(6):928-40.
143. Wei Y, Rector RS, Thyfault JP, Ibdah JA. Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. *World J Gastroenterol.* 2008;14(2):193-9.
144. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology.* 2001;120(5):1183-92.
145. Pérez-Carreras M, Del Hoyo P, Martín MA, Rubio JC, Martín A, Castellano G, et al. Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2003;38(4):999-1007.



146. Fromenty B, Pessayre D. Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. *Pharmacol Ther.* 1995;67(1):101-54.
147. Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin? *Hepatology.* 2004;40(1):46-54.
148. Kugelmas M, Hill DB, Vivian B, Marsano L, McClain CJ. Cytokines and NASH: a pilot study of the effects of lifestyle modification and vitamin E. *Hepatology.* 2003;38(2):413-9.
149. García-Ruiz I, Rodríguez-Juan C, Díaz-Sanjuan T, del Hoyo P, Colina F, Muñoz-Yagüe T, et al. Uric acid and anti-TNF antibody improve mitochondrial dysfunction in ob/ob mice. *Hepatology.* 2006;44(3):581-91.
150. Crespo J, Cayón A, Fernández-Gil P, Hernández-Guerra M, Mayorga M, Domínguez-Díez A, et al. Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology.* 2001;34(6):1158-63.
151. Sánchez-Alcázar JA, Schneider E, Martínez MA, Carmona P, Hernández-Muñoz I, Siles E, et al. Tumor necrosis factor-alpha increases the steady-state reduction of cytochrome b of the mitochondrial respiratory chain in metabolically inhibited L929 cells. *J Biol Chem.* 2000;275(18):13353-61.
152. Sobaniec-Lotowska ME, Lebensztejn DM. Ultrastructure of hepatocyte mitochondria in nonalcoholic steatohepatitis in pediatric patients: usefulness of electron microscopy in the diagnosis of the disease. *Am J Gastroenterol.* 2003;98(7):1664-5.
153. Santamaria E, Avila MA, Latasa MU, Rubio A, Martin-Duce A, Lu SC, et al. Functional proteomics of nonalcoholic steatohepatitis: mitochondrial proteins as targets of S-adenosylmethionine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(6):3065-70.
154. Demeilliers C, Maisonneuve C, Grodet A, Mansouri A, Nguyen R, Tinel M, et al. Impaired adaptive resynthesis and prolonged depletion of hepatic mitochondrial DNA after repeated alcohol binges in mice. *Gastroenterology.* 2002;123(4):1278-90.
155. Vancamelbeke M, Vermeire S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017;11(9):821-34.
156. Abdou RM, Zhu L, Baker RD, Baker SS. Gut Microbiota of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Dig Dis Sci.* 2016;61(5):1268-81.
157. Rodriguez J, Hiel S, Neyrinck AM, Le Roy T, Pötgens SA, Leyrolle Q, et al. Discovery of the gut microbial signature driving the efficacy of prebiotic intervention in obese patients. *Gut.* 2020;69(11):1975-87.
158. Le Roy T, Llopis M, Lepage P, Bruneau A, Rabot S, Bevilacqua C, et al. Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Gut.* 2013;62(12):1787-94.
159. Zhu L, Baker SS, Gill C, Liu W, Alkhouri R, Baker RD, et al. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology.* 2013;57(2):601-9.

160. Michail S, Lin M, Frey MR, Fanter R, Paliy O, Hilbush B, et al. Altered gut microbial energy and metabolism in children with non-alcoholic fatty liver disease. *FEMS Microbiol Ecol*. 2015;91(2):1-9.
161. Boursier J, Mueller O, Barret M, Machado M, Fizanne L, Araujo-Perez F, et al. The severity of nonalcoholic fatty liver disease is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota. *Hepatology*. 2016;63(3):764-75.
162. Duarte SMB, Stefano JT, Miele L, Ponziani FR, Souza-Basqueira M, Okada LSRR, et al. Gut microbiome composition in lean patients with NASH is associated with liver damage independent of caloric intake: A prospective pilot study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2018;28(4):369-84.
163. Jiang W, Wu N, Wang X, Chi Y, Zhang Y, Qiu X, et al. Dysbiosis gut microbiota associated with inflammation and impaired mucosal immune function in intestine of humans with non-alcoholic fatty liver disease. *Sci Rep*. 2015;5:8096.
164. Da Silva HE, Teterina A, Comelli EM, Taibi A, Arendt BM, Fischer SE, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with dysbiosis independent of body mass index and insulin resistance. *Sci Rep*. 2018;8(1):1466.
165. Wong VWS, Tse CH, Lam TTY, Wong GLH, Chim AML, Chu WCW, et al. Molecular characterization of the fecal microbiota in patients with nonalcoholic steatohepatitis--a longitudinal study. *PLoS One*. 2013;8(4):e62885.
166. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007;56(7):1761-72.
167. Henao-Mejia J, Elinav E, Jin C, Hao L, Mehal WZ, Strowig T, et al. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature*. 2012;482(7384):179-85.
168. Bashiardes S, Shapiro H, Rozin S, Shibolet O, Elinav E. Non-alcoholic fatty liver and the gut microbiota. *Mol Metab*. 2016;5(9):782-94.
169. Yuan J, Chen C, Cui J, Lu J, Yan C, Wei X, et al. Fatty Liver Disease Caused by High-Alcohol-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Cell Metab*. 2019;30(4):675-688.e7.
170. Loman BR, Hernández-Saavedra D, An R, Rector RS. Prebiotic and probiotic treatment of nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Nutr Rev*. 2018;76(11):822-39.
171. Smith BW, Adams LA. Nonalcoholic fatty liver disease and diabetes mellitus: pathogenesis and treatment. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7(8):456-65.
172. Anty R, Gual P. Physiopathologie des stéatoses hépatiques métaboliques. *La Presse Médicale*. 2019;48(12):1468-83.
173. Chen CL, Yang HI, Yang WS, Liu CJ, Chen PJ, You SL, et al. Metabolic factors and risk of hepatocellular carcinoma by chronic hepatitis B/C infection: a follow-up study in Taiwan. *Gastroenterology*. 2008;135(1):111-21.

174. Kowdley KV, Belt P, Wilson LA, Yeh MM, Neuschwander-Tetri BA, Chalasani N, et al. Serum ferritin is an independent predictor of histologic severity and advanced fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2012;55(1):77-85.
175. Deugnier Y, Brissot P, Loréal O. Iron and the liver: update 2008. *J Hepatol*. 2008;48 Suppl 1:S113-123.
176. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, et al. The Diagnosis and Management of Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Practice Guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. *Gastroenterology*. 2012;142(7):1592-609.
177. Patton HM, Lavine JE, Molleston J. Clinical Correlates of Histopathology in Pediatric Nonalcoholic Steatohepatitis. 2008;135(6):13.
178. Bedossa P, FLIP Pathology Consortium. Utility and appropriateness of the fatty liver inhibition of progression (FLIP) algorithm and steatosis, activity, and fibrosis (SAF) score in the evaluation of biopsies of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2014;60(2):565-75.
179. 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(5):1751-9.
180. Charatcharoenwitthaya P, Lindor KD, Angulo P. The spontaneous course of liver enzymes and its correlation in nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci*. 2012;57(7):1925-31.
181. Bayard M, Holt JD, Boroughs E. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *AFP*. 2006;73(11):1961-8.
182. Rodríguez G, Gallego S, Breidenassel C, Moreno LA, Gottrand F. Is liver transaminases assessment an appropriate tool for the screening of non-alcoholic fatty liver disease in at risk obese children and adolescents? *Nutr Hosp*. 2010;25(5):712-7.
183. Mathiesen UL, Franzén LE, Frydén A, Foberg U, Bodemar G. The clinical significance of slightly to moderately increased liver transaminase values in asymptomatic patients. *Scand J Gastroenterol*. 1999;34(1):85-91.
184. Fracanzani AL, Valenti L, Bugianesi E, Andreoletti M, Colli A, Vanni E, et al. Risk of severe liver disease in nonalcoholic fatty liver disease with normal aminotransferase levels: a role for insulin resistance and diabetes. *Hepatology*. 2008;48(3):792-8.
185. Mofrad P, Contos MJ, Haque M, Sargeant C, Fisher RA, Luketic VA, et al. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. *Hepatology*. 2003;37(6):1286-92.
186. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology*. 2004;40(6):1387-95.
187. Falck-Ytter Y, Younossi ZM, Marchesini G, McCullough AJ. Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes. *Semin Liver Dis*. 2001;21(1):17-26.
188. Ekstedt M, Franzén LE, Mathiesen UL, Thorelius L, Holmqvist M, Bodemar G, et al. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology*. 2006;44(4):865-73.

189. Fedchuk L, Nascimbeni F, Pais R, Charlotte F, Housset C, Ratzu V, et al. Performance and limitations of steatosis biomarkers in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014;40(10):1209-22.
190. Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, Masutti F, Passalacqua M, Castiglione A, et al. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol.* 2006;6:33.
191. Kotronen A, Peltonen M, Hakkarainen A, Sevastianova K, Bergholm R, Johansson LM, et al. Prediction of non-alcoholic fatty liver disease and liver fat using metabolic and genetic factors. *Gastroenterology.* 2009;137(3):865-72.
192. Piazzolla VA, Mangia A. Noninvasive Diagnosis of NAFLD and NASH. *Cells.* 2020;9(4):1005.
193. Lee JH, Kim D, Kim HJ, Lee CH, Yang JI, Kim W, et al. Hepatic steatosis index: a simple screening tool reflecting nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Liver Dis.* 2010;42(7):503-8.
194. Petta S, Amato M, Cabibi D, Cammà C, Di Marco V, Giordano C, et al. Visceral adiposity index is associated with histological findings and high viral load in patients with chronic hepatitis C due to genotype 1. *Hepatology.* 2010;52(5):1543-52.
195. Guerrero-Romero F, Simental-Mendía LE, González-Ortiz M, Martínez-Abundis E, Ramos-Zavala MG, Hernández-González SO, et al. The product of triglycerides and glucose, a simple measure of insulin sensitivity. Comparison with the euglycemic-hyperinsulinemic clamp. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(7):3347-51.
196. Cusi K, Chang Z, Harrison S, Lomonaco R, Bril F, Orsak B, 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(1):167-74.
197. Poynard T, Peta V, Munteanu M, Charlotte F, Ngo Y, Ngo A, et al. The diagnostic performance of a simplified blood test (SteatoTest-2) for the prediction of liver steatosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2019;31(3):393-402.
198. Poynard T, Ratzu V, Naveau S, Thabut D, Charlotte F, Messous D, et al. The diagnostic value of biomarkers (SteatoTest) for the prediction of liver steatosis. *Comp Hepatol.* 2005;4:10.
199. Berzigotti A, Tsochatzis E, Boursier J, Castera L, Cazzagon N, Friedrich-Rust M, et al. EASL Clinical Practice Guidelines on non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis – 2021 update. *Journal of Hepatology.* 1 sept 2021;75(3):659-89.
200. Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, Sola R, Correa MC, Montaner J, et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology.* 2006;43(6):1317-25.
201. Siddiqui MS, Yamada G, Vuppalanchi R, Van Natta M, Loomba R, Guy C, et al. Diagnostic Accuracy of Non-Invasive Fibrosis Models to Detect Change in Fibrosis Stage. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2019;17(9):1877-1885.e5.
202. Kim D, Kim WR, Kim HJ, Therneau TM. Association between noninvasive fibrosis markers and mortality among adults with nonalcoholic fatty liver disease in the United States. *Hepatology.* 2013;57(4):1357-65.

203. 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(10):1441-7.
204. Sheth SG, Flamm SL, Gordon FD, Chopra S. AST/ALT ratio predicts cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol*. 1998;93(1):44-8.
205. Ratzu V, Massard J, Charlotte F, Messous D, Imbert-Bismut F, Bonyhay L, et al. Diagnostic value of biochemical markers (FibroTest-FibroSURE) for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol*. 2006;6:6.
206. Siddiqui MS, Patidar KR, Boyett S, Luketic VA, Puri P, Sanyal AJ. Performance of non-invasive models of fibrosis in predicting mild to moderate fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int*. 2016;36(4):572-9.
207. Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003;38(2):518-26.
208. Nabi O, Lacombe K, Boursier J, Mathurin P, Zins M, Serfaty L. Prevalence and Risk Factors of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Advanced Fibrosis in General Population: the French Nationwide NASH-CO Study. *Gastroenterology*. 2020;159(2):791-793.e2.
209. Hagström H, Talbäck M, Andreasson A, Walldius G, Hammar N. Ability of Noninvasive Scoring Systems to Identify Individuals in the Population at Risk for Severe Liver Disease. *Gastroenterology*. 2020;158(1):200-14.
210. Guha IN, Parkes J, Roderick P, Chattopadhyay D, Cross R, Harris S, et al. Noninvasive markers of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: Validating the European Liver Fibrosis Panel and exploring simple markers. *Hepatology*. 2008;47(2):455-60.
211. Boyle M, Tiniakos D, Schattenberg JM, Ratzu V, Bugianessi E, Petta S, et al. Performance of the PRO-C3 collagen neo-epitope biomarker in non-alcoholic fatty liver disease. *JHEP Rep*. 2019;1(3):188-98.
212. Daniels SJ, Leeming DJ, Eslam M, Hashem AM, Nielsen MJ, Krag A, et al. ADAPT: An Algorithm Incorporating PRO-C3 Accurately Identifies Patients With NAFLD and Advanced Fibrosis. *Hepatology*. 2019;69(3):1075-86.
213. G P, M E, A P, C C, M A, C C, et al. AGILE 3+ Score for the Diagnosis of Advanced Fibrosis and for Predicting Liver-related Events in NAFLD. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association [Internet]*. 14 juill 2022 [cité 20 août 2022]; Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35842119/>
214. Poynard T, Imbert-Bismut F, Munteanu M, Messous D, Myers RP, Thabut D, et al. Overview of the diagnostic value of biochemical markers of liver fibrosis (FibroTest, HCV FibroSure) and necrosis (ActiTest) in patients with chronic hepatitis C. *Comp Hepatol*. 2004;3(1):8.
215. Lassailly G, Caiazzo R, Hollebecque A, Buob D, Leteurtre E, Arnalsteen L, et al. Validation of noninvasive biomarkers (FibroTest, SteatoTest, and NashTest) for prediction of liver injury in patients with morbid obesity. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2011;23(6):499-506.

216. Adams LA, George J, Bugianesi E, Rossi E, De Boer WB, van der Poorten D, et al. Complex non-invasive fibrosis models are more accurate than simple models in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011;26(10):1536-43.
217. Zachou K, Lygoura V, Arvaniti P, Giannoulis G, Gatselis NK, Koukoulis GK, et al. FibroMeter scores for the assessment of liver fibrosis in patients with autoimmune liver diseases. *Ann Hepatol.* juin 2021;22:100285.
218. Siddiqui MS, Vuppalanchi R, Van Natta ML, Hallinan E, Kowdley KV, Abdelmalek M, et al. Vibration-controlled Transient Elastography to Assess Fibrosis and Steatosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2019;17(1):156-163.e2.
219. Lăpădat A, Jianu I, Ungureanu B, Florescu L, Gheonea D, Sovaila S, et al. Non-invasive imaging techniques in assessing non-alcoholic fatty liver disease: a current status of available methods. *J Med Life.* 2017;10(1):19-26.
220. Debongnie JC, Pauls C, Fievez M, Wibin E. Prospective evaluation of the diagnostic accuracy of liver ultrasonography. *Gut.* 1981;22(2):130-5.
221. Joseph AE, Saverymuttu SH, al-Sam S, Cook MG, Maxwell JD. Comparison of liver histology with ultrasonography in assessing diffuse parenchymal liver disease. *Clin Radiol.* 1991;43(1):26-31.
222. Hamaguchi M, Kojima T, Itoh Y, Harano Y, Fujii K, Nakajima T, et al. The severity of ultrasonographic findings in nonalcoholic fatty liver disease reflects the metabolic syndrome and visceral fat accumulation. *Am J Gastroenterol.* 2007;102(12):2708-15.
223. Hamer OW, Aguirre DA, Casola G, Lavine JE, Woenckhaus M, Sirlin CB. Fatty liver: imaging patterns and pitfalls. *Radiographics.* 2006;26(6):1637-53.
224. Saverymuttu SH, Joseph AE, Maxwell JD. Ultrasound scanning in the detection of hepatic fibrosis and steatosis. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1986;292(6512):13-5.
225. Webb M, Yeshua H, Zelber-Sagi S, Santo E, Brazowski E, Halpern Z, et al. Diagnostic value of a computerized hepatorenal index for sonographic quantification of liver steatosis. *AJR Am J Roentgenol.* 2009;192(4):909-14.
226. de Alwis NMW, Anstee QM, Day CP. How to Diagnose Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Dig Dis.* 2016;34 Suppl 1:19-26.
227. Singh D, Das CJ, Baruah MP. Imaging of non alcoholic fatty liver disease: A road less travelled. *Indian J Endocrinol Metab.* 2013;17(6):990-5.
228. Iijima H, Moriyasu F, Tsuchiya K, Suzuki S, Yoshida M, Shimizu M, et al. Decrease in accumulation of ultrasound contrast microbubbles in non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res.* 2007;37(9):722-30.
229. Khov N, Sharma A, Riley TR. Bedside ultrasound in the diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20(22):6821-5.
230. Saadeh S, Younossi ZM, Remer EM, Gramlich T, Ong JP, Hurley M, et al. The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* 2002;123(3):745-50.

231. Açıkel M, Sunay S, Koplay M, Gündoğdu F, Karakelleoğlu S. Evaluation of ultrasonographic fatty liver and severity of coronary atherosclerosis, and obesity in patients undergoing coronary angiography. *Anadolu Kardiyol Derg.* 2009;9(4):273-9.
232. Needleman L, Kurtz AB, Rifkin MD, Cooper HS, Pasto ME, Goldberg BB. Sonography of diffuse benign liver disease: accuracy of pattern recognition and grading. *AJR Am J Roentgenol.* 1986;146(5):1011-5.
233. Mathiesen UL, Franzén LE, Aselius H, Resjö M, Jacobsson L, Foberg U, et al. Increased liver echogenicity at ultrasound examination reflects degree of steatosis but not of fibrosis in asymptomatic patients with mild/moderate abnormalities of liver transaminases. *Dig Liver Dis.* 2002;34(7):516-22.
234. Park YS, Park SH, Lee SS, Kim DY, Shin YM, Lee W, et al. Biopsy-proven nonsteatotic liver in adults: estimation of reference range for difference in attenuation between the liver and the spleen at nonenhanced CT. *Radiology.* 2011;258(3):760-6.
235. Polyzos SA, Mantzoros CS. Necessity for timely noninvasive diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism.* 2014;63(2):161-7.
236. Gheonea DI, Săftoiu A, Ciurea T, Gorunescu F, Iordache S, Popescu GL, et al. Real-time sono-elastography in the diagnosis of diffuse liver diseases. *World J Gastroenterol.* 2010;16(14):1720-6.
237. Kodama Y, Ng CS, Wu TT, Ayers GD, Curley SA, Abdalla EK, et al. Comparison of CT methods for determining the fat content of the liver. *AJR Am J Roentgenol.* 2007;188(5):1307-12.
238. Idilman IS, Aniktar H, Idilman R, Kabacam G, Savas B, Elhan A, et al. Hepatic steatosis: quantification by proton density fat fraction with MR imaging versus liver biopsy. *Radiology.* 2013;267(3):767-75.
239. Machann J, Thamer C, Schnoedt B, Stefan N, Haring HU, Claussen CD, et al. Hepatic lipid accumulation in healthy subjects: a comparative study using spectral fat-selective MRI and volume-localized 1H-MR spectroscopy. *Magn Reson Med.* 2006;55(4):913-7.
240. Raptis DA, Fischer MA, Graf R, Nanz D, Weber A, Moritz W, et al. MRI: the new reference standard in quantifying hepatic steatosis? *Gut.* 2012;61(1):117-27.
241. Yu H, Shimakawa A, McKenzie CA, Brodsky E, Brittain JH, Reeder SB. Multiecho water-fat separation and simultaneous R2\* estimation with multifrequency fat spectrum modeling. *Magn Reson Med.* 2008;60(5):1122-34.
242. Ajmera V, Kim BK, Yang K, Majzoub AM, Nayfeh T, Tamaki N, et al. Liver Stiffness on Magnetic Resonance Elastography and the MEFIB Index and Liver-Related Outcomes in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Individual Participants. *Gastroenterology.* 2022;S0016-5085(22):00735-1.
243. Dulai PS, Singh S, Patel J, Soni M, Prokop LJ, Younossi Z, et al. Increased risk of mortality by fibrosis stage in non-alcoholic fatty liver disease: Systematic Review and Meta-analysis. *Hepatology.* 2017;65(5):1557-65.
244. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the Management of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Obes Facts.* 2016;9(2):65-90.

245. Papagianni M, Sofogianni A, Tziomalos K. Non-invasive methods for the diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol.* 2015;7(4):638-48.
246. Roman JH, Siddiqui MS. The role of noninvasive biomarkers in diagnosis and risk stratification in nonalcoholic fatty liver disease. *Endocrinology, Diabetes & Metabolism.* 2020;3(4):e00127.
247. Xiao H, Shi M, Xie Y, Chi X. Comparison of diagnostic accuracy of magnetic resonance elastography and Fibroscan for detecting liver fibrosis in chronic hepatitis B patients: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2017;12(11):e0186660.
248. Chang D, Truong E, Mena EA, Pacheco F, Wong M, Guindi M, et al. Machine learning models are superior to noninvasive tests in identifying clinically significant stages of NAFLD and NAFLD-related cirrhosis. *Hepatology.* 2022;S1542-3565(22):00646-2.
249. Atsawarungruangkit A, Laoveeravat P, Promrat K. Machine learning models for predicting non-alcoholic fatty liver disease in the general United States population: NHANES database. *World J Hepatol.* 2021;13(10):1417-27.
250. Liu YX, Liu X, Cen C, Li X, Liu JM, Ming ZY, et al. Comparison and development of advanced machine learning tools to predict nonalcoholic fatty liver disease: An extended study. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International.* 2021;20(5):409-15.
251. Elizabeth M. Brunt, Belt H Wilson. Progression to bridging fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease over 4 years in the NASH CRN. *Hepatology.* 2013;58::495A.
252. Stefan N, Häring HU, Cusi K. Non-alcoholic fatty liver disease: causes, diagnosis, cardiometabolic consequences, and treatment strategies. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2019;7(4):313-24.
253. Targher G, Byrne CD, Lonardo A, Zoppini G, Barbui C. Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident cardiovascular disease: A meta-analysis. *J Hepatol.* 2016;65(3):589-600.
254. 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(2):443-457.e17.
255. Corey KE, Klebanoff MJ, Tramontano AC, Chung RT, Hur C. Screening for Nonalcoholic Steatohepatitis in Individuals with Type 2 Diabetes: A Cost-Effectiveness Analysis. *Dig Dis Sci.* 2016;61(7):2108-17.
256. Wong VWS, Chalasani N. Not routine screening, but vigilance for chronic liver disease in patients with type 2 diabetes. *J Hepatol.* 2016;64(6):1211-3.
257. Byrne CD, Targher G. NAFLD: a multisystem disease. *J Hepatol.* 2015;62(1 Suppl):S47-64.
258. Argo CK, Caldwell SH. Epidemiology and natural history of non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis.* 2009;13(4):511-31.
259. Younossi ZM, Otgonsuren M, Henry L, Venkatesan C, Mishra A, Erario M, et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) with hepatocellular carcinoma (HCC) in the United States from 2004 to 2009. *Hepatology.* 2015;62(6):1723-30.



260. Zins M, Bonenfant S, Carton M, Coeuret-Pellicer M, Guéguen A, Gourmelen J, et al. The CONSTANCES cohort: an open epidemiological laboratory. *BMC Public Health*. 2010;10(1):479.
261. Zins M, Goldberg M, CONSTANCES team. The French CONSTANCES population-based cohort: design, inclusion and follow-up. *Eur J Epidemiol*. 2015;30(12):1317-28.
262. Goldberg M, Carton M, Descatha A, Leclerc A, Roquelaure Y, Santin G, et al. CONSTANCES: a general prospective population-based cohort for occupational and environmental epidemiology: cohort profile. *Occup Environ Med*. 2017;74(1):66-71.
263. Ruiz F, Henny J, Lemonnier S, Ozguler A, Brigand A, Semaoun V, et al. Constances : l'exigence d'un système qualité robuste pour un suivi multicentrique à long terme. *Bulletin d'épidémiologie hebdomadaire*. 2016;2016(35-36):617-21.
264. Zins M, Goldberg M, Berkman L. La cohorte CONSTANCES : une infrastructure pour la recherche et la santé publique. 2019;(35636):612-6.
265. Zelber-Sagi S, Webb M, Assy N, Blendis L, Yeshua H, Leshno M, et al. Comparison of fatty liver index with noninvasive methods for steatosis detection and quantification. *World J Gastroenterol*. 2013;19(1):57-64.
266. Koehler EM, Schouten JNL, Hansen BE, Hofman A, Stricker BH, Janssen HLA. External validation of the fatty liver index for identifying nonalcoholic fatty liver disease in a population-based study. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013;11(9):1201-4.
267. McPherson S, Stewart SF, Henderson E, Burt AD, Day CP. Simple non-invasive fibrosis scoring systems can reliably exclude advanced fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*. 2010;59(9):1265-9.
268. Demir M, Lang S, Nierhoff D, Drebber U, Hardt A, Wedemeyer I, et al. Stepwise combination of simple noninvasive fibrosis scoring systems increases diagnostic accuracy in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol*. 2013;47(8):719-26.
269. Shah AG, Lydecker A, Murray K, Tetri BN, Contos MJ, Sanyal AJ, et al. Comparison of noninvasive markers of fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009;7(10):1104-12.
270. Sumida Y, Yoneda M, Hyogo H, Itoh Y, Ono M, Fujii H, et al. Validation of the FIB4 index in a Japanese nonalcoholic fatty liver disease population. *BMC Gastroenterol*. 2012;12:2.
271. Forns X, Ampurdanès S, Llovet JM, Aponte J, Quintó L, Martínez-Bauer E, et al. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology*. 2002;36(4 Pt 1):986-92.
272. Boursier J, de Ledingham V, Leroy V, Anty R, Francque S, Salmon D, et al. A stepwise algorithm using an at-a-glance first-line test for the non-invasive diagnosis of advanced liver fibrosis and cirrhosis. *Journal of Hepatology*. 2017;66(6):1158-65.
273. Fine JP, Gray RJ. A Proportional Hazards Model for the Subdistribution of a Competing Risk. *Journal of the American Statistical Association*. 1999;94(446):496-509.

274. Biondi-Zoccai G, Romagnoli E, Agostoni P, Capodanno D, Castagno D, D'Ascenzo F, et al. Are propensity scores really superior to standard multivariable analysis? *Contemp Clin Trials*. 2011;32(5):731-40.
275. Cepeda MS. Comparison of Logistic Regression versus Propensity Score When the Number of Events Is Low and There Are Multiple Confounders. *American Journal of Epidemiology*. 2003;158(3):280-7.
276. ROSENBAUM PR, RUBIN DB. The central role of the propensity score in observational studies for causal effects. *Biometrika*. 1983;70(1):41-55.
277. Austin PC, Stuart EA. Moving towards best practice when using inverse probability of treatment weighting (IPTW) using the propensity score to estimate causal treatment effects in observational studies. *Stat Med*. 2015;34(28):3661-79.
278. Hernán MA, Brumback B, Robins JM. Marginal structural models to estimate the causal effect of zidovudine on the survival of HIV-positive men. *Epidemiology*. 2000;11(5):561-70.
279. Cholanteril G, Wong RJ, Hu M, Perumpail RB, Yoo ER, Puri P, et al. Liver Transplantation for Nonalcoholic Steatohepatitis in the US: Temporal Trends and Outcomes. *Dig Dis Sci*. 2017;62(10):2915-22.
280. Zezos P, Renner EL. Liver transplantation and non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20(42):15532-8.
281. Pais R, Barritt AS, Calmus Y, Scatton O, Runge T, Lebray P, et al. NAFLD and liver transplantation: Current burden and expected challenges. *J Hepatol*. 2016;65(6):1245-57.
282. Dyson J, Jaques B, Chattopadhyay D, Lochan R, Graham J, Das D, et al. Hepatocellular cancer: the impact of obesity, type 2 diabetes and a multidisciplinary team. *J Hepatol*. janv 2014;60(1):110-7.
283. Singal AK, Salameh H, Kuo YF, Wiesner RH. Evolving frequency and outcomes of simultaneous liver kidney transplants based on liver disease etiology. *Transplantation*. 27 juill 2014;98(2):216-21.
284. Caldwell SH, Oelsner DH, Iezzoni JC, Hespenheide EE, Battle EH, Driscoll CJ. Cryptogenic cirrhosis: clinical characterization and risk factors for underlying disease. *Hepatology*. 1999;29(3):664-9.
285. O'Leary JG, Landaverde C, Jennings L, Goldstein RM, Davis GL. Patients with NASH and cryptogenic cirrhosis are less likely than those with hepatitis C to receive liver transplants. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2011;9(8):700-704.e1.
286. Beyersmann J, Scheike TH. *Classical Regression Models for Competing Risks*. :21.
287. Xia MF, Bian H, Gao X. NAFLD and Diabetes: Two Sides of the Same Coin? Rationale for Gene-Based Personalized NAFLD Treatment. *Front Pharmacol*. 2019;10:877.
288. Ioannou GN, Weiss NS, Kowdley KV, Dominitz JA. Is obesity a risk factor for cirrhosis-related death or hospitalization? A population-based cohort study. *Gastroenterology*. 2003;125(4):1053-9.

289. de Marco R, Locatelli F, Zoppini G, Verlato G, Bonora E, Muggeo M. Cause-specific mortality in type 2 diabetes. The Verona Diabetes Study. *Diabetes Care*. 1999;22(5):756-61.
290. El-Serag HB, Tran T, Everhart JE. Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2004;126(2):460-8.
291. Targher G, Bertolini L, Padovani R, Rodella S, Tessari R, Zenari L, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2007;30(5):1212-8.
292. Targher G, Bertolini L, Chonchol M, Rodella S, Zoppini G, Lippi G, et al. Non-alcoholic fatty liver disease is independently associated with an increased prevalence of chronic kidney disease and retinopathy in type 1 diabetic patients. *Diabetologia*. 2010;53(7):1341-8.
293. Silverman JF, O'Brien KF, Long S, Leggett N, Khazanie PG, Pories WJ, et al. Liver pathology in morbidly obese patients with and without diabetes. *Am J Gastroenterol*. 1990;85(10):1349-55.
294. Wanless IR, Lentz JS. Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. *Hepatology*. 1990;12(5):1106-10.
295. Younossi ZM, Gramlich T, Matteoni CA, Boparai N, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2004;2(3):262-5.
296. Hagström H, Nasr P, Ekstedt M, Hammar U, Stål P, Hultcrantz R, et al. Fibrosis stage but not NASH predicts mortality and time to development of severe liver disease in biopsy-proven NAFLD. *J Hepatol*. 2017;67(6):1265-73.
297. Singal AK, Salameh H, Kuo YF, Wiesner RH. Evolving frequency and outcomes of simultaneous liver kidney transplants based on liver disease etiology. *Transplantation*. 2014;98(2):216-21.
298. Angulo P, Kleiner DE, Dam-Larsen S, Adams LA, Bjornsson ES, Charatcharoenwitthaya P, et al. Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2015;149(2):389-397.e10.
299. Sung KC, Wild SH, Byrne CD. Resolution of fatty liver and risk of incident diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(9):3637-43.
300. McPherson S, Hardy T, Henderson E, Burt AD, Day CP, Anstee QM. Evidence of NAFLD progression from steatosis to fibrosing-steatohepatitis using paired biopsies: implications for prognosis and clinical management. *J Hepatol*. 2015;62(5):1148-55.
301. Lassailly G, Caiazzo R, Pattou F, Mathurin P. Perspectives on Treatment for Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2016;150(8):1835-48.
302. Sanna C, Rosso C, Marietti M, Bugianesi E. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Extra-Hepatic Cancers. *Int J Mol Sci*. 2016;17(5):717.
303. Lazo M, Hernaez R, Bonekamp S, Kamel IR, Brancati FL, Guallar E, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and mortality among US adults: prospective cohort study. *BMJ*. 2011;343:d6891.
304. Zou B, Yeo YH, Nguyen VH, Cheung R, Ingelsson E, Nguyen MH. Prevalence, characteristics and mortality outcomes of obese, nonobese and lean NAFLD in the United States, 1999–2016. *Journal of Internal Medicine*. 2020;288(1):139-51.

305. Ito T, Ishigami M, Zou B, Tanaka T, Takahashi H, Kurosaki M, et al. The epidemiology of NAFLD and lean NAFLD in Japan: a meta-analysis with individual and forecasting analysis, 1995-2040. *Hepatol Int.* 2021;15(2):366-79.
306. Zhou B, Lu Y, Hajifathalian K, Bentham J, Di Cesare M, Danaei G, et al. Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. *The Lancet.* 2016;387(10027):1513-30.
307. De A, Ahmad N, Mehta M, Singh P, Duseja A. NAFLD vs. MAFLD – It is not the name but the disease that decides the outcome in fatty liver. *Journal of Hepatology.* 2022;76(2):475-7.
308. Dongiovanni P, Anstee QM, Valenti L. Genetic predisposition in NAFLD and NASH: impact on severity of liver disease and response to treatment. *Curr Pharm Des.* 2013;19(29):5219-38.