

UNIVERSITE DE LILLE
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE–SANTÉ

Doctorat d'Université

Discipline : Biochimie et biologie moléculaire

**Étude du profil métabolomique des patients atteints de stéatose
hépatique non alcoolique (NASH) : recherche d'hypothèses
physiopathologiques et de biomarqueurs**

Thèse d'Université soutenue publiquement le 11 décembre 2020

par Guillaume GRZYCH

Membres du Jury :

Madame la Professeure Dominique Bonnefont-Rousselot	Rapporteuse
Monsieur le Docteur Hervé Guillou	Rapporteur
Monsieur le Professeur Thierry Brousseau	Examineur
Monsieur le Professeur Bart Staels	Président du jury
Madame la Professeure Anne Muhr-Tailleux	Co-directrice de thèse/ Membre invité
Monsieur le Docteur Joël Haas	Co-directeur de thèse/ Membre invité

**Cette thèse a été préparée à l'UMR1011 Inserm, Institut
Pasteur de Lille, Université de Lille - EGID. 59000 Lille,
France.**

Table des matières

I.	Introduction	11
A.	Contexte actuel de la NASH	11
1.	Épidémiologie.....	11
2.	Physiopathologie	14
a.	Dérégulation métabolique et stéatose.....	15
b.	Inflammation et évolution vers le stade de NASH.....	20
3.	Diagnostic.....	23
a.	Biopsie hépatique	23
b.	Tests non invasifs.....	28
i.	Imagerie	28
ii.	Biomarqueurs.....	30
4.	Traitements	33
a.	Chirurgie	33
b.	Traitements pharmacologiques.....	36
c.	Perspectives thérapeutiques	39
5.	Perspectives et stratégies.....	41
B.	Métabolomique	41
1.	Définition et intérêt.....	41
2.	Approches ciblées et non ciblées	42
3.	Méthodes expérimentales	44
II.	Objectifs de la thèse et organisation du manuscrit.....	46
III.	Travaux de thèse	50
A.	Les acides biliaires	50
1.	Structure et métabolisme des AB.....	50
2.	Les récepteurs des AB	52
3.	Acides biliaires et NAFLD	55
	Manuscrit 1 :.....	57
	Bile acid alterations in nonalcoholic fatty liver disease, obesity, insulin resistance and type 2 diabetes: what do the human studies tell?	57
	Manuscrit 2 :.....	70
	Insulin resistance interacts with NASH in the control of plasma bile acid levels..	70

B.	Les acides aminés	113
1.	Acides aminés, maladie métabolique et NASH.	113
	Manuscrit 3 :.....	115
	Amino acid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease	115
2.	Acides aminés ramifiés et NAFLD	164
	Manuscrit 4 :.....	165
	Plasma BCAA Changes in Patients With NAFLD Are Sex Dependent.....	165
3.	Autres acides aminés.....	179
a.	Ratio de Fisher	182
b.	Voie du glutathion	182
c.	Cycles des folates, de reméthylation et de transsulfuration.	183
4.	Exploration mécanistique des modifications du cycle de la méthionine.	187
	i. Analyse d'expression génique.....	187
	ii. Etude du métabolome dans un modèle murin de NASH.....	190
C.	Métabolomique non ciblée	201
1.	Objectifs	201
2.	Méthodes	202
a.	Cohorte.....	202
b.	Méthodologie analytique	202
c.	Analyses statistiques.....	202
IV.	Conclusion générale	204
V.	Références.....	205

Je remercie l'ensemble des personnes m'ayant accompagné, encadré, soutenu et ayant permis l'accomplissement de ce travail.

Liste des abréviations :

AA	Acides Aminés
AB	Acides Biliaires
BCAA	<i>Branched Chain Amino Acids</i>
BCAT	<i>Branched Chain Amino Transferase</i>
BCKDH	<i>Branched Chain Keto Deshydrogenase</i>
BMI	<i>Body Mass index</i>
CD	<i>Chow Diet</i>
DT2	Diabète de Type 2
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
FXR	<i>Farnesoid X Receptor</i>
GC-MS	Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
HOMA	<i>Homeostasis Model Assessment</i>
HSC	<i>Hepatic Stellate Cells</i>
IR	Insulino-résistance
LC-MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
mTor	<i>Mammalian Target of Rapamycine</i>
NAFL	<i>Non Alcoholic Fatty Liver</i>
NAFLD	<i>Non Alcoholic Fatty Liver Disease</i>
NAS	<i>NAFLD Activity Score</i>
NASH	<i>Non Alcoholic Steato Hepatitis</i>
ND	<i>NASH Diet</i>
PBH	Ponction Biopsie Hépatique
PPAR	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i>
TDM	Tomodensitométrie
TG	Triglycérides
TGR5	Takeda G protein-coupled receptor 5

Résumé de la thèse en français

La NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Disease), enjeu majeur de santé publique, est la complication hépatique du syndrome métabolique. La NAFLD se caractérise par des lésions hépatiques dues à une accumulation de triglycérides dans le foie qui, associée à une inflammation, évolue vers la stéato-hépatite (NASH Non-Alcoholic Steatohepatitis). Les mécanismes moléculaires sous-tendant la pathogenèse et particulièrement le passage de la stéatose à la NASH sont encore mal compris. Une meilleure compréhension de la physiopathologie de la NASH est nécessaire afin d'identifier de potentielles cibles thérapeutiques et des marqueurs non invasifs pour le diagnostic et le suivi de la pathologie. Dans ce contexte, la métabolomique apparaît prometteuse. La métabolomique est l'analyse de l'ensemble des métabolites dans un milieu biologique et complète les autres techniques «omics» pour l'étude des propriétés biologiques dynamiques. Ce travail a pour objectif d'utiliser l'approche métabolomique pour mettre en évidence un profil particulier chez les patients atteints de NASH afin de comprendre la physiopathologie et d'identifier de potentiels biomarqueurs. Pour cela, nous avons utilisé deux approches métabolomiques : 1/ l'approche ciblée, sur plasma, en se focalisant sur deux classes de métabolites, les acides aminés et les acides biliaires, 2/ l'approche non ciblée sur plasmas et foies humains (dont les résultats sont en attente).

Dans la littérature, les acides biliaires (AB) sont étudiés en tant qu'acteurs physiopathologiques et biomarqueurs dans la NASH. Cependant, l'interprétation des résultats est compliquée par l'association étroite de la NASH avec le diabète de type 2 (DT2), la résistance à l'insuline (IR) et l'obésité, contextes métaboliques qui sont aussi associés à des variations d'AB. Nous avons donc cherché à comprendre la relation complexe entre la NASH et les concentrations d'AB, en fonction du statut DT2, et en tenant compte de l'IR et de l'obésité. Par analyses des profils d'AB dans deux cohortes (ABOS n=219, RESOLVE n=58) de patients obèses bien caractérisés (biopsies hépatiques, statut clinico-biologique, effectif élevé), nous montrons que les concentrations plasmatiques des AB sont plus élevées chez les patients NASH vs non-NASH, à la fois chez les patients DT2 et Non-DT2. Par contre, ces augmentations dépendent du degré d'IR, ce qui suggère que la NASH n'entraîne des altérations d'AB qu'en présence d'une IR avancée et indépendamment du statut diabétique.

Dans la littérature, les concentrations plasmatiques d'AA à chaîne ramifiée (BCAA) sont associées avec l'obésité, l'IR et la gravité des lésions hépatiques de la NAFLD. De plus, les concentrations plasmatiques de BCAA diffèrent entre les sexes, qui présentent des susceptibilités différentes aux maladies cardiométaboliques. Nous avons évalué l'association entre les concentrations plasmatiques de BCAA et les stades de gravité de la NAFLD, indépendamment du sexe, de l'IR et de l'obésité. Dans la cohorte RESOLVE, 112 patients obèses ont été divisés en quatre groupes en fonction de la sévérité de la NAFLD, et appariés en fonction du sexe, de l'IMC, de l'IR et de l'HbA1c. Comme attendu, une corrélation positive modeste a été observée entre les concentrations de BCAA et la sévérité de la NAFLD, ainsi qu'un impact majeur du sexe sur les concentrations de BCAA. L'analyse des sous-groupes révèle que, si les concentrations plasmatiques de BCAA augmentent avec la sévérité de la NAFLD chez les femmes, elles ont tendance à diminuer chez les hommes, suggérant un impact du sexe sur la composante métabolique de la NAFLD. L'analyse des autres AA dans la cohorte

met en évidence des altérations plasmatiques d'AA impliqués dans le cycle de la méthionine (sérine, cystéine, ...), dont les mécanismes moléculaires sont en cours d'exploration dans des modèles murins.

L'utilisation de la métabolomique nous a permis de mieux caractériser les interactions complexes de la NASH avec l'IR et le sexe sur les AB et les AA.

Résumé de la thèse en anglais

NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease), a major public health issue, is considered the hepatic manifestation of the metabolic syndrome. NAFLD is characterized by liver injury due to an accumulation of triglycerides in the liver which, when associated with inflammation, can progress to steatohepatitis (NASH Non-Alcoholic Steato Hepatitis). The molecular mechanisms underlying the pathogenesis, and particularly the transition from steatosis to NASH, are still poorly understood. A better understanding of the pathophysiology of NASH is necessary to identify potential therapeutic targets and non-invasive markers for the diagnosis and monitoring of the pathology. In this context, metabolomic approaches are promising. Metabolomics is the comprehensive analysis of metabolites in a biological medium, and it complements other "omics" techniques for the study of dynamic biological processes. The objective of this work is to use the metabolomics approach to highlight a particular profile in NASH patients in order to understand the pathophysiology and identify potential biomarkers. For this, we have used two metabolomic approaches: 1/ the targeted approach, on plasma, focusing on two classes of metabolites, amino acids and bile acids, 2/ the non-targeted approach on human plasma and livers (results are pending).

In the literature, bile acids (BA) are studied as pathophysiological actors and potential biomarkers in the context of NASH. However, interpretation of many cohort studies is complicated by the close association of NASH with type 2 diabetes (T2D), insulin resistance (IR) and obesity, which are also associated with variations in BA. We therefore sought to understand the complex relationship between NASH and BA concentrations, as a function of T2D status, considering IR and obesity as confounding parameters. Through analysis of BA profiles in two cohorts (ABOS n=219, RESOLVE n=58) of well-characterized obese patients (histological analysis of liver biopsies, clinical-biological status, well-powered statistically), we show that plasma BA concentrations are higher in NASH vs. non-NASH patients in both T2D and non-T2D patients. These increases are dependent on the degree of IR, suggesting that NASH causes BA alterations only in the presence of advanced IR and independently of diabetes status.

In the literature, plasma levels of branched-chain AA (BCAA) are associated with obesity, IR, and severity of liver damage in NAFLD. In addition, plasma BCAA concentrations differ between genders, which display different susceptibilities to development of cardiometabolic disease. We evaluated the association between plasma BCAA concentrations and the severity stages of NAFLD, independent of gender, IR and obesity. In the RESOLVE cohort, 112 obese patients were divided into four groups based on NAFLD severity and matched for gender, BMI, IR, and HbA1c. As expected, a modest positive correlation was observed between BCAA concentrations and NAFLD severity, as well as a major impact of gender on BCAA concentrations. Subgroup analysis revealed that while plasma BCAA concentrations increased with the severity of NAFLD in females, they tended to decrease in males, suggesting an impact of gender on the metabolic component of NAFLD. Analysis of other AA in the cohort reveals plasma AA alterations involved in the methionine cycle (serine, cysteine, ...), whose molecular mechanisms are being explored in mouse models.

The use of metabolomics has allowed us to better characterize the complex interactions of NASH with IR and sex on BA and AA.

Résumé de thèse pour le grand public en français

La NAFLD ou maladie du foie gras est une des complications de l'obésité et du diabète dont la prévalence augmente fortement. Les causes de la pathologie restent mal comprises et aucun traitement n'est disponible. De plus le diagnostic n'est possible que par ponction du foie, geste invasif et de haut risque pour le patient. Il y a donc une nécessité de mieux comprendre l'histoire naturelle de la maladie afin d'identifier des cibles thérapeutiques mais également d'identifier des marqueurs pour le diagnostic et le suivi de la pathologie à l'aide d'une prise de sang qui permettront une amélioration de la prise en charge des patients. Dans ce contexte, les approches « omics » désignent des techniques permettant une analyse à large échelle et en simultanée de nombreux composés biologiques et dont la métabolomique fait partie. Il s'agit de l'étude de l'ensemble des métabolites (dont les sucres, les graisses et les acides aminés font partie). Ce travail a pour objectif d'utiliser cette approche sur des patients atteints de NASH afin de mettre en évidence un profil métabolique particulier. Deux grandes classes de métabolites ont particulièrement été étudiées, les acides aminés d'une part et les acides biliaires d'autre part. Des études dans le modèle animal ont également été utilisées afin de comprendre et expliquer les modifications observées chez les patients.

Résumé de thèse vulgarisé pour le grand public en anglais

NAFLD or fatty liver disease is one of the complications of obesity and diabetes, whose prevalence is increasing. The causes of this pathology remain poorly understood and no pharmacological treatments are available. Moreover, diagnosis is only possible by liver biopsy, an invasive procedure that is risky for the patient. There is, therefore, a need to better understand the natural history of the disease in order to identify therapeutic targets and markers for diagnosis and monitoring of the pathology by means of a blood test. This will significantly improve patient management. In this context, omics approaches refer to techniques that allow a large-scale and simultaneous analysis of numerous biological compounds, including metabolomics. This involves the study of all metabolites (including sugars, fats and amino acids). The aim of this work is to use this approach on NASH patients in order to highlight a particular metabolic profile. Two main classes of metabolites have been particularly studied, amino acids on the one hand and bile acids on the other hand. Studies in an animal model were also used to understand and explain the changes observed in patients.

I. Introduction

A. Contexte actuel de la NASH

1. Épidémiologie

La NAFLD (*Non Alcoholic Fatty Liver Disease*) est une pathologie évolutive qui présente différents stades, allant de la stéatose isolée (NAFL) à la stéato-hépatite (NASH) et, dans certains cas, à la fibrose et à la cirrhose. La stéatose hépatique non alcoolique (NASH) est la complication hépatique du syndrome métabolique. Il s'agit de **l'affection hépatique chronique la plus fréquente dans les populations occidentales**. Le diagnostic étant actuellement encore difficile à réaliser, la prévalence de la maladie reste difficile à établir et sous-estimée. Cependant, de récentes études montrent que la prévalence mondiale serait de 25% pour la NAFLD et entre 2 et 6% pour la NASH (1,2) (**Figure 1**). On estime que 20% des patients avec une NAFL développent une NASH et que 20% des patients avec une NASH développeront une cirrhose contre 4% des patients avec une NAFL simple (3). Il n'existe actuellement pas de données épidémiologiques de la NAFLD en France mais des simulations réalisées à partir de la cohorte Constances (projet visant à suivre prospectivement une cohorte généraliste de plus de 200 000 volontaires âgés de 18 à 69 ans en France) estime le nombre de personnes présentant une NAFLD à 14 millions en France, incluant plus de 900 000 NASH, 135 000 cirrhoses et 1760 carcinomes hépatiques (4).

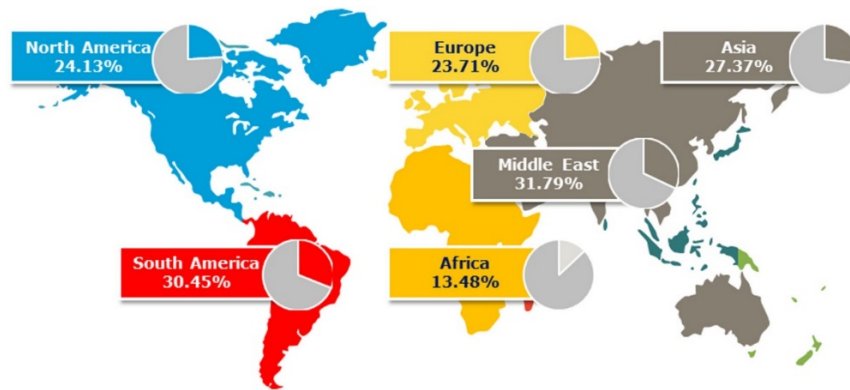


Figure 1. Prévalence mondiale de la NAFLD en 2019 (5)

En revanche, dans les populations obèses et diabétiques, la prévalence de la NAFLD est plus importante (2,6) et le diabète de type 2 (DT2) et l'obésité sont des facteurs de risque de NAFLD. La prévalence des NAFLD est importante parmi les patients diabétiques et est estimée globalement à 55% (7) avec un taux plus important en Europe (Figure 2). La prévalence globale de la NASH parmi les diabétiques est quant à elle estimée à 37%. La prévalence de la NAFLD est également associée à l'obésité et augmente à mesure de l'augmentation de l'indice de masse corporelle (IMC) (8). Les taux de prévalence de la stéatose et de la stéato-hépatite sont d'environ 15 % et 3 %, respectivement, chez les personnes non obèses, 65 % et 20 %, respectivement, chez les personnes présentant une obésité (IMC entre 30,0-39,9 kg/m²), et 85 % et 40 %, respectivement, chez les patients extrêmement obèses (IMC ≥40 kg/m²) (8).

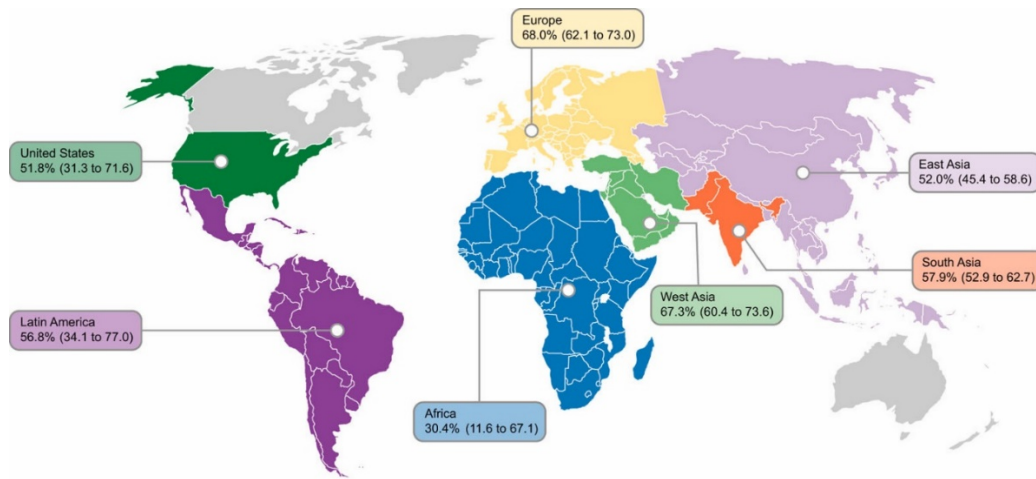


Figure 2. Prévalence mondiale de la NAFLD chez les patients atteints de diabète de type 2 en 2019 (7)

La NAFLD augmente la mortalité par une augmentation de l'apparition de maladies cardiovasculaires extra-hépatiques (9,10) dans le contexte général du syndrome métabolique (11,12). On retrouve chez les patients avec NAFLD une prévalence plus importante de l'hypertension (13), de l'athérosclérose (13), de la maladie rénale (14) ou des complications cardiaques par rapport à la population générale. Par exemple, aux USA, 68 % des patients avec NAFLD présentent une hypertension contre 29% dans la population générale américaine (3) (**Tableau 1**). Des études ont également montré que la NAFLD accroît d'un facteur 8 le risque d'augmentation de l'épaisseur intima-media responsable d'athérosclérose (15) et d'un facteur 3 le risque d'apparition de calcification coronaire (11).

Condition	% Estimated prevalence		
	General US population	Patients with NAFLD	Patients with NASH
Hypertriglyceridemia ^{7,14}	25.1	40.7	83.3
Obesity ^{7,15}	39.8	51.3	81.8
Dyslipidemia ^{7,16}	18.4	69.2	72.1
Metabolic syndrome ^{7,16}	34.3	42.5	70.7
Hypertension ^{7,17}	29.0	39.3	68.0
Type 2 diabetes ^{7,18}	14.0	22.5	43.6

Tableau 1. Composantes clinico-biologiques de la maladie cardio-métabolique associées avec la NAFLD aux Etats-Unis (3)

Les estimations montrent que la **prévalence de la NASH devrait augmenter de 63 % entre 2015 et 2030** et devrait devenir la première cause de transplantation hépatique aux USA dans les années à venir (16), il s'agit donc d'un enjeu majeur de santé publique.

2. Physiopathologie

La stéatose simple (NAFL) est généralement considérée comme bénigne. La NASH associe quant à elle la stéatose à des éléments de nécro-inflammation, considérés histologiquement comme une inflammation lobulaire et un ballonnement des hépatocytes (17,18). La NASH peut également évoluer vers d'autres complications hépatiques telles que la fibrose, la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire (**Figure 3**). La progression de la NAFLD est hétérogène et une réversibilité des stades de la maladie jusqu'à la stéatohépatite est possible. Actuellement, les signaux qui déterminent plus particulièrement le passage de la stéatose simple à la NASH sont encore mal compris (**Figure 3**).

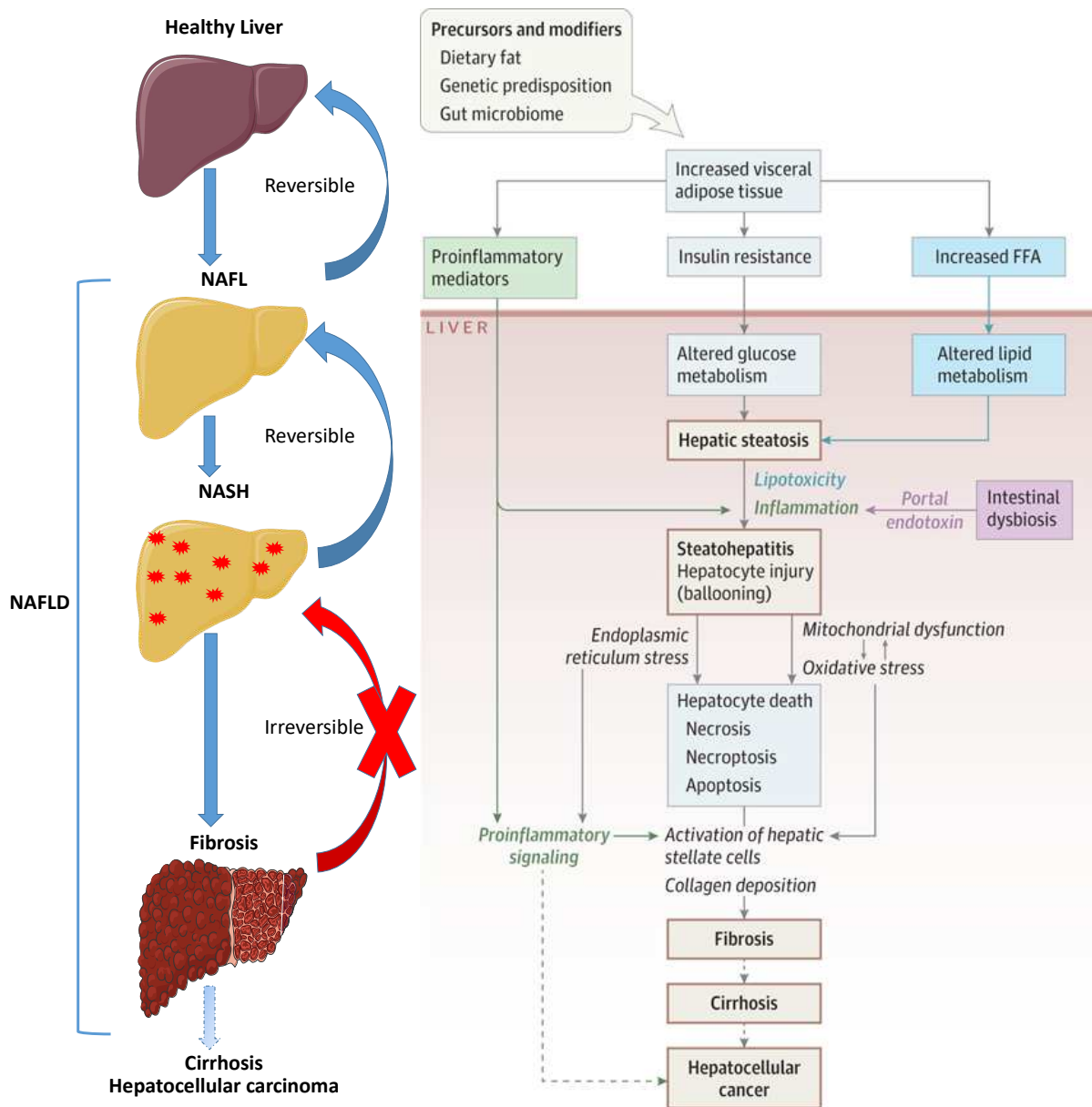


Figure 3. Représentation de l'histoire naturelle de la NAFLD et des mécanismes impliqués (Adapté de Rinella (18)).

a. Dérégulation métabolique et stéatose

Un dysfonctionnement métabolique joue un rôle évident dans le développement de la NAFLD (18). L'acronyme MAFLD (*Metabolic Associated Fatty Liver Disease*) a récemment été proposé comme consensus pour refléter plus précisément les connaissances actuelles sur la stéatose

hépatique associée à un dysfonctionnement métabolique (19). La stéatose hépatique correspond à une accumulation de triglycérides (TG) dans le foie (**Figure 3**). Les TG hépatiques ont plusieurs origines : l'intestin, le tissu adipeux et le foie lui-même. Un taux élevé de graisse corporelle et une forte densité calorique combinés à un mode de vie sédentaire conduisent à l'obésité et à l'insulino-résistance (IR) qui majorent la masse du tissu adipeux. L'IR dans le tissu adipeux augmente le flux d'acides gras libres (AGL) atteignant le foie en raison d'une lipolyse excessive (20), majorée par les adipokines. En plus de cela, s'ajoute l'augmentation de la lipogenèse *de novo* (21) et la diminution de l'oxydation des acides gras qui exacerbe la quantité d'acides gras dans le foie (**Figure 4**).

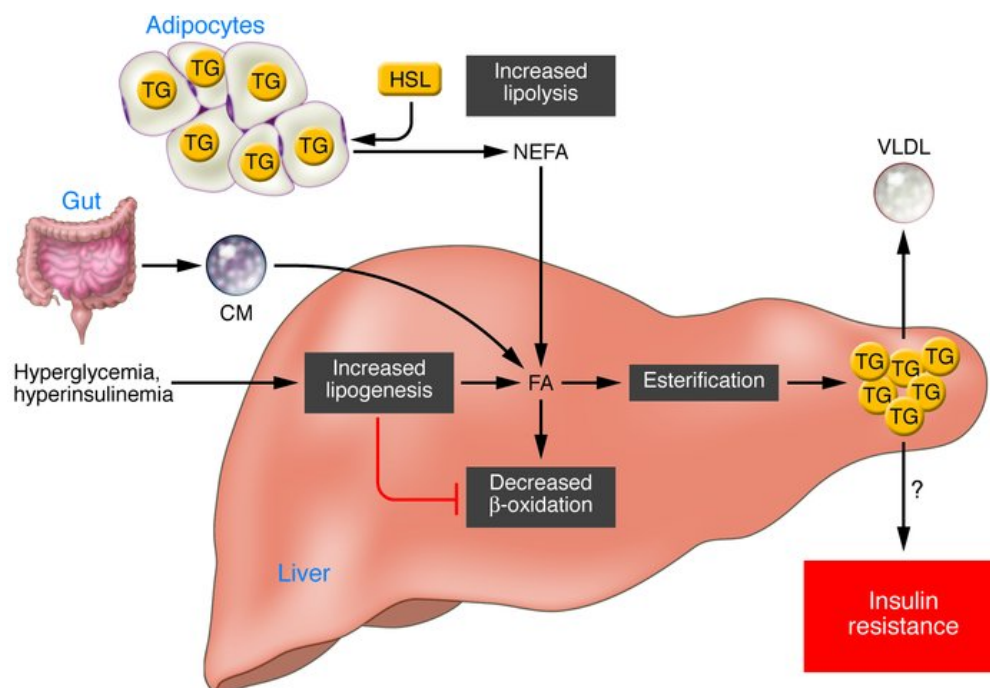


Figure 4. Mécanismes impliqués dans le développement de la stéatose hépatique (22). La stéatose hépatique correspond à une accumulation de triglycérides (TG) dans le foie qui ont plusieurs origines : l'intestin, le tissu adipeux et le foie lui-même.

L'accumulation de lipides dans le foie entraîne la formation de gouttelettes lipidiques intra-hépatiques qui (par leurs fonctions) vont avoir un impact sur la progression de la NAFLD. Les gouttelettes lipidiques sont la principale forme de stockage des lipides dans l'organisme (23,24). Par leurs fonctions, ces organelles ont une action indirecte sur les processus biochimiques utilisant les lipides comme médiateurs tels que la régulation de la lipogenèse, la lipotoxicité, l'homéostasie énergétique et l'inflammation (25,26). Les gouttelettes lipidiques vont donc favoriser la stéatose via la libération intra-hépatique d'acides gras et la synthèse de VLDL et favoriser les lésions hépatiques par la libération de lipides toxiques tels que le diacylglycérol (DAG) ou par l'augmentation du stress du réticulum qui entraîne une réponse pro-inflammatoire (27).

La β -oxydation, voie d'oxydation des acides gras, et la glycolyse aérobie, voie d'oxydation du glucose conduisent à la production d'acétyl-CoA. L'acétyl-CoA est un substrat de la production d'énergie et de la production de FADH₂ et NADH par le cycle de Krebs qui alimentent la chaîne respiratoire mitochondriale. D'autre part, l'acétyl-CoA participe à l'acétylation des histones impliquées dans les modulations épigénétiques. Un déficit de la β -oxydation peut avoir donc avoir un impact sur la production d'énergie métabolique mais également avoir des effets sur l'expression des gènes. La β -oxydation fournit l'acétyl-CoA pour l'acétylation des protéines mitochondriales impliqués dans les étapes finales de la β -oxydation (Énoyl-CoA hydratase, 3-Hydroxyacyl-CoA déshydrogénase et Acétyl-CoA C-acyltransférase). Un défaut de la β -oxydation perturbe ainsi le métabolisme énergétique mitochondrial dans des conditions de jeûne et de régime hyperlipidique ou dans des conditions pathologiques telles que le diabète et le syndrome métabolique (28). D'autre part, le déficit de la β -oxydation entraîne des

modifications épigénétiques dans les hépatocytes comme des modifications de l'acétylation des histones (29) et cette dérégulation épigénétique favorise le développement de la NAFLD (30).

Certains lipides tels que l'acide arachidonique et ses métabolites ainsi que d'autres acides gras polyinsaturés sont des ligands de la famille des récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) qui sont des récepteurs nucléaires. Trois isoformes de PPARs existent (α , β/δ et γ). PPAR α et β/δ sont fortement exprimés dans les hépatocytes contrairement à PPAR γ dont l'expression dans les hépatocytes se retrouve en condition de stéatose (31). Les fibrates sont des agonistes de PPAR α utilisés dans le traitement des hypertriglycéridémies mais aussi comme outils pharmacologiques dans les travaux étudiant le rôle physiopathologique de PPAR α . Chez l'Homme, l'activation de PPAR α dans le foie est associée à une amélioration du profil lipidique avec une augmentation de la concentration du cholestérol-HDL et une diminution du cholestérol total et des triglycérides (31,32). Dans un contexte de NASH, une diminution de l'expression génique de PPAR α dans le foie de patients est corrélée avec les lésions histologiques hépatiques et la régression des lésions hépatiques chez des sujets répondants au traitement de la NASH est associé à une augmentation de PPAR α et de ses gènes cibles (33). De plus, une déplétion spécifique de PPAR α dans le foie dans un modèle murin d'obésité favorise le développement de la NAFLD (34). Une surexpression de PPAR γ dans le foie chez la souris (par utilisation des agonistes de PPAR γ que sont les glitazones : pioglitazone et rosiglitazone) entraîne une amélioration des lésions hépatiques de la NAFLD (stéatose, inflammation et fibrose) (35). Enfin, un traitement par rosiglitazone diminue l'apparition de la fibrose chez des souris sous

régime NASH (régime déficient en méthionine et choline) (36). La famille des PPARs présente donc un intérêt majeur dans la physiopathologie de la NAFLD et des études supplémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents impliqués.

La voie de signalisation mTor (cible de la rapamycine qui est inhibitrice de cette voie) régule de nombreux processus métaboliques et physiologiques dont la lipogenèse. L'activation de mTor entraîne une augmentation de la synthèse des lipides en régulant l'expression de nombreux gènes dont *SREBP* (sterol regulatory element-binding protein). Les souris avec inactivation hépatique spécifique du complexe 1 de mTor (mTorC1) présentent une réduction de l'expression de SREBP et une diminution de la stéatose hépatique (37), ce qui suggère une implication du complexe mTORC1 dans la progression de la NAFLD (38) dont les mécanismes régulateurs sont encore mal connus.

Les études génomiques ont révélé que certains variants génétiques sont des déterminants forts de la NAFLD comme le variant I148M du gène Patatin-Like Phospholipase-3 (*PNPLA3*) ou encore le variant E167K du gène Transmembrane 6 Superfamily 2 (*TM6SF2*) (39). Le variant de *PNPLA3* est en lien avec un remodelage des gouttelettes lipidiques (40) alors que le variant de *TM6SF2* est lié à une réduction de la sécrétion hépatique de l'apolipoprotéine B (41), ceci entraînant un développement de la stéatose hépatique.

Les modulations métaboliques en lien avec la stéatose hépatique sont donc très diverses et impliquent un grand nombre de voies dont les interconnexions ne sont pas encore totalement claires dans l'histoire naturelle de la maladie.

b. Inflammation et évolution vers le stade de NASH

L'apparition d'une inflammation en plus de la stéatose hépatique, entraîne le passage de la NAFL à la NASH. Cette inflammation est induite par des processus oxydatifs et des dérégulations immunitaires sous l'impulsion de signaux pro-inflammatoires pouvant faire évoluer la maladie vers la fibrose. L'apparition d'une nécroinflammation dans la NAFL se manifeste histologiquement sous forme de recrutement et d'activation de cellules pro-inflammatoires (cellules stellaires hépatiques, lymphocytes, macrophages) et d'hépatocytes dysfonctionnels gonflés, ballonnés, pathognomoniques du stade de NASH (42) (**Figure 5**).

Le stress oxydant est un déterminant majeur dans l'inflammation retrouvée dans la NASH lié à un dysfonctionnement mitochondrial par l'accumulation d'intermédiaires lipidiques tels que certains dérivés d'acylcarnitine (43) et par la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) provenant à la fois de la β -oxydation et du dysfonctionnement de la chaîne respiratoire (44,45). Ces ERO vont à la fois promouvoir la dyslipidémie, la résistance à l'insuline mais aussi l'inflammation (46).

L'activation des macrophages du foie (cellules de Kupffer) et des monocytes/macrophages recrutés est associée à la progression de la NAFLD (**Figure 5**). La libération accrue d'acides gras libres par le tissu adipeux augmente la synthèse et le stockage des triglycérides dans les hépatocytes et induit la libération par les hépatocytes de cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines de recrutement des macrophages (CCL2, CXCL10). En plus des hépatocytes, les macrophages eux-mêmes peuvent également produire diverses chimiokines pour alimenter le recrutement accru de macrophages. Les cytokines produites par les macrophages (IL-6, TNF, IL-1 β) peuvent cibler directement les hépatocytes et favoriser la stéatose, l'inflammation et

les lésions hépatocellulaires. De plus, les macrophages peuvent générer des ERO et favoriser le stress oxydant au sein du foie (47). On trouve également dans la NAFLD, une augmentation des cellules dendritiques classiques (cDC) de type 1 et 2, et des cellules T CD8 cytotoxiques associées à l'inflammation lobulaire et à la ballonnisation (48).

Les cellules stellaires hépatiques (*Hepatic Stellate Cells* : HSC) ou cellules de Ito sont des cellules situées dans le parenchyme du foie qui sont quiescentes à l'état normal et contiennent une quantité importante de lipides sous la forme de gouttelettes lipidiques. Ces cellules jouent un rôle dans la fibrogenèse hépatique qui lorsqu'elles sont activées (49), deviennent des myofibroblastes et expriment des cytokines, chimiokines et des protéines de la matrice extracellulaire (50). L'activation des HSC est donc une étape clef dans le développement de la fibrose hépatique. Celle-ci est régulée principalement par des cytokines pro-inflammatoires mais également par le stress oxydant ou par certains lipides tels que le cholestérol (51). De plus, lors de leur activation, les HSC perdent leur contenu en lipide qui se retrouve alors dans le tissu hépatique et majore la stéatose (52).

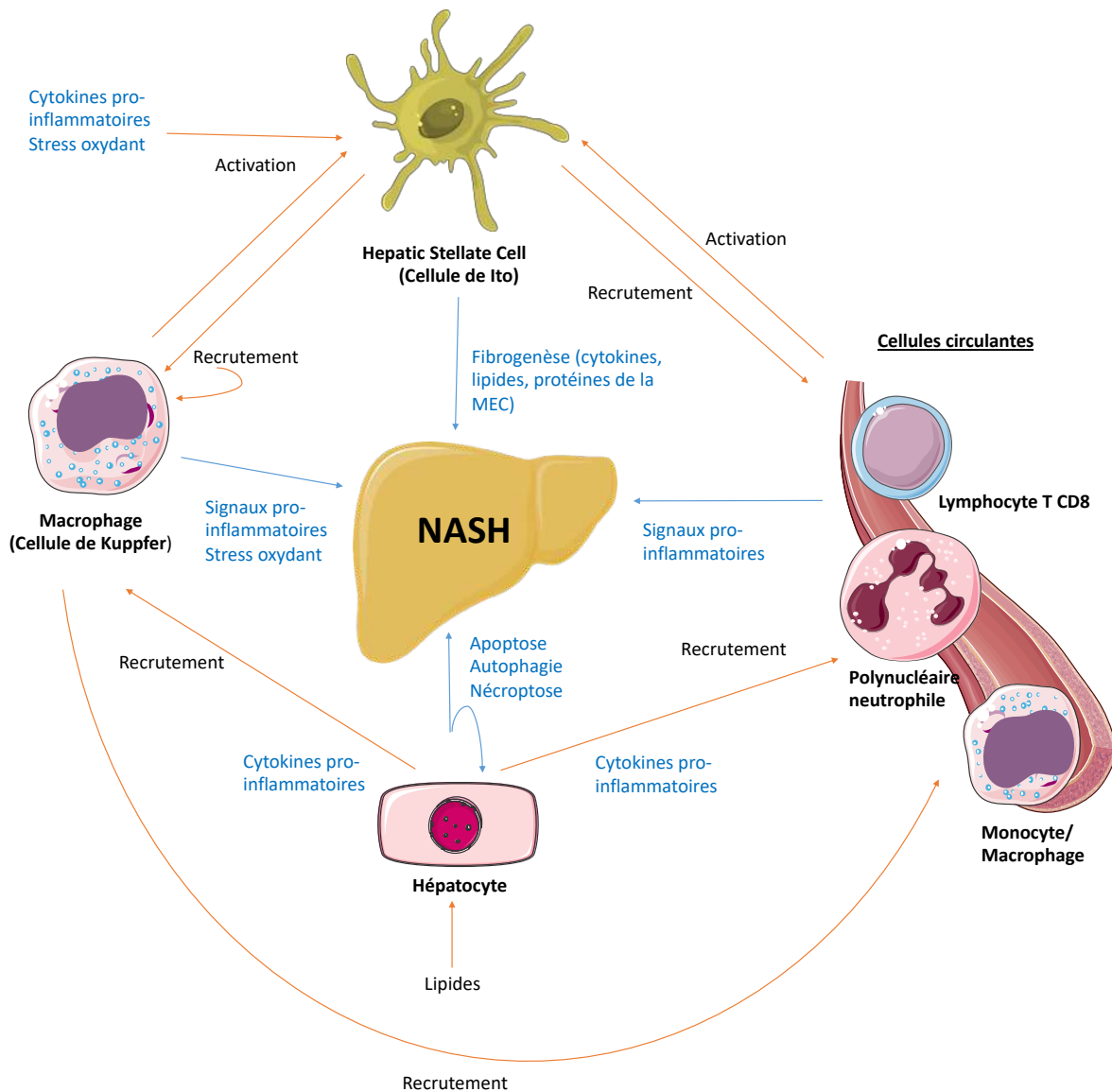


Figure 5. Mécanismes inflammatoires cellulaires impliqués dans physiopathologie de la NAFLD. Signaux pro-inflammatoires induisant le recrutement et l'activation de cellules inflammatoires favorisant le développement de la NASH.

La mort cellulaire des hépatocytes est également impliquée dans le développement de la NAFLD via des modulations de l'apoptose, l'autophagie, la nécroptose et la pyroptose (53). L'activation de la kinase 1 (Apoptosis signal-regulating kinase 1 : ASK1) régulatrice de l'apoptose (mort cellulaire programmée), active des voies de réponse au stress qui aggravent

l'inflammation hépatique, l'apoptose et la fibrose. L'inhibition de l'ASK1 a donc été proposée comme cible pour le traitement de la NASH. Dans un modèle murin de NASH, le selonsertib, un inhibiteur sélectif de l'ASK1, a non seulement amélioré de manière significative les paramètres métaboliques associés à la NASH, mais a également réduit la stéatose hépatique, l'inflammation et la fibrose (54). Comme vue précédemment, la voie mTor a une possible implication dans la physiopathologie de la NAFLD. En plus de son action sur la lipogénèse, l'activation de la voie mTor hépatique augmente les cytokines pro-inflammatoires et inhibe l'autophagie (autophagocytose et recyclage d'éléments cellulaires) (55). La nécroptose (nécrose programmée) dépend des activités kinases des récepteurs RIPK (*receptor interacting protein kinase*) et par opposition à l'apoptose, concerne le processus nécrotique. Les principales molécules de signalisation de la nécroptose, dont RIPK1, RIPK3 et MLKL, ont montré une augmentation dans des modèles murins de NAFLD induit par régime (56).

Il existe donc une dualité dans la physiopathologie de la NAFLD : d'une part par les perturbations métaboliques qui entraînent la stéatose, et d'autre part les processus inflammatoires entraînant l'hépatite et les complications telles que la fibrose et la cirrhose. Cependant, il existe une multitude de mécanismes proposés mais ceux-ci sont encore mal compris.

3. Diagnostic

a. Biopsie hépatique

Actuellement, le diagnostic de NASH repose principalement sur la PBH (Ponction Biopsie Hépatique), par la mise en évidence des lésions histologiques caractéristiques (stéatose, foyers nécrotico-inflammatoires, ballonnisation hépatocytaire et fibrose péri-sinusoïdale)

(Figure 6) permettant la détermination de différents scores histologiques (57–60). Des systèmes de notation histologique ont été successivement mis au point pour la plupart des maladies chroniques du foie tel que le score METAVIR utilisé pour les hépatites chroniques virales (61).

Le système de Brunt est le premier à avoir été utilisé dans le cadre des NAFLD (58) et permet l'évaluation semi-quantitative de la stéatose, du ballonnement et de l'inflammation lobulaire. Trois grades d'activité de la NAFLD sont alors définis : le grade 1 (minime) est caractérisé par la présence de stéatose <66 % sur la PBH, la ballonnisation minime et l'absence ou présence d'inflammation lobulaire ou portale minime ; le grade 2 (modéré) est caractérisé par une stéatose ≥66%, une ballonnisation modérée, une inflammation lobulaire modérée, et une inflammation portale minime à modérée et enfin le grade 3 (sévère) est caractérisé par la stéatose diffuse >66%, la ballonnisation marquée et l'inflammation lobulaire et portale importante. Cependant ce système de score ne prend pas en compte la fibrose hépatique **(Figure 7A)**.

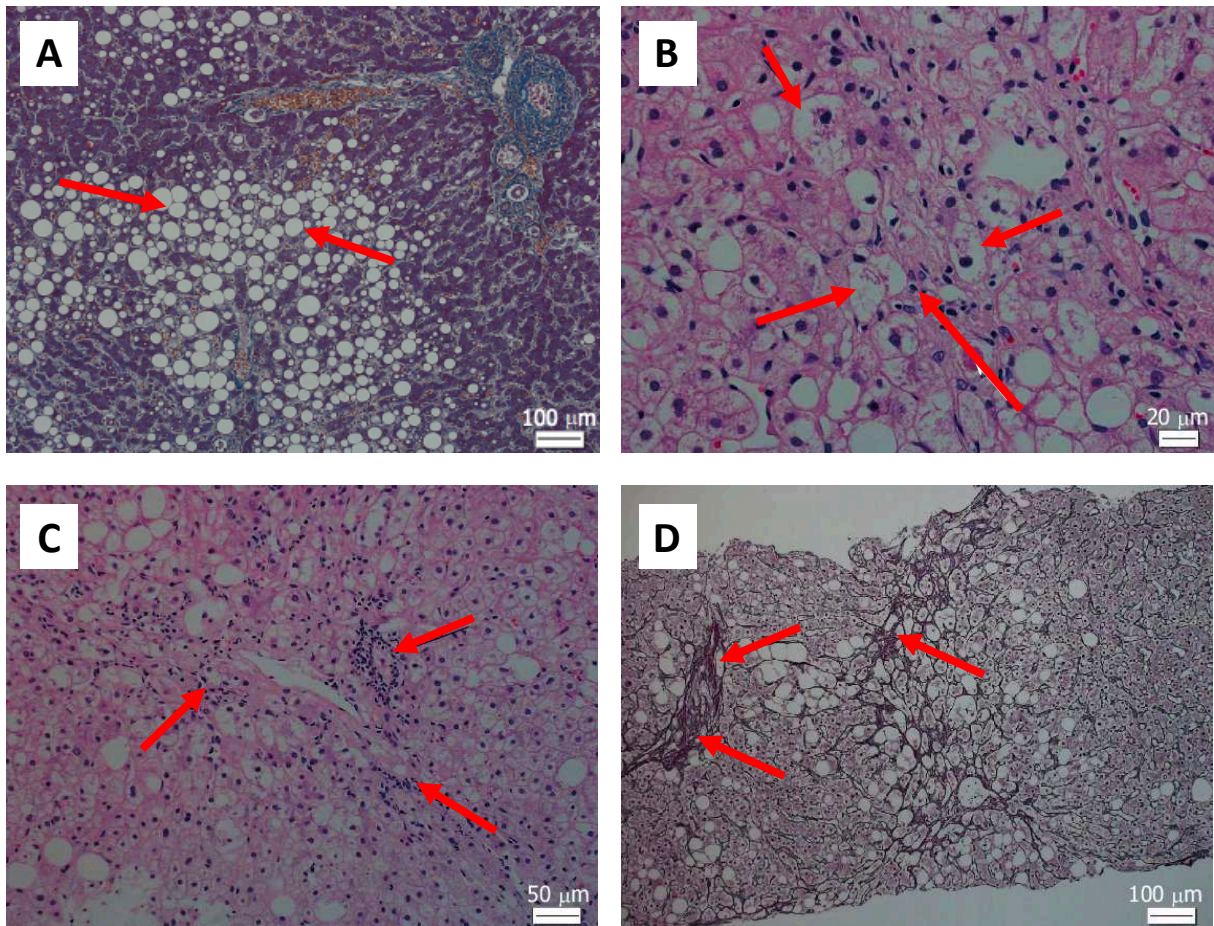


Figure 6. Lésions histologiques observées dans les NAFLD. Images de coupes histologiques de foie obtenues à partir de biopsie hépatique humaine. A : Stéatose hépatique, coloration au trichrome Masson ; les flèches rouges indiquent les macrovésicules de stéatose. B : Ballonisation des hépatocytes, coloration au HE (Hématoxyline/Eosine) les flèches rouges indiquent les hépatocytes ballonisés C : Inflammation lobulaire, coloration au HE (Hématoxyline/Eosine) les flèches rouges indiquent les lésions inflammatoires. D : Fibrose hépatique, coloration à la réticuline, les flèches rouges indiquent les lésions fibrotiques. Adapté de Takahashi (62)

Le score d'activité NAFLD (NAS : NAFLD Activity Score) a ensuite été proposé par Kleiner et Brunt (59) et permet une quantification des lésions afin de déterminer une valeur comprise en 0 et 8 par la somme non pondérée de la stéatose (0,1,2,3), du ballonnement (0,1,2) et de l'inflammation lobulaire (0,1,2,3) mais ne prend pas en compte la fibrose (**Figure 7B**). Un score NAS supérieur ou égal à 5 définit alors le stade de NASH. Le score NAS a été utilisé dans les essais cliniques pour l'évaluation de marqueurs non invasifs chez les patients souffrant

d'obésité morbide (63). Le NAS n'est cependant pas considéré comme un outil de diagnostic, mais plutôt comme une échelle continue d'évaluation de l'activité. En effet, en retirant la fibrose, la NASH se différencie de la NAFL simple par des marqueurs histologiques de lésions hépatiques continues (c'est-à-dire d'activité), la présence de ballonnement et d'inflammation lobulaire. Bien que la probabilité de présence de NASH augmente avec le score NAS, il existe une large zone grise (NAS 3-4) où la NASH peut ou non être présente.

Le score NAS a pour principal limite son côté purement additionnel et quantitatif. Le score SAF (Stéatose Activité Fibrose) (**Figure 7C**) combiné à l'algorithme FLIP (Fatty Liver Inhibition of Progression) (**Figure 7D**) a été récemment proposé et prend en compte également la fibrose. Contrairement au NAS score, le score SAF mesure la stéatose séparément de marqueurs de lésions cellulaires (ballonisation et inflammation lobulaire) et peut mieux préciser le stade d'évolution de la pathologie. L'algorithme FLIP indique que la présence d'une stéatose supérieure à 5% des hépatocytes confirme le diagnostic de NAFLD. Le FLIP indique également que les patients ayant une NAFLD sans ballonisation ou avec une ballonisation minimale et sans inflammation lobulaire sont classés stéatose simple alors que la présence d'une stéatose hépatique associée à une inflammation sévère soit à une ballonisation ou une inflammation lobulaire, définit la NASH (**Figure 7D**).

A

Grade	Stéatose	Ballonisation	Inflammation lobulaire et périportale
1	<66%	Minime	Absence ou minime
2	≥66%	Présente	Minime à modérée
3	≥66%	Importante	Importante

B

NAFLD ACTIVITY SCORE - NAS (NASH CRN) ADDITIVE SCORING SYSTEM	
Steatosis	0-3
	+
Ballooning	0-2
	+
Inflammation	0-3
NAS (0-8)	

C

SAF SCORE (FLIP) DESCRIPTIVE SCORING SYSTEM	
Steatosis	(0-3)
Activity	(0-4)
Ballooning (0-2) + Inflammation (0-2)	
Fibrosis	(0-4)
S₀₋₃ A₀₋₄ F₀₋₄	

D

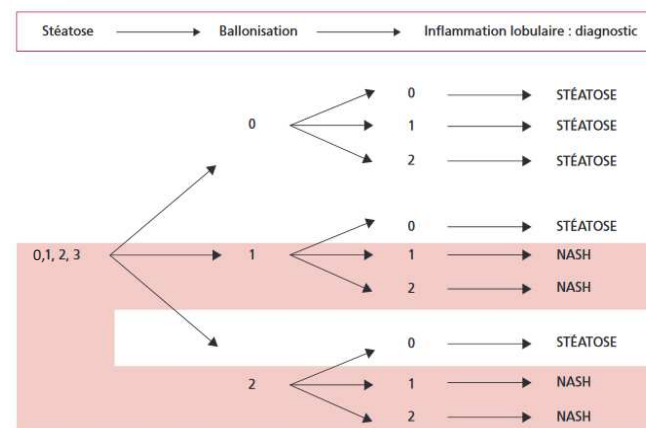


Figure 7. Classification histologique des NAFLD par établissement de scores (64). A : Score de Brunt ; B : Score NAFLD Activity Score (NAS) ; C : Score Stéatose Activité Fibrose (SAF) ; D : Algorithme Fatty Liver Inhibition of Progression (FLIP).

Cependant, la PBH est un geste invasif pouvant induire douleurs et complications (en particulier des hémorragies) pour le patient. De plus, il existe des variabilités inter-opérateurs importantes lors de la détermination des scores histologiques en anatomopathologie (65–67). Enfin, la biopsie n’est pas nécessairement représentative de l’ensemble du tissu hépatique. Il

est donc important de pouvoir proposer des alternatives à la fois pour simplifier et renforcer le diagnostic et le suivi, dans ce contexte les tests non invasifs ont leur importance.

b. Tests non invasifs

Un des enjeux actuels est de pouvoir proposer des tests non invasifs pour le diagnostic et le suivi de la NAFLD. Ces tests sont alors évalués contre la méthode de référence qu'est la biopsie hépatique, sur des critères de performances tels que la sensibilité et la spécificité mais également selon l'indice AUROC (aire sous une courbe ROC). Cette valeur de 0 à 1 mesure l'intégralité de l'aire à deux dimensions située, sous l'ensemble de la courbe ROC traçant les valeurs des taux de vrais positifs et de faux positifs pour différents seuils de classification. Plus ce chiffre est proche de 1 plus le test est performant.

i. Imagerie

L'imagerie présente plusieurs avantages dans le diagnostic des NAFLD (68). C'est une technique sans risque pour le patient, non invasive et elle permet une évaluation du foie dans son intégralité anatomique contrairement à la biopsie.

L'échographie abdominale dans le cadre de la NAFLD montre que l'accumulation de graisse hépatique entraîne une échogénicité accrue, une hépatomégalie et un flou vasculaire intra-hépatique. La stéatose serait détectable lorsque plus de 20 % des hépatocytes contiennent des gouttelettes de graisse histologiquement visibles (69). L'échographie présente une sensibilité de 79% et une spécificité de 86% pour la stéatose hépatique mais ne permet pas de détecter la fibrose ni de différencier la stéatose simple de la NASH.

Le scanner ou la tomodensitométrie (TDM) est plus spécifique que l'échographie dans le diagnostic de la NAFLD. La TDM mesure la NAFLD par la teneur en triglycérides du foie et est utilisé dans le cadre des suivis de patients NASH (70). Cependant la TDM peut confondre le dépôt de graisse dans le foie avec d'autres molécules tels que le fer, le cuivre, le glycogène et l'amiodarone (71). La TDM présente une sensibilité de 82% et une spécificité de 100% pour la stéatose hépatique mais ne permet pas de détecter la fibrose ni de différencier la stéatose simple de la NASH.

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) permet la détection de graisse et d'eau dans le foie. L'IRM présente une sensibilité entre 76 et 90% et une spécificité entre 87 et 91% pour la stéatose hépatique mais ne permet pas de détection de la fibrose ni de différencier la stéatose simple de la NASH.

Le Fibroscan permet la détection de la fibrose hépatique par élastométrie impulsionnelle, et est donc capable de détecter la cirrhose du foie avec une grande précision. Les AUROC pour la détection de la fibrose intermédiaire (F2 et F3) sont respectivement de 0,84 et 0,93, et la sensibilité et la spécificité de la fibrose avancée ($F > 3$) sont de 91% et 75% (72). Dans la détection de la NASH, une étude portant sur 183 patients, le Fibroscan a montré une bonne capacité à discriminer la NASH de la NAFL simple parmi des patients atteints de NAFLD, avec un AUROC de 0,812 (73).

Ces méthodes permettent principalement une mise en évidence de la stéatose par détection de graisse dans le foie. Cependant les performances de ces méthodes sont très dépendantes de la variabilité inter-opérateur. De plus, la NAFLD étant très liée à l'obésité, l'excès de masse adipeuse rend le diagnostic très difficile chez le patient obèse (74).

ii. Biomarqueurs

La recherche de biomarqueurs est un défi actuel dans la NAFLD (75). Un biomarqueur est un paramètre biologique utilisé dans le diagnostic et dans le suivi d'une pathologie donnée. Il doit répondre à certains critères afin de pouvoir être utilisable en routine : il doit être usuellement mesurable, poser ou orienter fortement le diagnostic, permettre un suivi et avoir des variations spécifiques de la pathologie (76). L'avantage par rapport à la biopsie et à l'imagerie est l'objectivité de la méthode qui ne peut pas être dépendante de variabilités inter-observateurs (67).

Score	Formule
FLI	$\frac{e^{0,953 \cdot \log(\text{TG}) + 0,139 \cdot \text{IMC} + 0,718 \cdot \log(\text{GGT}) + 0,053 \cdot (\text{tour de taille}) - 15,745}}{1 + e^{0,953 \cdot \log(\text{TG}) + 0,139 \cdot \text{IMC} + 0,718 \cdot \log(\text{GGT}) + 0,053 \cdot (\text{tour de taille}) - 15,745}} \times 100$
HSI	$8 * \frac{\text{ALAT}}{\text{ASAT}} + \text{IMC} (+2 \text{ pour les femmes, } +2 \text{ si diabète type 2})$
SteatoTest	Formule propriétaire (Bilirubine, GGT, α 2-macroglobuline, Haptoglobine, Apolipoprotéine A1, glycémie à jeun, triglycérides, cholestérol, ALAT, âge, sexe, poids et taille)
APRI	$\frac{\text{ASAT} / \text{Norme ASAT}}{\text{Plaquettes}}$
FIB-4	$\frac{\text{Age} * \text{ASAT}}{\text{Plaquettes} * \text{ALAT}}$
NAFLD fibrosis score (NFS)	$-1,67 + 0,037 * \text{Age} + 0,094 * \text{IMC} + 1,13 * \text{diabete}(0,1) + 0,99 * \frac{\text{ASAT}}{\text{ALAT}} - 0,013 * \text{Plaquettes} - 0,66 * \text{Albumine}$

Tableau 2. Scores non invasifs basés sur des marqueurs biologiques utilisés dans le diagnostic de la NAFLD (77).

Les variants génomiques de *PNPLA3* et *TM6SF2* sont très liés à la prévalence de la NAFLD (39) et peuvent donc orienter le diagnostic. Cependant, la recherche de variants génétiques ne peut se faire à l'heure actuelle que dans des laboratoires spécialisés et la pénétrance n'est pas

complète. En ce sens, des scores utilisant des paramètres biologiques de routine ont été développés.

Dans l'évaluation de la stéatose hépatique, deux scores ont principalement été étudiés, le *Fatty Liver Index* (FLI) et le *Hepatic Steatosis Index* (HSI). Le FLI combine l'indice de masse corporelle (IMC), le tour de taille, les triglycérides (TG) et les GGT (78) (**Tableau 2**) et présente une exactitude (AUROC) de 0,84 pour détecter la stéatose hépatique. Une étude indépendante sur 324 patients a montré que le FLI avait une sensibilité de 76% et une spécificité de 87% dans le diagnostic de la stéatose hépatique (79). Le HSI comprend le sexe, l'alanine aminotransférase (ALT), l'aspartate aminotransférase (AST), l'IMC et le statut diabétique (**Tableau 2**) et présente une exactitude (AUROC) de 0,81 pour détecter la stéatose hépatique (80). Cependant ces deux scores présentent des performances qui sont biaisées car ils sont comparés à l'échographie (en tant que méthode de référence), alors que l'échographie n'a pas de performances parfaites et que l'interprétation des images peut être dépendante de la variabilité inter-opérateur. Un autre score pour l'évaluation de la stéatose hépatique a été évalué contre la biopsie hépatique. Le SteatoTest combine 9 paramètres biochimiques (bilirubine totale, GGT, α 2-macroglobuline, haptoglobine, ALT, le cholestérol total, les TG, le glucose et l'apolipoprotéine AI) avec l'âge, le sexe et l'IMC (**Tableau 2**) et montre une exactitude (AUROC) de 0,79 (81). Cependant ce test présente un coût élevé car en plus du prix des dosages biologiques, l'usage de la formule est déposé par Biopredictive et est payant. Enfin, pour l'évaluation de la fibrose hépatique, plusieurs scores gratuits sont disponibles, l'APRI (*AST to platelet ratio index*) qui utilise les transaminases et la numération plaquettaire, le FIB-4 (*Fibrosis-4*) qui combine le rapport des transaminases, l'âge et la numération

plaquettaire (**Tableau 2**) et le NAFLD fibrosis score (NFS) combine l'âge, l'IMC, le glucose à jeun, les TG et le rapport des transaminases (ALT/AST) (82) présentent des performances équivalentes (AUROC 0,84) au Fibrotest comparé à la biopsie hépatique chez les patients présentant une NAFLD (81).

Concernant la recherche de biomarqueurs spécifiques de la NASH, la cytokératine 18 est un marqueur apoptotique qui a révélé prédire la NASH de façon indépendante avec une spécificité de 99,9% et une sensibilité de 85,7% sur 139 patients (69 avec et 70 sans NASH) (83). Cependant une étude indépendante menée sur 318 patients (dont 199 patients avec NASH) montrent des performances moindres avec une spécificité de 68% et une sensibilité de 58% pour la détection de la NASH et une sensibilité de 54% pour la détection de la fibrose hépatique (84). Des marqueurs de l'inflammation ont été également proposés tels que le TNF, l'interleukine 8 ou le CXCL10 mais ils manquent de spécificité car ils peuvent être influencés par un processus inflammatoire systémique (85). Concernant l'étude des métabolites, les études de métabolome de patients atteints de NASH ont montré un intérêt pour le profil des acides biliaires (AB) (86) et des acides aminés (AA) (87,88). Cependant les AB et les AA sont soumis à des facteurs confondants tels que le diabète (89) et l'obésité (90) qui peuvent influencer le résultat et nécessitent équilibre et ajustement lors des études cliniques. Il n'existe donc actuellement pas de test non invasif spécifique qui pose avec certitude le diagnostic de NASH et permet de suivre les stades de la maladie (81,91). Les stratégies diagnostiques utilisées actuellement sont donc une combinaison de méthodes qui utilise les scores biochimiques chez les patients à risque de NAFLD pour les orienter vers un hépatologue qui utilisera alors des méthodes d'imagerie ou une biopsie pour confirmer le diagnostic (**Figure**

8). Il est donc important de pouvoir proposer des tests biochimiques performants en première ligne afin d'orienter correctement le patient dans la démarche diagnostique.

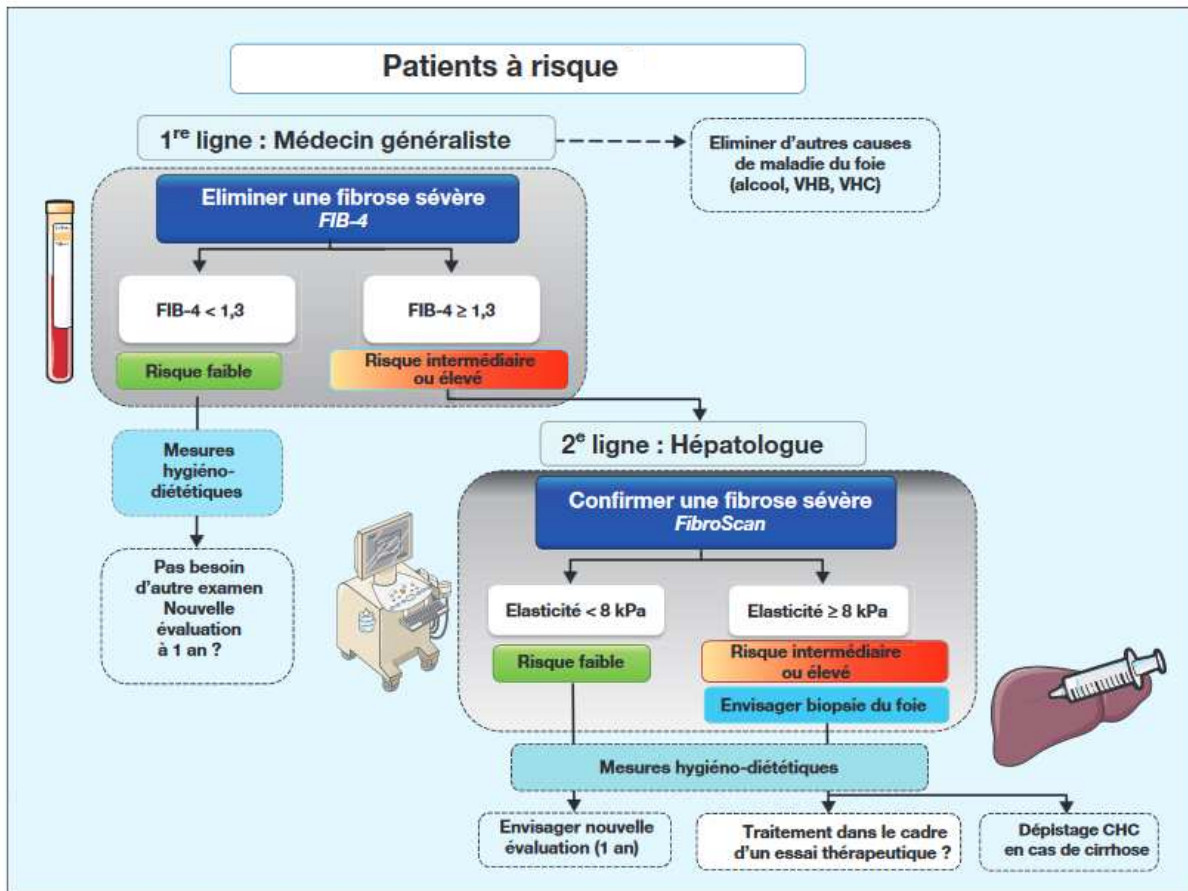


Figure 8. Stratégies diagnostiques selon les stades de NAFLD : biomarqueurs, imagerie et histologie (92).

4. Traitements

a. Chirurgie

La cirrhose associée à la NAFLD fait partie des trois premières indications de transplantation hépatique avec le carcinome hépato-cellulaire et les hépatites virales (93). Cependant il s'agit d'un traitement lourd dont les listes d'attente s'allongent. La NAFLD étant très lié à l'obésité et au syndrome métabolique, la prise en charge repose donc principalement sur la correction

des facteurs du syndrome métabolique et plus particulièrement la restriction calorique et la perte de poids. La prise en charge repose sur la mise en place de règles hygiéno-diététiques (RHD) strictes (94). Le manque d'observance et donc d'efficacité à long terme des RHD nécessite d'envisager d'autres approches thérapeutiques. Actuellement seule la chirurgie bariatrique a montré des résultats efficaces. Plusieurs types de chirurgie bariatriques existent : la gastrectomie partielle, la pose d'un anneau gastrique ou le bypass gastrique (Roux en Y Gastric Bypass : RYGB) (**Figure 9**). Dans le traitement de l'obésité, un suivi de patients (hors contexte de NAFLD) pendant 5 ans a montré une efficacité plus importante de la chirurgie bariatrique que des traitements pharmacologiques dans la régulation des composants du syndrome métabolique suggérant des améliorations métaboliques globales (95). De plus, il a été montré une efficacité plus importante pour le bypass gastrique par rapport à la pose d'un anneau gastrique (96). La chirurgie bariatrique entraîne des modifications métaboliques durables qui précèdent la perte de poids (97). Dans un modèle de mini porc non obèse, la chirurgie bariatrique a montré une amélioration de l'insulino-résistance par une augmentation du glucagon-like peptide-1 (GLP-1) (98) et une modulation du transporteur sodium-glucose confirmée chez des patients ayant bénéficié d'une chirurgie bariatrique (99), ceci indiquant une amélioration de l'homéostasie glucidique pour ce type de chirurgie. Une méta-analyse de métabolome de patients après chirurgie (Roux en Y Gastric Bypass : RYGB) (100) montre des modifications du profil des lipides (avec principalement diminution des acides gras libres et de l'acide palmitique, pro-inflammatoire) (101) et des métabolites du microbiote (diminution du p-crésol et de l'acide hippurique, témoin de la dégradation des protéines par le microbiote) mais également des altérations importantes du

profil des acides aminés (AA) avec en particulier une diminution des acides aminés ramifiés (102,103). Donc la chirurgie bariatrique permet une amélioration métabolique chez les patients obèses pouvant avoir un intérêt dans le cadre de la prise en charge de la NAFLD.



Figure 9. Types de chirurgie bariatrique : anneau gastrique, gastrectomie partielle et Bypass gastrique (104).

Dans le contexte de la NASH, une étude réalisée au CHU de Lille a montré que, un an après la chirurgie bariatrique, une résolution de la NASH a été observée pour 85% des patients (105), avec une plus grande proportion pour les NASH modérées (94%) par rapport aux NASH sévères (70%). Les patients présentaient une perte de poids significative et une résolution de la NASH plus importante avec le bypass gastrique comparé à la pose d'un anneau gastrique. Les améliorations métaboliques observées après bypass gastrique sont une normalisation du lipidogramme, une amélioration de l'insulino-résistance et une diminution de l'inflammation (106). La chirurgie bariatrique reste cependant une intervention lourde, risquée pour le patient pouvant entraîner des complications telles que des déficits nutritionnels (107,108), des calculs biliaires (109), des complications péri-opératoires (110) et des altérations de la

qualité de vie (111,112). Des alternatives thérapeutiques ont donc un intérêt majeur dans la prise en charge de la NASH.

b. Traitements pharmacologiques

Des traitements pharmacologiques sont actuellement testés dans le cadre des NAFLD (**Tableau 3**) (113).

Non pharmacologique	Pharmacologique
<p>Règles hygiéno-diététiques</p> <ul style="list-style-type: none"> • Exercice physique • Régime alimentaire <p>Chirurgie</p> <ul style="list-style-type: none"> • Chirurgie bariatrique • Greffe hépatique 	<p>Agonistes de FXR</p> <ul style="list-style-type: none"> • Acide obéticholique (Phase 3) <p>Agoniste des PPARs</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pioglitazone (Phase 3) • Elafibranor (Phase 3) <p>Analogues de GLP-1</p> <ul style="list-style-type: none"> • Liraglutide (Phase 2) <p>Inhibiteurs de ASK1</p> <ul style="list-style-type: none"> • Selonsertib (Phase 3) <p>Antioxydant</p> <ul style="list-style-type: none"> • Vitamine E (Phase 3) <p>Analogue de FGF21</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pegbelfermin (Phase 2)

Tableau 3. Prises en charge actuelles et essais cliniques des NAFLD, principales cibles et principales molécules étudiées.

L'acide obéticholique est un agoniste du récepteur des acides biliaires (Farnesoid X Receptor : FXR). L'étude FLINT (multicentrique, randomisée) menée sur 141 patients a montré des améliorations hépatiques histologiques mais sans résolution par rapport au placebo. En outre,

les patients sous traitement ont tendance à développer un prurit et présente une augmentation de l'insulino-résistance (augmentation de l'indice HOMA) ainsi qu'une diminution du HDL-cholestérol (114). L'essai de phase 3 sur 1968 patients (étude REGENERATE, multicentrique et randomisée) a révélé que l'acide obéticholique améliore la fibrose et les lésions hépatiques de la NASH et confirme que le principal effet indésirable est le prurit (115).

Les agonistes du récepteur au GLP-1 ou analogues non dégradables du GLP-1 tel que le liraglutide sont principalement utilisés pour traiter le diabète de type 2. Une méta-analyse rétrospective chez les patients atteints de NASH a montré des résultats significatifs pour le liraglutide dans la résolution de la NASH (116). L'étude LEAN de phase 2 (multicentrique, randomisée) a évalué la tolérance et l'efficacité du liraglutide dans la NASH chez 52 patients. L'étude a révélé que les patients sous liraglutide ont une amélioration hépatique et présentent moins d'évolution vers la fibrose que le groupe contrôle (117). L'essai de phase 3 (multicentrique, randomisé) est actuellement en cours (NCT02654665).

Une activation de la voie apoptotique ASK1 a été montrée dans la NASH (Partie B. Physiopathologie, page 25 de ce manuscrit). Dans ce contexte, un inhibiteur spécifique d'ASK1, le selonsertib a été testé. L'essai de phase 2 sur 72 patients (multicentrique, randomisé) montre une réduction de la fibrose chez les patients atteints de NASH (118). Les résultats de l'essai de phase 3 sur plus de 4000 patients (étude STELLAR multicentrique et randomisée) récemment publiés montrent qu'il inhibe sa cible (ASK1), qu'il est bien toléré mais qu'il n'entraîne pas de régression de la fibrose ni ne permet la résolution de la NASH (119).

Concernant les agonistes des PPARs, elafibranor un co-agoniste de PPAR α et de PPAR δ , a montré en phase 2 (étude GOLDEN-505 multicentrique, randomisée) sur 184 patients une amélioration chez les patients atteints de NASH sans cirrhose par rapport au placebo (120). Cependant, l'essai de phase 3 (étude RESOLVE-IT multicentrique et randomisée) sur 1070 patients montre des taux de résolution plus importants pour le placebo par rapport au traitement (121). De nouveaux essais sont actuellement en préparation pour évaluer l'efficacité de la molécule en combinaison avec le liraglutide. La pioglitazone est un agoniste de PPAR γ qui améliore l'insulino-résistance chez les patients diabétiques. Dans un essai de phase 2 sur 70 patients atteints de NASH, la prise de pioglitazone entraîne des améliorations métaboliques et histologiques (122). Des essais de phase 3 sont actuellement en cours de préparation.

Le stress oxydatif est impliqué dans la pathogenèse de la NASH. Par conséquent, la vitamine E en tant qu'antioxydant pourrait être efficace pour le traitement de la NASH (63). Dans l'étude PIVENS de phase 3 (multicentrique, randomisée) menée sur 247 sujets non diabétiques atteints de NASH, la thérapie combinée vitamine E et pioglitazone a permis une diminution significative de la stéatose et de la ballonnisation hépatique par rapport à la vitamine E seule (123). Les essais cliniques supplémentaires montrent cependant des résultats discordants dans la résolution de la NASH et ne permettent pas de confirmer les bénéfices de la vitamine E. Cependant les études s'accordent sur l'absence d'effet de la vitamine E sur la fibrose hépatique (124).

L'hépatokine FGF21 (Fibroblast Growth Factor 21) présente de nombreuses actions métaboliques. Elle favorise l'oxydation des acides gras, réduit la lipogenèse et améliore la

dyslipidémie et l'insulino-sensibilité (125). L'utilisation d'un analogue de FGF21, la pegbelfermin, dans une étude de phase 2 sur 600 patients NASH diagnostiquée par biopsie, (NCT02413372) a permis une réduction de la stéatose hépatique (évaluée par IRM) et des transaminases plasmatiques et a une amélioration de la dyslipidémie (réduction des TG et du C-LDL plasmatiques et augmentation du C-HDL) (126).

Ces molécules montrent une efficacité modérée et sont encore très peu nombreuses et il y a donc une nécessité de proposer d'autres pistes thérapeutiques. Au-delà d'une action hépatique directe sur la NASH, l'ensemble des risques cardio-vasculaires associés doivent être considérés et pris en charge (hypertension, dyslipidémie, diabète ...).

c. Perspectives thérapeutiques

Des alternatives thérapeutiques sont testées dans la NASH telles que les régimes alimentaires spécifiques (127) ou encore la phytothérapie (128) et montrent des résultats encourageants.

Comme vu précédemment, le respect de règles hygiéno-diététique associant exercice physique (129) et régime alimentaire a montré des améliorations chez les patients atteints de NAFLD (130). Dans ce contexte, plusieurs types de régimes alimentaires spécifiques ont été évalués. Une perte de poids par régime hypocalorique avec diminution des acides gras saturés montre une amélioration des patients atteints de NAFLD. En effet, les acides gras saturés doivent être diminués car contrairement aux graisses insaturées et aux glucides, ils augmentent la lipogenèse *de novo* et la teneur en graisses du foie (131). Un régime isocalorique, n'induisant pas de diminution de poids, à très faible teneur en glucides, associé à une forte teneur en lipides et en protéines, a montré qu'il réduisait la lipogenèse hépatique

de novo, augmentait l'oxydation des acides gras et réduisait significativement le contenu hépatique en lipides (132). Ce régime isocalorique a également modifié la composition et la fonction du microbiote intestinal et pourrait contribuer à l'amélioration de l'état métabolique général et à la diminution des lésions hépatiques (132). Le régime cétogène est un régime alimentaire à très basse teneur en glucides avec un apport important de lipides et de protéines utilisé pour la perte de poids. Il a été démontré chez l'homme que ce régime cétogène améliore la NASH, (133) et même si la perte de poids apparaît comme un impact bénéfique évident sur la régression de la NASH, certains mécanismes métaboliques sous-jacents restent inconnus. Le régime cétogène induit une protéolyse et pourrait avoir un impact sur le métabolome et plus particulièrement sur le pool d'acides aminés et entraîner des altérations métaboliques associées impliquant des voies physiopathologiques de la NAFLD non encore élucidées (134).

En phytothérapie, les extraits de plantes utilisés dans le cadre de la NAFLD ont principalement un rôle anti-inflammatoire. Plusieurs essais cliniques sont actuellement enregistrés concernant la phytothérapie pour le traitement de la NAFLD. Le gingembre pour son activité anti-oxydante, est actuellement évalué dans la NAFLD (135) (NCT02535195). La berbérine, issue de la pharmacopée asiatique a montré à la fois dans un modèle murin et chez des patients atteints de NAFLD une atténuation de la stéatose hépatique par modulation de la voie AMPK-SCD1 (136) (NCT04049396, NCT03198572). La curcumine, un polyphénol, extraite du curcumin, possède des propriétés anti-inflammatoires et anti-oxydantes et a montré une amélioration biologique (avec baisse des transaminases et amélioration du lipidogramme) des patients NAFLD ainsi qu'une diminution de la stéatose (137) (NCT03864783). La silymarine,

anti-oxydant extrait du chardon marie (NCT02006498) a montré lors d'un essai clinique, une amélioration biologique par diminution des transaminases plasmatiques par rapport au groupe témoin (138).

En absence de preuves formelles de ces alternatives et perspectives thérapeutiques, il est nécessaire d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et voies physiopathologiques impliquées dans la NASH.

5. Perspectives et stratégies

Actuellement, une meilleure compréhension de la physiopathologie de la NASH est nécessaire afin d'identifier de potentiels cibles thérapeutiques mais également d'identifier des marqueurs non invasifs pour le diagnostic et pour le suivi des évolutions de la pathologie chez les patients. Dans ce contexte, les stratégies «*omics*» et plus particulièrement la métabolomique peuvent se révéler prometteuses.

B. Métabolomique

1. Définition et intérêt

La métabolomique est l'étude de l'ensemble des métabolites (petites molécules avec un poids moléculaire inférieur à 1 kDa) présents dans un organite, une cellule, un tissu, un organe ou un organisme (139). La métabolomique complète les techniques «*omics*» (génomique, transcriptomique, protéomique) permettant l'étude de propriétés biologiques dynamiques (**Figure 9**). Ce domaine émergent fournit des données complémentaires pour une approche intégrée afin d'appréhender des voies biologiques dans toutes leurs dimensions (génétique, expression génique, protéines, lipides, ...) (76). La métabolomique a déjà montré un grand

potentiel dans les études de toxicité des médicaments, la modélisation de la maladie et le diagnostic, et peut être intégrée aux données génomiques et protéomiques à l'avenir pour fournir une compréhension approfondie des systèmes, des voies et de leurs interactions fonctionnelles dynamiques (140). Par exemple, l'approche intégrée a été utilisée pour reconstruire des réseaux biologiques dans le cadre de l'exploration du diabète type 2 en combinant et en confrontant des données omics chez des patients sains contre des patients diabétiques de types 2 (**Figure 10**).

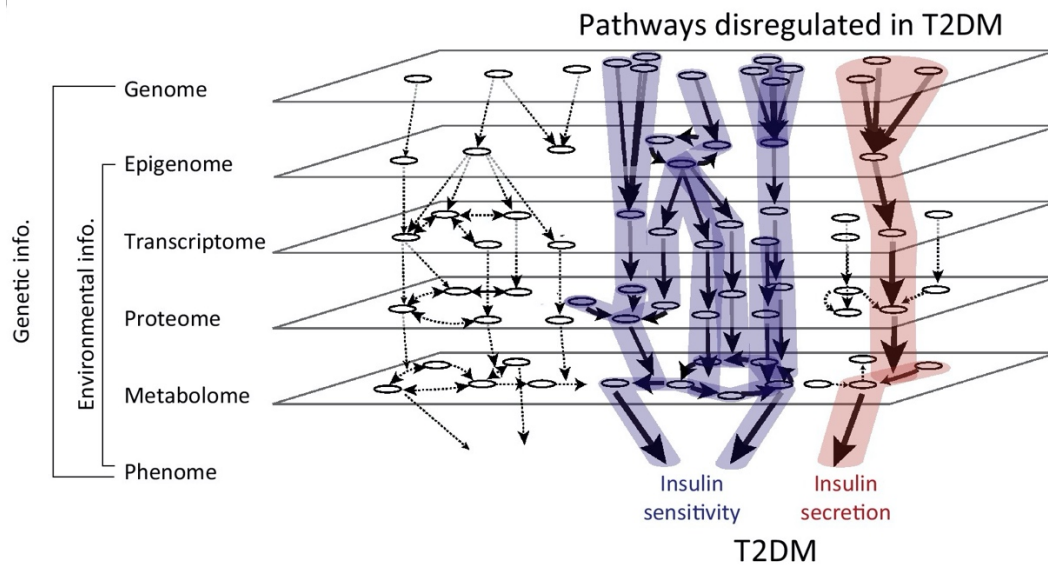


Figure 10. Stratégies *omics* et place de la métabolomique dans les reconstructions de réseaux biologiques(140). Exemple de l'étude multi-omics (génomique, épigénomique, transcriptomique, protéomique et métabolomique) chez des patients diabétiques qui permet d'identifier les voies métaboliques impliquées dans la sensibilité à l'insuline (en bleu) et dans la sécrétion de l'insuline (en rouge).

2. Approches ciblées et non ciblées

Il existe deux approches en métabolomique : l'analyse globale, dite « non ciblée » sans a priori et l'analyse « ciblée » (141). L'analyse globale non ciblée permet de détecter un grand nombre de métabolites mais ne permet pas de les quantifier : les concentrations sont alors relatives

(rapport numérique entre les groupes étudiés). Cette approche a l'avantage de pouvoir détecter un grand nombre de métabolites connus mais également des métabolites non identifiés (pics inconnus), qu'il est possible d'identifier a posteriori par des expérimentations complémentaires (structures moléculaires ...) (**Figure 10**). Cependant, cette approche ne permet pas de quantification exacte et les analyses manquent parfois de reproductibilité. L'approche ciblée permet la détection et la quantification d'un nombre restreint de métabolites qui est fonction des standards internes utilisés dans le protocole expérimental. L'avantage de cette méthode est la forte reproductibilité et l'obtention de la concentration absolue des métabolites mais se limite à un nombre fini de métabolites (**Figure 11**). L'utilisation de l'une ou l'autre des approches sera donc dépendante de la question scientifique posée. Si l'objectif est la découverte sans a priori de métabolites impliqués dans un processus biologique donné, l'approche non ciblée apparaît celle de choix. Si la question biologique est précise, la métabolomique ciblée est plus adaptée.

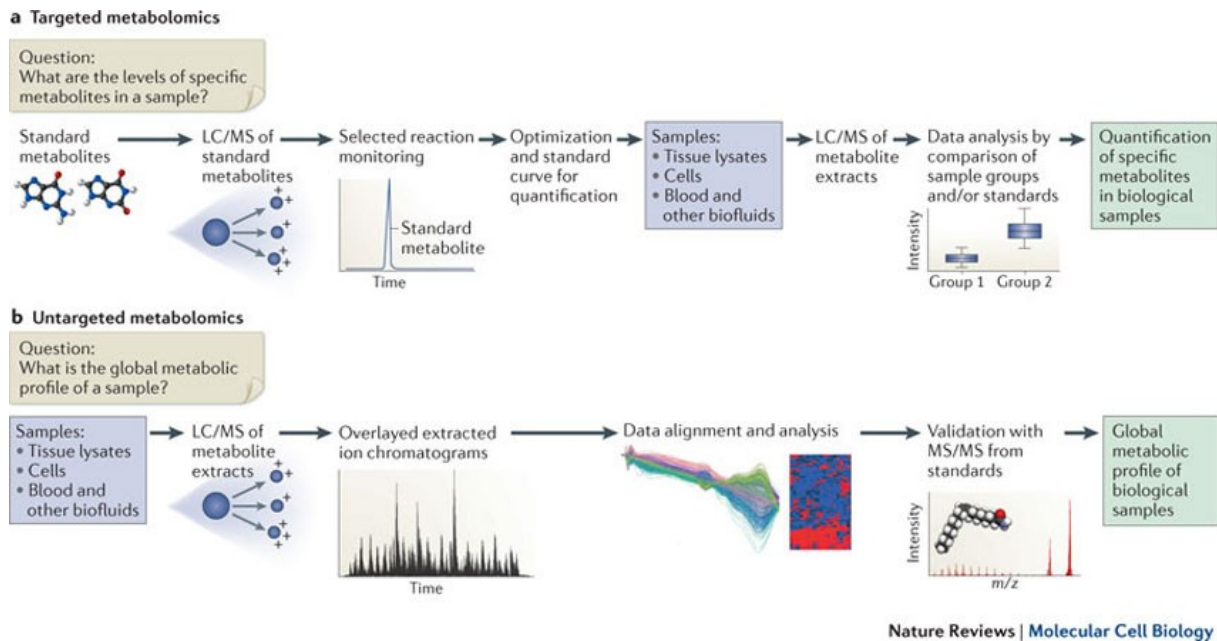


Figure 11. Stratégies métabolomiques (approches ciblées et non ciblées) (142). (a) L'approche ciblée permet la détection et la quantification d'un nombre restreint de métabolites qui est fonction des standards internes utilisés dans le protocole expérimental. (b) L'analyse globale non ciblée permet de détecter un grand nombre de métabolites mais ne permet de les quantifier que de façon relative.

3. Méthodes expérimentales

Les deux principaux outils permettant les analyses métabolomiques sont la résonance magnétique nucléaire (RMN) (143) et la chromatographie couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS et LC-MS) (144). L'utilisation de l'approche métabolomique nécessite la combinaison d'une technique séparative d'une part (chromatographie en phase gazeuse GC ou liquide LC), et d'une technique analytique d'autre part (spectrométrie de masse). Il est également possible de travailler sans étape de séparation (en injection directe : DI) ou directement par RMN. L'analyse par SM présente l'avantage d'être plus sensible que la RMN (Figure 11). ; elle permet donc l'analyse d'un plus grand nombre de métabolites présents en concentrations moins élevées que l'analyse par RMN, mais aura une moins bonne spécificité que cette dernière (145). Le choix de la technologie repose donc en partie sur les

concentrations attendues de métabolites dans le milieu biologique d'intérêt. Par exemple, dans le cadre du dosage des acides biliaires plasmatiques, les concentrations attendues sont de l'ordre de la nanomole par litre et seule la spectrométrie de masse a une sensibilité suffisante pour les détecter dans un volume classique d'échantillon (autour du mL) (**Figure 12**).

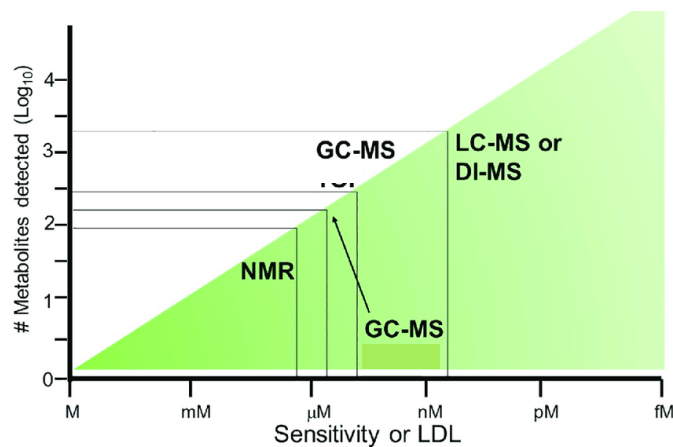


Figure 12. Sensibilité relative des technologies utilisées en analyse métabolomique. La résonance magnétique nucléaire (RMN), la chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse (GC-MS) et la chromatographie en phase liquide (LC)-MS ou en injection directe (DI-MS) sont les plateformes métabolomiques les plus couramment utilisées, avec des limites de détection variables (146). Le choix de la technologie dépend de la sensibilité de la méthode et repose sur les concentrations attendues de métabolites dans le milieu biologique d'intérêt.

Les avancées technologiques en spectrométrie de masse et en RMN permettent aujourd'hui l'analyse simultanée d'un grand nombre de métabolites. Cependant, ces technologies génèrent de grandes quantités de données qui nécessitent l'utilisation d'outils bio-statistiques et bio-informatiques.

Une expérience d'analyse de métabolome se compose donc de plusieurs parties : le design expérimental qui permet la sélection des échantillons (sujets, milieux biologiques), le

traitement des échantillons, l'analyse des échantillons, l'identification des métabolites, le traitement des données par des outils bioinformatiques et biostatistiques (**Figure 13**) (147).

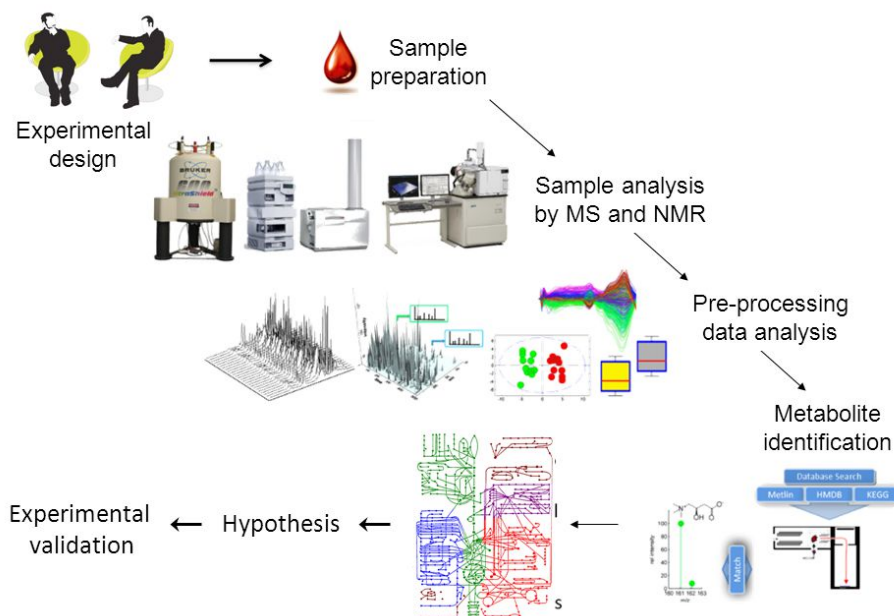


Figure 13. Étapes d'une analyse métabolomique (148). Une expérience d'analyse de métabolome se compose de plusieurs parties : le design expérimental qui permet le choix des échantillons, le traitement des échantillons, l'analyse des échantillons, l'identification des métabolites, le traitement des données par des outils bioinformatiques et biostatistiques.

II. Objectifs de la thèse et organisation du manuscrit.

L'objectif de ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre général de la compréhension de la physiopathologie mais aussi dans l'identification de potentiels biomarqueurs dans la NAFLD, en particulier le passage de la Stéatose simple (NAFL) à la Stéatose Hépatique Non Alcoolique (NASH) ainsi que la fibrogenèse. Pour cela nous utiliserons l'approche métabolomique afin de mettre en évidence un profil métabolique particulier chez les patients à différents stades de la NAFLD. L'originalité de ce travail repose sur l'utilisation de cohortes de patients à effectifs importants, avec des stades de NAFLD caractérisés par biopsie hépatique permettant de stratifier la pathologie à différents niveaux et avec un contrôle des facteurs confondants de la

pathologie que sont le DT2, l'insulino-résistance, l'obésité mais également le sexe, grâce un recueil important de données clinico-biologiques et thérapeutiques.

Dans la première partie de ce travail, nous nous sommes intéressés aux acides biliaires (AB) dans le cadre de la NAFLD. Nous avons tout d'abord fait une revue de la littérature sur les études de cohortes s'intéressant aux AB dans le contexte de la NAFLD, de l'obésité et du DT2 qui a conduit à la publication du **manuscrit 1** dans le journal *Current Opinion in Lipidology*. Le **manuscrit 1** pose la problématique des discordances de résultats liés aux facteurs confondants. Nous avons donc cherché à comprendre la relation complexe entre la NASH et les concentrations d'AB, en fonction du statut DT2, et en tenant compte de l'IR et de l'obésité. Par analyses des profils d'AB dans deux cohortes (ABOS n=219, RESOLVE n=58) de patients obèses bien caractérisés (biopsies hépatiques, statut clinico-biologique, effectif élevé), nous montrons que les concentrations plasmatiques des AB sont plus élevés chez les patients NASH vs non-NASH, à la fois chez les patients DT2 et Non-DT2. Ces augmentations dépendent du degré d'IR, ce qui suggère que la NASH n'entraîne des altérations d'AB qu'en présence d'une IR avancée et indépendamment du statut diabétique. Ces données ont fait l'objet de la rédaction du **manuscrit 2** actuellement en révision dans *Journal of Hepatology Reports*.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous nous sommes intéressés aux acides aminés (AA) dans le contexte de la NAFLD. Nous avons tout d'abord réalisé une revue de la littérature sur les voies métaboliques impliquant les AA participant à la physiopathologie de la NAFLD. Ce travail fait actuellement l'objet de l'écriture du **manuscrit 3** et se focalise sur 5 voies métaboliques pouvant avoir un intérêt dans l'étude de la physiopathologie de la NAFLD que sont le catabolisme des acides aminés ramifiés, le cycle de la méthionine, le cycle de Krebs, la

synthèse du glutathion et le cycle de l'urée. Notre revue montre, entre autre, des résultats sont discordants concernant les variations d'AA ramifiés (BCAA pour *Branched-Chain Amino Acids*) en cas de NAFLD dans les études de cohorte. Ces discordances peuvent être liées aux facteurs confondants de la NAFLD que sont l'obésité, l'IR et le sexe. Aussi, nous avons évalué l'association entre les concentrations plasmatiques de BCAA et les stades de gravité de la NAFLD, indépendamment du sexe, de l'IR et de l'obésité. Dans la cohorte RESOLVE, 112 patients obèses ont été répartis en quatre groupes en fonction de la gravité de la NAFLD, et appariés en fonction du sexe, de l'IMC, de l'IR et de l'HbA1c. Comme attendu, une corrélation positive modeste a été observée entre les concentrations de BCAA et la gravité de la NAFLD, ainsi qu'un impact majeur du sexe sur les concentrations de BCAA. L'analyse des sous-groupes révèle que, si les concentrations plasmatiques de BCAA augmentent avec la gravité de la NAFLD chez les femmes, elles ont tendance à diminuer chez les hommes, suggérant un impact du sexe sur la composante métabolique de la NAFLD. Ces résultats ont fait l'objet de la publication du **manuscrit 4** dans *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Enfin, une étude de métabolome ciblé sur les AA dans la cohorte de patients Resolve pour l'étude des AA ramifiés a également mis en évidence des variations dans les AA impliqués dans le cycle de la méthionine. L'utilisation conjointe de l'analyse de transcriptome hépatique sur les mêmes patients, montre un potentiel rôle des gènes codants pour des enzymes impliquées dans la voie de la reméthylation, dans la progression de la NAFLD. Ces variations d'AA identifiés chez l'Homme sont actuellement étudiés dans un modèle murin de NASH où après la mise au point du dosage, nous avons mesuré le métabolome ciblé des AA à la fois sur plasma et sur tissu hépatique. Les variations de métabolome retrouvées chez la souris sont en accord

avec celles retrouvées chez l'Homme et permettront une utilisation de ce modèle pour comprendre les mécanismes moléculaires en lien avec le profil métabolique retrouvé et plus particulièrement avec PPAR α .

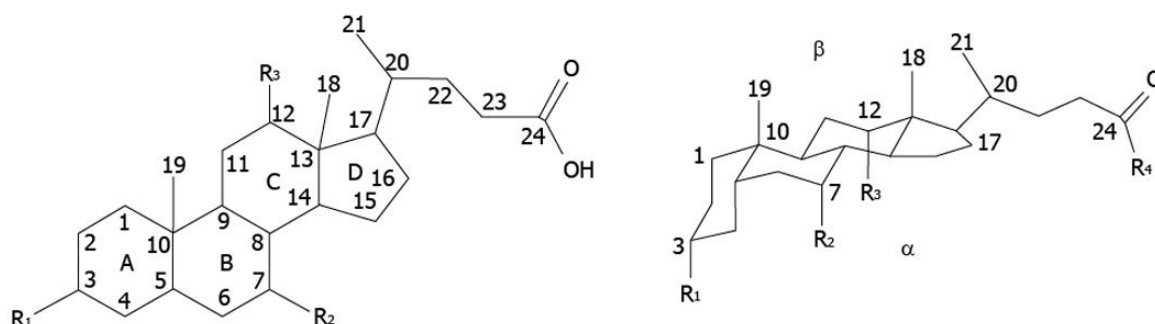
Dans la dernière partie de ce travail, nous avons utilisé l'approche métabolomique non ciblée sur une cohorte humaine de patients NASH diagnostiqués par biopsie et avec une caractérisation clinico-biologique complète. Cette approche sera utilisée à la fois sur le plasma et sur le tissu hépatique des patients afin d'identifier de nouvelles voies impliquées dans la physiopathologie de la NAFLD.

III. Travaux de thèse

A. Les acides biliaires

1. Structure et métabolisme des AB

Les acides biliaires (AB) sont des dérivés du cholestérol, stéroïdes à 24 atomes de carbones. Leur diversité repose sur la position des atomes d'hydrogène ou des fonctions hydroxyles en position 3, 7 et 12 (R1, R2, R3) du noyau stérol ainsi que de la nature du groupe sur la chaîne latérale en position 24 (R4) donnant des AB libres ou des AB conjugués à la taurine ou à la glycine (**Figure 14**).



Nom	R1	R2	R3	R4
Acide Cholique (CA)	α -OH	α -OH	OH	OH
Acide Chénodeoxycholique (CDCA)	α -OH	α -OH	H	OH
Acide Deoxycholique (DCA)	α -OH	H	OH	OH
Acide Ursodeoxycholique (UDCA)	α -OH	β -OH	H	OH
Acide Litocholique (LCA)	α -OH	H	H	OH
Acide Hyocholique (HCA)	α -OH	α -OH	α -OH	OH
Acide Hydéoxycholique (HDCA)	α -OH	H	H	OH

Figure 14. Structure des acides biliaires libres les plus abondants chez l'humain (149). Chaque AB peut être conjugué sur le C24 à la glycine (majoritairement chez l'Homme) ou à la taurine (majoritairement chez le rongeur) pour former les AB conjugués.

Les AB sont synthétisés à partir du cholestérol, par une suite de réactions enzymatiques réalisées par le foie ou par le microbiote intestinal. Le marqueur de la synthèse des AB est le 7α -hydroxy-4-cholesten-3-one, (C4) (**Figure 15**). Les acides biliaires primaires sont synthétisés dans les hépatocytes puis conjugués à la glycine ou à la taurine avant d'être stockés dans la vésicule biliaire. En période post prandiale, ils sont libérés dans l'intestin grêle pour permettre la digestion et l'absorption des lipides. Au niveau de l'iléon terminal, les acides biliaires sont déconjugués et sont transformés par les enzymes du microbiote intestinal pour aboutir aux acides biliaires secondaires (**Figure 15**). La majorité des AB est réabsorbée par transport actif ou passif pour retourner au foie et se retrouver dans la bile par le cycle entéro-hépatique. En retournant au foie par la veine porte, une partie des AB échappe à la recapture des hépatocytes et passe dans la circulation sanguine systémique par laquelle ils atteignent les organes périphériques et outre leur rôle dans l'absorption intestinale des lipides, les AB exercent un rôle de signalisation en se fixant et en modulant l'activité de leurs récepteurs : FXR et TGR5.

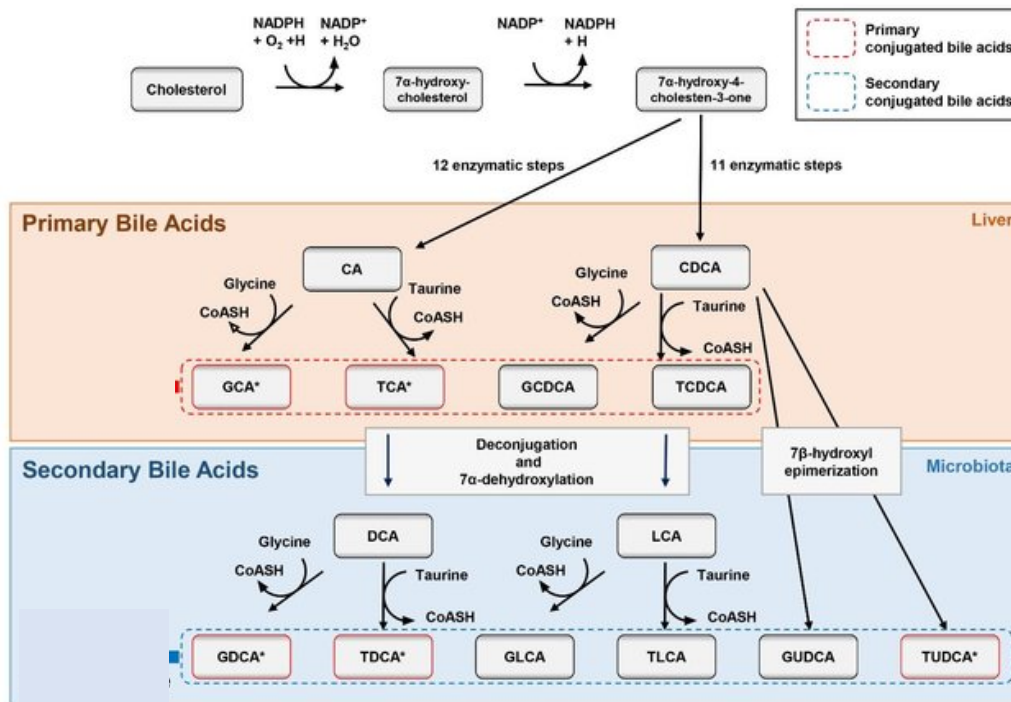


Figure 15. Métabolisme des acides biliaires (150). Les acides biliaires primaires sont synthétisés dans les hépatocytes puis conjugués à la glycine ou à la taurine avant d'être stockés dans la vésicule biliaire. En période post prandiale, ils sont libérés dans l'intestin grêle pour permettre la digestion et l'absorption des lipides. Au niveau de l'intestin distal, les acides biliaires sont déconjugués et sont transformés par les enzymes du microbiote intestinal pour aboutir aux acides biliaires secondaires.

2. Les récepteurs des AB

Le récepteur FXR (Farnesoid X Receptor) appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires. Il possède un domaine de transactivation (AF1), un domaine de liaison à l'ADN (DBD) et un domaine de liaison à ses ligands et à la dimérisation (LBD). FXR est codé par le gène NR1H4. Les AB activent ce récepteur qui se lie à l'ADN, sur ses éléments de réponse (FXRE) présents dans le promoteur de gènes cibles. L'activation de FXR favorise la sécrétion des AB et diminue leur synthèse hépatique (Figure 15) par augmentation de l'expression de FGF15 qui active l'hétérodimère FGFR4/ β Klotho et SHP, qui rétroinhibe alors l'expression de l'enzyme CYP7A1 (151). L'activation de FXR joue également un rôle dans l'homéostasie glucidique en favorisant la sécrétion d'insuline, en augmentant la néoglucogenèse hépatique et l'absorption intestinale du glucose et en diminuant la glycolyse hépatique et la sécrétion

intestinale de GLP-1 (152) (**Figure 16**). L'activation de FXR entraîne une réduction de la lipogenèse, de l'inflammation et du développement de la fibrose, ce qui peut avoir un effet bénéfique sur la NAFLD (153).

Le récepteur TGR5 (Takeda G protein-coupled receptor 5) est un récepteur membranaire couplé à une protéine G. Son activation entraîne la libération de l'unité α de la protéine G et active l'adénylate cyclase qui augmente la production d'AMPc à l'origine de l'activation des voies de signalisation liées à la protéine kinase A (PKA). Une fois activée, la PKA induit la phosphorylation de la protéine «cAMP-response-element-binding» qui induira la transcription de gènes cibles. L'activation de TGR5 module l'homéostasie glucidique en favorisant la synthèse et la sécrétion de GLP-1 dans l'intestin (**Figure 16**), et augmente la dépense énergétique dans le tissu adipeux brun. Enfin, TGR5 a une action sur l'inflammation par une diminution de l'activation des monocytes et des macrophages du foie (152).

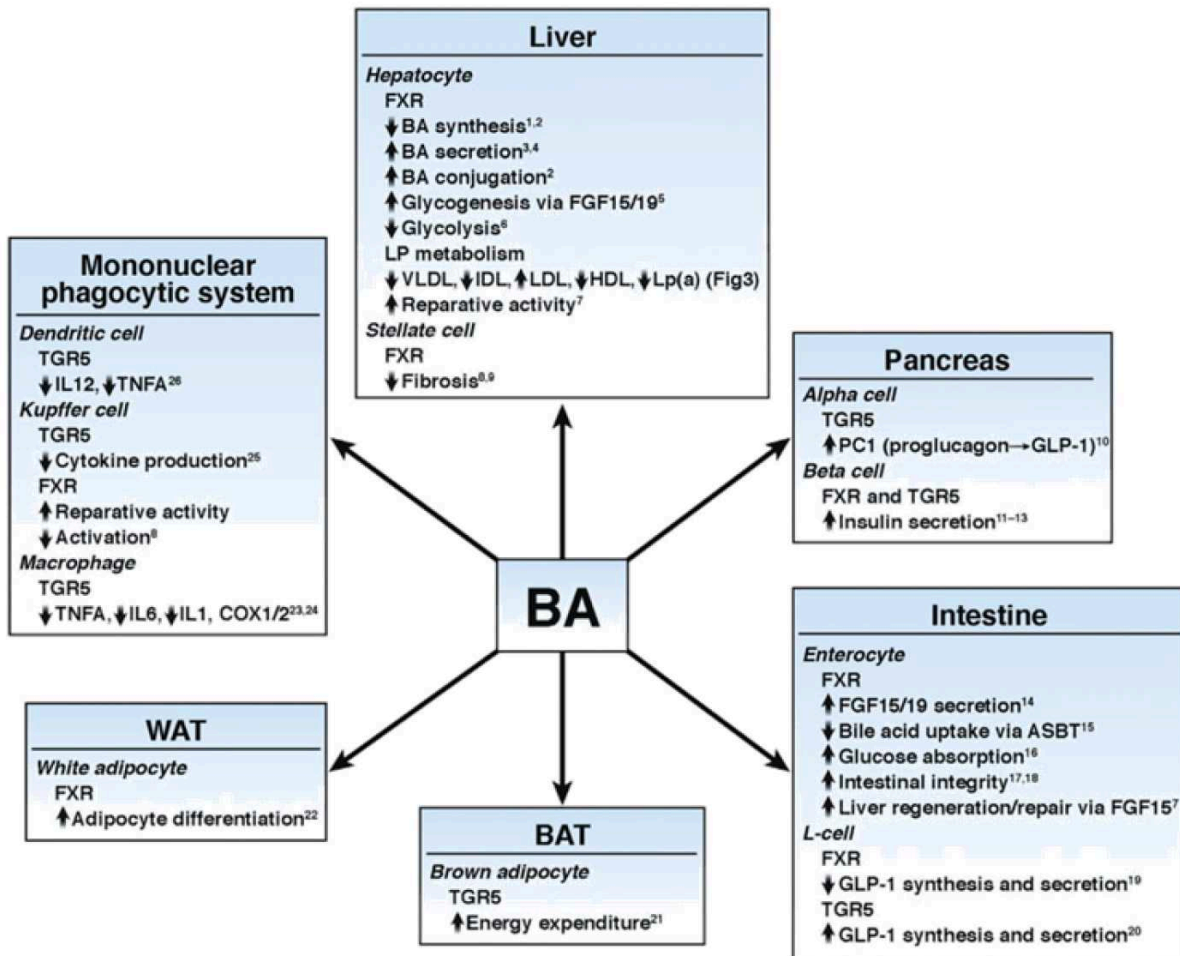


Figure 16. Rôle des acides biliaries sur l'homéostasie métabolique via leurs récepteurs FXR et TGR5 (152). Impact de l'activation des récepteurs FXR et TGR5 sur le foie, le pancréas, l'intestin, les tissus adipeux et les cellules mononucléées.

Les AB étant des ligands naturels de ces récepteurs, la modulation de leurs concentrations peut entraîner des changements à la fois sur l'homéostasie métabolique mais aussi sur le processus inflammatoire et donc avoir un impact sur le développement et la progression de la NAFLD.

Les AB peuvent être dosés dans de nombreux milieux biologiques (plasma, bile, feces, tissus) et les technologies actuelles permettent de déterminer et de quantifier de façon absolue le

profil complet des AB par utilisation conjointe de la chromatographie liquide et de la spectrométrie de masse (154). Il existe également des méthodes de routine (enzymatique colorimétrique) qui permettent de doser la concentration totale en AB (155) voire même certaines espèces spécifiques tels que le GCA par chimiluminescence automatique (Kit CLIA Maglumi, Diasys Diagnostic Systems, Holzheim, Allemagne).

3. Acides biliaires et NAFLD

Les AB sont potentiellement impliqués dans la physiopathologie de la NAFLD à plusieurs niveaux. Les AB ont des actions régulatrices sur le métabolisme des lipides et l'homéostasie glucidique via l'action du récepteur FXR et du récepteur TGR5 dont la dérégulation peut entraîner des altérations de l'homéostasie du glucose et des lipides et favoriser l'inflammation et la fibrose hépatique (156). De plus, les AB et le microbiote intestinal ont une relation complexe. D'une part les AB façonnent le microbiote intestinal par des effets antimicrobiens directs et par la production de peptides antimicrobiens. D'autre part, le microbiote module la composition du pool d'AB par ses activités enzymatiques (telles que la déconjugaison, la déshydroxylation, l'oxydation) (157). Par conséquent, l'altération du métabolisme des AB peut affecter la composition du microbiote et la dysbiose peut affecter la composition du pool des AB, ce qui favorise potentiellement le développement de la NAFLD et de la NASH. De nombreuses études chez l'Homme montrent une augmentation du pool des AB chez des patients atteints de NASH qui pourrait alors être impliquée dans la pathogenèse de la NASH (86). Cependant les AB sont altérés aussi par des contextes métaboliques tels que l'insulino-résistance, le DT2 et l'obésité. Ces contextes métaboliques sont souvent associés à la NAFLD. Pourtant ces comorbidités métaboliques ne sont pas pris en compte dans les études. Nous

formulons alors l'hypothèse que les changements observés dans le profil des AB des patients avec NASH n'étaient pas directement liés au phénotype hépatique mais à ces contextes métaboliques associés (90,152).

Le **manuscrit numéro 1** ci-après fournit une revue de la littérature des études cliniques étudiant les acides biliaires dans le contexte de la NAFLD de l'obésité et du DT2.

Manuscrit 1 :

**Bile acid alterations in nonalcoholic fatty liver disease, obesity,
insulin resistance and type 2 diabetes: what do the human studies
tell?**

Publié en Juin 2019 dans *Current Opinion in Lipidology*



Bile acid alterations in nonalcoholic fatty liver disease, obesity, insulin resistance and type 2 diabetes: what do the human studies tell?

Oscar Chávez-Talavera*, Joel Haas*, Guillaume Grzych, Anne Tailleux[†], and Bart Staels[†]

Purpose of review

The purpose of this review is to discuss the influence of obesity, insulin resistance, type 2 diabetes (T2D), and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) on bile acid metabolism and to analyze whether these findings reinforce current beliefs about the role of bile acids in the pathophysiology of these diseases.

Recent findings

Discordant results on plasma bile acid alterations in NAFLD patients have been reported. Obesity, insulin resistance, and T2D, common comorbidities of NAFLD, have been associated with bile acid changes, but the individual bile acid species variations differ between studies (summarized in this review), perhaps because of clinicobiological differences between the studied patient populations and the heterogeneity of statistical analyses applied.

Summary

The regulatory role of bile acids in metabolic and cellular homeostasis renders bile acids attractive candidates as players in the pathophysiology of NAFLD. However, considering the complex relationship between NAFLD, obesity, insulin resistance and T2D, it is difficult to establish clear and independent associations between bile acid alterations and these individual diseases. Though bile acid alterations may not drive NAFLD progression, signaling pathways activated by bile acids remain potent therapeutic targets for its treatment. Further studies with appropriate matching or adjustment for potential confounding factors are necessary to determine which pathophysiological conditions drive the alterations in bile acid metabolism.

Keywords

bile acids, insulin resistance, metabolic syndrome, nonalcoholic fatty liver disease, nonalcoholic steatohepatitis, obesity, type 2 diabetes

INTRODUCTION

The increasing global prevalence of the metabolic syndrome (MetS), which groups obesity, hyperglycemia, dyslipidemia, and hypertension, is a major worldwide public health problem. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is often considered the hepatic manifestation of MetS and is closely related to many of its features. NAFLD comprises a hepatic spectrum ranging from simple hepatic steatosis or nonalcoholic fatty liver (NAFL), characterized by abnormal triglyceride accumulation in hepatocytes, which can progress to nonalcoholic steatohepatitis (NASH). While NAFL is generally considered benign, NASH combines NAFL with elements of hepatic tissue injury including evidence of inflammation and hepatocyte ballooning with or without fibrosis. NAFLD is an independent risk factor for cirrhosis, hepatocellular carcinoma, cardiovascular disease,

and mortality. Importantly, NAFLD is strongly and bidirectionally associated with obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes (T2D) [1^{*,2*},3].

There are several unmet research needs in the field of NAFLD. The natural history of NAFLD is not entirely understood and no pharmacological therapies exist for its treatment. For example, NAFL can be diagnosed with noninvasive imaging techniques,

University of Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1011 - EGID, F-59000 Lille, France

Correspondence to Bart Staels, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, BP245, 59019 Lille, France. Tel: +33320877388; fax: +33320877360; e-mail: bart.staels@pasteur-lille.fr

*O.C.T. and J.H.: cofirst authors.

[†]A.T. and B.S.: colast authors.

Curr Opin Lipidol 2019, 30:000–000

DOI:10.1097/MOL.0000000000000597

KEY POINTS

- Bile acid changes have been associated with obesity, insulin resistance, and T2D, common comorbidities of NAFLD.
- Discordant results on plasma bile acid alterations in NAFLD patients have been reported.
- The intricate relationship between NAFLD, obesity, insulin resistance, and T2D renders difficult the establishment of clear and independent associations between bile acid alterations and these individual diseases.
- Further studies with appropriate matching or adjustment for potential confounding factors are necessary to determine which of these diseases drive the alterations in bile acid metabolism in NAFLD.
- Bile acid signaling pathways remain attractive candidates for the treatment of NAFLD, but whether bile acids are a driving force in the pathogenesis and progression of NAFLD or just innocuous bystanders remains undetermined.

but NASH diagnosis currently requires liver biopsy for histological evaluation, an intervention not devoid of risk, and highly susceptible to interobserver variations [4^{*}]. It is thus urgent to find circulating biomarkers to better identify those patients to be submitted to biopsy for NASH screening and monitoring NAFLD progression and staging for assessment of treatment efficacy. Recently, bile acids have emerged as potential candidates, and new emerging therapies for NAFLD target bile acid signaling pathways. Moreover, some evidence suggests that bile acid alterations could be associated with NAFLD.

BILE ACID PHYSIOLOGY

Bile acids are cholesterol-derived molecules synthesized exclusively in hepatocytes via two pathways. The classical pathway produces the majority of bile acids. It is initiated by cytochrome P450 (CYP) cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1), whose activity correlates with plasma levels of 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one (C4). The alternative pathway, initiated by CYP 27 α -hydroxylase (CYP27A1), synthesizes the remaining minor bile acid fraction. These pathways produce the primary bile acids cholic acid (CA), chenodeoxycholic acid (CDCA), and hyocholic acid (HCA) in humans. Notably, CA is a 12 α -hydroxylated bile acid, synthesized by the CYP 12 α -hydroxylase (CYP8B1), which is indirectly regulated by insulin signaling via forkhead box protein O1 (FoxO1). Thus, the 12 α -hydroxylated:non-12 α -hydroxylated bile acid ratio reflects the activity of CYP8B1 and is a marker of hepatic insulin sensitivity of the bile acid

synthesis pathway. Upon synthesis, bile acids are conjugated to glycine or taurine (the proportion being essentially determined by dietary intake), secreted into bile, and released in the duodenum postprandially to facilitate dietary fat solubilization and absorption. In the gut, microbiota deconjugate and transform primary bile acids into secondary bile acids: CA into deoxycholic acid (also a 12 α -hydroxylated bile acid), CDCA into ursodeoxycholic acid (UDCA) and lithocholic acid (LCA), and HCA into hyodeoxycholic acid. Approximately 95% of bile acids are recaptured in the ileum and return to the liver via the portal vein to be reconjugated and resecreted into bile. A minor fraction of portal bile acids escapes hepatic reuptake and reach the systemic circulation, hence potentially allowing signaling actions in peripheral organs [5^{*}]. However, it should be noted that circulating plasma bile acids do not necessarily reflect the composition of the portal, intrahepatic, biliary, or intestinal bile acid pools.

Apart from their role in dietary lipid solubilization, bile acids are natural ligands of the farnesoid X receptor (FXR) and the Takeda G-protein-coupled receptor (TGR5), through which bile acids regulate their own synthesis, as well as glucose, lipid and energy homeostasis, inflammation, hepatic fibrosis, and modulate reparative activity (reviewed in [5^{*}]). Importantly, not all bile acids activate FXR (CDCA > DCA > CA > LCA) and TGR5 (LCA > D-DCA > CDCA > CA) with the same affinity or potency. Hence, qualitative alterations of the bile acid pool composition, in addition to quantitative changes in total bile acids, could modulate the activity of their receptors and hence impact metabolism.

Bile acid-FXR signaling in enterocytes stimulates the secretion of fibroblast growth factor 19 (FGF19) into portal venous blood, which then activates FGFR4/ β -Klotho in the liver. Through this mechanism, FGF19 suppresses CYP7A1, thereby decreasing bile acid synthesis via the classical pathway, and also regulates hepatic carbohydrate and lipid metabolism. Interestingly, plasma FGF19 (a biomarker of intestinal FXR activation) is decreased in the metabolic syndrome, suggesting that it could be implicated in the pathogenesis of NAFLD [6,7]. Considering many interactions between diet, insulin signaling, and bile acid metabolism, it appears logical that alterations in circulating bile acids could be markers of, or even actors in, the pathophysiology of the metabolic processes that they modulate.

BILE ACIDS IN OBESITY, INSULIN RESISTANCE, AND TYPE 2 DIABETES

The effect of obesity on bile acid metabolism is not entirely clear. BMI has been reported to positively

correlate with fasting bile acids [8] but negatively with postprandial bile acids [9]. Other studies have reported either no changes [10–12] or increased concentrations of CA [13] in fasting plasma bile acids, and no changes [10] or decreased glyco-conjugated bile acids [11] in postprandial plasma of obese individuals. There is also evidence that the normal meal-induced bile acid increase in plasma bile acids is suppressed with obesity [12,14]. Similarly, insulin infusion during an euglycemic hyperinsulinemic clamp decreased serum bile acids in lean but not in obese patients [12]. Fasting plasma C4 levels were higher in obese patients in two different studies [12,15^{***}], suggesting increased bile acid biosynthesis. Expression of the canalicular (BSEP) and sinusoidal (NTCP) bile acid transporter mRNA levels were negatively correlated with BMI [12]. Although there is a large heterogeneity between the reported results, possibly because of the known large inter and intraindividual variability in bile acids and the diurnal variations of bile acids in humans [15^{***}], overall fasting plasma bile acids appear elevated, but the postprandial increase is lower in obese individuals.

A parameter confounding these studies may be related to differences in the level of insulin resistance among the studied patient populations. Studies analyzing bile acid changes in insulin resistant, but not diabetic patients have reported higher fasting total and 12 α -hydroxylated bile acids [16^{*}]. Mechanistic studies in insulin-resistant mice suggest that impaired insulin-mediated repression of FoxO1 results in higher 12 α -hydroxylase CYP8B1 expression [17]. Moreover, insulin resistance was associated with increased total bile acid concentrations [18,19], fasting tauro-conjugated bile acids [20], CDCA, CA, DCA [13], and glyco-chenodeoxycholic acid (GCDCA) [21].

Some studies in overtly T2D patients have reported no changes in fasting [9,22] or postprandial [9,23] bile acids compared with controls, whereas other studies have reported either increased fasting [7,16^{*},24] and postprandial [24] total bile acid concentrations, increased fasting DCA [9,13,25], tauro-chenodeoxycholic acid, tauro-deoxycholic acid, and tauro-ursodeoxycholic acid (TUDCA) [20], or decreased CA and HCA [25]. Bile acid levels were not modified by intensive insulin treatment in diabetic patients [20].

The mechanisms underlying the quantitative and qualitative modifications in bile acids in the metabolic syndrome are not fully elucidated. Apart from the previously described alterations of the insulin receptor–protein kinase b (Akt)–FoxO1 signaling pathway impacting bile acid synthesis in insulin resistance, dysbiosis (occurring in metabolic

disorders) could modify bile acid deconjugation, secondary bile acid synthesis, and modulate the bile acid pool composition [5^{*}]. Another mechanism implies the enterohepatic cross-talk via intestinally FXR-induced FGF19. Indeed, FGF19 levels correlate positively with total bile acid concentrations [10,24] and negatively with plasma C4 [10,26]. Interestingly, FGF19 is lower in T2D and obese patients and correlates negatively with BMI [10,27] and glycated hemoglobin (HbA1c) [27]. However, these changes in FGF19 in T2D patients [9,24] or its correlation with MetS components [20] are not universally observed. Importantly, differences in control populations and the degree of insulin resistance or T2D severity are potential confounding factors between these studies and are not always well reported nor well characterized.

In conclusion, although not all reported data are entirely consistent, it is clear that bile acid metabolism alterations occur in obese and/or insulin-resistant humans (summarized in Table 1). However, it remains undetermined whether bile acids are innocent bystanders or if they participate to the pathophysiology of these diseases.

BILE ACIDS AND NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE

Given that bile acid accumulation in hepatocytes is cytotoxic in intrahepatic cholestatic liver diseases, it is conceivable that bile acids could be altered in NAFLD also and that their accumulation in NASH patients could favor progression of the disease. Furthermore, hepatic necroinflammatory lesions in NAFLD may alter the anatomy of liver zonation. Since the liver is the sole site of bile acid synthesis and as bile acid synthesis is zoned in physiological conditions, altered bile acid metabolism could occur in a setting of pathologically altered liver zonation. Indeed, treatment of NASH with the FXR agonist obeticholic acid [28^{***}] or with the FGF19 analog NGM282 [29^{***}] improved several NAFLD histological features. Therefore, several groups have studied whether NAFLD patients present bile acid profile alterations (summarized in Table 2).

Fasting plasma bile acids were reported to be higher in NASH patients because of increased primary [30^{***}] and conjugated bile acid species [30^{***},31,32]. Similar changes were also observed in NAFL patients [31]. Moreover, histological lesions of NASH have been associated with bile acid alterations [i.e. associations of high plasma glyco-cholic acid (GCA) [30^{***}] or CA [33^{***}] concentrations with lobular inflammation, low TUDCA, and high tauro-lithocholic acid concentrations with portal inflammation [30^{***}], high

Table 1. Clinical studies assessing bile acids in obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes

Topic	Reference	Nutritional state	n	BMI (kg/m ²)	HOMA-IR	FPG (mg/l)	HbA1c (%)	Results
Obesity – bile acids	[11]	Fasting Meal test (30, 60, 90, 120, 150, 180 min)	Control: 12 Obese: 7	Control: 23.2 (2.8) Obese: 47.2 (7.2) ^a	ND	ND	ND	Fasting: No \neq in BAs Postprandial: \neq glyco-bile acids
Obesity – bile acids	[14]	Fasting Meal test (–15, 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 min)	Control: 8 Obese: 5	Control: 21.7 \pm 1.6 Obese: 47.7 \pm 7.4	ND	ND	ND	Fasting: \neq tauro-bile acids in obese versus controls Meal test: \neq meal-induced conjugated bile acid increase in obese versus controls
Obesity – bile acids	[8]	Fasting	Anorexia: 15 Control: 15 Obesity I: 15 Obesity II: 14 Obesity III: 15	Anorexia nervosa: 13.1 (8.9–15.6) ^a Control: 22.1 (20.3–25) Obesity I: 37.6 (30.1–39.8) ^a Obesity II: 45.6 (41.1–49.7) ^a Obesity III: 67.1 (59–84.6) ^a	ND	ND	ND	Fasting: Total bile acids positively correlated with BMI
Obesity – bile acids	[12]	Fasting Meal test (60, 120, 180 min) Euglycemic hyperinsulinemic clamp	Control: 11 Obese: 32	Control: 23.9 \pm 0.7 Obese: 44 \pm 1.6 ^a	M/I Control: 103 (63) Obese: 33 (26) ^a	Control: 90 \pm 1.8 Obese: 91.8 \pm 1.8	ND	Fasting: \neq C4 and \neq 17,12-dHCO in obese versus controls. C4 and 7,12-dHCO positively correlated with BMI and negatively correlated with insulin sensitivity Meal test: \neq meal-induced bile acid increase despite \neq total bile acid concentrations in obese versus controls Insulin infusion: \neq total bile acids in controls whereas \neq free but not conjugated bile acids in obese patients Other results: BMI negatively correlated with NITCP and BSEP hepatic gene expression
Insulin resistance – bile acids	[19]	Fasting	Control: 40 Overweight and obese: 40	Control: 22.3 \pm 1.6 Overweight and obese: 32.6 \pm 3.7	Control: 1.8 \pm 1.2 Overweight and obese: 3.5 \pm 2.2	ND	ND	Fasting: No bile acid \neq between groups Total bile acids positively associated with HOMA-IR in pooled patients, stronger association in overweight and obese patients
Insulin resistance – bile acids	[21]	Fasting	Heterogeneous patients: 997	26.6 \pm 5.3	1.04 \pm 0.83	96 \pm 19	ND	Fasting: GCDCA associated with HOMA-IR
T2D – bile acids	[23]	Fasting Meal test (0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 min)	Control: 12 T2D: 13	Control: 41 (38.4–43.4) T2D: 44 (40.8–45.5)	Control: 2.6 (2.2–2.8) T2D: 6.2 (4.4–8) ^a	Control: 95.4 (90–104.4) T2D: 144 (138.6–158.4) ^a	ND	Fasting and postprandial: No \neq in total bile acids in obese nondiabetic patients versus obese T2D patients
T2D – bile acids	[9]	Postprandial (120 min)	Control: 12 T2D: 16	Control: 28.9 (25.2–32) T2D: 30.6 (25.2–35.5)	Control: 1.6 (1.1–4.8) T2D: 6.2 (2.1–16.6) ^a	Control: 91.8 (75.6–102.6) T2D: 156.6 (113.4–279) ^a	Control: 5.5 (5.1–6.1) T2D: 8.6 (6.3–10.6) ^a	Fasting and postprandial: no \neq in total bile acids in fasting and postprandial bile acids in T2D versus controls \neq DCA pool size in T2D versus controls Postprandial bile acids negatively correlated with BMI
T2D – bile acids	[22]	Fasting Postprandial (30, 60, 90, 120 min)	Control: 12 T2D: 12	Control: 38 (35–38) T2D: 36 (32–37)	ND	Control: 88.2 (86.4–99) T2D: 131.4 (122.4–147.6) ^a	ND	Fasting: no \neq in T2D versus controls Postprandial: total bile acids in T2D versus controls due to glyco-bile acids

Table 1 (Continued)

Topic	Reference	Nutritional state	n	BMI (kg/m ²)	HOMA-IR	FGP (mg/l)	HbA1c (%)	Results
T2D – bile acids	[25]	Fasting	Control: 60 T2D: 40	Control: 28.31 ± 3.4 T2D: 30.01 ± 3.6 ^a	ND	ND	Control: 5.29 ± 0.37 T2D: 5.95 ± 0.72 ^a	Fasting: TCA, DCA, HCA in T2D versus controls
Insulin resistance, T2D – bile acids	[16]	Fasting Euglycemic hyperinsulinemic clamp	Control: 200 (classified into quartiles based on insulin resistance) T2D: 35	Control: 25 ± 3.5 T2D: 38.3 ± 12.3 ^a	M/I Control: 1.34 ± 88 T2D: 3.6 ± 19 ^a	Control: 90 ± 9 T2D: 174.6 ± 57.6 ^a	ND	12α-Hydroxy-non-12α-hydroxy-bile acid ratio in nondiabetic insulin resistance patients associated with insulin sensitivity and plasma Takeda Gs. Total bile acids in T2D without \neq in 12α-hydroxy-non-12α-hydroxy-bile acid ratio
Insulin resistance, T2D – bile acids	[18]	Fasting	Control: 967 Insulin resistance: 704 T2D: 254 T2D-insulin resistance: 224	Control: 24.4 ± 2.96 Insulin resistance: 27.48 ± 3.23 ^a T2D: 24.79 ± 3.07 T2D-insulin resistance: 27.85 ± 3.24 ^a	ND	Control: 90.72 ± 9.54 Insulin resistance: 97.2 ± 10.26 ^a T2D: 117.36 ± 32.76 ^a T2D-insulin resistance: 140.94 ± 46.44 ^{a,b}	ND	Fasting: Insulin resistance (HOMA-IR > 2.7) positively associated with hyperlipidemia (total bile acids > 10 nM) independently of diabetes status
Obesity, insulin resistance, T2D – bile acids	[13]	Fasting	Control: 14 Obese: 22 T2D: 20	Control: 23.85 (21.2–32.4) Obese: 33.6 (27.9–38.5) ^{a,b} T2D: 31.85 (22.8–39.1) ^a	Control: 1.33 (0.6–3.03) Obese: 3.15 (0.85–10.79) T2D: 3.85 (0.66–16.38) ^a	Control: 90.54 (81–105.3) Obese: 99 (77.4–122.4) ^{a,b} T2D: 132.66 (91.98–225) ^a	Control: 5.40 (5–5.9) Obese: 5.45 (4.8–6.5) ^b T2D: 7.4 (5.8–11.7) ^a	Fasting: Total bile acids, TCA in obese versus controls. DCA in T2D versus controls. CDCA and CA negatively correlated glucose infusion rate. CDCA, DCA, and CA positively correlated with HOMA-IR
MetS, T2D – bile acids	[15]	Fasting	Control: 49 MetS: 50 T2D: 50	Control: 27.4 (19.1–42.1) MetS: 29.6 (21.8–37.7) ^{a,b} T2D: 31.2 (20–51.8) ^a	Control: 2.11 (0.21–8.96) MetS: 2.95 (0.87–26.31) T2D: 6.35 (1.11–47.14)	Control: 96.84 (75.96–112.86) MetS: 100.44 (82.98–120.96) ^b T2D: 144.9 (2.88–345.6) ^a	Control: 5.6 (4.9–6.1) MetS: 5.8 (5.3–6.4) ^{a,b} T2D: 7.4 (5.9–13.6) ^a	Fasting: No independent association of bile acids with MetS and T2D. TCA in T2D and MetS patients correlated by positive correlation of C4 with BMI and Takeda G
Obesity – bile acids – FGF19	[10]	Fasting OFT (2, 4, 6h)	Control: 16 Overweight: 14 Obese: 12	Control: 24.2 (21.8–26.6) Overweight: 28.3 (26.3–29.2) ^a Obese: 35.3 (32.7–39) ^a	ND	ND	ND	Fasting: No \neq in bile acids or C4 between groups. FGF19 in obese versus controls. FGF19 positively correlated with bile acids only in controls and negatively correlated with BMI in all patients OFT: No \neq in bile acids or C4. FGF19 in overweight versus controls. FGF19 negatively correlated to C4
Insulin resistance, T2D – bile acids – FGF19	[20]	Fasting Postglucose load (120 min)	Control: 62 IGT: 25 T2D: 12	Control: 28.6 ± 5.8 IGT: 31 ± 8.6 T2D: 32.3 ± 8.7	Control: 2.2 ± 1.4 IGT: 3.3 ± 2.1 ^a T2D: 6.7 ± 6.7 ^a	Control: 93 ± 7 IGT: 96 ± 8 T2D: 115 ± 17	Control: 5.3 ± 0.3 IGT: 5.5 ± 0.3 T2D: 6.2 ± 0.8 ^{a,b}	Fasting: Tauro-bile acids in T2D versus controls but not in IGT Postglucose load: Tauro-MCA in IGT versus controls Tauro-bile acids positively correlated with FPG, fasting insulin, HOMA-IR, HbA1c and postglucose load glycemia, but negatively correlated with oral disposition index bile acids not correlated with sex, age, BMI, Takeda G or cholesterol FGF19 not correlated with bile acids, BMI, age, lipids, HbA1c neither on fasting nor postglucose load No \neq in bile acids upon insulin intensification

Table 1 (Continued)

Topic	Reference	Nutritional state	n	BMI (kg/m ²)	HOMA-IR	FFG (mg/l)	HbA1c (%)	Results
T2D – bile acids – FGF19	[24]	Fasting OGTT Low-fat, medium-fat, and high-fat meal tests (-20, -10, 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240 min)	Control: 15	Control: 27.9 ± 2	ND	ND	Control: 5.2 ± 0.2	Fasting: Total bile acids in T2D versus controls Postprandial: Total bile acids in OGTT, low-fat and medium-fat meals but not in high fat meal in T2D versus controls. Total bile acids positively correlated with meal fat content No β in FGF19 between groups. FGF19 correlated positively with total bile acid, but negatively with C-peptide in T2D and controls. FGF19 negatively correlated with plasma glucose in controls but not in T2D.
			T2D: 15	T2D: 28 ± 2.2			T2D: 7.5 ± 1.4	
T2D – FGF19	[27]	Fasting	Control: 12	Control: 22.6 (21.4–23.9)	ND	Control: 86.58 (84.24–89.82)	Control: 5 (4.5–5)	Fasting: FGF19 negatively correlated with BMI and HbA1c
			T2D: 26	T2D: 28.9 (26.2–31.3) ^a		T2D: 124.74 (106.74–156.78) ^a	T2D: 6 (6–8) ^b	
Insulin resistance, T2D – FGF19	[6]	Fasting	Control: 81	Control: 22.2 ± 2.2	Control: 1.24 (0.89–1.61)	Control: 92 (84.96–97.56)	Control: 5.5 (5.3–5.7)	Fasting: FGF19 in IFG and T2D versus controls FGF19 negatively associated with FFG
			IGT: 93	IGT: 25.2 ± 3.7 ^a	IGT: 1.65 (1.19–2.7) ^a	IGT: 97 (88.56–102.04)	IGT: 5.8 (5.5–5.9) ^a	
Insulin resistance, T2D – bile acids, FGF19	[7]	Fasting	IGF: 91	IGF: 24.5 ± 2.6 ^a	IGF: 2.04 (1.24–3.27) ^a	IGF: 114 (111.06–117) ^a	IGF: 5.7 (5.5–6) ^a	Fasting: Total bile acids, FGF19 in T2D versus controls
			T2D: 104	T2D: 25.4 ± 3.6 ^a	T2D: 2.81 (1.77–4.04) ^a	T2D: 137 (118.8–163.06) ^a	T2D: 6.7 (6–7.8) ^a	
			Control: 125	ND	ND	ND	ND	
			T2D: 181					

Data extracted from the articles and presented as means ± SD, means ± SEM, medians (Q1–Q3), medians (IQR), or medians [range]. BA, bile acid; BSEP, bile salt export pump; 7, 12-d/HCO, 7 α -12 α -dihydroxy-4-cholesten-3-one; C4, 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one; FFG, fasting plasma glycemia; GCDCA, glycochenodeoxycholic acid; HbA1c, glycated hemoglobin; HOMA-IR, homeostatic model assessment for insulin resistance; IFG, impaired fasting glucose; IGT, impaired glucose tolerance; MCA, mucicholic acid; MW, insulin sensitivity index; MeS, metabolic syndrome; OHT, oral fat tolerance test; OGTT, oral glucose tolerance test.

^aStatistically different from control.

^bStatistically different from T2D.

Table 2. Clinical studies assessing bile acids in NAFLD.

Reference	Medium for bile acid analysis	Nutritional state	N	BMI (kg/m ²)	HOMA-IR	FPG (mg/dl)	HbA1c (%)	Results
[40]	Plasma	ND	Control: 38 NASH: 36	ND	ND	ND	ND	Bile acids: ↑CGCA ↑TCA ↑CDCA in NASH versus controls Other: ↑FGF21 in NASH versus controls
[31]	Plasma	Fasting	Control: 25 NAFL: 11 NASH: 24	Control: 24.5 ± 2.6 NAFL: 34 ± 4 ^a NASH: 34.8 ± 4.7 ^a	Control: 0.96 ± 0.4 NAFL: 2.6 ± 1.1 ^a NASH: 3.26 ± 1.6 ^a	Control: 84.6 ± 9 NAFL: 88.2 ± 10.8 NASH: 95.4 ± 16.2 ^a	ND	Bile acids: ↑CGCA ↑TCA ↑GCDCa in NASH versus controls ↑TCA in NAFL versus controls
[34]	Plasma	ND	Control: 10 NAFL: 39 NASH: 39	Control: 22.4 ± 2.46 NAFL: 31.3 ± 1.5 NASH: 33.5 ± 1.3	ND	Control: ND NAFL: 95.3 ± 8.5 NASH: 122.9 ± 11 ^a	Control: ND NAFL: 5.34 ± 0.16 NASH: 16.92 ± 4.59 ^a	Bile acids: total bile acids positively correlated with NAS Other: no \neq in C4 between NAFL, NASH and controls. Serum adiponectin negatively correlated with serum bile acids and NAS Hepatic mRNA levels: ↓INTCP, ↓BSEP, ↓EPHX1 in NASH versus controls
[32]	Serum, urine	Fasting, postprandial	Control: 15 NASH: 7	Control: 25 ± 2.7 NASH: 32 ± 5.2 ^a	Control: 1.6 ± 0.6 NASH: 13 ± 8.7 ^a	Control: 86 ± 8 NASH: 124 ± 16 ^a	ND	Bile acids: fasting plasma: ↑conjugated bile acids in NASH versus controls Postprandial plasma: ↑total bile acids in NASH versus controls. Postprandial urine: ↑CGCA ↑TCA ↑GCDCa ↑DCA in NASH versus controls Other: MCA are majority bile acid species in urine
[38]	Serum	ND	Control: 11 NASH: 16	Control: 19.2 ± 3.4 NASH: 33.8 ± 7.7 ^a	Control: ND NASH: 4.28 ± 2.83	ND	ND	Bile acids: ↑total bile acids ↑CA ↑CDCA ↑DCA ↑UDCA in NASH versus controls ↑secondary/primary BA ratio, ↑CDCA ↑DCA proportions in NASH versus controls Other: ↓FGF19 in NASH versus control. Microbiota: ↑glycine and taurine-metabolizing bacteria Hepatic mRNA levels: ↑CYP7A1 ↑CYP27A1 ↑CYP8B1 ↑BACS ↑INTCP ↑OATP1B1 ↑OATP1B3 ↑HNF4A ↑FGFR4 ↑KLB in NASH versus controls
[30 ^{***}]	Plasma	Fasting	Control: 24 NAFL: 25 NASH: 37	Control: 27.3 ± 5.8 NAFL: 32.6 ± 5.4 NASH: 34.4 ± 4.2 ^a	ND	ND	ND	Bile acids: ↑Primary BAs ↑UDCA in NASH versus controls. ↑CGCA ↑TCA in NASH versus NAFL. ↑TCA ↑CDCA in NAFL associated with severe steatosis. ↑CGCA associated with severe lobular inflammation. ↑TUDCA and ↑TLCA associated with portal inflammation. ↑CGCA, ↑TCA, ↑GCDCa, ↑DCA, ↑GLCA associated with hepatocyte ballooning. ↑Conjugated CA associated with NAS > 4 Other: No \neq in C4 or FGF19 Hepatic mRNA levels: ↑CYP7A1 in NASH versus controls and NAFL

Table 2 (Continued)

Reference	Medium for bile acid analysis	Nutritional state	N	BMI (kg/m ²)	HOMA-IR	FPG (mg/dl)	HbA1c (%)	Results
[39 ^a]	Plasma	Fasting	Control: 26 NASH: 32	Control: 39.4 ± 5.9 NASH: 40.2 ± 5.8	Control: 3.25 ± 2.05 NASH: 4.05 ± 2.65	Control: 82.3 ± 11.8 NASH: 85.8 ± 8.4	ND	Bile acids: no # in bile acids in NASH versus controls. No correlation of bile acids and necroinflammatory lesions of NASH Other: no # in CA Hepatic mRNA levels: ↓PPARA, ↓CYP3A4, ↓BSEP, ↓CYP7A1, ↑ATP8B1 in NASH versus controls
[33 ^a]	Plasma	Fasting	Cohort 1 Non-NAFLD by MRI: 120 NAFLD by MRI: 36 Cohort 2 Biopsy-proven NAFLD: 156	Cohort 1 Non-NAFLD by MRI: 25 ± 5.2 NAFLD by MRI: 31.8 ± 5.9 ^a Cohort 2 Biopsy-proven NAFLD: 32 ± 6	Cohort 1 Non-NAFLD by MRI: 1.7 ± 1 NAFLD by MRI: 6.6 ± 11.4 ^a Cohort 2 Biopsy-proven NAFLD: 8.5 ± 17.3	Cohort 1 Non-NAFLD by MRI: 88.4 ± 9.6 NAFLD by MRI: 102.5 ± 27.5 ^a Cohort 2 Biopsy-proven NAFLD: 106.2 ± 33.1	Cohort 1 Non-NAFLD by MRI: 5.7 ± 0.4 NAFLD by MRI: 6.1 ± 0.7 ^a Cohort 2 Biopsy-proven NAFLD: 6 ± 0.9	Cohort 1: bile acids: No # in bile acid concentrations in NAFLD versus non-NAFLD. ↑CA, ↑CDCA, ↑GHCA proportions in NAFLD versus non-NAFLD Cohort 2: bile acids: No # in bile acid concentrations among NAFLD patients classified on NAFL versus NASH. ↑Bile acids associated with ↑fibrosis stages. Lobular inflammation positively correlated with free CA. Ballooning positively correlated with free CA and CDCA but negatively correlated with conjugated CA and DCA. NAS positively correlated with free CA and CDCA but negatively correlated with conjugated CA
[37]	Liver	ND	Control: 8 NASH: 15	Control: ND NASH: 26.6 ± 2.5	ND	ND	ND	Bile acids: ↓CDCA, ↑DCA in NASH versus controls. ↑DCA in NASH versus controls. CA correlated with inflammation and CDCA with fibrosis in NASH
[36]	Liver	ND	Control: 17 NAFL: 4 NASH: 16	ND	ND	ND	ND	Bile acids: ↓CA, ↑TCA, ↑GDCA, ↓GDCA in NASH versus controls. ↓GDCA, ↑TDCDCA in NASH versus NAFL Other: CA, DCA, CDCA, and GDCA negatively correlated with CYP7B1 gene expression. GDCA positively correlated with CYP8B1 gene expression Hepatic mRNA levels: ↓CYP27A1, ↓CYP7B1, ↓HSD3B7, ↓CYP8B1, ↓BAAT in NASH versus controls. Protein levels: ↑CYP7B1 in NASH versus controls and NAFL
[35]	Feces	ND	Control: 25 NAFL: 12 NASH: 16	Control: 27 (20–35) NAFL: 28 (25–44) NASH: 33 (24–50) ^a	Control: 1.3 (0.5–7.6) NAFL: 1.6 (0.6–15.6) NASH: 4.3 (1.2–40) ^a	Control: 88.2 (72–117) NAFL: 95.4 (82.2–205.2) NASH: 102.6 (73.8–135)	Control: 5.1 (4.4–7.2) NAFL: 5.3 (0.1–5.8) ^a NASH: 5.9 (5.3–7.3) ^a	Bile acids: in feces: ↑Total bile acids, ↑CA, ↑CDCA in NASH versus controls. ↑Conjugated LCA in NASH versus NAFL. Primary fecal bile acids positively correlated with ALT, NAS and serum Takeda G Other: ↑CA in NASH versus controls. Gut microbiota: ↓Bacteroidetes, Clostridium leptum negatively correlated with CA and LCA

Data extracted from the articles and presented either as mean ± SD, means ± SEM, or median (range). BA, bile acid; BACS, bile acid Co-A synthase; BAAT, bile acid Co-A:amino acid N-acyltransferase; BSEP, bile salt export pump; CA, cholic acid; DCA, deoxycholic acid; FGF21, fibroblast growth factor 21; FPG, Fasting plasma glycemia – data reported in sources as mmol/l was transformed to mg/dl by multiplying the reported value by 18; GCA, glyco-cholic acid; GDCA, glyco-chenodeoxycholic acid; GHCA, glyco-hydrocholic acid; GICA, glyco-lithocholic acid; HbA1c, glycated hemoglobin; HOMA-IR, homeostatic model assessment for insulin resistance; LCA, lithocholic acid; MCA, muricholic acid; NAS, NAFLD activity score; TCDC, tauro-chenodeoxycholic acid; TDC, tauro-deoxycholic acid; TUDCA, tauro-ursodeoxycholic acid; UDCA, ursodeoxycholic acid.
^aNASH statistically different from controls.

CA, CDCA [33^{***}], GCA, TCA, GCDCA, DCA, and glyco-lithocholic acid [30^{***}] concentrations with hepatocyte ballooning have been reported, as well as elevated total bile acids [34], CA, CDCA [33^{***}], and both increased [30^{***}] or decreased [33^{***}] conjugated CA concentrations have been associated with high NAFLD activity score (NAS). Additionally, increased postprandial total bile acids have been reported in plasma and in urine [32], as well as increased fecal bile acid loss, which positively correlated with NAS and associated with decreased proportions of the gut microbiota phylum *Bacteroidetes* [35]. Furthermore, hepatic tissue-extracted bile acids were reported to be altered in NASH and NAFL patients resulting in qualitative changes in hepatic bile acid content, although inconsistent results were obtained between both studies [36,37]. Such results should be taken with caution, as bile acids were extracted from whole hepatic tissue, preventing discrimination between blood, biliary, and intrahepatocyte bile acid concentrations.

The expression of hepatic bile acid metabolism genes has also been studied in livers from NASH patients. Both increased [38] and decreased [36] CYP27A1 mRNA levels were reported, in addition to increased CYP7B1 gene and protein levels [36]. These results suggest possible modifications in the alternative bile acid synthesis pathway. Furthermore, increased expression of the gene encoding CYP7A1 [30^{***},38,39^{*}] suggests that the classical bile acid synthesis pathway may also be activated. FGF19 levels, which regulate bile acid synthesis, have been reported as decreased [38] or unchanged [30^{***}] in NASH patients. Plasma C4 levels are, however, unchanged in NASH patients versus controls [30^{***},34,39^{*}]. A summary of the hepatic gene expression changes reported in NASH patients is provided in Table 2.

We recently compared bile acid metabolism parameters in NASH patients matched for BMI and insulin resistance with obese individuals without NASH. No qualitative or quantitative differences in fasting plasma bile acids were found in NASH patients, with only GCA weakly correlating with steatosis ($r=0.29$, $p=0.03$). However, reanalysis by severity of insulin resistance revealed a tendency toward previously reported associations in fasting plasma bile acids (Table 1). These findings suggest that bile acid metabolism correlates with the metabolic comorbidities of NAFLD, rather than with the histopathological parameters of NASH itself [39^{*}]. It will be important in future studies to carefully assess NASH independently of common comorbidities to determine which changes, if any, in bile acid

metabolism are specifically related to histological changes in NASH.

ARE BILE ACID CHANGES ASSOCIATED WITH NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE INDEPENDENTLY FROM OBESITY, INSULIN RESISTANCE, AND TYPE 2 DIABETES?

Assessment of the clinicobiological status of the studied populations appears essential to understand discordant results and allow their appropriate interpretation. In studies lacking information on the nutritional status [34,38,40] and biochemical markers of glucose metabolism as fasting plasma glycemia, homeostatic model assessment for insulin resistance (HOMA-IR), or HbA1c [30^{***},33^{***},34,38,40], it cannot be excluded that differences between the compared groups, other than histological parameters of NAFLD, influence the interpretation of the results. Many studies that provided the clinicobiological characteristics of the study groups are flawed by the comparison of NASH or NAFL patients with control groups presenting significantly lower BMI [30^{***},31,32,34,38], HbA1c [34], insulin resistance, or fasting glycemia [31,32]. As discussed above, these metabolic comorbidities of NAFLD are correlated with bile acid alterations. It is thus difficult to conclude whether bile acid alterations are associated per se with NAFLD or with the associated insulin resistance. Appropriate statistical adjustment or patient matching could help to determine whether the associations are independent from potential confounding factors.

CONCLUSION

Although bile acid signaling targets are attractive candidates for the treatment of NAFLD, it remains undetermined whether bile acids are a driving force in the pathogenesis and progression of NAFLD or just innocuous bystanders. The current literature does not clearly support a causal role. Moreover, the large interindividual variation and diurnal bile acid changes in peripheral blood suggest that they are likely unsuitable as biomarkers for the diagnosis or leading to the decision of biopsy taking in NAFLD patients. However, this does not exclude that targeting bile acid signaling remains an attractive therapeutic target for NASH treatment. Further clinical studies assessing plasma bile acid profiles should carefully consider matching BMI and insulin resistance profiles across controls, NAFL, and NASH patients to more clearly assess the connection

between alterations in bile acid metabolism and these parameters of the metabolic syndrome.

Acknowledgements

None.

Financial support and sponsorship

The work was supported by Agence Nationale pour la Recherche (ANR-10-LABX-46 and ANR-10-INBS-08; ProFI project, 'Infrastructures Nationales en Biologie et Santé'; 'Investissements d'Avenir' call) and by Société Francophone du diabète. OCT received a Ph.D. fellowship from the French Ministry of Research. B.S. is a recipient of an advanced ERC grant (694717).

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

REFERENCES AND RECOMMENDED READING

Papers of particular interest, published within the annual period of review, have been highlighted as:

- of special interest
- of outstanding interest

1. Diehl AM, Day C. Cause, pathogenesis, and treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2017; 377:2063–2072. This review summarizes clinical essentials on NASH.
2. Haas JT, Francque S, Staels B. Pathophysiology and mechanisms of non-alcoholic fatty liver disease. *Annu Rev Physiol* 2016; 78:181–205. This review summarizes basics of the pathophysiology of NAFLD.
3. Younossi Z, Henry L. Contribution of alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease to the burden of liver-related morbidity and mortality. *Gastroenterology* 2016; 150:1778–1785.
4. Younossi ZM, Loomba R, Anstee QM, et al. Diagnostic modalities for non-alcoholic fatty liver disease, nonalcoholic steatohepatitis, and associated fibrosis. *Hepatology* (Baltimore, MD) 2018; 68:349–360. This review presents a critical overview of the currently available diagnostic techniques for NAFLD.
5. Chávez-Talavera O, Tailleux A, Lefebvre P, Staels B. Bile acid control of metabolism and inflammation in obesity, type 2 diabetes, dyslipidemia and NAFLD. *Gastroenterology* 2017; 152:1679.e3–1694.e3. This review describes the role of bile acids in the regulation of metabolism in physiology and in the metabolic syndrome.
6. Fang Q, Li H, Song Q, et al. Serum fibroblast growth factor 19 levels are decreased in Chinese subjects with impaired fasting glucose and inversely associated with fasting plasma glucose levels. *Diabetes Care* 2013; 36:2810–2814.
7. Gerhard GS, Styer AM, Wood GC, et al. A role for fibroblast growth factor 19 and bile acids in diabetes remission after Roux-en-Y gastric bypass. *Diabetes Care* 2013; 36:1859–1864.
8. Prinz P, Hofmann T, Ahnis A, et al. Plasma bile acids show a positive correlation with body mass index and are negatively associated with cognitive restraint of eating in obese patients. *Front Neurosci* 2015; 9:199.
9. Brufau G, Stellaard F, Prado K, et al. Improved glycemic control with colesevelam treatment in patients with type 2 diabetes is not directly associated with changes in bile acid metabolism. *Hepatology* (Baltimore, MD) 2010; 52:1455–1464.
10. Friedrich D, Marschall HU, Lammert F. Response of fibroblast growth factor 19 and bile acid synthesis after a body weight-adjusted oral fat tolerance test in overweight and obese NAFLD patients: a nonrandomized controlled pilot trial. *BMC Gastroenterol* 2018; 18:76.
11. Glicksman C, Pourmaras DJ, Wright M, et al. Postprandial plasma bile acid responses in normal weight and obese subjects. *Ann Clin Biochem* 2010; 47:482–484.
12. Haeusler RA, Camastra S, Nannipieri M, et al. Increased bile acid synthesis and impaired bile acid transport in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2016; 101:1935–1944.
13. Cariou B, Chetiveaux M, Zaïr Y, et al. Fasting plasma chenodeoxycholic acid and cholic acid concentrations are inversely correlated with insulin sensitivity in adults. *Nutr Metab* 2011; 8:48.
14. Ahmad NN, Plalzer A, Kaplan LM. Roux-en-Y gastric bypass normalizes the blunted postprandial bile acid excursion associated with obesity. *Int J Obes* 2013; 37:1553–1559.
15. Steiner C, Othman A, Saely CH, et al. Bile acid metabolites in serum: intraindividual variation and associations with coronary heart disease, metabolic syndrome and diabetes mellitus. *PLoS One* 2011; 6:e25006. This article describes inter and intraindividual bile acid variations, suggesting that bile acids are not good biomarkers for the diagnosis and staging of noncholestatic metabolic diseases.
16. Haeusler RA, Astiarraga B, Camastra S, et al. Human insulin resistance is associated with increased plasma levels of 12 α -hydroxylated bile acids. *Diabetes* 2013; 62:4184–4191. This article links insulin sensitivity and bile acid metabolism, showing increased 12 α hydroxylation and bile acid synthesis in obese and insulin resistant patients.
17. Haeusler RA, Pratt-Hyatt M, Welch CL, et al. Impaired generation of 12-hydroxylated bile acids links hepatic insulin signaling with dyslipidemia. *Cell Metab* 2012; 15:65–74.
18. Sun W, Zhang D, Wang Z, et al. Insulin resistance is associated with total bile acid level in type 2 diabetic and nondiabetic population: a cross-sectional study. *Medicine* (Baltimore) 2016; 95:e2778.
19. Ginos BN, Navarro SL, Schwarz Y, et al. Circulating bile acids in healthy adults respond differently to a dietary pattern characterized by whole grains, legumes and fruits and vegetables compared to a diet high in refined grains and added sugars: a randomized, controlled, crossover feeding study. *Metabolism* 2018; 83:197–204.
20. Wewalka M, Patti ME, Barbato C, et al. Fasting serum taurine-conjugated bile acids are elevated in type 2 diabetes and do not change with intensification of insulin. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99:1442–1451.
21. Kimberly WT, O'Sullivan JF, Nath AK, et al. Metabolite profiling identifies anandamide as a biomarker of nonalcoholic steatohepatitis. *JCI Insight* 2017; 2:e92989.
22. Vincent RP, Omar S, Ghozlan S, et al. Higher circulating bile acid concentrations in obese patients with type 2 diabetes. *Ann Clin Biochem* 2013; 50:360–364.
23. Jørgensen NB, Dirksen C, Bojsen-Møller KN, et al. Improvements in glucose metabolism early after gastric bypass surgery are not explained by increases in total bile acids and fibroblast growth factor 19 concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 100:E398–E406.
24. Sonne DP, van Nierop FS, Kulik W, et al. Postprandial plasma concentrations of individual bile acids and FGF-19 in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2016; 101:3002–3009.
25. Suhre K, Meisinger C, Döring A, et al. Metabolic footprint of diabetes: a multiplatform metabolomics study in an epidemiological setting. *PLoS One* 2010; 5:e13953.
26. Lundäsen T, Gälman C, Angelin B, Rudling M. Circulating intestinal fibroblast growth factor 19 has a pronounced diurnal variation and modulates hepatic bile acid synthesis in man. *J Intern Med* 2006; 260:530–536.
27. Barutcuoglu B, Basol G, Cakir Y, et al. Fibroblast growth factor-19 levels in type 2 diabetic patients with metabolic syndrome. *Ann Clin Lab Sci* 2011; 41:390–396.
28. Neuschwander-Tetri BA, Loomba R, Sanyal AJ, et al. Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for noncirrhotic, nonalcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Lond Engl* 2015; 385:956–965. This phase 2 trial shows the effectiveness of obeticholic acid for the treatment of NASH, despite elevated LDL-C as an adverse effect.
29. Harrison SA, Rinella ME, Abdelmalek MF, et al. NGM282 for treatment of nonalcoholic steatohepatitis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Lond Engl* 2018; 391:1174–1185. This phase 2 trial reports improved hepatic steatosis in NAFLD patients treated with the FGF19 analog NGM282, showing well-tolerated profiles.
30. Puri P, Daita K, Joyce A, et al. The presence and severity of nonalcoholic steatohepatitis is associated with specific changes in circulating bile acids. *Hepatology* (Baltimore, MD) 2017; 67:534–548. This article reports circulating bile acids and hepatic bile acid metabolism alterations in NASH patients, and correlation of hepatic necroinflammatory lesions of NASH with plasma bile acid alterations.
31. Kalhan SC, Guo L, Edmison J, et al. Plasma metabolomic profile in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism* 2011; 60:404–413.
32. Ferslew BC, Xie G, Johnston CK, et al. Altered bile acid metabolome in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Dig Dis Sci* 2015; 60:3318–3328.
33. Caussy C, Hsu C, Singh S, et al. Serum bile acid patterns are associated with the presence of NAFLD in twins, and dose-dependent changes with increase in fibrosis stage in patients with biopsy-proven NAFLD. *Aliment Pharmacol Ther* 2019; 49:183–193. This article reports circulating bile acid alterations in NAFLD patients, and correlation of hepatic necroinflammatory lesions of NASH with plasma bile acid alterations.

34. Bechmann LP, Kocabayoglu P, Sowa JP, *et al.* Free fatty acids repress small heterodimer partner (SHP) activation and adiponectin counteracts bile acid-induced liver injury in superobese patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* (Baltimore, MD) 2013; 57:1394–1406.
35. Mouzaki M, Wang AY, Bandsma R, *et al.* Bile acids and dysbiosis in non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One* 2016; 11:e0151829.
36. Lake AD, Novak P, Shipkova P, *et al.* Decreased hepatotoxic bile acid composition and altered synthesis in progressive human nonalcoholic fatty liver disease. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013; 268:132–140.
37. Aranha MM, Cortez-Pinto H, Costa A, *et al.* Bile acid levels are increased in the liver of patients with steatohepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008; 20:519–525.
38. Jiao N, Baker SS, Chapa-Rodriguez A, *et al.* Suppressed hepatic bile acid signalling despite elevated production of primary and secondary bile acids in NAFLD. *Gut* 2018; 67:1881–1891.
39. Legry V, Francque S, Haas JT, *et al.* Bile acid alterations are associated with insulin resistance, but not with NASH in obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2017; 102:3783–3794.
40. Dasarathy S, Yang Y, McCullough AJ, *et al.* Elevated hepatic fatty acid oxidation, high plasma fibroblast growth factor 21, and fasting bile acids in nonalcoholic steatohepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011; 23:382–388.

Chez L'Homme, la revue de la littérature nous indique d'une part que le profil des AB plasmatique varie dans le contexte de l'obésité, du DT2 et avec l'insulino-résistance. D'autre part, le profil des AB plasmatiques varie avec la NAFLD qui elle-même est très souvent lié à l'obésité, au DT2 et à l'insulino-résistance. L'existence de ces facteurs confondants se traduit donc par une grande hétérogénéité des résultats dans les études de cohorte sur la relation entre le pool plasmatique d'AB et la NAFLD. Le manque d'étude de cohorte prenant en compte l'intégralité des facteurs confondants que sont l'obésité, le diabète et l'insulino-résistance rend l'interprétation des résultats difficiles. Une étude récente de métabolomique ciblée au laboratoire sur des patients obèses et non diabétiques issus de la cohorte Resolve et réalisée par V. Legry a montré une association entre la modification du profil des acides biliaires et l'insulino-résistance, mais pas d'association entre les AB et la NASH (158). Nous souhaitons donc compléter cette étude de métabolomique ciblée sur le profil plasmatique des AB sur cohorte humaine en se focalisant cette fois sur des sujets présentant ou non diabétiques et présentant ou non une NASH, afin de caractériser l'association entre profil des AB, NASH et IR. Les patients sont issus de la cohorte ABOS (CHU de Lille) constituée de 1283 patients obèses candidats à la chirurgie bariatrique. Les patients inclus ont été regroupés selon le grade histologique de NASH établi sur la biopsie hépatique et sélectionnés sur des critères d'appariements précis afin d'équilibrer les sous-groupes selon l'obésité, l'âge, l'insulino-résistance et les traitements pouvant influencer le pool plasmatique des AB. Au total, l'analyse a pu être réalisée sur le plasma de 219 patients dont les résultats sont présentés dans le **manuscrit 2** ci-après.

Manuscrit 2 :

Insulin resistance interacts with NASH in the control of plasma bile acid levels.

En révision dans *Journal of Hepatology Reports*

Insulin resistance interacts with NASH in the control of plasma bile acid levels.

Guillaume Grzych^{1,2}, Oscar Chávez-Talavera¹, Amandine Descat³, Dorothée Thuillier⁴, An Verrijken^{5,6}, Mostafa Kouach³, Vanessa Legry¹, Hélène Verkindt⁴, Violeta Raverdy⁴, Benjamin Legendre⁴, Robert Caiazzo⁴, Luc Van Gaal^{5,6}, Jean-Francois Goossens³, Réjane Paumelle¹, Sven Francque^{5,7}, François Pattou⁴, Joel T. Haas^{1*}, Anne Tailleux^{1*}, Bart Staels^{1,2*}

Affiliations:

¹ Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1011- EGID, F-59000 Lille, France.

² CHU Lille, Service d'Endocrinologie, Métabolisme, Nutrition, Oncologie, F-59000 Lille, France

³ Univ. Lille, CHU Lille, EA 7365-GRITA-Groupe de Recherche sur les formes Injectables et les Technologies Associées, F-59000 Lille, France

⁴ Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1190 - EGID, F-59000, Lille, France

⁵ Laboratory of Experimental Medicine and Pediatrics, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Antwerp, 2610 Wilrijk/Antwerp, Belgium

⁶Department of Endocrinology, Diabetology and Metabolism, Antwerp University Hospital, 2650 Edegem/Antwerp, Belgium

⁷ Department of Gastroenterology and Hepatology, Antwerp University Hospital, 2650 Edegem/Antwerp, Belgium

* These authors co-supervised this study

Corresponding author:

Bart Staels

Mail: bart.staels@pasteur-lille.fr

Tel. 33-3-20 87 78 25

Fax. 33-3-20 87 73 60

Keywords: NASH, NAFLD, Bile Acids, Diabetes, Insulin Resistance, Obesity, Translational Study.

Word count: 3680

Number of figures and tables: 4 figures / 3 tables

Financial support statement:

Bart Staels is a recipient of an ERC Advanced Grant (694717). This work benefits from State grant managed by the National Research Agency under the program "Investissement d'Avenir" with the reference ANR-16-RHUS-0006_PreciNASH. This study was also supported by funding from the Société Francophone du Diabète (AAP2014 - V. Legry).

Abstract:

Introduction: Plasma bile acids (BA) have been extensively studied as pathophysiological actors in Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH). However, results from clinical studies are often complicated by the association of NASH with type 2 diabetes (T2D), obesity and insulin resistance (IR). Here, we sought to dissect the relationship between NASH, T2D and plasma BA levels in a large patient cohort.

Materials and Methods: Four groups of patients from the ABOS cohort (Clin Trials NCT01129297) were included based on presence or absence of histologically evaluated NASH with or without coincident T2D. Patients were matched for BMI, HOMA2-assessed IR, HbA_{1c}, age and gender. To study the effect of IR and BMI on the association of plasma BA and NASH, patients from the Hepadip study were included. In both cohorts, fasting plasma BA concentrations were measured.

Results: Plasma BA concentrations were higher in NASH compared to No-NASH patients both in T2D and NoT2D patients from the ABOS cohort. As we previously reported that plasma BA levels were unaltered in NASH patients of the Hepadip cohort, we assessed the impact of BMI and IR on the association of NASH and BA on the combined BA datasets. Our results revealed

that NASH-associated increases in plasma total cholic acid (CA) concentrations depend on the degree of HOMA2- assessed systemic IR, but not on β -cell function nor on BMI.

Conclusion: Plasma BA concentrations are elevated only in those NASH patients exhibiting pronounced IR.

Introduction

Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) covers a spectrum of hepatic disorders ranging from isolated steatosis (NAFL) to Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH) [1]. While steatosis is generally considered benign, NASH, which combines steatosis with inflammation and hepatocyte damage (evidenced histologically by ballooning), is a risk factor for progressive fibrosis and, ultimately cirrhosis and hepatocellular carcinoma, as well as for cardiovascular disease, type 2 diabetes (T2DM) and other extra-hepatic consequences [2]. Given the importance of metabolic alterations in this disease, Metabolic Associated Fatty Liver Disease (MAFLD) has recently been proposed as a more accurate denomination of fatty liver disease associated with metabolic dysfunction [3]. The pathogenesis of NAFLD remains poorly understood, and there is currently an urgent need to identify therapeutic targets.

Bile acids (BA) are amphipathic molecules that facilitate absorption of dietary fat and lipophilic vitamins in the small intestine. Recently, BA have attracted growing interest as they are also signaling molecules that control energy expenditure and glucose and lipid metabolism *via* receptors such as the farnesoid-X-receptor (FXR, *NR1H4*) and TGR5 (*GPBAR1*) [4,5]. BA are synthesized in the liver as primary BAs (CA, CDCA, HCA), secreted in the bile and the intestine where they are transformed by the gut flora into secondary BA (DCA, LCA, HDCA, UDCA). Each BA species can be measured as free or conjugated to taurine or glycine. In humans, more than 90% of BA are reabsorbed in the intestine and returned to the liver via the portal vein in an enterohepatic cycle. While it is still unclear whether alterations in BA metabolism drive NASH development, BA-activated signaling pathways remain attractive therapeutic targets for its treatment. For example, treating NASH patients with the FXR agonist obeticholic acid

improved several key histological features of NAFLD [6–8]. Thus, BA may play a role in NASH pathophysiology.

Several studies have assessed whether NAFLD patients display changes in plasma BA profiles (for review, see [9]). Globally, plasma BA concentrations are higher in NASH vs no-NASH patients, with qualitative differences varying among studies, *i.e.* increased primary BA [10] or conjugated BA [11,12]. However, increased plasma BA concentrations are also observed in patients with T2D, insulin resistance (IR) and obesity [9,13–15], all major risk factors for NASH [16]. Thus, the intricate relationship between NAFLD, obesity, IR and T2D complicates the establishment of clear and independent associations between plasma BA alterations and these individual clinical features. Indeed, in our previous study, Legry *et al.* reported that plasma BA concentrations positively correlated with glucose homeostasis parameters (HOMA-IR, fasting plasma glucose, 2hr oral glucose tolerance tests (OGTT)- glucose), but were not affected by the presence of histologically assessed NASH [17].

In the present study, we aimed to investigate the association of plasma BA changes and NASH depending on T2D status. To do this, we analyzed fasting plasma BA profiles in patients with histologically assessed NASH with or without coincident T2D, selected from the ABOS cohort [18], enlarged with previously studied patients from the Hepadip cohort [17] for part of the analyses. Groups of NASH and No-NASH patients were carefully matched to control for obesity and IR as potential confounding factors.

Methods:

Description of the patients

ABOS study

Patients were selected from the prospective Biological Atlas of Severe Obesity (ABOS) cohort, which included patients referred to the Lille University Hospital bariatric surgery unit for evaluation. All patients fulfilling the subsequent criteria for bariatric surgery were prospectively included in the cohort prior to surgery. No specific dietary restrictions were imposed immediately preceding the surgery. Blood collection was performed the morning of the surgery after an overnight fast. Patients were to be 18 years or older at time of evaluation and meeting the criteria for bariatric surgery according to French national guidelines: severe obesity with at least one comorbidity factor (*i.e.* arterial hypertension or diabetes mellitus) for at least 5 years and failure of a well-conducted medical treatment during 6 to 12 months, including life style modification and appropriate drug treatment; absence of medical or psychological contra-indications for bariatric surgery; social security insurance coverage; no current significant alcohol consumption (maximum average daily consumption of alcohol of 20 g/d for women and 30 g/d for men), and no past excessive drinking for a period longer than 2 years at any time in the last 20 years; absence of long-term consumption of hepatotoxic drugs; negative screening for chronic liver disease (including, but not limited to viral hepatitis and autoimmune liver diseases). Informed written consent was obtained from all patients and the study was conducted in conformity with the Helsinki Declaration. The Lille University Hospital ethics committee approved the cohort (NCT01129297).

Hepadip study

Additionally, patients visiting the obesity clinic of the Antwerp University Hospital from the HEPADIP protocol were included as described in our previous study (see patient characteristics in table 1 of [17]). Briefly, overweight (BMI between 25-30 kg/m²) or obese (BMI \geq 30 kg/m²) patients were recruited between October 2006 to May 2014. When NAFLD was suspected based on abnormal blood biochemistry or ultrasound, patients were screened for the presence of NAFLD by liver biopsy upon additional informed consent.

Rationale of study group compositions

To study the relation between plasma BA concentrations and NASH according to diabetes status, patients were first classified into two clearly distinct groups (“diabetes status”): non-type 2 diabetes (No-T2D) and type 2 diabetes (T2D). From these two groups, patients were subsequently classified according to their liver histological characteristics in distinct groups of normal or nearly normal liver (No-NASH) (accepting the presence of up to grade 1 (mild) steatosis without any other lesion) or NASH patients [19]. Among the No-T2D or T2D patients, No-NASH and NASH groups were propensity score matched, without predefined ranges, for the following parameters: body mass index (BMI), HOMA2S, HOMA2B, HbA_{1c} and insulin/statin treatments (**Supplemental Figure 1**), yielding a study cohort of 219 patients divided into four groups depending on NASH and T2D diagnosis (No-T2D No-NASH, n=85; No-T2D NASH, n=17; T2D No-NASH, n=59; and T2D NASH, n=58). The relatively low proportion of patients with NASH without T2D in the ABOS cohort (only 17 patients) is in agreement with epidemiological observations [20]. As expected from the study group selection and matching criteria, the NASH and No-NASH patients showed no significant differences for HOMA2S,

HOMA2B, HbA_{1c}, fasting plasma glucose and insulin within the No-T2D (**Table 1A**) nor the T2D (**Table 1B**) groups.

There was no significant difference in the proportion of patients taking insulin or anti-diabetic treatments (i.e. sulfonylurea, glinides, glucagon-like peptide 1 receptor agonists and dipeptidylpeptidase-4 inhibitors) between the T2D No-NASH and T2D NASH patients. Only a slightly higher number of patients were treated with metformin in the NASH group (No-NASH: 47% vs NASH: 70%, $p=0.02$). Similarly, the proportion of patients on statin or fibrate treatment was also similar between T2D No-NASH and T2D NASH patients, as well as between the 2 No-T2D groups (data not shown).

To investigate the interaction between NASH and plasma BA according to IR levels, a patient group covering a large range of HOMA2 was studied by including the 58 patients with histological NASH assessment and accompanying clinical data (26 No-NASH; 32 NASH) from the Hepadip study [17]. Since exogenous insulin therapy impacts on HOMA2 values, patients on insulin treatment ($n=38$) were excluded, yielding a “combined cohort” of 239 patients.

Biological assays

Fasting plasma glucose, insulin and HbA_{1c} were measured as previously described [18]. The Homeostatic Model Assessment 2 (HOMA2) was used to estimate steady state β -cell function (HOMA2B) and insulin sensitivity (HOMA2S) from fasting plasma insulin and glucose using the online calculator [21]. Results are expressed as percentages of normal values in a reference population.

Diabetes assessment

All participants were submitted to a standard oral glucose (75g) tolerance test (OGTT). Diabetes was diagnosed according to American Diabetes Association (ADA) guidelines as defined by fasting glycaemia > 1.26 g/L (7.0 mmol/L) or plasma HbA_{1c} > 6.5 % (48 mmol/mol) or 2h glycaemia ≥ 2 g/L (11.1 mmol/L) during OGTT or use of an anti-diabetic drug [22].

Histological assessment on liver biopsies

Liver biopsies were systematically planned during the surgical procedure in the ABOS cohort and analyzed as previously described [23]. A liver needle biopsy was performed during the first part of the surgical procedure after trocar insertion and abdominal exploration, within 10 minutes after pneumo-peritoneum installation. The MONOPTY needle biopsy system (16G, ref: 121620; C. R. Bard, Tempe AZ) was used. Biopsies were routinely stained with haematoxylin-eosin, Saffron and Masson's trichrome, Sirius Red, and Perl's iron staining. Pathologists were blinded to clinical and biological data and independently graded steatosis (ranging 0-3), lobular inflammation (ranging 0-3), and ballooning (ranging 0-2) according to NASH Clinical Research Network criteria [24]. Liver fibrosis was assessed using the Kleiner fibrosis score [24]. In the present study, in order to compare 2 groups with clearly distinct liver phenotypes, 2 histological groups were defined: No-NASH was defined as steatosis<2, ballooning=0 and lobular inflammation=0, which hence means normal liver or minimal isolated steatosis without any other lesion; NASH was defined by the combined presence of steatosis and ballooning and lobular inflammation of any degree [19,25]. Patients with moderate to severe steatosis (grade 2-3) and/or some ballooning or lobular inflammation meeting neither the No-NASH definition as described for our study nor the NASH definition,

were excluded. Histological assessment and classification of the Hepadip cohort was identical, as reported in our previous study, but in this cohort, the majority of the biopsies were taken outside the setting of bariatric surgery [17].

Plasma BA and C4 quantification

Plasma concentrations of 21 BA species (**Supplemental Table 1**) and 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one (C4, an intermediate product of the classical BA synthesis pathway and marker of hepatic BA synthesis) were quantified as previously described [17]. Briefly, after protein precipitation with iced methanol, BA were quantified by high-performance liquid chromatography (UFLC-XR device; Shimadzu, Kyoto, Japan) coupled to tandem mass spectrometry (MS/MS) (QTRAP 5500 hybrid system, equipped with a Turbo VTM ion source; Sciex, Foster City, CA, USA) using 5 deuterated BA (D4-CA, D4-GCA, D4-TCA, D4-CDCA, D4-GCDCA) as internal standards. After isolation using a SPE column, C4 was quantified by LC-MS/MS using a deuterated C4 as internal standard. Plasma BA and C4 concentrations were expressed in nmol/L. Ratio and total values were determined according to formulas presented in **Supplemental Table 1**.

Statistical analysis

Values are expressed as mean \pm standard deviation (mean \pm SD), mean \pm standard error of the mean (SEM) or median \pm Inter Quartile Range (median \pm IQR) as indicated in figure legends. Statistical differences in clinical and biological parameters were assessed by Mann-Whitney or Student's t-test for continuous variables or Chi-squared test for categorical values. P-values less than 0.05 were considered statistically significant. Random forest analyses were used to obtain a variable importance plot for discrimination of NASH status for each plasma BA

species. A two-way analysis of variance (ANOVA) and moderated multiple regression analysis model were used to test interaction between plasma BA, NASH, BMI, HOMA2B and HOMA2S.

Results

Plasma BA concentrations are elevated both in T2D and No-T2D NASH patients.

To investigate a potential association between plasma BA and NASH in patients with T2D, fasting plasma BA were measured in patients from the ABOS cohort, composed of both T2D and No-T2D patients with biopsy-assessed NAFLD. In the overall study cohort (n=219), irrespective of diabetes status, plasma total BA concentrations were elevated in patients with NASH (NASH: 4589 ± 5640 nmol/L; n=75; vs No-NASH: 2035 ± 1299 nmol/L; n=144; mean \pm SD, $p < 0.0001$) (**Figure 1A**). Among the measured plasma BA species, only total lithocholic acid (LCA), total hyocholic acid (HCA) and total hyodeoxycholic acid (HDCA) were not significantly increased in NASH patients.

T2D NASH patients displayed two-fold higher total plasma BA than T2D No-NASH patients (4671 ± 6100 nmol/L, n=58; vs 1996 ± 1078 nmol/L, n= 59; mean \pm sd; $p < 0.0001$) (**Figure 1B and Supplemental Table 2**). Surprisingly, total plasma BA concentrations were also approximately two-fold higher in No-T2D patients with NASH compared to No-T2D No-NASH (NASH: 4311 ± 3806 nmol/L; n=17; No-NASH: 2063 ± 1438 nmol/L; n=85; mean \pm SD, $p < 0.001$) (**Figure 1B and Supplemental Table 2**). Primary (CA, chenodeoxycholic acid (CDCA) and HCA) and secondary (deoxycholic acid (DCA), LCA, ursodeoxycholic acid (UDCA) and hyodeoxycholic acid (HDCA)) BA were elevated in NASH patients both in the No-T2D and T2D groups. Similarly, both 12aOH (CA and DCA) and non12aOH BA (CDCA, HCA, LCA, UDCA and HDCA) (**Supplemental Table 1**) were higher in both groups of NASH patients compared to their respective No-NASH controls, leaving their ratio unchanged (**Supplemental Table 2**). Moreover, plasma C4 was higher in NASH vs No-NASH patients in the overall study cohort

(**Figure 1A**), this increase being statistically significant only in T2D patients (**Figure 1B and Supplemental Table 2**). Thus, total plasma BA concentrations were higher in NASH patients both with T2D or without T2D, findings which were at first sight conflicting with our previous report [17].

Plasma BA concentrations are mainly associated to NASH and not to glucose homeostasis parameters in the ABOS study cohort.

To identify the specific disease features associated with plasma BA changes in NASH, we assessed correlations between plasma BA concentrations and BMI, parameters of glucose homeostasis and NAFLD histological characteristics in the entire ABOS study cohort including both No-T2D and T2D patients (n=219) (**Supplemental Figure 2**). A modest inverse correlation between the ratio of plasma 6aOH species (HCA and HDCA) to non-6aOH species (CA, CDCA, DCA, LCA and UDCA), GHCA, THCA, total HDCA, free HDCA, and glycaemia at 2-hours after OGTT, as well as a modest positive correlation between plasma free LCA, DCA, total DCA and C4 and fasting plasma glycaemia (FPG) were observed (**Supplemental Figure 2**). However, the most pronounced correlations were observed with hepatic lesions: plasma total BA, total, free and conjugated CA, CDCA, DCA and C4 all positively correlated with NAFLD histological characteristics including steatosis, lobular inflammation, ballooning and also with fibrosis stage (except for free CA) (**Supplemental Figure 2**). Conversely, total 6aOH BA as well as each specific species (*i.e.* total, free and conjugated HCA and HDCA) did not correlate with hepatic lesions, but correlated negatively with 2h OGTT glucose levels. These latter results are in line with our previous findings in a different cohort showing an association of total HCA with

parameters of glucose metabolism in patients with prediabetes [26]. These results indicate that in this ABOS study cohort, plasma BA alterations are mainly associated with NASH rather than with glucose homeostasis parameters.

CA species discriminate NASH independently of glucose homeostasis parameters.

We next sought to identify the plasma BA which most efficiently discriminate NASH status independently of glucose homeostasis parameters. Interestingly, the top 3 plasma BA identified by random forest analysis were all CA species (GCA, TCA and total CA) (**Figure 2A**). Whereas no significant differences were found for GCA, TCA and total CA between No-T2D and T2D patients (**Figure 2B, 2D and 2F**), significantly higher levels of these BA were found in NASH vs No-NASH patients ($p < 0.001$) (**Figure 2C, 2E and 2G**). Multiple linear regression analysis of NASH status, T2D status, BMI, HOMA2B, HOMA2S, HbA_{1c} and total CA, GCA and TCA showed that NASH was the only parameter significantly contributing to plasma CA, GCA and TCA (**Supplemental Table 3**), suggesting that, in the ABOS cohort, these BA most efficiently discriminate NASH status, independently of other confounding factors.

Insulin sensitivity interacts with NASH status in the determination of plasma BA levels.

Since the results obtained in the ABOS cohort appear in contradiction to our previous study in the Hepadip cohort (Legry *et al.* [17]), we compared the two cohorts to try to explain this discrepancy. In the ABOS study, the No-T2D patients (No-NASH and NASH combined) were more obese and insulin resistant compared to the Hepadip patients (BMI: 40.0 ± 5.8 kg/m² vs 46.1 ± 7.2 kg/m², and HOMA2S: 62 ± 37 % vs 41 ± 23 %, for Hepadip vs ABOS patients, respectively, mean \pm SD). To determine whether differences in metabolic status may alter the correlations between plasma BA and NASH, we assessed whether BMI, HOMA2S or

HOMA2B affect the NASH-associated increase in plasma BA. We focused on total CA, the major plasma BA component most correlated with NASH ([10,11,27] and **Figure 2A**) or IR [17,28], by combining Hepadip and ABOS cohort patients as described in the material and methods section. Two-way ANOVA analysis assessing the influence of glucose parameters and BMI on total plasma CA levels, showed an interaction between HOMA2S, but not HOMA2B nor BMI, with NASH status in the determination of plasma total CA levels (**Table 2**). Identical results were obtained when the interaction was tested by moderated multiple regression analysis (data not shown) and when patients treated with secretagogues (sulfonylureas) were excluded. Interestingly, there was no correlation between total CA and HOMA2S or HOMA2B in No-NASH patients (respectively $R=-0.08$, $p=0.28$ and $R=0.02$, $p=0.81$) (**Figure 3A and 3B**). By contrast, a significant negative correlation was found in NASH patients between total CA and HOMA2S ($R=-0.31$, $p<0.01$) (**Figure 3A**), but not between total CA and HOMA2B ($R=-0.04$, $p=0.69$) (**Figure 3B**).

These results suggest that alterations caused by reduced insulin sensitivity drive the NASH-associated increase in plasma total CA.

Discussion

Previous studies assessed whether NASH is associated with altered BA metabolism either in No-T2D patients or in cohorts not stratified for T2D. However, T2D and obesity are also associated with changes in plasma BA. Therefore, we measured plasma BA concentrations in patients selected from the ABOS cohort, which contains T2D and No-T2D patients with histologically evaluated NASH. Our results showed that plasma BA concentrations are higher in NASH compared to No-NASH patients, irrespective of the T2D status. Additionally, this is the first study showing an interaction between the degree of insulin sensitivity and NASH status in the determination of plasma BA levels. These findings provide an explanation for the previous discrepant reports on plasma BA in NASH.

Our results are in agreement with several previous studies showing increased plasma BA in NASH compared to No-NASH patients [9–11]. Both fasting primary [10] and conjugated BA species were reported to be higher in NASH patients [10–12]. Moreover, positive correlations between histological lesions of NASH (lobular inflammation, portal inflammation, and ballooning) and plasma BA concentrations (mainly GCA, TCA and GCDCA) have been reported [11], findings largely in agreement with the present study.

However, in a previous study [17], we found that plasma BA levels were unaffected by NASH when patients were matched by BMI and had relatively low levels of IR. Moreover, BA concentrations were rather associated with IR than with NASH. These findings were in line with previous studies showing strong associations of BA with IR and obesity [13,29,30]. Unfortunately, in many published studies, BMI and IR were not always carefully controlled when comparing NASH and healthy liver patients, complicating their interpretation [8].

Therefore, the present findings in the ABOS cohort, carefully controlled for IR and BMI, were surprising and prompted us to perform a combined analysis including the Hepadip cohort dataset to understand this apparent discrepancy. A clear difference between the 2 cohorts was that the patients in the Hepadip cohort were generally less metabolically compromised. In line, the No-T2D groups in the ABOS cohort contain a high number (78%) of prediabetic subjects (fasting blood glucose between 100 and 125 mg/dL and/or 2hr OGTT glucose between 140 and 199 mg/dL [31]) with higher BMI and IR (46.1 ± 7.2 and 41 ± 23 % for BMI and HOMA2S, respectively). Comparatively, patients in the Hepadip cohort have lower BMI and IR, indicated by higher HOMA2S (40.0 ± 5.8 kg/m² and 62 ± 37 % for BMI and HOMA2S, respectively). Therefore, we addressed the hypothesis of an interaction between metabolic status and NASH on BA metabolism by combining the Hepadip and ABOS cohorts, hence covering a large range of BMI and HOMA2S (**Figure 3A** and **Supplemental Figure 3**).

Overall, our findings suggest that in a setting of milder metabolic perturbations (less severe obesity with less pronounced IR), as in the Hepadip cohort, NASH is not associated with BA profile changes [17]. Conversely, in a context of worse insulin-resistance (with lower HOMA2S), BA are elevated in NASH and correlate better with histological parameters than with measures of glucose homeostasis, suggesting an interaction between NASH pathophysiology and altered glucose metabolism pathways in the control of plasma BA levels (**Figure 4**).

The molecular mechanisms linking BA and glucose homeostasis involve alterations in signaling pathways through BA-activated receptors, such as the membrane receptor TGR5 and the nuclear receptor FXR. For instance, FXR regulates not only genes coding for enzymes involved

in BA synthesis, such as cholesterol 7 α -hydroxylase (*Cyp7a1*), the rate limiting enzyme in the classical BA synthesis pathway, and 12 α -hydroxylase (*Cyp8b1*), but also genes involved in glucose and lipid metabolism [5]. Moreover, hepatic FXR expression is altered in animal models of diabetes, and is regulated by glucose [32]. Furthermore, insulin and glucose regulate *Cyp7a1* gene transcription in human hepatocytes, hence reciprocally impacting on BA metabolism [33]. Moreover, mice deficient in *Cyp8B1* display improved glucose tolerance, insulin sensitivity, and β -cell function [34]. Therefore, severe IR may precipitate NASH induced alterations of hepatic BA metabolism. In addition, hepatic BA clearance and/or intestinal BA metabolism and uptake may also be differently affected in NASH patients exhibiting severe IR. Unfortunately, detailed studies on the involved mechanisms are difficult to perform in humans.

Importantly, this study has a number of limitations. First, the cohorts consisted mainly of overweight and obese patients (BMI >27 kg/m²) who were generally younger than in other NASH cohorts. Furthermore, we have not explored how genetic and lean forms of NAFLD may also affect plasma BA homeostasis [10,35]. Second, many diabetic patients have pharmacological treatments which may impact bile acid metabolism. To avoid these potential confounding effects, patients were matched for their treatments, and patients treated with insulin were excluded from the combined analysis. Finally, insulin resistance was not evaluated by the gold standard hyperinsulinemic-euglycemic clamp technique but estimated by HOMA2 calculation, and the duration since diagnosis of either T2D or NASH are not considered. This may have led to underestimation of the severity of insulin resistance in some patients.

In conclusion, our findings confirm the high inter-regulation of BA and glucose metabolism and show that insulin sensitivity interacts with NASH in the regulation of plasma BA metabolism.

Acknowledgements.

We thank Paul-Emile Hecquet for analytical support. Bart Staels is a recipient of an ERC Advanced Grant (694717). This work benefits from State grant managed by the National Research Agency under the program "Investissement d'Avenir" with the reference ANR-16-RHUS-0006_PreciNASH. This study was also supported by funding from the Société Francophone du Diabète (AAP2014 - V. Legry).

References

- [1] Haas JT, Francque S, Staels B. Pathophysiology and Mechanisms of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Annu Rev Physiol* 2016;78:181–205. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105331>.
- [2] Stefan N, Häring H-U, Cusi K. Non-alcoholic fatty liver disease: causes, diagnosis, cardiometabolic consequences, and treatment strategies. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2019;7:313–24. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(18\)30154-2](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(18)30154-2).
- [3] Eslam M, Sanyal AJ, George J. MAFLD: A consensus-driven proposed nomenclature for metabolic associated fatty liver disease. *Gastroenterology* 2020;0. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.11.312>.
- [4] Kuipers F, Bloks VW, Groen AK. Beyond intestinal soap—bile acids in metabolic control. *Nat Rev Endocrinol* 2014;10:488–98. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.60>.
- [5] Chávez-Talavera O, Tailleux A, Lefebvre P, Staels B. Bile Acid Control of Metabolism and Inflammation in Obesity, Type 2 Diabetes, Dyslipidemia, and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 2017;152:1679-1694.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.01.055>.
- [6] Mudaliar S, Henry RR, Sanyal AJ, Morrow L, Marschall H, Kipnes M, et al. Efficacy and Safety of the Farnesoid X Receptor Agonist Obeticholic Acid in Patients With Type 2 Diabetes and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 2013;145:574-582.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.05.042>.
- [7] Neuschwander-Tetri PBA, Loomba R, Sanyal PAJ, Lavine PJE, Natta MLV, Abdelmalek MF, et al. Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic,

non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 2015;385:956. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61933-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61933-4).

[8] Younossi ZM, Ratziu V, Loomba R, Rinella M, Anstee QM, Goodman Z, et al. Obeticholic acid for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: interim analysis from a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *The Lancet* 2019;394:2184–96. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)33041-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)33041-7).

[9] Chávez-Talavera O, Haas J, Grzych G, Tailleux A, Staels B. Bile acid alterations in nonalcoholic fatty liver disease, obesity, insulin resistance and type 2 diabetes: what do the human studies tell? *Curr Opin Lipidol* 2019;30:244–54. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000597>.

[10] Puri P, Daita K, Joyce A, Mirshahi F, Santhekadur PK, Cazanave S, et al. The presence and severity of nonalcoholic steatohepatitis is associated with specific changes in circulating bile acids. *Hepatology* 2018;67:534–48. <https://doi.org/10.1002/hep.29359>.

[11] Kalhan SC, Guo L, Edmison J, Dasarathy S, McCullough AJ, Hanson RW, et al. Plasma Metabolomic Profile in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Metabolism* 2011;60:404–13. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2010.03.006>.

[12] Ferslew BC, Xie G, Johnston CK, Su M, Stewart PW, Jia W, et al. Altered Bile Acid Metabolome in Patients with Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Dig Dis Sci* 2015;60:3318. <https://doi.org/10.1007/s10620-015-3776-8>.

[13] Sun W, Zhang D, Wang Z, Sun J, Xu B, Chen Y, et al. Insulin Resistance is Associated With Total Bile Acid Level in Type 2 Diabetic and Nondiabetic Population. *Medicine (Baltimore)* 2016;95. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002778>.

- [14] Prinz P, Hofmann T, Ahnis A, Elbelt U, Goebel-Stengel M, Klapp BF, et al. Plasma bile acids show a positive correlation with body mass index and are negatively associated with cognitive restraint of eating in obese patients. *Front Neurosci* 2015;9. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00199>.
- [15] Brufau G, Bahr MJ, Staels B, Claudel T, Ockenga J, Böker KH, et al. Plasma bile acids are not associated with energy metabolism in humans. *Nutr Metab* 2010;7:73. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-7-73>.
- [16] Younossi ZM, Golabi P, Avila L de, Paik JM, Srishord M, Fukui N, et al. The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* 2019;71:793–801. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.06.021>.
- [17] Legry V, Francque S, Haas JT, Verrijken A, Caron S, Chávez-Talavera O, et al. Bile Acid Alterations Are Associated With Insulin Resistance, but Not With NASH, in Obese Subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2017;102:3783–94. <https://doi.org/10.1210/jc.2017-01397>.
- [18] Margerie D, Lefebvre P, Raverdy V, Schwahn U, Ruetten H, Larsen P, et al. Hepatic transcriptomic signatures of statin treatment are associated with impaired glucose homeostasis in severely obese patients. *BMC Med Genomics* 2019;12. <https://doi.org/10.1186/s12920-019-0536-1>.
- [19] EASL–EASD–EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2016;64:1388–402. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.11.004>.
- [20] Younossi ZM, Stepanova M, Younossi Y, Golabi P, Mishra A, Rafiq N, et al. Epidemiology of chronic liver diseases in the USA in the past three decades. *Gut* 2019;gutjnl-2019-318813. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-318813>.

- [21] Levy JC, Matthews DR, Hermans MP. Correct Homeostasis Model Assessment (HOMA) Evaluation Uses the Computer Program. *Diabetes Care* 1998;21:2191–2. <https://doi.org/10.2337/diacare.21.12.2191>.
- [22] Association AD. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2019. *Diabetes Care* 2019;42:S13–28. <https://doi.org/10.2337/dc19-S002>.
- [23] Caiazzo R, Lassailly G, Leteurtre E, Baud G, Verkindt H, Raverdy V, et al. Roux-en-Y Gastric Bypass Versus Adjustable Gastric Banding to Reduce Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A 5-Year Controlled Longitudinal Study. *Ann Surg* 2014;260:893–9. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000000945>.
- [24] Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;41:1313–21. <https://doi.org/10.1002/hep.20701>.
- [25] Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 2018;67:328–57. <https://doi.org/10.1002/hep.29367>.
- [26] Chávez-Talavera O, Wargny M, Pichelin M, Descat A, Vallez E, Kouach M, et al. Bile acids associate with glucose metabolism, but do not predict conversion from impaired fasting glucose to diabetes. *Metab - Clin Exp* 2020;103.
- [27] Jiao N, Baker SS, Chapa-Rodriguez A, Liu W, Nugent CA, Tsompana M, et al. Suppressed hepatic bile acid signalling despite elevated production of primary and secondary bile acids in NAFLD. *Gut* 2017;gutjnl-2017-314307. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314307>.

- [28] Lee S-G, Lee Y, Choi E, Cho Y, Kim J-H. Fasting serum bile acids concentration is associated with insulin resistance independently of diabetes status. *Clin Chem Lab Med CCLM* 2019;57:1218–1228. <https://doi.org/10.1515/cclm-2018-0741>.
- [29] Sonne DP, van Nierop FS, Kulik W, Soeters MR, Vilsbøll T, Knop FK. Postprandial Plasma Concentrations of Individual Bile Acids and FGF-19 in Patients With Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2016;101:3002–9. <https://doi.org/10.1210/jc.2016-1607>.
- [30] Vincent RP, Omar S, Ghozlan S, Taylor DR, Cross G, Sherwood RA, et al. Higher circulating bile acid concentrations in obese patients with type 2 diabetes. *Ann Clin Biochem* 2013;50:360–4. <https://doi.org/10.1177/0004563212473450>.
- [31] Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2010;33:S62–9. <https://doi.org/10.2337/dc10-S062>.
- [32] Duran-Sandoval D, Mautino G, Martin G, Percevault F, Barbier O, Fruchart J-C, et al. Glucose Regulates the Expression of the Farnesoid X Receptor in Liver. *Diabetes* 2004;53:890–8. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.4.890>.
- [33] Li T, Chanda D, Zhang Y, Choi H-S, Chiang JYL. Glucose stimulates cholesterol 7 α -hydroxylase gene transcription in human hepatocytes. *J Lipid Res* 2010;51:832–42. <https://doi.org/10.1194/jlr.M002782>.
- [34] Kaur A, Patankar JV, Haan W de, Ruddle P, Wijesekara N, Groen AK, et al. Loss of Cyp8b1 Improves Glucose Homeostasis by Increasing GLP-1. *Diabetes* 2015;64:1168–79. <https://doi.org/10.2337/db14-0716>.
- [35] Anstee QM, Darlay R, Cockell S, Meroni M, Govaere O, Tiniakos D, et al. Genome-wide association study of non-alcoholic fatty liver and steatohepatitis in a histologically-

characterised cohort. J Hepatol 2020:S0168827820302130.
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.04.003>.

Table 1A. Clinical, biological, and liver histological characteristics of non-diabetic patients (No-T2D) from the ABOS study cohort grouped according to NASH status.

Data are expressed as mean \pm standard deviation or number of patients for categorical variables. P-values are obtained using the Chi-square test for qualitative data and the t-test for quantitative data. P-values <0.05 are considered statistically significant (bold). NA: Not Available values

	No-NASH (n=85)	NASH (n=17)	p-value
Sex (F/M)	57/28	12/5	1
Age (years)	38.5 \pm 12.3	38.2 \pm 10.5	0.91
BMI (kg/m ²)	46.1 \pm 7.4	46.1 \pm 6.3	0.99
HOMA2S (%)	42 \pm 24	35 \pm 16	0.27
HOMA2B (%)	164 \pm 56	179 \pm 48	0.26
HbA _{1c} (%)	5.7 \pm 0.3	5.6 \pm 0.3	0.08
Fasting plasma glucose (mmol/L)	5.5 \pm 0.5	5.5 \pm 0.6	0.89
Fasting plasma insulin (mUI/L)	23.2 \pm 10.7	27.1 \pm 12.3	0.24
Steatosis Grade (0,1,2,3)	20/65/0/0	0/6/6/5	<0.001
Ballooning (0,1,2)	85/0/0	0/15/2	<0.001
Lobular Inflammation (0,1,2,3)	85/0/0/0	0/12/5/0	<0.001
Fibrosis Stage (0,1,2,3,4) (NA)	78/2/1/2/0 (2)	7/4/2/4/0	<0.001

Table 1B. Clinical, biological, and liver histological characteristics of diabetic patients (T2D) from the ABOS study cohort grouped according to NASH status.

Data are expressed as mean \pm standard deviation or number of patients for categorical variables. P-values are obtained using the Chi-square test for qualitative data and the ANOVA test for quantitative data. P-values <0.05 are considered statistically significant (bold). NA: Not Available values

	No-NASH (n=59)	NASH (n=58)	p-value
Sex (F/M)	39/20	37/21	0.95
Age (years)	47.1 \pm 9.7	49.3 \pm 7.6	0.17
BMI (kg/m ²)	47.0 \pm 7.7	46.0 \pm 8.1	0.85
HOMA2S (%)	57 \pm 130	39 \pm 45	0.52
HOMA2B (%)	105 \pm 88	100 \pm 76	0.62
HbA _{1c} (%)	7.3 \pm 1.9	8.1 \pm 1.9	0.053
Fasting plasma glucose (mmol/L)	8.8 \pm 3.4	9.3 \pm 3.2	0.39
Fasting plasma insulin (mUI/L)	30.8 \pm 28.1	37.1 \pm 44.7	0.36
Insulin treatment	20	18	0.89
Steatosis Grade (0,1,2,3)	9/50/0/0	0/16/18/24	<0.001
Ballooning (0,1,2)	59/0/0	0/43/15	<0.001
Lobular Inflammation (0,1,2,3)	59/0/0/0	0/41/17/0	<0.001
Fibrosis Stage (0,1,2,3,4) (NA)	40/14/2/1/0 (2)	8/13/7/23/1 (6)	<0.001

Table 2. Interaction of plasma BA concentrations with NASH, IR and BMI in the combined cohort (n=239).

F-ratios from two-way ANOVA test of main interactive effects of NASH, BMI, HOMA2S and HOMA2B on plasma total BA, total CA, free CDCA and free DCA levels are shown. P-values in bold indicate statistical significance.

		Total BA		Total CA		CDCA		DCA	
		F	p-value	F	p-value	F	p-value	F	p-value
	NASH	14	<0.001	14	<0.001	8	0.003	8	0.005
BMI	BMI	0.14	0.71	0.63	0.42	0.02	0.87	0.6	0.43
	NASH-BMI	0.19	0.66	0.63	0.66	0.41	0.51	0.7	0.38
	NASH	16	<0.001	13	<0.001	9	0.002	8	0.004
HOMA2S	HOMA2S	1.7	0.19	0.7	0.39	2	0.15	0.5	0.47
	NASH-HOMA2S	18	<0.001	12	<0.001	15	<0.001	12	<0.001
	NASH	14	<0.001	13	<0.001	8	0.003	8	0.005
HOMA2B	HOMA2B	0.02	0.86	0.7	0.37	0.4	0.49	3	0.06
	NASH-HOMA2B	0.07	0.78	0.3	0.54	0.5	0.46	1.5	0.21

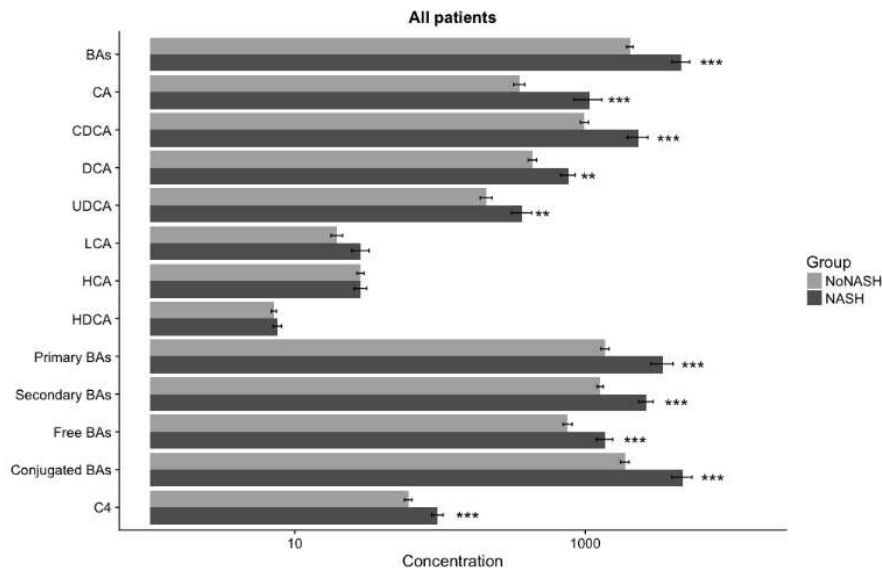
Figure 1. Plasma BA concentrations are higher in NASH vs No-NASH irrespective of T2D status in the ABOS study cohort (n=219).

A. Plasma total (free + conjugated) BA and C4 concentrations (log-scale, nmol/L) according to NASH status (grey, No-NASH; black, NASH).

B. Plasma total (free + conjugated) BA and C4 concentrations (log-scale, nmol/L) according to type 2 diabetes status (left, No-T2D; right, T2D) and NASH status (grey, No-NASH; black, NASH).

Data are expressed as mean and SEM (standard error of mean). p-values from non-parametric Mann-Whitney test. To compare No-NASH and NASH groups: *: p < 0.05, **: p < 0.01, ***p < 0.001. To compare No-T2D and T2D groups: \$: p < 0.05.

A



B

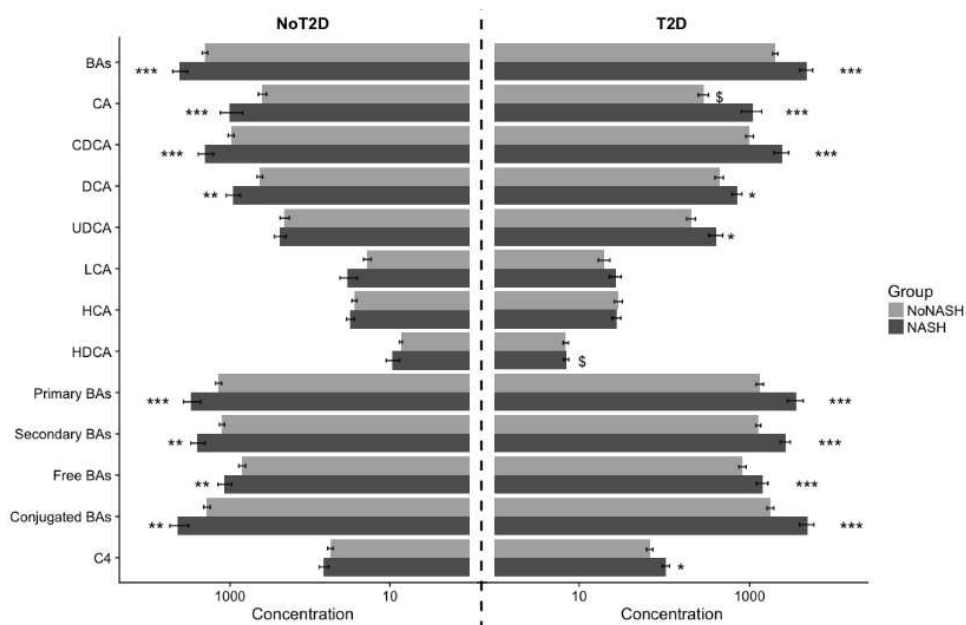


Figure 2. Identification of specific BA discriminating NASH independently of type 2 diabetes (T2D) in the ABOS study cohort (n=219).

A. Variable importance plot of the Random Forest analysis. The variables are ordered top-to-bottom as most-to-least important in classifying between No-NASH and NASH groups.

B to G. Plasma BA concentrations (log-scale, nmol/L) according to T2D status (B, D, F) and NASH status (C, E, G). Data are expressed as median and IQR (interquartile range). P-values from non-parametric Mann-Whitney's test.

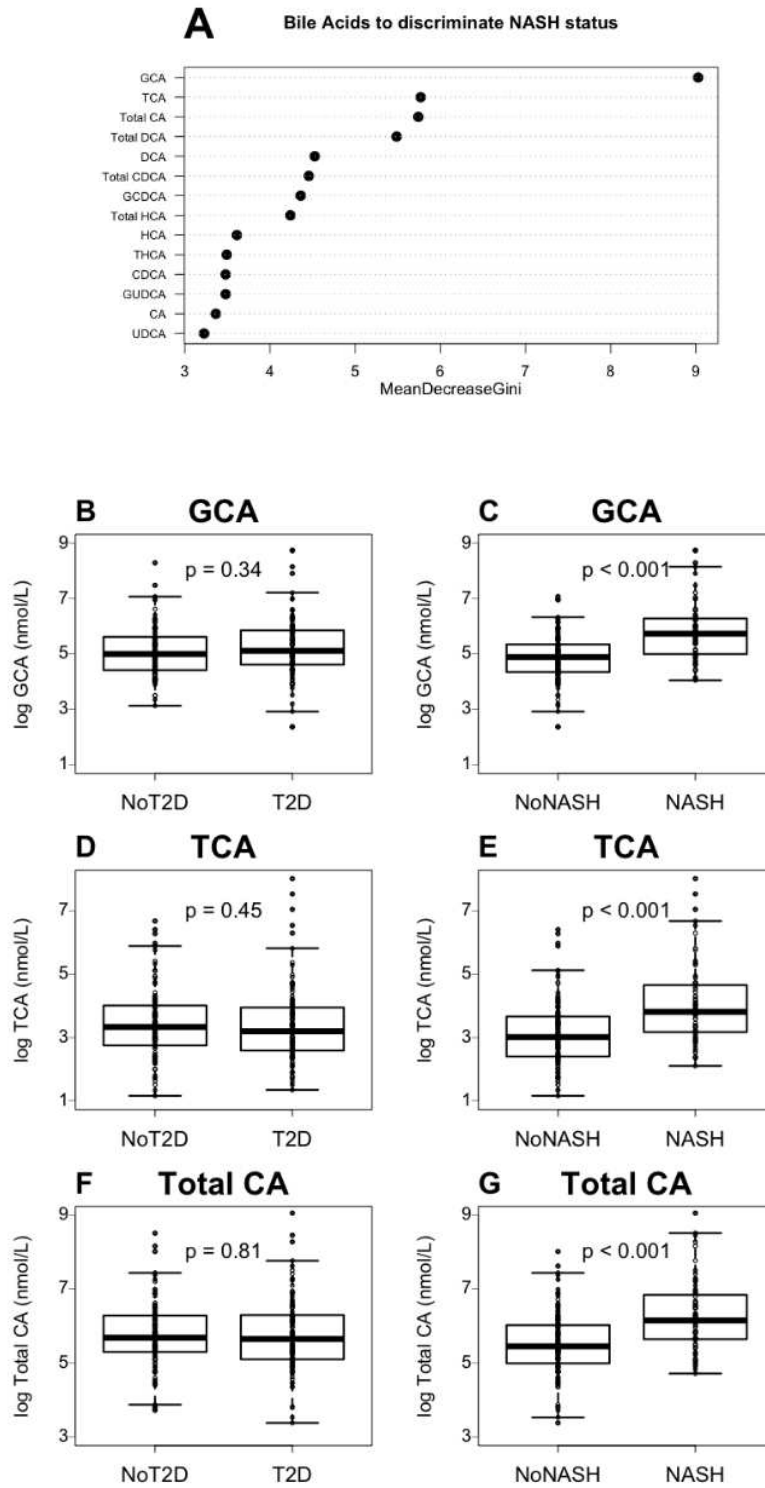


Figure 3. Insulin sensitivity modulates the NASH-associated increase in plasma BA in the combined cohort (n=239).

A. Plasma total CA concentrations (nmol/L) according to HOMA2S (%).

B. Plasma total CA concentrations (nmol/L) according to HOMA2B (%).

White circles represent the No-NASH and black circles the NASH patients. Dashed lines: regression curves for No-NASH patients; solid lines: regression curves for NASH patients. Rho coefficients and p-values are obtained using the Spearman Rank test.

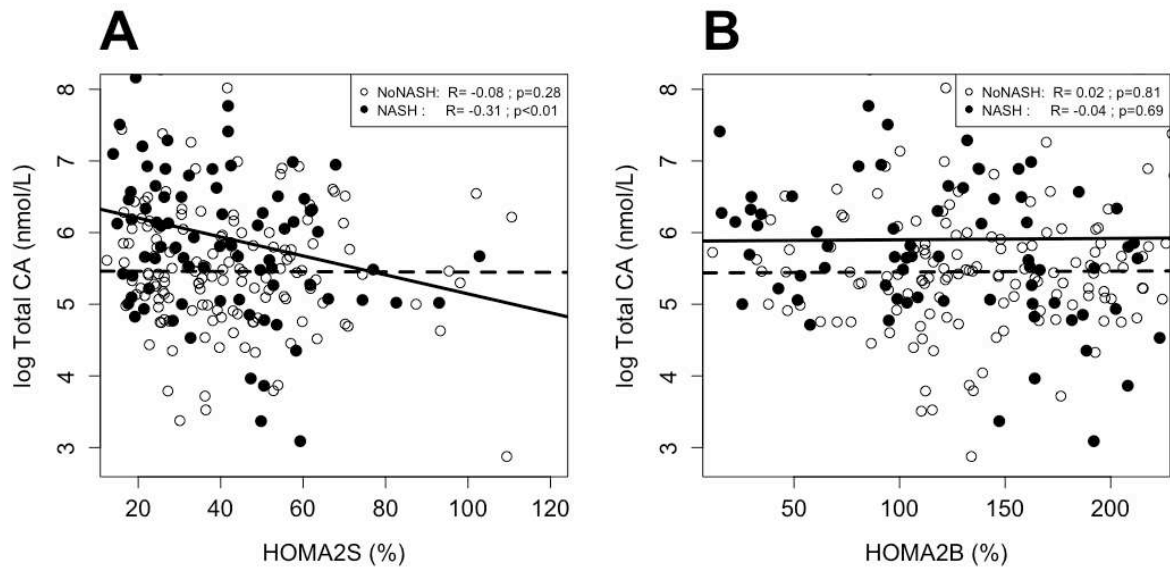
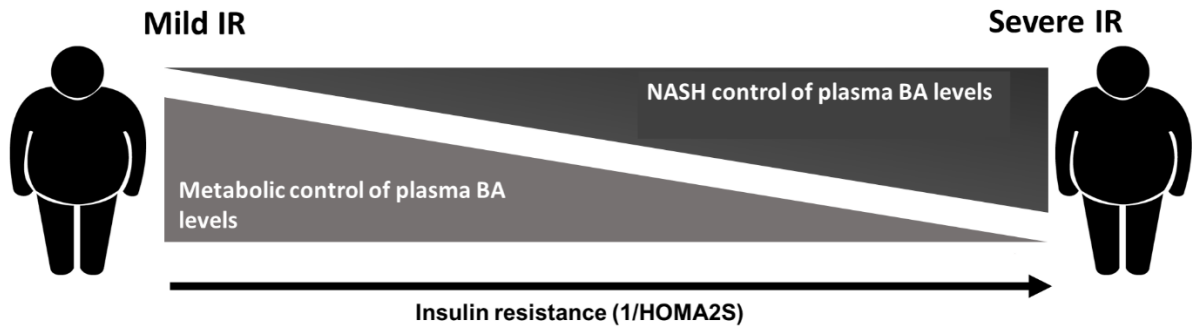


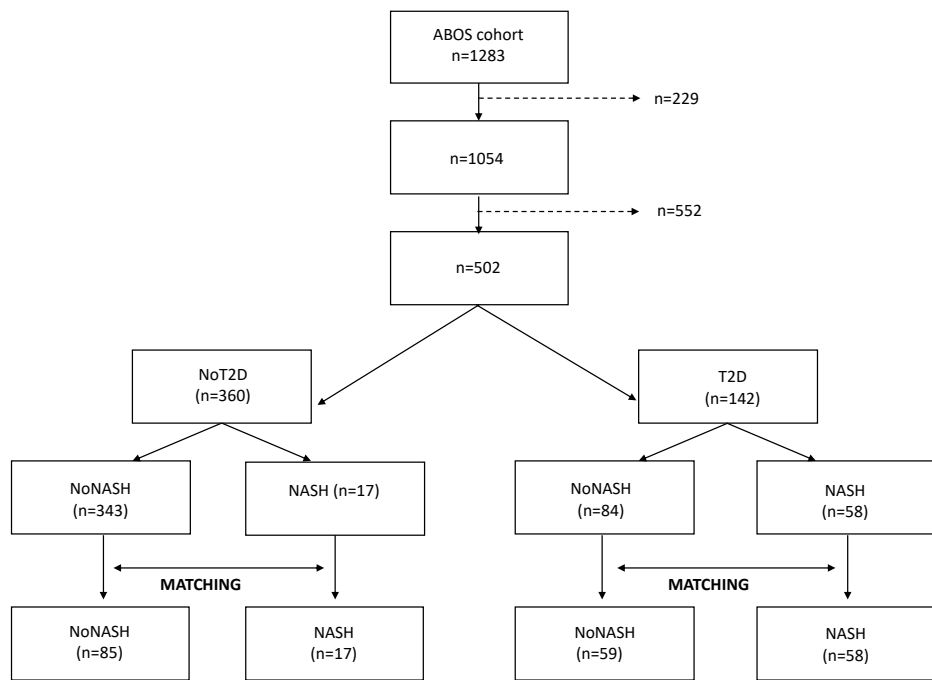
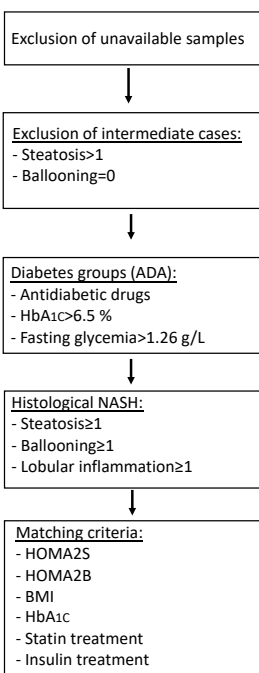
Figure 4. The impact of NASH on plasma BA concentrations depends on the degree of insulin-resistance (IR). In patients with mild IR, NASH does not affect plasma BA which are driven by metabolic homeostasis. In contrast, in patients with severe IR, NASH is associated with increased plasma BA.



Supplemental Figure 1. Patient selection flowchart

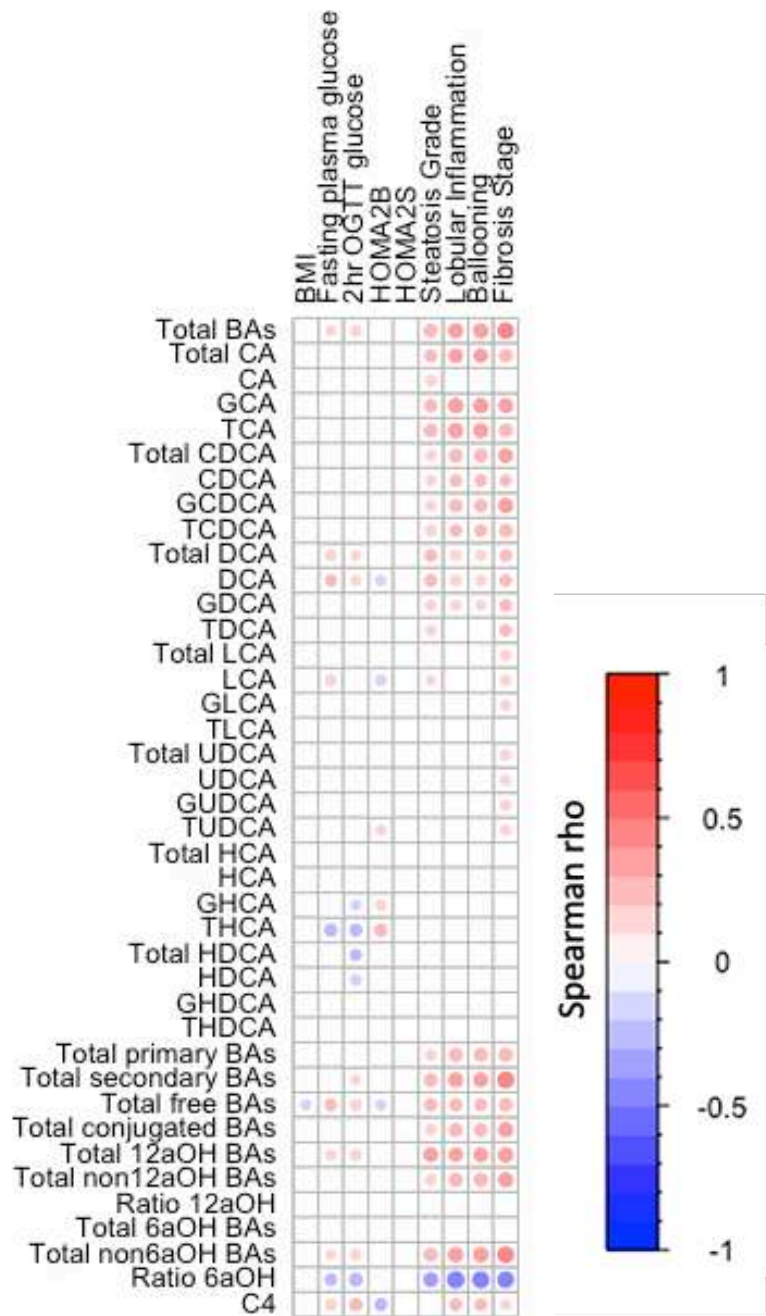
In the whole cohort (n=1283), 1054 patients had sufficient blood and liver sample to perform assays. To determine the specific influence of NASH, excluding isolated steatosis, on plasma BAs, we excluded patients with isolated steatosis >1 (NAFL) and/or some degree of ballooning or lobular inflammation but insufficient to qualify for the diagnosis of NASH. Then, the 502 remaining patients were separated in T2D and No-T2D groups. Within these 2 groups (No-T2D and T2D), patients were classified in No-NASH and NASH groups according to liver biopsy scoring. Finally, we matched each subgroup of patients by HOMA2S, HOMA2B, BMI, HbA_{1c} and insulin/statin treatment to obtain homogeneous groups on these parameters.

Selection Criteria:

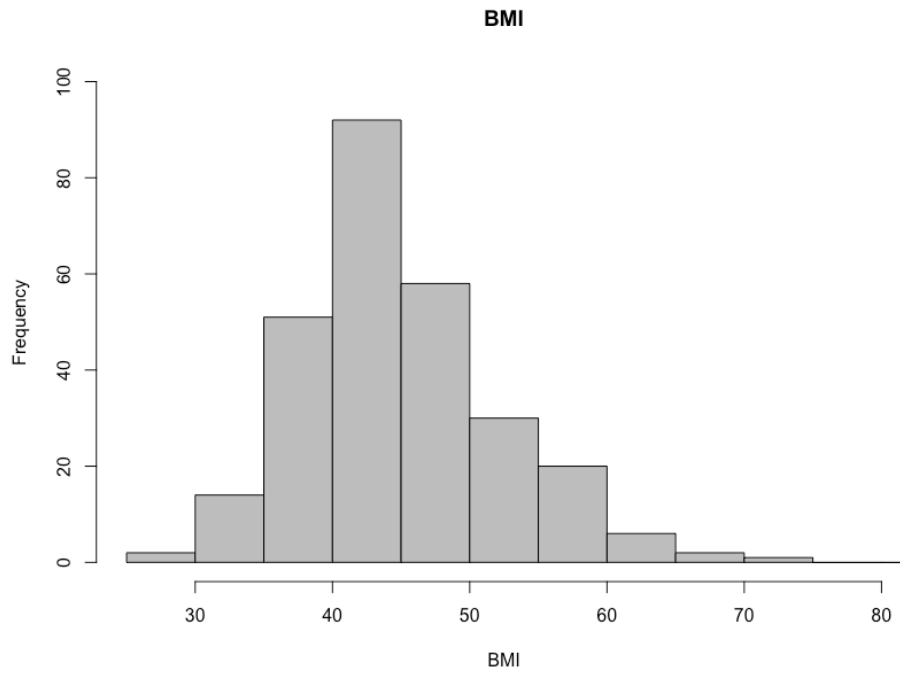


Supplemental Figure 2. Plasma BA concentrations are mainly associated to NASH and not to glucose homeostasis parameters in patients of the ABOS study cohort.

Unadjusted Spearman correlations between plasma BA concentrations and BMI, glucose homeostasis parameters and NASH parameters in the ABOS study cohort (n=219). Colours and area of circles reflect the Spearman rho values (red for positive, blue for inverse correlations). Only rho with significant p-value (p<0.05) were represented. BA species, ratios and total values were determined according to **Supplemental Table 1**.



Supplemental Figure 3. BMI distribution in the combined cohort (n=239).



Supplemental Table 1. Definition of the bile acid clusters and ratios. BAs = Bile acids. I : Primary BA, II: Secondary BA

Bile acid cluster	Acronym and definition
Free cholic acid	CA (I)
Free chenodeoxycholic acid	CDCA (I)
Free hyocholic acid	HCA (I)
Free deoxycholic acid	DCA (II)
Free lithocholic acid	LCA (II)
Free ursodeoxycholic acid	UDCA (II)
Free hyodeoxycholic acid	HDCA (II)
Glyco-cholic acid	GCA (I)
Glyco-chenodeoxycholic acid	GCDCA (I)
Glyco-deoxycholic acid	GDCA (II)
Glyco-lithocholic acid	GLCA (II)
Glyco-ursodeoxycholic acid	GUDCA (II)
Glyco-hyocholic acid	GHCA (I)
Glyco-hyodeoxycholic acid	GHDCA (II)
Tauro-cholic acid	TCA (I)
Tauro-chenodeoxycholic acid	TCDCA (I)
Tauro-deoxycholic acid	TDCA (II)
Tauro-lithocholic acid	TLCA (II)
Tauro-ursodeoxycholic acid	TUDCA (II)
Tauro-hyocholic acid	THCA (I)
Tauro-hyodeoxycholic acid	THDCA (II)
Total CA	CA + GCA + TCA
Total CDCA	CDCA + GCDCA + TCDCA

Total DCA	$DCA + GDCA + THCA$
Total LCA	$LCA + GLCA + TLCA$
Total UDCA	$UDCA + GUDCA + TUDCA$
Total HCA	$HCA + GHCA + THCA$
Total HDCA	$HDCA + GHDCA + THDCA$
Total primary BAs	$Total\ CA + Total\ CDCA + Total\ HCA$
Total secondary BAs	$Total\ DCA + Total\ LCA + Total\ UDCA + Total\ HDCA$
Total free BAs	$CA + CDCA + DCA + LCA + UDCA + HCA + HDCA$
Total conjugated	$GCA + GCDCA + GDCA + GLCA + GUDCA + GHCA + GHDCA +$ $TCA + TCDCA + TDCA + TLCA + TUDCA + THCA + THDCA$
Total BAs	$Total\ Free\ BAs + Total\ Conjugated\ BAs$
Total 12aOH BAs	$Total\ CA + Total\ DCA$
Total non12aOH BAs	$Total\ CDCA + Total\ LCA + Total\ UDCA + Total\ HCA + Total\ HDCA$
Ratio 12aOH	$Total\ 12aOH\ BAs / Total\ non12aOH\ BAs$
Total 6aOH BAs	$Total\ HCA + Total\ HDCA$
Total non6aOH BAs	$Total\ CA + Total\ CDCA + Total\ DCA + Total\ LCA + Total\ UDCA$
Ratio 6aOH	$Total\ 6aOH\ BAs / Total\ non6aOH\ BAs$

Supplemental Table 2. Plasma BA and C4 concentrations (nmol/L) according to diabetes and NASH status.

Data are mean and SD (standard deviation), p-values from non-parametric Mann-Whitney test. P-values in bold are statistically significant. a: 12aOH species, b: non12aOH species, c: 6aOH species, d: non6aOH species.

	NoT2D (n=102)			T2D (n=117)		
	NoNASH (n=85)	NASH (n=17)	p	NoNASH (n=59)	NASH (n=58)	p
Total BA (a, b, c, d)	2063 (1438)	4311 (3806)	6E-04	1996 (1078)	4671 (6100)	1.6E-05
Total CA (a, d)	396 (434)	1010 (1287)	5E-04	289 (305)	1085 (2217)	2E-06
- CA	141 (299)	205 (327)	0.03	114 (269)	266 (688)	0.01
-GCA	201 (211)	671 (960)	3E-04	150 (113)	641 (1216)	3E-07
-TCA	54 (101)	134 (191)	0.001	24 (27)	178 (484)	2E-07
Total DCA (a, d)	427 (321)	928 (778)	0.01	441 (385)	716 (733)	0.05
-DCA	220 (165)	417 (313)	0.01	258 (234)	371 (312)	0.09
-GDCA	154 (160)	405 (467)	0.02	144 (173)	271 (402)	0.03
-TDCA	53 (75)	106 (136)	0.13	39 (48)	75 (168)	0.05
Total CDCA (b, d)	976 (772)	2059 (1833)	0.001	1004 (792)	2401 (3539)	7E-04
-CDCA	245 (286)	452 (400)	0.002	334 (389)	608 (887)	0.04
-GCDCA	611 (517)	1382 (1487)	0.005	598 (481)	1497 (2146)	8E-04
-TCDCa	120 (208)	224 (277)	0.02	72 (88)	296 (780)	0.0012
Total UDCA (b, d)	210 (257)	240 (165)	0.10	206 (188)	407 (575)	0.05
-UDCA	85 (152)	91 (68)	0.07	98 (104)	153 (187)	0.09
-GUDCA	114 (134)	138 (120)	0.12	103 (100)	236 (393)	0.03
-TUDCA	10 (17)	11 (10)	0.06	5 (7)	19 (40)	0.04
Total LCA (b, d)	19 (21)	34 (35)	0.13	20 (24)	27 (34)	0.22
-LCA	9 (10)	13 (12)	0.2	10 (14)	14 (18)	0.11
-GLCA	8 (12)	17 (20)	0.1	9 (13)	11 (14)	0.26
-TLCA	1.6 (2.4)	3.7 (5.3)	0.1	1.4 (2.8)	2.2 (4.9)	0.12
Total HCA (b, c)	28 (18)	31 (15)	0.31	29 (24)	28 (26)	0.45
-HCA	8 (12)	8 (7)	0.52	12 (22)	7 (13)	0.18
-GHCA	18 (8)	20 (9)	0.25	16 (7)	18 (14)	0.35
-THCA	2.2 (2.8)	2.8 (3.7)	0.41	1.3 (1.5)	2.1 (4.5)	0.64

Total HDCA (b, c)	7.3 (2.5)	9.3 (7.4)	0.47	7.0 (3.8)	7.1 (3.5)	0.87
-HDCA	1.6 (1.8)	3.3 (7.1)	0.93	1.4 (2.8)	1.2 (2.1)	0.92
-GHDCA	5.4 (1.4)	5.6 (1.3)	0.37	5.3 (1.4)	5.5 (2.0)	0.70
-THDCA	0.3 (0.2)	0.4 (0.2)	0.05	0.3 (0.1)	0.3 (0.2)	0.27
Total primary BAs	1400 (1133)	3100 (3077)	0.001	1322 (1005)	3513 (5672)	2E-04
-free	394 (524)	665 (705)	0.004	460 (588)	882 (1537)	0.04
-conjugated	1006 (946)	2435 (2860)	0.002	862 (662)	2632 (4470)	9E-05
Total secondary BAs	1266 (834)	2576 (2194)	0.004	1264 (655)	2644 (2707)	5E-05
-free	316 (223)	525 (349)	0.02	367 (264)	538 (360)	0.006
-conjugated	950 (778)	2052 (2084)	0.008	897 (608)	2106 (2598)	3E-04
Total free BAs	710 (647)	1190 (951)	0.003	827 (634)	1420 (1673)	0.007
Total conjugated BAs	1956 (1704)	4486 (4926)	0.005	1759 (1246)	4737 (6966)	1E-04
6aOH BAs	35 (18)	40 (20)	0.22	36 (23)	34 (26)	0.49
non6aOH BAs	2027 (1424)	4270 (3794)	7E-04	1960 (1071)	4635 (6081)	2E-04
Ratio 6aOH	0.02 (0.01)	0.01 (0.007)	2E-04	0.02 (0.02)	0.01 (0.006)	1E-08
12aOH BAs	823 (635)	1938 (1929)	0.001	730 (419)	1801 (2435)	1E-05
non12aOH BAs	1240 (958)	2373 (1937)	0.002	1266 (913)	2870 (3892)	5E-04
Ratio 12aOH	0.8 (0.4)	0.8 (0.3)	0.63	0.8 (0.7)	0.8 (0.5)	0.61
C4	56 (43)	68 (38)	0.14	67 (44)	105 (80)	0.013

Supplemental Table 3. Multiple linear regression analysis of plasma BA concentrations potential confounding factors in the ABOS study cohort (n=219).

Values are β coefficients for bile acids from multiple linear regressions. P values in bold are statistically significant.

	GCA		TCA		Total CA	
	β	p-value	β	p-value	β	p-value
NASH	419	<10⁻⁶	95	<0.001	570	<0.0001
T2D	4	0.96	1	0.96	-65	0.7
BMI	-6	0.3	-1	0.32	-9	0.2
HOMA2S	0.005	0.9	0.003	0.98	-0.2	0.8
HOMA2B	0.86	0.1	0.29	0.1	0.9	0.3
HbA_{1c}	-8	0.7	-2	0.8	8.7	0.8

Nos résultats montrent que les concentrations plasmatiques d'AB sont plus élevées chez les patients NASH que chez les patients No-NASH, à la fois chez les patients DT2 et non DT2 de la cohorte ABOS. Pourtant, une étude du laboratoire avait précédemment montré (158), que les concentrations plasmatiques d'AB n'étaient pas modifiées chez les patients NASH non DT2 de la cohorte Resolve. Pour comprendre cette apparente discordance, nous avons évalué l'impact de l'obésité et de l'IR sur l'association de la NASH et des AB plasmatiques sur l'ensemble des données des cohortes Resolve et ABOS combinées. Nos résultats ont révélé que les augmentations des concentrations plasmatiques d'AB associées à la NASH dépendent principalement du degré d'IR systémique (évalué par l'indice HOMA2S), mais pas de la fonction cellulaire beta du pancréas (évalué par l'indice HOMA2B) ni de l'obésité. Les concentrations plasmatiques d'AB augmentent donc avec la NASH chez les patients DT2 et non DT2 présentant un faible taux de HOMA2S, ce qui suggère que la NASH n'entraîne des altérations des AB plasmatique qu'en présence d'une IR systémique avancée.

Ces résultats permettent en partie d'expliquer 1/l'hétérogénéité des données des précédentes études de cohorte où l'IR n'était pas pris en considération (90) et 2/ l'absence de modification du profil des AB plasmatiques en cas de NASH chez les patients avec une faible IR de l'étude de V Legry (158). Ces conclusions pourraient également expliquer l'hétérogénéité des réponses aux traitements ciblant le récepteur FXR dans le cadre de la NASH (qui pourrait montrer une efficacité plus importante chez les patients NASH avec une IR importante par rapport aux patients NASH avec une faible IR). Nous montrons ici qu'il existe une interaction complexe entre AB, NASH et IR qui doit être considérée dans les futures investigations pré-cliniques et cliniques.

Les AB sont donc très difficiles à utiliser en qualité de biomarqueurs isolés pour le diagnostic et le suivi de la NASH par leur interaction complexe avec l'IR mais pourraient être intéressants pour certaines catégories de patients présentant une IR modérée à sévère. Des évaluations complémentaires à large échelle sur des populations plus hétérogènes en considérant plus particulièrement l'IR sont alors nécessaires pour évaluer l'efficacité des AB en qualité de biomarqueurs plasmatiques utilisables à large échelle et intégrés dans des scores combinés.

L'élucidation des mécanismes moléculaires permettant d'établir le lien entre AB et NASH modulé par les stades d'IR est encore compliqué aujourd'hui. En effet, cela nécessiterait l'utilisation d'un modèle murin avec développement de la NASH mais avec différents niveaux d'IR, mais ce modèle n'est pas encore disponible à ce jour.

B. Les acides aminés

1. Acides aminés, maladie métabolique et NASH.

Le développement de la NAFLD est étroitement lié à des facteurs dépendants du mode de vie notamment à un apport calorique excessif (130) représenté par les glucides, les graisses et les protéines en tant que principaux constituants alimentaires. Alors que l'altération du métabolisme des glucides (159,160) et des lipides (27) dans la pathogenèse de la NAFLD a été largement étudiée, le rôle des acides aminés (AA) dans ce domaine est apparu plus récemment. Les AA peuvent être classés en AA protéinogènes ou non protéinogènes, 9 des 20 AA protéinogènes sont essentiels car ils ne peuvent pas être synthétisés par l'Homme, et dépendent donc de sources alimentaires, bien qu'il existe chez la souris, des preuves que certains AA essentiels peuvent être synthétisés par le microbiote dans certaines conditions telles que l'obésité (161). Les AA non protéinogènes, qui n'existent qu'à l'état libre (par exemple l'homocystéine, la citrulline, l'ornithine, ...) servent de substrats pour de nombreux processus cellulaires. Certains AA jouent un rôle à la fois comme constituants protéiques et sous forme libre (par exemple la glycine, la glutamine, l'acide aspartique, la leucine, l'isoleucine, la valine). Il est important de noter que les AA protéinogènes, lorsqu'ils sont à l'état libre, servent également de molécules de signalisation. De plus, ils exercent un rôle dans les processus biologiques, en effet, les AA peuvent participer directement à la gluconéogenèse, à la lipogenèse et au cycle du TCA. Tous les AA protéinogènes, à l'exception de la lysine et de la leucine, sont glucogéniques, tandis que la lysine et la leucine sont exclusivement utilisées dans la lipogenèse et la production de corps cétoniques. Certains AA protéinogènes et non protéinogènes contribuent également au TCA par le biais de réactions

cataplérotiques et anaplérotiques. Enfin, les AA sont aussi indirectement impliqués dans l'homéostasie métabolique mais aussi dans des voies de signalisation cellulaire (inflammation, stress oxydant, méthylation et modulation de l'épigénétique) en tant que précurseurs de molécules non protéiques (par exemple le glutathion, l'oxyde nitrique (NO), les coenzymes nucléotidiques, ...) ou d'amines biogènes (par exemple l'histamine, la sérotonine, ...). Bien que le métabolisme des AA soit omniprésent, le foie y occupe une place centrale. Par conséquent, par leur rôle à la fois dans l'homéostasie métabolique et l'inflammation dans le foie et en périphérie, la modulation du métabolisme des AA peut participer à la pathophysiologie de la NAFLD. Le **manuscrit 3** ci-après est une revue de la littérature qui met en évidence le rôle des AA dans la physiopathologie de la NAFLD. Nous nous sommes concentrés sur les voies des AA impliquées dans l'homéostasie métabolique du foie tels que le catabolisme des acides aminés à chaîne ramifiée (BCAA), le cycle de la reméthylation, la synthèse du glutathion, le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA) et le cycle de l'urée.

Manuscrit 3 :

Amino acid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease

Article en préparation

Amino acid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease

Guillaume Grzych^{1,2}, Joël Haas¹, Anne Tailleux¹, Bart Staels^{1,2}

Affiliations:

¹ Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1011- EGID, F-59000 Lille, France.

² CHU Lille, Service d'Endocrinologie, Métabolisme, Nutrition, Oncologie, F-59000 Lille, France

Corresponding author: Bart STAELS

Institut Pasteur de Lille, 1 rue du professeur Calmette, BP245, 59019 LILLE - France

Tel: +33320877388 - Fax: +33320877360

e-mail: bart.staels@pasteur-lille.fr

Disclosure: The authors declare no conflict of interest.

Abstract

Purpose of review:

Whereas alterations in carbohydrate and lipid metabolism in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) pathogenesis have been studied extensively, the role of amino acids (AA) metabolism remains largely unknown. AA have diverse roles as signaling molecules and metabolic substrates both for protein synthesis and metabolic pathways like gluconeogenesis, the TCA cycle and sphingolipid synthesis. Additionally, several recent studies have identified changes in plasma AA levels in patients with NAFLD, suggesting a potential role in the pathophysiology of the disease. In this review, we will discuss these findings focusing on pathways involved in hepatic metabolic homeostasis such as branched-chain AA (BCAA) catabolism, one carbon metabolism, glutathione synthesis, tricarboxylic acid cycle (TCA) and urea cycle. For each AA pathway, we provide an overview of the biochemistry and describe how metabolic disorders associated to NAFLD may affect the pathway. Finally, we highlight findings from clinical and mechanistic studies of these pathways in the context of NAFLD.

Keywords: Amino Acids, NAFLD, NASH, metabolic syndrome.

Introduction:

Non Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) is the most common chronic liver disease worldwide and is closely associated with obesity and insulin resistance (IR)¹. NAFLD is a progressive pathology with different stages, ranging from isolated steatosis to steatohepatitis (NASH, Non-Alcoholic Steatohepatitis)² and, in certain cases, fibrosis and cirrhosis. While steatosis is generally considered benign, NASH combines steatosis with elements of necroinflammation, viewed histologically as lobular inflammation and ballooning. Importantly, NAFLD progression is heterogeneous and the signals that drive the transition from steatosis to NASH are poorly understood. However, dysfunctions in whole body glucose and lipid homeostasis clearly play a role. A recent proposal suggests the new moniker: Metabolic Associated Fatty Liver Disease (MAFLD) to more accurately reflect current knowledge of fatty liver disease's association with metabolic dysfunction³.

Excessive hepatic triglycerides (TG) have several origins: dietary, adipose tissue and liver itself. High fat and calorically dense diets combined with sedentary lifestyle leads to obesity and IR which increase adipose tissue mass. Adipose tissue IR enhances the flux of free fatty acids (FFA) reaching the liver as a result of excessive lipolysis⁴ which can be exacerbated by adipokines (such as adiponectin and leptin). In the liver, increased *de novo* lipogenesis⁵ and decreased β -oxidation further contribute to steatosis. Over time, complications like dyslipidemia, hepatic IR and hyperglycemia accumulate⁶⁻⁸ and can lead to mitochondrial dysfunction⁹ and oxidative stress¹⁰ which drives necroinflammation¹¹. These metabolic factors then lead to activation of the hepatic immune system^{12 13 14} and eventually fibrosis due to activation of hepatic stellate cells¹⁵. If left unchecked, this process will dramatically increase the risk for cirrhosis, hepatocellular carcinoma (HCC) and extrahepatic complications like cardiovascular disease and type 2 diabetes (T2D).

Development of NAFLD is closely linked to lifestyle factors, especially diets rich in sugars and fats¹⁶. The alterations in carbohydrate^{6,7} and lipid¹⁷ metabolism in NAFLD pathogenesis have been studied extensively, but the role of amino acids (AA) has been largely overlooked. AA can be classified as proteinogenic or non-proteinogenic AA (**Table 1**). Non-proteinogenic AA exist only in the free state (e.g. homocysteine, citrulline, ornithine, ...) and serve as important

substrates for numerous cellular processes. Proteinogenic AA serve as the building blocks for proteins, but can also serve as signaling molecules and metabolic substrates. Indeed, AA can be utilized in gluconeogenesis, lipogenesis (**Table 1**) and the TCA cycle. Nine of the 20 proteinogenic AA are essential (**Table 1**), and therefore require alimentary sources, though, there is some evidence that certain essential AA can be synthesized by microbiota in specific contexts, like obesity¹⁸. In their free form, all proteinogenic AA are gluconeogenic except lysine and leucine, which are instead used in lipogenesis and ketone body production (**Table 1**). Part of proteinogenic and non-proteinogenic AA metabolism intersects with the TCA *via* cataplerotic and anaplerotic reactions. Finally, AA are also indirectly involved in metabolic homeostasis as precursors of non-protein molecules (e.g. glutathione, nitric oxide (NO), nucleotide coenzymes, ...) or biogenic amines (e.g. histamine, serotonin, ...). While AA metabolism occurs ubiquitously, the liver remains a central regulator of whole-body AA homeostasis. Consequently, it is hardly surprising that changes in circulating and hepatic AA are observed in the context of NAFLD.

We here review current literature assessing the role of AA in the pathophysiology of NAFLD. We focus on AA pathways involved in liver metabolic homeostasis or pathological disorders such as branched-chain amino acid (BCAA) catabolism, one carbon metabolism, glutathione synthesis, tricarboxylic acid cycle (TCA) and urea cycle. For each AA family, we provide a brief summary of their physiological metabolism, and describe how metabolic disorders associated to NAFLD relate to each pathway. Finally, we highlight findings from clinical and mechanistic studies of these pathways in the context of NAFLD.

Branched Chain Amino Acids

Physiological metabolism

The three BCAA (leucine, isoleucine and valine) are essential AA containing a branched aliphatic side chain. The food sources most enriched in BCAA are meat, fish, dairy products and eggs. BCAA are used for protein synthesis or for oxidation as TCA precursors. BCAA also regulate many key pathways such as activation of the mammalian target of Rapamycin (mTor) signaling¹⁹ and have various roles in development, nutrient transport and immune modulation²⁰. BCAA are catabolized in a two-step process that involves inter-organ transport of the intermediates^{21,22}. First, all BCAA are reversibly converted into their respective α -ketoacids by branched-chain aminotransferase (BCAT), which occurs primarily in adipose tissue and muscle (**Figure 1**) These reactions also generate glutamate and alanine, precursors of gluconeogenesis, as byproducts. Of the two BCAT isoforms, the mitochondrial isoform (BCAT2) is widely expressed²³ and the cytoplasmic isoform (BCAT1) is mainly expressed in the brain²⁴. Notably, the liver has very low levels of BCAT activity. In the second step, which occurs primarily in the liver and muscle, BCAA-derived α -keto acids are irreversibly decarboxylated and dehydrogenated by the branched-chain α -ketoacid dehydrogenase complex (BCKDH). Then, further reaction generate several TCA precursors: leucine is converted to acetyl-CoA, isoleucine to propionyl-CoA (the precursor of succinyl-CoA) and acetyl-CoA, and valine to propionyl-CoA in addition to aceto-acetate. Incomplete BCAA oxidation can also generate C3- and C5-acylcarnitines, among other intermediate metabolites (**Figure 1**). BCAA catabolism is mainly regulated through BCKDH activity *via* reversible phosphorylation; it is activated by PPM1K (Protein Phosphatase Mg²⁺/Mn²⁺ Dependent 1K) and inactivated by BCKDK (BCKDH kinase) (**Figure 1**).

Outside of studying the metabolic flux by labelled BCAA²¹, there are no specific markers of total BCAA metabolism. However, BCAT activity can be estimated by measuring circulating levels of BCAA-derived α -ketoacids. Conversely, BCAA oxidation products like acetyl-CoA, propionyl-CoA, C3- and C5-acylcarnitines are not exclusively produced by BCAA catabolism.

Alteration of BCAA in metabolic disorders

Plasma BCAA levels change with nutritional state, increasing after a protein rich meal and during prolonged fasting as a consequence of muscle proteolysis²⁵. Plasma BCAA levels are sexually dimorphic with men showing 20-30% higher levels compared to women in the general population^{26,27}. Physiologically, BCAA enhance muscle protein synthesis and mass during exercise training and can be beneficial for treatment of cachexia¹⁹ and prevention of age-related sarcopenia²⁸.

In the context of metabolic disorders, circulating BCAA concentrations increase with IR, T2D^{22,29,30} and obesity³¹⁻³³. This increase in plasma BCAA is could be due to the disruption of their oxidation³⁴. Accumulation of BCAA catabolites such as C3- and C5-acylcarnitines leads to incomplete fatty acids oxidation in mitochondria by overloading and increased of excess lipids such as diacylglycerols or ceramides, mitochondrial stress, and impaired glucose homeostasis³⁴. Elevated BCAA (especially leucine) also induces chronic phosphorylation of mTor³⁰ that increases lipogenesis and also inflammation³⁵⁻³⁷ both in hepatocytes and immune cells by release of cytokines, adhesion molecules and by mononuclear cell activation³⁷.

Nutritional intervention increasing BCAA levels in pre-clinical models is associated with impaired glucose and lipid homeostasis. In high fat diet (HFD) fed mice with labeled BCAA infusion, it has been shown that BCAA oxidation decreased in adipose tissue and liver. Conversely, BCAA increased in muscle causing accumulation of lipid derivated from C3- and C5- acylcarnitine (e.g. ceramides and diacylglycerols)^{21,38} that increase IR by decrease of insulin-stimulated IRS-1/IRS-2 tyrosine phosphorylation, PI3K activation and downstream insulin signaling³⁹. Furthermore, supplementation of HFD with BCAA (BCAA+HFD) in rodents leads to phosphorylation of insulin receptor substrates (IRS) and jun-N-terminal-kinase (JNK) in muscle, as markers of IR³⁰. Similar effects are also observed in the liver where BCAA+HFD challenge increases accumulation as a result of impaired Akt2/Foxo1 signaling compared to a simple HFD challenge⁴⁰. Increased BCKDK and decreased of PPM1K expression using both pharmacological tools and recombinant adenovirus, thus decreasing BCAA catabolism, promotes *de novo* lipogenesis *via* ChREBP- β activation^{38,41}. Similarly, overexpression of BCKDK in liver increases ATP citrate lyase phosphorylation catalyzing the formation of acetyl-CoA and

oxaloacetate and thus fatty acid synthesis. Interestingly, brown adipose tissue (BAT) also plays a major role in BCAA clearance in both humans and mice⁴². Thus, impaired BAT activity in obesity or T2D decreases BCAA clearance⁴². Taken together, these studies suggest that BCAA excess in the context of obesity is deleterious and promotes IR.

Several strategies have been employed to reduce BCAA accumulation and all generally lead to improvements in metabolic homeostasis. For example, *ob/ob* mice display decreased expression of BCKDH and BCAT in adipose tissue, which associates with increased circulating BCAA⁴³ compared to *ob/+* controls. In these mice, enhancing BCAA oxidation *via* pharmacological inhibition of the BCKDH improves several IR (evaluated by HOMA)⁴⁴. Similarly, lowering the hepatic BCKDK:PPM1K ratio (thereby enhancing BCKDH activity and BCAA catabolism) in obese rats improves glucose and lipid homeostasis³⁸. Mice with impaired skeletal muscle mitochondrial function leading to reduced ATP synthase, forces BCAA catabolism to provide acetyl-CoA for lipogenesis, which promotes lipid droplet formation and increased visceral adiposity⁴⁵. Thus, decreased BCAA catabolism drives dysregulation of lipid homeostasis.

Surprisingly, BCAA decrease is not universally beneficial. In a clinical setting, the ratio of plasma BCAA to AAA (Aromatic Amino Acids: phenylalanine and tyrosine), called Fischer ratio, is used as a diagnostic marker of severity of liver dysfunction. As liver function deteriorates, plasma levels of BCAAs decrease while AAA increase, thereby decreasing the Fischer ratio^{46,47}. A low Fischer ratio is related to increased BCAA oxidation and decreased endogenous BCAA disposal⁴⁸. Interestingly, BCAA supplementation for treatment of cirrhosis showed significant clinical improvements suggesting a protective effect of BCAA in this setting⁴⁹.

Therefore, BCAA are markers of metabolic disorders such as IR, T2D and obesity and there is growing evidence that they participate in their pathogenesis primarily in this context and in liver disease (out of NAFLD). Hence, BCAA may play a role in NAFLD pathogenesis through their actions both on metabolic pathways (IR and obesity) and in inflammation.

Alterations of BCAA metabolism in NAFLD

Observational studies

A large epidemiological study showed that protein-rich diet (and indirectly BCAA, which are major components) is associated with ultrasound-diagnosed NAFLD⁵⁰, thus providing a rationale to evaluate BCAA metabolism in the pathophysiology of NAFLD. Untargeted metabolomics revealed that α -ketoglutarate, and to a lesser extent the BCAA and their related catabolic products C3- and C5-acylcarnitines, may discriminate patients with or without NAFLD⁵¹ (**Table 2**).

Targeted analysis of plasma AA in NAFLD and no NAFLD patients (assessed by imagery or biopsy proven) all showed increased BCAA in patients with NAFLD^{52–54}. However, these studies were poorly controlled for metabolic confounders (IR, T2D and obesity), as well as patient sex (**Table 2**). In line, recent work from our group showed that plasma BCAA concentrations display sexually-dimorphic changes with increasing severity of biopsy-evaluated NAFLD, independently of BMI, IR and age⁵⁵ (**Table 2**). Sex subgroup analysis in this study revealed that while plasma BCAA concentrations increased with NAFLD severity in women, they tended to decrease in men. Additionally, only women displayed significantly increased plasma BCAAs with significant fibrosis⁵⁵. These data suggest BCAA metabolism is disturbed in case of NAFLD but confounders such as IR, obesity and sex should be considered.

Pathophysiologic role of BCAA in NAFLD pathogenesis

A potential causal link between BCAA and NAFLD has been explored both in pre-clinical and clinical studies. BCAA-enriched diet in ob/ob mice promotes heterogeneity of lipid droplet sizes in hepatocytes promoting hepatic steatosis by lipid release in the liver⁵⁶. Supplementation of HFD with BCAA in mice causes liver injury (shown by increase of ALT and pro inflammatory cytokines in the liver) by promoting adipocyte lipolysis through AMPK α 2 pathway mediation and increasing flux of FFA to the liver⁵⁷. Changes in gut microbiota may also impact BCAA metabolism to drive the development of steatosis. Low gut microbiota richness, a marker of metabolism disorders, is present in patients with steatosis and high

plasma BCAA levels⁵⁸. Using fecal transplantation in mice, Hoyles *et al.*⁵⁸ showed that microbiota of patients with steatosis produced phenylacetic acid (PAA). Interestingly, these authors found that PAA increased the expression of *ACADSB*, encoding for an enzyme involved in BCAA catabolism, and increased utilization of BCAA⁵⁸ in hepatocytes. Hence, in this case, steatosis controls BCAA catabolism *via* microbiota alteration. Hepatic and extra-hepatic actions of BCAA metabolism can therefore drive the development of steatosis in the context of metabolic dysfunction.

Several studies have also identified mechanisms by which BCAA promotes hepatic inflammation in NAFLD, mostly focusing on the regulation of hepatic mTOR activity. Transcriptomic analysis of liver biopsies from patients with NAFLD showed an increase of *BCAT1* and decreased *BCKDH* expression in biopsy-proven NAFLD vs normal liver. Interestingly, NAFLD states associated with increased hepatic BCAA concentrations, as well as increased plasma C3- and C5-acylcarnitines⁵⁹. This increase of hepatic BCAA is associated to decrease of mTor expression despite an increase of RPS6KA5 expression (a positive regulator of mTor)⁵⁹, suggesting complex regulation of hepatic mTor by BCAA in the context of NAFLD. Metabolic flux analysis in mice with NAFLD failed to optimally induce hepatic mTor by BCAA in case of acute elevation of plasma BCAA⁶⁰. Finally, supplementation of BCAA in HFD mice cause liver injury by inhibiting hepatic autophagy⁵⁷ (a process regulated by mTor pathway⁶¹). Despite the finding that BCAA, especially leucine, activate mTor, the above studies suggest that increased plasma BCAA observed in NAFLD are associated with decreased mTor activity. Hence, the role of BCAA in the development of necroinflammation in NAFLD is unclear, and whether is it cause or consequence of dysregulation of hepatic mTor pathway and remains to be elucidated.

Consequently, increased BCAA in NAFLD may affect several pathways including lipogenesis, gluconeogenesis and mTor modulation, but remains not fully understood. Moreover, these findings could be complicated by several confounders such as T2D, obesity and gender that also impact BCAA metabolism. It is not yet clear whether BCAA modulation in NAFLD is a driving force of pathogenesis or the consequence of global metabolic disorders of MAFLD.

One carbon metabolism.

Physiological metabolism

Methionine, serine and glycine are the three AA centrally involved in one carbon metabolism (OCM). While methionine is an essential AA, serine and glycine are non-essential AA and can be generated from glycolysis intermediates. One carbon metabolism is a cycle of transmethylation (providing methyl group donors) and 2 remethylation reactions (folate-dependent or independent) which can affect epigenetics and metabolic reaction involving methyl acceptor molecules.

OCM, largely localized to the liver and kidney⁶², is composed of 3 cycles involving the exchange of methyl groups between a number of intermediates (**Figure 2**). In the main cycle, methionine is conjugated to S-adenosine to form S-adenosyl-L-methionine (SAME), a principle methyl donor in a number of pathways. After removal of the methyl group, SAME is converted to SA-homocysteine (SAH) and then to homocysteine. This demethylation is catalyzed by numerous methyltransferases including glycine N-methyltransferase (GNMT) that also converts glycine into sarcosine (**Figure 2**). SAH is then converted to homocysteine. Importantly, methionine is the sole source of homocysteine in the body and homocysteine levels are reflective of OCM activity. There are two auxiliary reactions that regenerate methionine from homocysteine, the folate-dependent remethylation pathway and the folate-independent remethylation pathway (**Figure 2**). The folate-dependent remethylation pathway uses methionine synthase (vitamin B12 dependent) and the methyl group from methyl tetrahydrofolate (CH₃-THF). The folate-independent remethylation pathway leads to the transfer of a methyl group from betaine and a hydrogen ion from homocysteine to produce dimethylglycine and methionine respectively (**Figure 2**). There are also several branches from these cycles that can generate other key metabolites. For example, homocysteine can enter the transsulfuration pathway to generate cysteine by cystathionine beta synthase (CβS) which is a vitamin B6 dependent-enzyme. This route ultimately leads to glutathione production, making the link between homocysteine, methionine, OCM and glutathione pathway (**Figure 2**).

Several pathologies can affect OCM activity and are associated with alterations in plasma homocysteine levels. Plasma homocysteine concentration is increased in various physiological conditions such as aging, nutrition state⁶³ and also by some drugs (i.e XXXX)⁶⁴. Moreover, high homocysteine levels are found in inherited metabolic diseases involving enzymes of OCM, in vitamin deficiencies (i.e. folates, B6, B12) due to malnutrition and in various pathological conditions such as renal failure or cardiovascular diseases⁶³. Hence, simultaneous measurements of intermediates of OCM such as glycine, methionine, serine could be useful to estimate OCM activity, additionally to the SAMe/SAH ratio reflecting the methylation pathway.

Alteration of OCM in metabolic disorders

Because homocysteine is metabolized specifically by the OCM pathway, measurement of its plasma concentration has been widely applied to check changes in OCM in metabolic disorders such as IR, T2D and obesity. In type 2 diabetic subjects, homocysteine levels increase, without concomitant modification of methionine flux⁶⁵. Consequently, increased plasma homocysteine could be rather the consequence of kidney disorders (both decrease of metabolism and clearance) instead of OCM alterations⁶⁵. Conversely, a meta-analysis revealed that elevated homocysteine level is causally associated with increased risk of T2D⁶⁶. One proposed mechanism is via dysregulation of epigenetic modifications^{67,68} whereby OCM modification leads to gene expression changes related to β -cell development and functions, insulin secretion and sensitivity⁶⁹. Moreover, low concentrations of glycine and serine were found in patients with T2D⁷⁰. In line, L-serine supplementation in non-obese diabetic (NOD) mice improves glucose homeostasis and reduces body weight⁷¹. Mice with high levels of homocysteine display elevation of endoplasmic reticulum (ER) stress markers in adipose tissue, which activates JNK to promote proinflammatory cytokine production and macrophage infiltration⁶⁹. These findings suggest that OCM alterations may have deleterious consequences on glucose homeostasis and thus could be involved in metabolic disorders related to NAFLD pathogenesis.

One Carbon Metabolism and NAFLD

Observational studies

Cohort studies of OCM in patients with NAFLD have yielded apparently conflicting results, showing increased⁷²⁻⁷⁴ or decreased^{75,76} plasma homocysteine levels in NAFLD patients (**Table 2**). One potential explanation is the relative impact of changes in homocysteine due either to folate-dependant or -independant (betaine) remethylation pathways (**Figure 2**). At least one study has shown that folates and vitamin B12 are decreased in NASH patients compared to those with normal liver histology⁶⁷, which could explain increased plasma homocysteine sometimes observed in these patients⁷²⁻⁷⁴. Moreover, these vitamins plasma concentrations are inversely correlated with histological NASH severity⁷⁷. Hence, despite to known confounders of homocysteine plasma levels described above (IR, T2D and obesity), the potential direct association between homocysteine and NAFLD remains unclear. In addition to homocysteine, other AA of the OCM pathways vary with NAFLD. Targeted metabolomics on AA showed that glycine levels decreased in obese NAFLD versus lean controls⁵². Moreover, a population study using fatty liver index (FLI) to evaluate fatty liver disease (FLD) showed a decrease of glycine and serine whereas methionine increase in FLD⁷⁸ (**Table 2**). The reported alterations in plasma AA (homocysteine, glycine, serine, methionine) in patients with NAFLD suggests an involvement of OCM in the development and/or evolution of the disease.

OCM in NAFLD pathogenesis

Pre-clinical models suggest a key role for OCM in the pathogenesis of NAFLD as several models manipulating this pathway are routinely used in the pre-clinical setting. Among the best studied models of NAFLD in rodents is the methionine and choline deficient diet (MCDD). Mice and rats fed the MCDD develop hepatic steatosis, oxidative stress (discussed below) and potentially fibrosis in mice⁷⁹ depending on the length of the protocol. The MCDD leads to steatosis *via* a block in VLDL secretion⁸⁰. The absence of methionine leads to hepatic injury, inflammation, and fibrosis, whereas the deficiency of choline leads to macrovesicular steatosis by oxidative stress. In accordance with the involvement of OCM in methylation-dependant

epigenetic alteration, the MCDD mouse model displays hepatic changes in epigenetic marks⁷⁹ with histone methylation that predetermines susceptibility to steatosis⁸¹. In mouse, deficiency in methionine adenosyltransferase 1A (Mat1a), the enzyme that catalyzes the formation of SAdMe from methionine (see **Figure 2**), leads to liver injury⁸². Serum metabolome of Mat1a-KO mice showed common altered pathway compared to patients with biopsy-proven NAFLD, namely methionine (increase for Mat1a-KO mice and decrease for NAFLD patients)⁸³. Hence, either increase or decrease of plasma methionine is related to OCM alteration that could be related to methylation impairment.

By use of multi-omic strategy (transcriptomics, metabolomics and metagenomics), Mardinoglu *et al.*, investigated the effects of a carbohydrate-restricted diet with high protein content in ten obese biopsy-proven NAFLD patients. This diet alters gut microbial composition that increases circulating folates and subsequently folate-dependent OCM hepatic gene expression, resulting in an improvement of liver fat (increase of β -oxidation and decrease of *de novo* lipogenesis)⁸⁴. On High Fat High Cholesterol (HFHC) mice, the observed decrease of hepatic methionine, serine and glycine are related to lower *Gnmt* gene expression (**Figure 2**)⁸⁵. Furthermore, studying NAFLD human liver biopsy and MCDD mice, it has been shown that GNMT expression is downregulated by miR-873p^{86,87}. Upregulation of miR-873-5p is shown in the liver of NAFLD/NASH patients and correlate with hepatic GNMT depletion. Use of anti-miR-873-5p in MCDD mice resolve lipid accumulation, inflammation and fibrosis by enhancing fatty acid β -oxidation in the mitochondria⁸⁷. Moreover, this same study showed that GNMT participates in the regulation of mitochondrial functionality through the regulation of Complex II activity in the electron transport chain (ETC)⁸⁷.

Consequently, alteration of OCM results firstly to SAdMe decrease and epigenetic deregulation leading to steatosis and secondly to ETC disruption and increase of reactive oxygen species (ROS) levels that promotes inflammation, all involved in NAFLD pathogenesis. Finally, modulation of OCM also impacts glutathione (GSH) synthesis *via* transsulfuration pathway from homocysteine impacting regulation of ROS levels and inflammatory process as discussed in the next session.

Glutathione

Physiological metabolism

GSH is a tripeptide formed by the three non-essential AA, glutamate, cysteine and glycine. Intra-cellular GSH concentration depends both on uptake from the extracellular space by transporters (such as OATP and MRP1⁸⁸) and *de novo* synthesis⁸⁹. Glutamate is synthesized from glutamine via glutaminolysis or from the TCA intermediate α -ketoglutarate (α -KG). Glycine is synthesized from serine via a glycolysis-coupled reaction or as part of OCM. Finally, cysteine is formed in the transulfuration pathway from homocysteine and serine⁶⁷. Hence, GSH synthesis is closely linked to TCA, glycolysis and OCM activities. The 3 AA forming GSH are assembled in the cytosol by the successive action of glutamylcysteine synthetase (GCS) and glutathione synthetase (GS) (**Figure 2**). GSH is ubiquitous but particularly abundant in red blood cells (RBC), liver and lung. Free GSH is present in the cytosol and up to 15% can be sequestered in the mitochondria, endoplasmic reticulum or nuclei⁸⁹. GSH forms homodimers, glutathione disulfide (GSSG), by reversible oxido-reduction driven by the glutathione reductase and the glutathione peroxidase enzymes. This process requires NADPH produced by pentose phosphate pathway. As the reduced GSH form is necessary for ROS detoxification and oxidative stress homeostasis, a decrease of GSH is associated with increased ROS, inflammation and oxidative damage.

ROS generation could be due to impaired molecular oxygen oxidation from ETC. Physiologically, some mechanisms could protect against ROS such as SOD, catalase and GSH. Hence, increase of ROS production and redox imbalance leads to a decrease of GSH by consumption.

Moreover, GSH modulates cell proliferation, apoptosis, immune function, and fibrogenesis⁸⁹. GSH is particularly important in the mitochondria for defending against both physiologically and pathologically generated oxidative stress to limits inflammatory process.

Glutathione in metabolic disorders

In metabolic disorders, decrease of GSH concentration leads to an increase of oxidative stress. Indeed, compared to non-diabetic controls, patients with T2D have lower erythrocyte GSH concentration⁹⁰. This lower concentration is due both to a decrease of *de novo* GSH synthesis and to reduced availability of NADPH for GSH-reductase, mostly attributed to overactivation of NADPH-dependent aldose reductase in the polyol pathway. Indeed, hyperglycemia increases the enzymatic conversion of glucose to sorbitol (a polyol) by sorbitol dehydrogenase, with concomitant decrease in NADPH and GSH⁹¹, resulting in higher sensitivity to oxidative stress. Chronic GSH deficiency in liver and skeletal muscle in mice promotes impaired fatty acid oxidation and insulin resistance⁹². ROS affects cysteine residues of related phosphatase enzyme activity (such as PTEN or MKP-1) and stress-sensitive kinases (such as PI3K or PDK1) involved in insulin signaling cascade⁹³. ROS accumulation could also lead to lipids oxidation by peroxidation (increase of malonaldehyde MDA, oxysterols and 4-hydroxynonenal 4-HNE) that could promote inflammation and vascular damages⁹⁴.

Glutathione and NAFLD

By their role in the pathogenesis of insulin resistance by modulation of metabolic and inflammatory process, GSH changes could be actor in the pathogenesis of NAFLD. First, in NAFLD patients, Gaggini *et al.* evaluate the plasma “GSG-index” as the ratio of glutamate/(serine+glycine) which reflects glutathione synthesis. The GSG-index correlates with hepatic IR and increased more in subjects with NAFLD and obesity than in those with NAFLD without obesity⁵² (**Table 2**). These findings suggest an increase of GSH synthesis by increasing intracellular GSH turnover to counteract production of ROS. Moreover, circulating levels of GSH were significantly lower in patients with NAFLD compared to controls⁷³.

HFD mice that developed hepatic steatosis and liver injuries displayed decreased GSH and elevation of GSSG⁹⁵. Administration of metabolic precursors of GSH in MCDD rats improved liver fatty degeneration, inflammation, and necrosis⁹⁶. Moreover, shifting glutamine from TCA cycle to GSH can also correct oxidative stress in MCDD model⁹⁷. A lower hepatic GSH level in

bile duct ligation (BDL) rat model with fibrosis was shown and was related to the decreased hepatic transsulfuration pathway activity as measured by GCL gene expression⁹⁸. This decrease of GSH drives hepatic stellate cell (HSC) activation and subsequent fibrosis. Antioxidant therapy with glutathione supplementation may reduce the pathological oxidative stress in the liver, as seen in human liver biopsy, preventing the progression from NAFL to NASH⁹⁹. In addition to modulation of hepatic methionine metabolism, Pacana *et al.*, showed a decreased of GSH levels related to serine depletion in patients with NASH⁸⁵. Moreover, using unbiased genome-scale metabolic model of hepatocytes, Mardinoglu *et al.* revealed serine levels are reduced in patients with NASH¹⁰⁰. In line, serine supplementation in mice with hepatic steatosis improved liver function related to GSH and NAD biosynthesis¹⁰¹.

There are also some evidences that levels of lipid oxidation (related to ROS production by GSH decrease) are associated with the progression of NAFLD. Indeed, oxysterols and 4-HNE increase inflammation and hepatic oxidative damage that promoting NASH progression¹⁰².

Taken together, these findings suggest that decreased GSH synthesis, directly or indirectly *via* modulation of its precursors, cysteine, glutamate and glycine. Furthermore, GSH decreases could increase oxidative stress and favor NAFLD progression.

Urea cycle modulations

Physiological metabolism

The urea cycle (UC) activity is overwhelmingly localized to the liver and permits detoxification of ammonia producing urea, which can then be excreted through the urine. Ammonia could be transported by some AA such as glutamine or alanine in systemic circulation, hence increase of this AA is the reflect of hyperammonemia. In the liver, free ammonia is first converted to carbamoyl phosphate by carbamoyl phosphate synthetase 1 (CPS1) (**Figure 3**). Then, carbamoyl phosphate is conjugated to ornithine to form citrulline through a reaction catalyzed by ornithine transcarbamoylase (OTC). Citrulline is next condensed with aspartate to form argininosuccinate catalyzed by argininosuccinate synthetase (ASS). After cleavage of argininosuccinate by argininosuccinase (ASL) to form arginine and fumarate. Finally, arginase

(ARG) is degraded into urea and ornithine that re-enters the urea cycle (**Figure 3**). Thus, measurements of AA precursors (glutamine, glutamate) and intermediaries (citrulline, ornithine, arginine) of UC could contribute to evaluate its activity¹⁰³.

Moreover, some enzymes of the UC are also presents in macrophages (ARG, ASS and ASL) and transform arginine into some UC intermediaries such as citrulline and ornithine leading to urea formation¹⁰⁴.

Urea cycle and metabolism

Ammonia accumulation is indicative of UC disruption and general liver dysfunction. This can lead to several adverse pathologies such as neurological complication (i.e. hepatic encephalopathy)¹⁰³, among others. The most common causes of UC disruption are liver injury (leading to hepatic dysfunction), advanced fibrosis and decompensated cirrhosis. These final stages of liver disease and failure are associated with major impaired hepatocellular functions¹⁰⁵. UC disorders lead to decreased citrulline, a metabolite whose role in cardiometabolic health has recently been highlighted by several studies¹⁰⁶. These effects are mostly attributed to its role in NO homeostasis and its antioxidant properties. Decreased citrulline leads to vasoconstriction via decrease of NO that have both direct and indirect effects on skeletal muscle metabolism. Vasoconstriction by NO contribute to increase IR through blood flow modulation and glucose clearance^{107,108}. Conversely, citrulline supplementation in HFD obese rats induced fatty acid release from visceral adipose tissue¹⁰⁹ and also decrease VLDL and LDL oxidation in aging¹¹⁰. Hence, in addition to the effect of ammonia accumulation, UC disruption promotes metabolic disorders as IR and obesity related to the decrease of citrulline.

Urea cycle and NAFLD

UC disorders could impact NAFLD pathogenesis through two mechanisms: the decrease of citrulline and the accumulation of ammonia.

Recent experimental studies have produced evidence for a role of citrulline in controlling the pathophysiological of NAFLD¹¹¹. In rats, citrulline supplementation was sufficient to prevent fructose-induced NAFLD¹¹². Similarly, citrulline decrease de novo lipogenesis, increase fatty acid oxidation through induction of UCP1 and PPAR α ¹¹³ in white adipose tissue. Decreased citrulline could also be a result of increased systemic inflammation and oxidative stress. Indeed, it has been shown that citrulline decreases ER stress and acts as a potent hydroxyl radical scavenger that protects DNA and other enzymes from ROS attacks¹¹⁴.

On human liver biopsies and HFHC rat models, it has been shown that NASH is associated with a reduction in the gene, protein expression, and activity of urea cycle enzymes (UCEs)¹⁰⁵ by hypermethylation of *OTC* and *CPS1* leading to hyperammonemia and impaired urea synthesis. In HFHC rodent model, hyperammonemia is associated with progression of hepatic fibrosis¹¹⁵. Liver mRNA analyses on non-diabetic, biopsy-proven NAFLD patients showed increase of Glutamine Synthetase (*GS*) and decrease of *CPS1* leading to hyperammonemia¹¹⁶. Moreover, reduction of ammonia levels prevented progression of fibrosis, providing a potential treatment for NAFLD. This link between NASH, UCEs and hyperammonemia could lead to future therapeutic target¹⁰⁵.

Additionally, as we previously shown, macrophages could transform some UC metabolites, there are some evidence that arginine macrophage metabolism increases hepatic macrophage activation that could promotes NAFLD progression¹².

Thus, disruption of UC could lead to NAFLD through citrulline depletion and ammonia accumulation promoting metabolic disorders, inflammation and fibrosis.

Tricarboxylic Acid Cycle

Physiological metabolism

The tricarboxylic acid (TCA) cycle is a metabolic pathway present in all aerobic cells and whose primary function is to generate energetic molecules (ATP) from the oxidative catabolism of carbohydrates, fats and proteins. The TCA cycle recovers energy from reduction of NAD and FAD, whose electrons circulate through the mitochondrial electron transport chain (ETC) to

finally form ATP by oxidative phosphorylation¹¹⁷ (**Figure 4**). The maintenance of TCA depends on a balance between anaplerosis, the synthesis of metabolic intermediates, and cataplerosis, the extraction of metabolic intermediates for breakdown. The main entry point of metabolites in the TCA cycle is acetyl-CoA, which can be generated from fatty acids, AA (aspartate, asparagine) or pyruvate oxidation (from glucose but also alanine, serine, glycine, threonine, cysteine or tryptophan). Acetyl-CoA is then combined with oxaloacetate (OAA) to generate citrate (**Figure 4**). Citrate is next converted into isocitrate that is converted into α -ketoglutarate (α -KG), and subsequently succinyl-CoA with the generation of two NADH. Next, succinyl-CoA converts into succinate that is oxidized to fumarate. Some TCA cycle intermediates (acetyl-CoA, α -KG, succinate, fumarate, ...) can directly control gene expression via activation of transcription factors and by modification of epigenetic regulators to change cell function and fate (for review see ¹¹⁷). AA metabolic pathways can exchange several TCA intermediaries: such as BCAA catabolism with acetoacetate and succinyl-CoA, OCM by transulfuration pathway leading to succinyl-CoA and urea cycle by glutamate metabolism leading to α -KG synthesis¹¹⁸ (**Figure 4**). Hence, as TCA is tightly linked to AA *via* anaplerotic and cataplerotic reactions.

TCA in metabolic disorders

Impaired molecular oxygen oxidation in oxidative phosphorylation and disruption of TCA leads to redox alteration and overproduction of ROS¹¹⁹ involved in both arms of the immunological defense system, the innate and the acquired responses. ROS is also implicated in the development in metabolic diseases and chronic inflammation¹²⁰. T2D is associated with a dysregulation of FA metabolism, related to defective [?] mitochondrial oxidative phosphorylation¹²¹ and reduced muscular TCA cycle flux reflecting mitochondrial dysfunction¹²². In HFD mice, increased mitochondrial respiration protects against excessive substrate oxidant toxicity imparting glucose tolerance and insulin sensitivity¹²³. Moreover, antioxidation treatment of obese mice decreased ROS levels and improved insulin sensitivity¹²⁴. Hence TCA involves many AA and is closely associated to metabolic syndrome (IR and obesity) and inflammation, two processes also involved in NAFLD pathogenesis.

TCA alteration in NAFLD

Observational studies

Kalhan *et al.* report an increase of plasma aspartate and glutamate in patients with NAFLD, a finding they attribute to increased anaplerosis of these AA into the TCA cycle. These changes are only partly counteracted by an increased cataplerosis removal of the resulting AA from the cycle¹²⁵. In a case-control study of patients with NAFLD, increase of plasma glutamic acid is reported in NAFLD patients, reflecting impaired mitochondrial function through transamination reaction modulation¹²⁶ (**Table 2**). Furthermore, these alterations lead to a metabolic signature reflecting perturbation of TCA by high levels of glutamate related to lower levels of enzymes transforming glutamate to α -ketoglutarate, *GPT2* and *GOT2*¹²⁷. Hence, observational studies suggest an involvement of TCA in the perturbation of AA metabolism in case of NAFLD.

TCA metabolic disruption in case of NASH

It has been shown that disruption of TCA leads to accumulation of ROS and poor adaptation of hepatic mitochondrial metabolism. This is reported as a central feature of the transition from simple steatosis to NASH, driving hepatocyte ROS generation and inflammation¹²⁸.

Evaluation of systemic lipolysis, hepatic glucose production, and mitochondrial pathways by fluxomics in human, showed that NAFLD could lead to excessive hepatic mitochondrial TCA cycle and gluconeogenesis¹²⁹. Furthermore, it has been shown that expression of *GLS1*, the primary enzyme for glutaminolysis, is increased in NASH patients and resulting to higher serum glutamate levels⁹⁷. Moreover, in MCDD NASH mouse model, *GLS1* inhibition lead to reduction of steatosis in NASH by increasing VLDL export and diminution of oxidative stress⁹⁷. As discussed in the previous section about OCM, Mardinoglu *et al.* showed that serine levels are reduced in patients with NASH¹⁰⁰ and supplementation with serine improved NAD⁺ biosynthesis in mice fed a NASH-inducing diet¹⁰¹. Recently, in cells and mouse models, Yang *et al.* showed that serine catabolism in the folate pathway produces NADH¹³⁰, while inhibition of respiration decreases NADH production by TCA cycle but not serine catabolism.

Consequently, increased serine catabolism observed in NAFLD could be a result of modulation of cellular redox equilibrium.

Taken together, these findings suggest that TCA disruption promotes NAFLD progression through metabolic disturbance (IR and lipid homeostasis) increasing steatosis and also to redox imbalance that promotes inflammation. Moreover, as a central metabolic pathway, TCA disruption could be related to other metabolic disruption discussed in previous sections.

Conclusion and perspectives

AA as biomarkers in the context of NAFLD?

As discussed in this review, the concentrations of some AA vary with the stages of NAFLD. However, since these concentrations also vary with clinico-biological factors associated with NAFLD (IR, T2D, obesity), these AA considered individually cannot be used as a biomarkers for the diagnosis and monitoring of the pathology. Nevertheless, it may be relevant that they can be incorporated into NAFLD scores, in combination with other circulating parameters, especially since their measurement in the bloodstream is feasible routinely by chromatography and mass spectrometry.

AA as actors in the pathophysiology of NAFLD and as therapeutic targets?

On the first hand, AA pathway dysregulation are related to glucose and lipid homeostasis disorders promoting the development of hepatic steatosis. On the other hand, AA are involved in liver injury through inflammation, oxidative stress and fibrogenesis leading to liver injury. However, since metabolic contexts such as IR, T2D and obesity, which are risk factors for NAFLD, are also linked to alterations in AA, it is difficult to determine whether AA are indirectly or directly responsible in the pathophysiology of NAFLD, independently of these confounding factors. Thus, it is fundamental to consider these confounding factors in clinical studies analyzing the relationship between AA and NAFLD.

Until now, in clinical studies, AA concentrations are measured in bloodstream at time T, which does not account for the dynamics of the evolution of these molecules over time as a function of their synthesis, degradation and transformation, involving several organs. In this context, fluxomic and metabolomic studies not only in plasma but also in tissues could be much more informative. Moreover, there is a need to consider other omic strategies (genomics, transcriptomics, metagenomics) by trans-omics build metabolic model pathways to highlight new pathogenesis pathways. Additionally, AA implication in NAFLD could be promoted by other metabolites. For example bile acids (BA), known to play a role in the pathophysiology of NAFLD, as in mouse livers, the liver receptor of BA, Farnesoid-X-receptor (FXR), regulates AA

catabolism and detoxification of ammonium *via* ureagenesis and glutamine synthesis¹³⁴. In addition to current therapy such as bariatric surgery and life style intervention¹³⁵, recent study showed that ketogenic diet could be an effective treatment for hepatic lesion related to mitochondrial fluxes and redox state¹³⁶. It has been shown that ketogenic diet improves NASH¹³⁷ but underlying mechanisms remains unknown. As ketogenic diet is associated to proteolysis¹³⁸, this diet could impact AA pool and lead to alteration of metabolic related pathway. Moreover, other dietary intervention (supplementation or depletion in specific AA) could have an interest to limit or reverse some metabolic pathway disorders related to NAFLD¹³⁹.

References

1. Younossi, Z. M. Non-alcoholic fatty liver disease – A global public health perspective. *J. Hepatol.* **70**, 531–544 (2019).
2. Haas, J. T., Francque, S. & Staels, B. Pathophysiology and Mechanisms of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Annu. Rev. Physiol.* **78**, 181–205 (2016).
3. Eslam, M., Sanyal, A. J. & George, J. MAFLD: A consensus-driven proposed nomenclature for metabolic associated fatty liver disease. *Gastroenterology* **0**, (2020).
4. Parker, R. The role of adipose tissue in fatty liver diseases. *Liver Res.* **2**, 35–42 (2018).
5. Chiu, S., Mulligan, K. & Schwarz, J.-M. Dietary carbohydrates and fatty liver disease: de novo lipogenesis. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **21**, 277–282 (2018).
6. Jensen, T. *et al.* Fructose and Sugar: A Major Mediator of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J. Hepatol.* **68**, 1063–1075 (2018).
7. Petersen, M. C., Vatner, D. F. & Shulman, G. I. Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* **13**, 572–587 (2017).
8. Mato, J. M., Alonso, C., Noureddin, M. & Lu, S. C. Biomarkers and subtypes of deranged lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* **25**, 3009–3020 (2019).
9. Peng, K.-Y. *et al.* Mitochondrial dysfunction-related lipid changes occur in nonalcoholic fatty liver disease progression. *J. Lipid Res.* **59**, 1977–1986 (2018).
10. Masarone, M. *et al.* Role of Oxidative Stress in Pathophysiology of Nonalcoholic Fatty

Liver Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, (2018).

11. Machado, M. V. *et al.* Reduced lipoapoptosis, hedgehog pathway activation and fibrosis in caspase-2 deficient mice with non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* **64**, 1148–1157 (2015).
12. Oates, J. R. *et al.* Macrophage Function in the Pathogenesis of Non-alcoholic Fatty Liver Disease: The Mac Attack. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
13. Haas, J. T. *et al.* Transcriptional Network Analysis Implicates Altered Hepatic Immune Function in NASH development and resolution. *Nat. Metab.* **1**, 604–614 (2019).
14. Wang, Y. *et al.* Mammalian target of the rapamycin pathway is involved in non-alcoholic fatty liver disease. *Mol. Med. Rep.* **3**, 909–915 (2010).
15. Hoffmann, C. *et al.* Hepatic stellate cell hypertrophy is associated with metabolic liver fibrosis. *Sci. Rep.* **10**, (2020).
16. Hallsworth, K. & Adams, L. A. Lifestyle modification in NAFLD/NASH: Facts and figures. *JHEP Rep.* **1**, 468–479 (2019).
17. Gluchowski, N. L., Becuwe, M., Walther, T. C. & Farese, R. V. Lipid droplets and liver disease: from basic biology to clinical implications. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **14**, 343–355 (2017).
18. Ridaura, V. K. *et al.* Gut Microbiota from Twins Discordant for Obesity Modulate Metabolism in Mice. *Science* **341**, (2013).
19. Zhang, S., Zeng, X., Ren, M., Mao, X. & Qiao, S. Novel metabolic and physiological functions of branched chain amino acids: a review. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **8**, (2017).

20. Zhou, H., Yu, B., Gao, J., Htoo, J. K. & Chen, D. Regulation of intestinal health by branched-chain amino acids. *Anim. Sci. J.* **89**, 3–11 (2018).
21. Neinast, M. D. *et al.* Quantitative Analysis of the Whole-Body Metabolic Fate of Branched-Chain Amino Acids. *Cell Metab.* **29**, 417-429.e4 (2019).
22. Lynch, C. J. & Adams, S. H. Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. *Nat. Rev. Endocrinol.* **10**, 723–736 (2014).
23. Suryawan, A. *et al.* A molecular model of human branched-chain amino acid metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* **68**, 72–81 (1998).
24. Hull, J. *et al.* Distribution of the branched chain aminotransferase proteins in the human brain and their role in glutamate regulation. *J. Neurochem.* **123**, 997–1009 (2012).
25. Finn, P. F. & Dice, J. F. Proteolytic and lipolytic responses to starvation. *Nutrition* **22**, 830–844 (2006).
26. Guevara-Cruz, M. *et al.* Amino acid profiles of young adults differ by sex, body mass index and insulin resistance. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **28**, 393–401 (2018).
27. Yamamoto, H. *et al.* Reference intervals for plasma-free amino acid in a Japanese population. *Ann. Clin. Biochem.* **53**, 357–364 (2016).
28. Fujita, S. & Volpi, E. Amino Acids and Muscle Loss with Aging. *J. Nutr.* **136**, 277S-280S (2006).
29. Newgard, C. B. Interplay between lipids and branched-chain amino acids in development of insulin resistance. *Cell Metab.* **15**, 606–614 (2012).

30. Newgard, C. B. *et al.* A Branched-Chain Amino Acid-Related Metabolic Signature that Differentiates Obese and Lean Humans and Contributes to Insulin Resistance. *Cell Metab.* **9**, 311–326 (2009).
31. Laferrère, B. *et al.* Differential Metabolic Impact of Gastric Bypass Surgery Versus Dietary Intervention in Obese Diabetic Subjects Despite Identical Weight Loss. *Sci. Transl. Med.* **3**, 80re2 (2011).
32. Zhou, Y. *et al.* Obesity and diabetes related plasma amino acid alterations. *Clin. Biochem.* **46**, 1447–1452 (2013).
33. Moore, S. C. *et al.* Human metabolic correlates of body mass index. *Metabolomics Off. J. Metabolomic Soc.* **10**, 259–269 (2014).
34. Koves, T. R. *et al.* Mitochondrial Overload and Incomplete Fatty Acid Oxidation Contribute to Skeletal Muscle Insulin Resistance. *Cell Metab.* **7**, 45–56 (2008).
35. Hagiwara, A., Nishiyama, M. & Ishizaki, S. Branched-chain amino acids prevent insulin-induced hepatic tumor cell proliferation by inducing apoptosis through mTORC1 and mTORC2-dependent mechanisms. *J. Cell. Physiol.* **227**, 2097–2105 (2012).
36. Wolfson, R. L. *et al.* Sestrin2 is a leucine sensor for the mTORC1 pathway. *Science* **351**, 43–48 (2016).
37. Zhenyukh, O. *et al.* High concentration of branched-chain amino acids promotes oxidative stress, inflammation and migration of human peripheral blood mononuclear cells via mTORC1 activation. *Free Radic. Biol. Med.* **104**, 165–177 (2017).
38. White, P. J. *et al.* The BCKDH Kinase and Phosphatase Integrate BCAA and Lipid

Metabolism via Regulation of ATP-Citrate Lyase. *Cell Metab.* **27**, 1281-1293.e7 (2018).

39. Erion, D. M. & Shulman, G. I. Diacylglycerol-mediated insulin resistance. *Nat. Med.* **16**, 400–402 (2010).

40. Zhao, H. *et al.* Branched-Chain Amino Acids Exacerbate Obesity-Related Hepatic Glucose and Lipid Metabolic Disorders via Attenuating Akt2 Signaling. *Diabetes* (2020) doi:10.2337/db19-0920.

41. White, P. J. & Newgard, C. B. Branched-chain amino acids in disease. *Science* **363**, 582–583 (2019).

42. Yoneshiro, T. *et al.* BCAA catabolism in brown fat controls energy homeostasis through SLC25A44. *Nature* **572**, 614–619 (2019).

43. She, P. *et al.* Obesity-related elevations in plasma leucine are associated with alterations in enzymes involved in branched chain amino acid (BCAA) metabolism. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **293**, E1552–E1563 (2007).

44. Zhou, M. *et al.* Targeting BCAA Catabolism to Treat Obesity-Associated Insulin Resistance. *Diabetes* **68**, 1730–1746 (2019).

45. Sánchez-González, C. *et al.* Dysfunctional oxidative phosphorylation shunts branched-chain amino acid catabolism onto lipogenesis in skeletal muscle. *EMBO J.* **39**, e103812 (2020).

46. Tajiri, K. & Shimizu, Y. Branched-chain amino acids in liver diseases. *Transl. Gastroenterol. Hepatol.* **3**, (2018).

47. Suzuki, K. *et al.* Measurement of serum branched-chain amino acids to tyrosine ratio level is useful in a prediction of a change of serum albumin level in chronic liver disease.

Hepatol. Res. **38**, 267–272 (2008).

48. Dejong, C. H. C., van de Poll, M. C. G., Soeters, P. B., Jalan, R. & Olde Damink, S. W. M. Aromatic Amino Acid Metabolism during Liver Failure. *J. Nutr.* **137**, 1579S-1585S (2007).

49. Ooi, P. H., Gilmour, S. M., Yap, J. & Mager, D. R. Effects of branched chain amino acid supplementation on patient care outcomes in adults and children with liver cirrhosis: A systematic review. *Clin. Nutr. ESPEN* **28**, 41–51 (2018).

50. Alferink, L. J. *et al.* Association of dietary macronutrient composition and non-alcoholic fatty liver disease in an ageing population: the Rotterdam Study. *Gut* gutjnl-2017-315940 (2019) doi:10.1136/gutjnl-2017-315940.

51. Rodríguez-Gallego, E. *et al.* Mapping of the circulating metabolome reveals α -ketoglutarate as a predictor of morbid obesity-associated non-alcoholic fatty liver disease. *Int. J. Obes.* **39**, 279–287 (2015).

52. Gaggini, M. *et al.* Altered amino acid concentrations in NAFLD: Impact of obesity and insulin resistance. *Hepatology* **67**, 145–158 (2018).

53. Feldman, A. *et al.* Clinical and metabolic characterization of obese subjects without non-alcoholic fatty liver: a targeted metabolomics approach. *Diabetes Metab.* **45**, 132–139 (2019).

54. Goffredo, M. *et al.* A Branched-Chain Amino Acid-Related Metabolic Signature Characterizes Obese Adolescents with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrients* **9**, (2017).

55. Grzych, G. *et al.* Plasma BCAA changes in Patients with NAFLD are Sex Dependent. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **105**, (2020).

56. Kakazu, E. *et al.* Branched chain amino acids are associated with the heterogeneity of the area of lipid droplets in hepatocytes of patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol. Res.* **49**, 860–871 (2019).
57. Zhang, F. *et al.* Branched Chain Amino Acids Cause Liver Injury in Obese/Diabetic Mice by Promoting Adipocyte Lipolysis and Inhibiting Hepatic Autophagy. *EBioMedicine* **13**, 157–167 (2016).
58. Hoyles, L. *et al.* Molecular Phenomics and Metagenomics of Hepatic Steatosis in Non-Diabetic Obese Women. *Nat. Med.* **24**, 1070–1080 (2018).
59. Lake, A. D. *et al.* Branched chain amino acid metabolism profiles in progressive human nonalcoholic fatty liver disease. *Amino Acids* **47**, 603–615 (2015).
60. Sunny, N. E. *et al.* Cross-talk between branched-chain amino acids and hepatic mitochondria is compromised in nonalcoholic fatty liver disease. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **309**, E311–E319 (2015).
61. Jung, C. H., Ro, S.-H., Cao, J., Otto, N. M. & Kim, D.-H. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett.* **584**, 1287–1295 (2010).
62. Ducker, G. S. & Rabinowitz, J. D. One-Carbon Metabolism in Health and Disease. *Cell Metab.* **25**, 27–42 (2017).
63. Kumar, A. *et al.* The metabolism and significance of homocysteine in nutrition and health. *Nutr. Metab.* **14**, (2017).
64. Pichardo, D. *et al.* Effect of Nitrous Oxide Exposure during Surgery on the Homocysteine Concentrations of Children. *Anesthesiol. J. Am. Soc. Anesthesiol.* **117**, 15–21

(2012).

65. Tessari, P. *et al.* Effects of Insulin on Methionine and Homocysteine Kinetics in Type 2 Diabetes With Nephropathy. *Diabetes* **54**, 2968–2976 (2005).

66. Huang, T., Ren, J., Huang, J. & Li, D. Association of homocysteine with type 2 diabetes: a meta-analysis implementing Mendelian randomization approach. *BMC Genomics* **14**, 867 (2013).

67. Froese, D. S., Fowler, B. & Baumgartner, M. R. Vitamin B12, folate, and the methionine remethylation cycle—biochemistry, pathways, and regulation. *J. Inherit. Metab. Dis.* **42**, 673–685 (2019).

68. Eslam, M., Valenti, L. & Romeo, S. Genetics and epigenetics of NAFLD and NASH: Clinical impact. *J. Hepatol.* **68**, 268–279 (2018).

69. Alam, F., Islam, M. A., Gan, S. H., Mohamed, M. & Sasongko, T. H. DNA Methylation: An Epigenetic Insight into Type 2 Diabetes Mellitus. *Curr. Pharm. Des.* **22**, 4398–4419 (2016).

70. Chen, S. *et al.* Serum amino acid profiles and risk of type 2 diabetes among Japanese adults in the Hitachi Health Study. *Sci. Rep.* **9**, (2019).

71. Holm, L. J. *et al.* L-serine supplementation lowers diabetes incidence and improves blood glucose homeostasis in NOD mice. *PLoS ONE* **13**, (2018).

72. Gulsen, M. *et al.* Elevated plasma homocysteine concentrations as a predictor of steatohepatitis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **20**, 1448–1455 (2005).

73. Pastore, A. *et al.* Plasma Levels of Homocysteine and Cysteine Increased in Pediatric

NAFLD and Strongly Correlated with Severity of Liver Damage. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 21202–21214 (2014).

74. Dai, H. *et al.* Association between homocysteine and non-alcoholic fatty liver disease in Chinese adults: a cross-sectional study. *Nutr. J.* **15**, (2016).

75. Polyzos, S. A. *et al.* Serum homocysteine levels in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Ann. Hepatol.* **11**, 68–76 (2012).

76. Xu, Y., Guan, Y., Yang, X., Xia, Z. & Wu, J. Association of Serum Homocysteine Levels with Histological Severity of NAFLD. *J. Gastrointestin. Liver Dis.* **29**, 51–58 (2020).

77. Mahamid, M. *et al.* Folate and B12 Levels Correlate with Histological Severity in NASH Patients. *Nutrients* **10**, (2018).

78. Yamakado, M. *et al.* Plasma amino acid profile associated with fatty liver disease and co-occurrence of metabolic risk factors. *Sci. Rep.* **7**, 14485 (2017).

79. Stephenson, K. *et al.* Updates on Dietary Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Current Studies and Insights. *Gene Expr.* **18**, 5–17 (2018).

80. Rinella, M. E. *et al.* Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet. *J. Lipid Res.* **49**, 1068–1076 (2008).

81. Pogribny, I. P. *et al.* Hepatic epigenetic phenotype predetermines individual susceptibility to hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methyl-deficient diet. *J. Hepatol.* **51**, 176–186 (2009).

82. Lu, S. C. *et al.* Methionine adenosyltransferase 1A knockout mice are predisposed to liver injury and exhibit increased expression of genes involved in proliferation. *Proc. Natl.*

Acad. Sci. U. S. A. **98**, 5560–5565 (2001).

83. Alonso, C. *et al.* Metabolomic Identification of Subtypes of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* **152**, 1449-1461.e7 (2017).

84. Mardinoglu, A. *et al.* An Integrated Understanding of the Rapid Metabolic Benefits of a Carbohydrate-Restricted Diet on Hepatic Steatosis in Humans. *Cell Metab.* **27**, 559-571.e5 (2018).

85. Pacana, T. *et al.* Dysregulated Hepatic Methionine Metabolism Drives Homocysteine Elevation in Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *PLoS ONE* **10**, (2015).

86. Fernández-Ramos, D. *et al.* MiR-873-5p acts as an epigenetic regulator in early stages of liver fibrosis and cirrhosis. *Cell Death Dis.* **9**, (2018).

87. Fernández-Tussy, P. *et al.* miR-873-5p targets mitochondrial GNMT-Complex II interface contributing to non-alcoholic fatty liver disease. *Mol. Metab.* **29**, 40–54 (2019).

88. Ballatori, N., Krance, S. M., Marchan, R. & Hammond, C. L. Plasma membrane glutathione transporters and their roles in cell physiology and pathophysiology. *Mol. Aspects Med.* **30**, 13–28 (2009).

89. Lu, S. C. Glutathione synthesis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1830**, 3143–3153 (2013).

90. Lutchmarsingh, F. K. *et al.* Glutathione metabolism in type 2 diabetes and its relationship with microvascular complications and glycemia. *PLoS ONE* **13**, (2018).

91. Yan, L. Redox imbalance stress in diabetes mellitus: Role of the polyol pathway. *Anim. Models Exp. Med.* **1**, 7–13 (2018).

92. Nguyen, D., Samson, S. L., Reddy, V. T., Gonzalez, E. V. & Sekhar, R. V. Impaired mitochondrial fatty acid oxidation and insulin resistance in aging: novel protective role of glutathione. *Aging Cell* **12**, 415–425 (2013).
93. Besse-Patin, A. & Estall, J. L. An Intimate Relationship between ROS and Insulin Signalling: Implications for Antioxidant Treatment of Fatty Liver Disease. *Int. J. Cell Biol.* **2014**, (2014).
94. Ito, F., Sono, Y. & Ito, T. Measurement and Clinical Significance of Lipid Peroxidation as a Biomarker of Oxidative Stress: Oxidative Stress in Diabetes, Atherosclerosis, and Chronic Inflammation. *Antioxidants* **8**, (2019).
95. Dou, X. *et al.* Glutathione disulfide sensitizes hepatocytes to TNF α -mediated cytotoxicity via IKK- β S -glutathionylation: a potential mechanism underlying non-alcoholic fatty liver disease. *Exp. Mol. Med.* **50**, 1–16 (2018).
96. Oz, H. S., Im, H.-J., Chen, T. S., de Villiers, W. J. S. & McClain, C. J. Glutathione-enhancing agents protect against steatohepatitis in a dietary model. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **20**, 39–47 (2006).
97. Simon, J. *et al.* Targeting Hepatic Glutaminase 1 Ameliorates Non-alcoholic Steatohepatitis by Restoring Very-Low-Density Lipoprotein Triglyceride Assembly. *Cell Metab.* **31**, 605-622.e10 (2020).
98. Ramani, K., Tomasi, M. L., Yang, H., Ko, K. & Lu, S. C. Mechanism and Significance of Changes in Glutamate-Cysteine Ligase Expression during Hepatic Fibrogenesis. *J. Biol. Chem.* **287**, 36341–36355 (2012).

99. Irie, M. *et al.* Reduced Glutathione suppresses Oxidative Stress in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Euroasian J. Hepato-Gastroenterol.* **6**, 13–18 (2016).
100. Mardinoglu, A. *et al.* Genome-scale metabolic modelling of hepatocytes reveals serine deficiency in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nat. Commun.* **5**, 1–11 (2014).
101. Mardinoglu, A. *et al.* Personal model-assisted identification of NAD⁺ and glutathione metabolism as intervention target in NAFLD. *Mol. Syst. Biol.* **13**, 916 (2017).
102. Bellanti, F., Villani, R., Facciorusso, A., Vendemiale, G. & Serviddio, G. Lipid oxidation products in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Free Radic. Biol. Med.* **111**, 173–185 (2017).
103. Rodney, S. & Boneh, A. Amino Acid Profiles in Patients with Urea Cycle Disorders at Admission to Hospital due to Metabolic Decompensation. in *JIMD Reports – Case and Research Reports, 2012/6* (eds. Zschocke, J., Gibson, K. M., Brown, G., Morava, E. & Peters, V.) 97–104 (Springer, 2013). doi:10.1007/8904_2012_186.
104. Rath, M., Müller, I., Kropf, P., Closs, E. I. & Munder, M. Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Front. Immunol.* **5**, (2014).
105. De Chiara, F. *et al.* Urea cycle dysregulation in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* **69**, 905–915 (2018).
106. Allerton, T. D. *et al.* L-Citrulline Supplementation: Impact on Cardiometabolic Health. *Nutrients* **10**, 921 (2018).
107. Timmerman, K. L. *et al.* Pharmacological Vasodilation Improves Insulin-Stimulated

Muscle Protein Anabolism but Not Glucose Utilization in Older Adults. *Diabetes* **59**, 2764–2771 (2010).

108. Barrett, E. J. *et al.* The vascular actions of insulin control its delivery to muscle and regulate the rate-limiting step in skeletal muscle insulin action. *Diabetologia* **52**, 752 (2009).

109. Joffin, N. *et al.* Citrulline reduces glyceroneogenesis and induces fatty acid release in visceral adipose tissue from overweight rats. *Mol. Nutr. Food Res.* **58**, 2320–2330 (2014).

110. Moinard, C. *et al.* Citrulline Supplementation Induces Changes in Body Composition and Limits Age-Related Metabolic Changes in Healthy Male Rats. *J. Nutr.* **145**, 1429–1437 (2015).

111. Jegatheesan, P. & De Bandt, J.-P. Hepatic steatosis: a role for citrulline. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **19**, 360–365 (2016).

112. Jegatheesan, P. *et al.* Citrulline and Nonessential Amino Acids Prevent Fructose-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Rats. *J. Nutr.* **145**, 2273–2279 (2015).

113. Joffin, N. *et al.* Acute induction of uncoupling protein 1 by citrulline in cultured explants of white adipose tissue from lean and high-fat-diet-fed rats. *Adipocyte* **4**, 129–134 (2015).

114. Akashi, K., Miyake, C. & Yokota, A. Citrulline, a novel compatible solute in drought-tolerant wild watermelon leaves, is an efficient hydroxyl radical scavenger. *FEBS Lett.* **508**, 438–442 (2001).

115. De Chiara, F. D. *et al.* Ammonia Scavenging Prevents Progression of Fibrosis in Experimental Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology* **71**, 874–892 (2020).

116. Eriksen, P. L. *et al.* Non-alcoholic fatty liver disease alters expression of genes governing

hepatic nitrogen conversion. *Liver Int.* **39**, 2094–2101 (2019).

117. Martínez-Reyes, I. & Chandel, N. S. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nat. Commun.* **11**, 102 (2020).

118. Owen, O. E., Kalhan, S. C. & Hanson, R. W. The Key Role of Anaplerosis and Cataplerosis for Citric Acid Cycle Function. *J. Biol. Chem.* **277**, 30409–30412 (2002).

119. Cardaci, S. & Ciriolo, M. R. TCA Cycle Defects and Cancer: When Metabolism Tunes Redox State. *Int. J. Cell Biol.* (2012) doi:<https://doi.org/10.1155/2012/161837>.

120. Liu, Z. *et al.* Role of ROS and Nutritional Antioxidants in Human Diseases. *Front. Physiol.* **9**, (2018).

121. Petersen, K. F., Dufour, S., Befroy, D., Garcia, R. & Shulman, G. I. Impaired Mitochondrial Activity in the Insulin-Resistant Offspring of Patients with Type 2 Diabetes. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa031314> **350**, 664–671 (2004).

122. Schrauwen, P. & Hesselink, M. K. C. Reduced tricarboxylic acid cycle flux in type 2 diabetes mellitus? *Diabetologia* **51**, 1694 (2008).

123. Morrow, R. M. *et al.* Mitochondrial energy deficiency leads to hyperproliferation of skeletal muscle mitochondria and enhanced insulin sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 2705–2710 (2017).

124. Houstis, N., Rosen, E. D. & Lander, E. S. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* **440**, 944–948 (2006).

125. Kalhan, S. C. *et al.* Plasma Metabolomic Profile in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Metabolism.* **60**, 404–413 (2011).

126. Sookoian, S. & Pirola, C. J. The nonalcoholic steatohepatitis metabotype: Imbalance of circulating amino acids and transamination reactions reflect impaired mitochondrial function. *Hepatology* **67**, 1177–1178 (2018).
127. Sookoian, S. *et al.* Serum aminotransferases in nonalcoholic fatty liver disease are a signature of liver metabolic perturbations at the amino acid and Krebs cycle level. *Am. J. Clin. Nutr.* **103**, 422–434 (2016).
128. Sunny, N. E., Bril, F. & Cusi, K. Mitochondrial Adaptation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Novel Mechanisms and Treatment Strategies. *Trends Endocrinol. Metab.* **28**, 250–260 (2017).
129. Sunny, N. E., Parks, E. J., Browning, J. D. & Burgess, S. C. Excessive Hepatic Mitochondrial TCA Cycle and Gluconeogenesis in Humans with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Cell Metab.* **14**, 804–810 (2011).
130. Yang, L. *et al.* Serine Catabolism Feeds NADH when Respiration Is Impaired. *Cell Metab.* **0**, (2020).
131. Filee, R., Schoos, R. & Boemer, F. Evaluation of Physiological Amino Acids Profiling by Tandem Mass Spectrometry. *JIMD Rep.* **13**, 119–128 (2013).
132. Lawton, K. A. *et al.* Analysis of the adult human plasma metabolome. *Pharmacogenomics* **9**, 383–397 (2008).
133. Kochhar, S. *et al.* Probing gender-specific metabolism differences in humans by nuclear magnetic resonance-based metabolomics. *Anal. Biochem.* **352**, 274–281 (2006).
134. Massafra, V. *et al.* Farnesoid X Receptor Activation Promotes Hepatic Amino Acid

Catabolism and Ammonium Clearance in Mice. *Gastroenterology* **152**, 1462-1476.e10 (2017).

135. Zou, T.-T. *et al.* Lifestyle interventions for patients with nonalcoholic fatty liver disease: a network meta-analysis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **30**, 747–755 (2018).

136. Luukkonen, P. K. *et al.* Effect of a ketogenic diet on hepatic steatosis and hepatic mitochondrial metabolism in nonalcoholic fatty liver disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **117**, 7347–7354 (2020).

137. Watanabe, M. *et al.* Beneficial effects of the ketogenic diet on nonalcoholic fatty liver disease: A comprehensive review of the literature. *Obes. Rev.* **21**, e13024 (2020).

138. Nakao, R., Abe, T., Yamamoto, S. & Oishi, K. Ketogenic diet induces skeletal muscle atrophy via reducing muscle protein synthesis and possibly activating proteolysis in mice. *Sci. Rep.* **9**, (2019).

139. Lee, D.-Y. & Kim, E.-H. Therapeutic Effects of Amino Acids in Liver Diseases: Current Studies and Future Perspectives. *J. Cancer Prev.* **24**, 72–78 (2019).

Table 1. Non exhaustive Amino Acids list and their characteristics. Essential AA cannot be synthesized *de novo* by the human organism. Proteinogenic AA are incorporated biosynthetically into proteins. Glucogenic AA are transformed to pyruvate or TCA cycle intermediates, and thus can supply gluconeogenesis pathway. Ketogenic AA are converted to acetyl CoA or acetoacetyl CoA and contribute to synthesis of fatty acids or ketone bodies.

Amino Acids	Essential	Proteinogenic	Glucogenic	Ketogenic
alanine		•	•	
arginine		•	•	
arginosuccinate				
asparagine		•	•	
aspartic acid		•	•	
citrulline				
cysteine		•	•	
glutamic acid		•	•	
glutamine		•	•	
glycine		•	•	
histidine	•	•	•	
homocysteine				
hydroxyproline		•		
isoleucine	•	•	•	•
leucine	•	•		•
lysine	•	•		•
methionine	•	•	•	
ornithine				
phenylalanine	•	•	•	•
proline		•	•	

S-adenosylhomocysteine				
S-adenosylmethionine				
sarcosine				
serine		•	•	
taurine				
threonine	•	•	•	•
tryptophan	•	•	•	•
tyrosine		•	•	•
valine	•	•	•	

Table 2. Amino acids alteration according to NAFLD status and consideration of confounders.

Abbreviations: AA: Amino Acids; BMI: body mass index; FL: Fatty liver; KF: Kidney Failure; IR: insulin-resistance; MRI: magnetic resonance imaging; ND: Not Determined; Ob: Obese; PAA: phenyl acetic acid; Vit: Vitamin B6, B9, B12

↑: increase; ↓: decrease ⇕: significant changes but undefined sense of variation

Ref	Matrix for AA analysis	NAFLD status determination	N	Confounding factors considered	Main results
[51]	Plasma	Liver biopsy	Control: 15 Steatosis: 15	IR: Yes BMI: Yes Sex: No	⇕ Leu, Ile, Val Others: ⇕C3, C5
[52]	Plasma	Liver biopsy	Control: 20 Non-Ob NAFLD: 29 Ob NAFLD: 15	IR: No BMI: Yes Sex: No	NAFLD vs Control: ↑Leu, Ile, Val, Glu ↓Ser, Gly
[53]	Serum	Ultrasound + transaminases	Control: 69 Ob No NAFLD: 50 Ob NAFLD: 62	IR: No BMI: No Sex: No	NAFLD vs Control: ↑Leu, Ile, Val, Glu ↓Gly Others: ↑C5
[54]	Plasma	MRI	Control: 48 FL: 30	IR: No BMI: Yes Sex: No	↑Leu, Ile, Val, Glu Others: ↑C4, C5
[55]	Plasma	Liver biopsy	Control: 23 NAFL: 30 NASH: 30 NASH with fibrosis: 29	IR: Yes BMI: Yes Sex: Yes (separated)	NAFLD progression: ↑Leu, Ile, Val in ♀ ↓Leu, Ile, Val in ♂
[58]	Plasma	Liver biopsy	Control: 10 Low Steatosis: 22 Moderate Steatosis: 14 Severe Steatosis: 10	IR: No BMI: Yes Sex: Yes (only women)	Steatosis progression: ↑Leu, Ile, Val in ♀ Others: ↑PAA in ♀
[59]	Liver	Liver biopsy	Control: 17 NAFL: 4	IR: ND BMI: ND	NAFLD progression: ↑Leu, Ile, Val

			NASH (no FL):14 NASH (FL): 23	Sex: ND	Others: ↑C3 Hepatic mRNA levels: ↑BCAT ↓ BCKDH, mTor
[72]	Plasma	Liver biopsy	Control: 30 NAFLD: 71	Vit: No KF: Yes	↑Hcys
[73]	Plasma	Liver biopsy	Control: 63 NAFLD: 63	Vit: ND KF: ND	↑Hcys Others: ↓GSH
[75]	Plasma	Liver biopsy	NAFL: 25 NASH: 29	Vit: Yes KF: ND	↓Hcys
[76]	Plasma	Liver biopsy	No NASH: 173 NASH: 116	Vit: ND KF: ND	↓Hcys
[83]	Plasma	Liver biopsy	NAFL: 353 NASH: 182	IR: No BMI: No Sex: Yes	↑Glu, Gln, Tau, Asp ↓Met
[125]	Plasma	Liver biopsy	Control: 25 NAFL: 11 NASH: 24	IR: No BMI: No Sex: No	NAFL vs Control: ↑Glu, Lys, Tyr, Ile NASH vs Control: ↑Leu, Ile, Val, Tyr, Glu, Asp, Phe NAFL vs Control: ↑Glu, Lys, Tyr, Ile
[127]	Plasma	Liver biopsy	Control: 16 NAFL: 16 NASH: 16	IR: No BMI: No Sex: Yes	Correlation with ALT: > 0 with Met, Ala, Lys, Glu, Arg, Tyr < 0 with Tau

Figure 1. Branched Chain Amino Acids catabolism.

BCAT : branched chain amino transferase 1/2 ; **BCKDH** : Branched-Chain α -Ketoacid DeHydrogenase; **BCKDK** : Branched Chain Keto Acid Dehydrogenase Kinase; **PPM1K** : Protein Phosphatase Mg^{2+}/Mn^{2+} Dependent 1K. The dotted arrows correspond to **several steps** metabolic transformations. The underlined metabolites are intermediates of the **TCA cycle**.

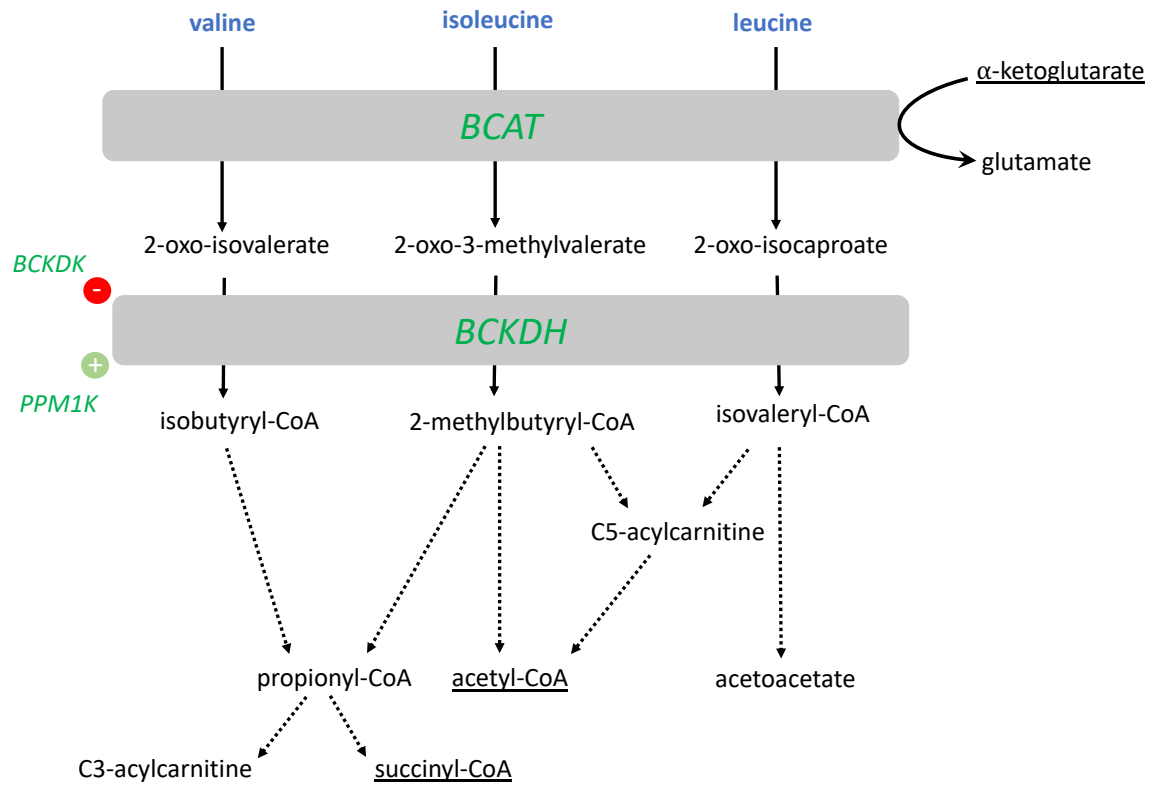


Figure 2. One carbon metabolism, including the transmethylation pathway (or methionine cycle), folate-independent remethylation pathway (betaine), folate-dependent remethylation pathway, transsulfuration (or homocysteine recycling) pathway and glutathione synthesis pathway.

Amino acids (in blue).

Metabolites (in black): SAMe : S-Adenosyl Méthionine ; SAH : S-Adénosyl Homocysteine, THF : Tétrahydrofolate.; vit B6 : vitamin B6 ; vit B12 : vitamin B12

Enzymes (in green) : MAT1A : Methionine adenosyltransferase; AHCY : S-adenosylhomocysteine hydrolase; BHMT : Betaine-homocysteine methyltransferase; CHDH : Choline oxidase ; SARDH, Sarcosine dehydrogenase or PIPOX : Pipecolic acid oxidase; GNMT, Glycine methyltransferase; MS : Methionine synthase; SHMT : Serine hydroxymethyltransferase; MTHFR, 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase; CBS : Cystathionine β -synthase; CTH : Cystathionase ; GCL, Glutamate-cysteine ligase; GS : Glutathione synthetase.

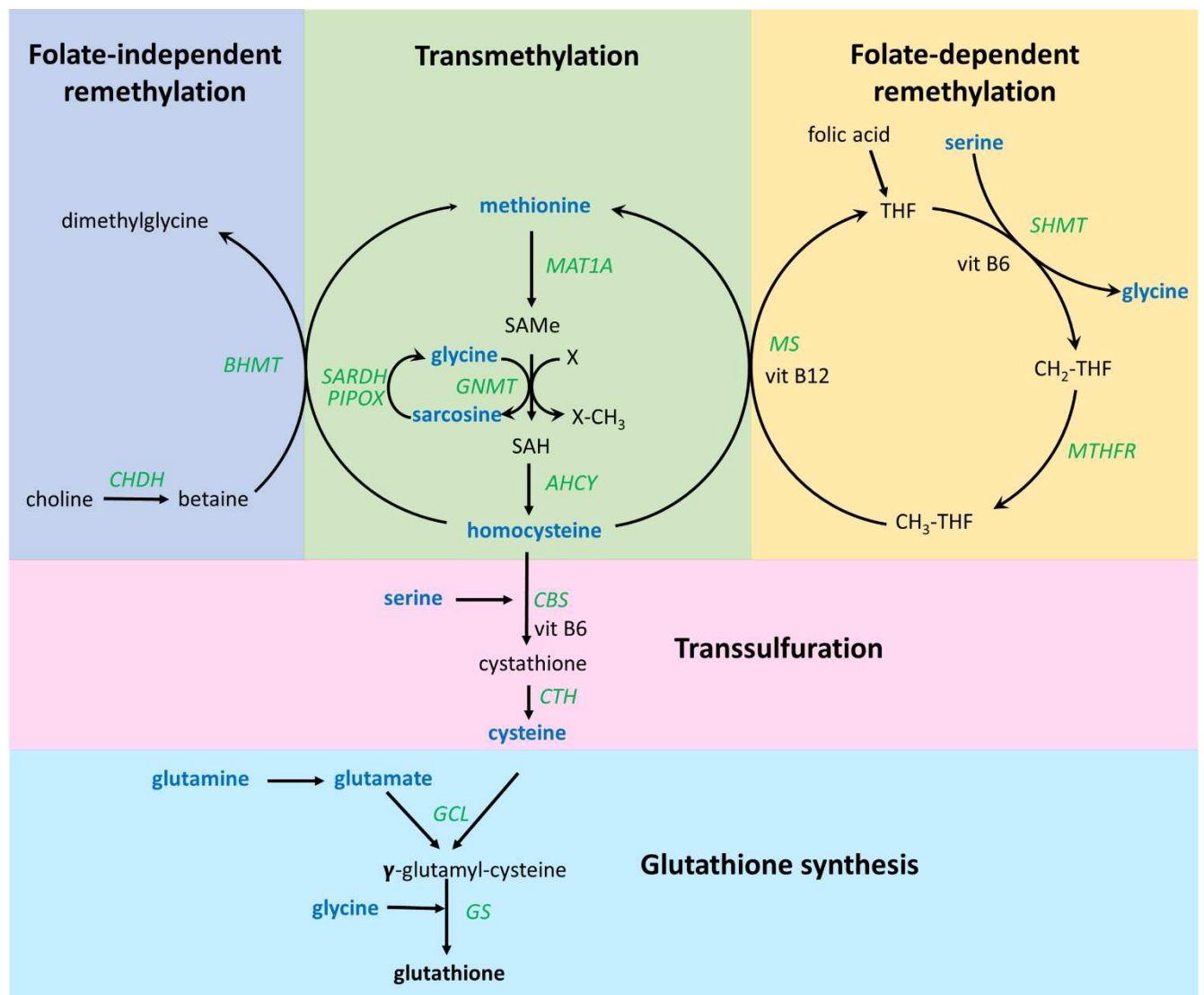


Figure 3. Urea cycle.

Amino acids (in blue).

Enzymes (in green): **NAGS** : N-Acetylglutamate synthase; **CPS1**: Carbamoyl phosphate synthetase I
OTC: Ornithine transcarbamylase; **ASS**: Argininosuccinate synthase; **ASL**: Argininosuccinate lyase;
ARG: Arginase.

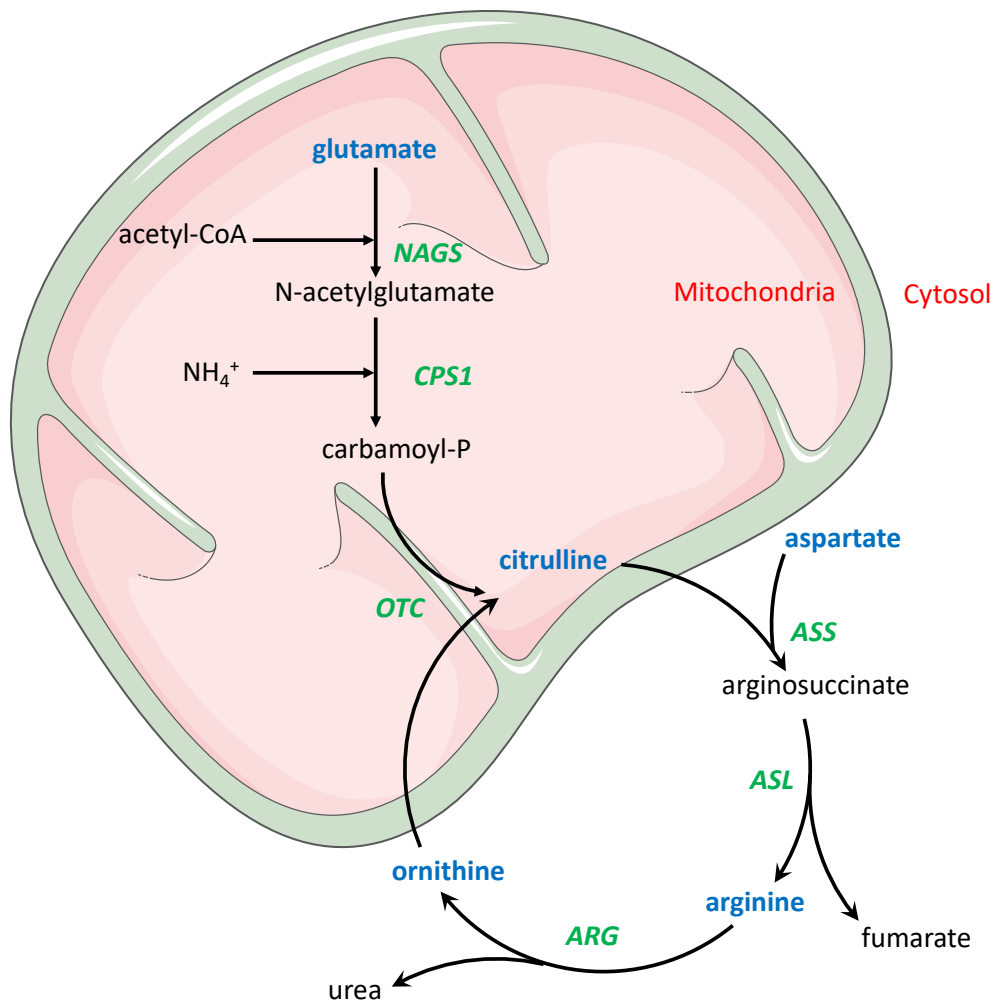
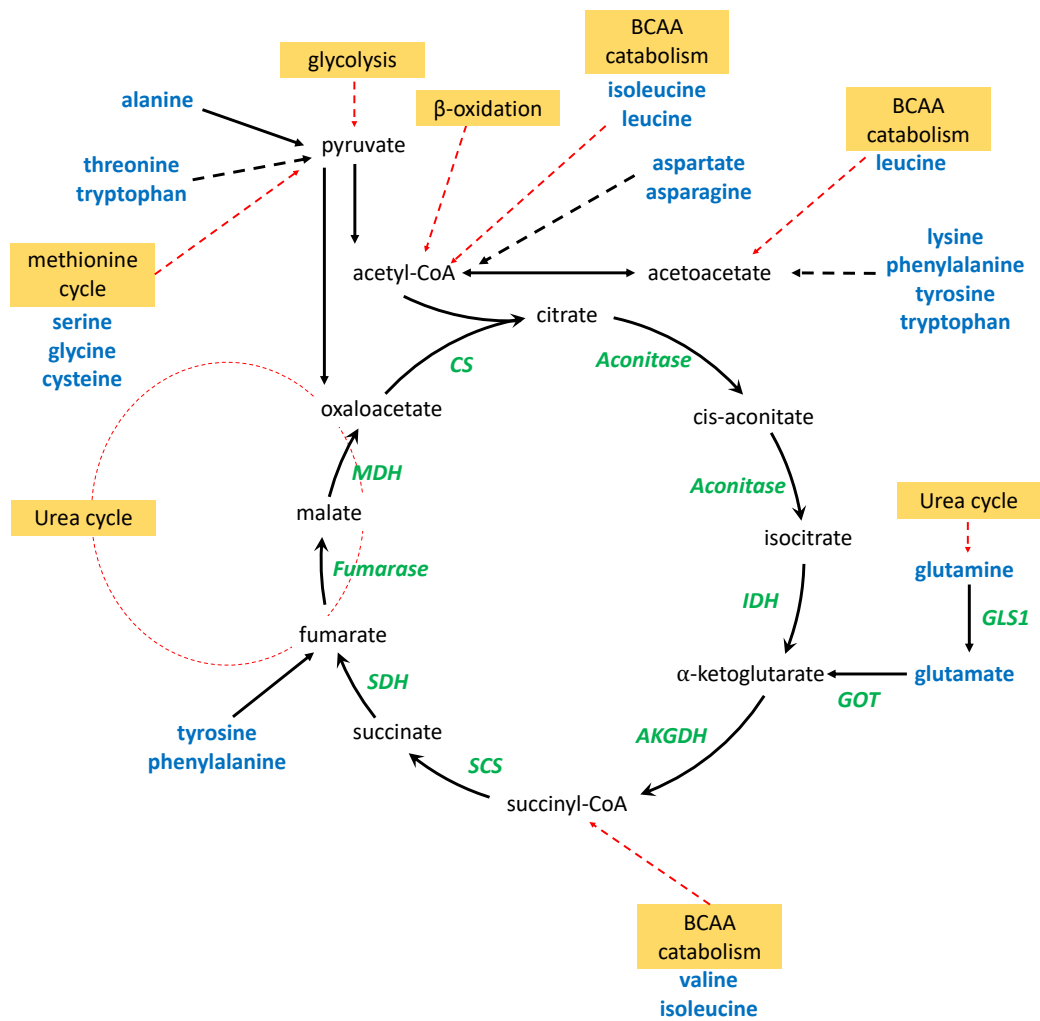


Figure 4. Tricarboxylic acid (TCA) cycle, also known as the Krebs or citric acid cycle.

Amino acids (in blue). Associated metabolic pathways (in yellow square) and their connexion to TCA cycle (red dotted arrows).

Enzymes (in green) : CS : citrate synthetase, IDH : Isocitrate deshydrogenase; AKGDH : alpha-ketoglutarate deshydrogenase; SCS : succinyl-CoA synthétase; SDH : succinate deshydrogenase; MDH, malate deshydrogenase, GLS1 : glutaminase, GOT : glutamic-oxaloacetic transaminase



Notre revue de la littérature nous a permis d'identifier 5 voies métaboliques pouvant avoir un intérêt dans l'étude de la physiopathologie de la NAFLD : le catabolisme des acides aminés ramifiés, le cycle de la méthionine, le cycle de Krebs, la synthèse du glutathion et le cycle de l'urée. Notre revue montre cependant que dans les études de cohorte, certains résultats sont discordants concernant les variations d'acides aminés ramifiés en cas de NAFLD. Ces discordances peuvent être liées à des facteurs confondants de la NAFLD que sont l'obésité, l'insulino-résistance et le sexe. Nous souhaitons donc utiliser l'approche de métabolomique ciblée sur cohorte humaine bien caractérisée sur le plan clinico-biologique. Notre premier objectif est d'étudier les variations d'acides aminés ramifiés plasmatiques chez des patients NAFLD afin de caractériser l'association entre ces AA et la NAFLD. Notre second objectif sera d'utiliser une approche de métabolomique semi-ciblée afin d'étudier le profil global des acides aminés sur la même cohorte de patient dans le but d'identifier de nouvelles voies physiopathologiques qui seront ensuite explorées dans des modèles murins.

2. Acides aminés ramifiés et NAFLD

Notre premier objectif est de mettre en évidence un **profil particulier d'acides aminés plasmatiques** pour discriminer les patients en fonction des atteintes histologiques dans les NAFLD. La cohorte Resolve a été utilisée et des modifications dans plusieurs familles d'acides aminés ont été mises en évidence.

Le profil plasmatique des **acides aminés ramifiés** (BCAA) a été préalablement étudié en fonction des grades histologiques de NAFLD. La littérature rapporte une augmentation des BCAA plasmatiques en cas de NAFLD (162). Des **augmentations des BCAA** sont également rapportées en cas de diabète (89) et d'obésité (163) qui, étant également très liés à la NAFLD, peuvent être des facteurs confondants dans les études d'association. Notre étude montre une corrélation positive modeste entre la concentration plasmatique de BCAA et la gravité de la NAFLD, ainsi qu'une forte liaison entre les taux plasmatiques de BCAA et le **sexe**. L'analyse des sous-groupes selon le sexe a révélé que même si les concentrations plasmatiques de BCAA augmentaient avec la gravité de la NAFLD chez les femmes, elles avaient tendance à diminuer chez les hommes. De plus, seules les femmes présentaient une augmentation significative des BCAA plasmatiques en cas d'augmentation de la fibrose. Les concentrations plasmatiques de BCAA sont associées au sexe et à la gravité croissante de la NAFLD, **indépendamment de l'obésité, de l'insulinorésistance (IR)** et de l'âge. De plus, chez les femmes, mais pas chez les hommes, les BCAA plasmatiques sont associés à la fibrose. Ces résultats soulignent l'importance d'une prise en compte attentive du sexe en tant que facteur de confusion majeur dans les études transversales pour la NAFLD et les maladies cardiométaboliques. **Ces résultats ont été publiés dans le manuscrit 4 présenté ci-après (164).**

Manuscrit 4 :

Plasma BCAA Changes in Patients With NAFLD Are Sex Dependent

Publié en Avril 2020 dans *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*

Plasma BCAA Changes in Patients With NAFLD Are Sex Dependent

Guillaume Grzych,^{1,2} Luisa Vonghia,^{3,4} Marie-Adélaïde Bout,² Jonas Weyler,^{3,4} An Verrijken,^{4,5} Eveline Dirinck,^{4,5} Marie Joncquel Chevalier Curt,² Luc Van Gaal,^{4,5} Réjane Paumelle,¹ Sven Francque,^{3,4,*} Anne Tailleux,^{1,*} Joel T. Haas,^{1,*} and Bart Staels^{1,2,*}

¹University of Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1011-EGID, F-59000 Lille, France; ²CHU Lille, Service d'Endocrinologie, Métabolisme, Nutrition, Oncologie, F-59000 Lille, France; ³Department of Gastroenterology and Hepatology, Antwerp University Hospital, 2650 Edegem/Antwerp, Belgium; ⁴Laboratory of Experimental Medicine and Pediatrics, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Antwerp, 2610 Wilrijk/Antwerp, Belgium; and ⁵Department of Endocrinology, Diabetology and Metabolism, Antwerp University Hospital, 2650 Edegem/Antwerp, Belgium

ORCID numbers: 0000-0003-2813-0109 (G. Grzych); 0000-0002-4489-0717 (R. Paumelle); 0000-0002-7527-4714 (S. Francque); 0000-0003-1430-2627 (R. Paumelle); 0000-0002-0028-5988 (J. T. Haas); 0000-0002-3784-1503 B. Staels).

Context: Plasma branched chain amino acid (BCAA) concentrations correlate positively with body mass index (BMI), measures of insulin resistance (IR), and severity of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Moreover, plasma BCAA concentrations also differ between the sexes, which display different susceptibilities to cardio-metabolic diseases.

Objective: Assess whether plasma BCAA concentrations associate with NAFLD severity independently of BMI, IR, and sex.

Patients: Patients visiting the obesity clinic of the Antwerp University Hospital were consecutively recruited from 2006 to 2014.

Design and Setting: A cross-sectional study cohort of 112 obese patients (59 women and 53 men) was divided into 4 groups according to NAFLD severity. Groups were matched for sex, age, BMI, homeostatic model assessment of IR, and hemoglobin A1c.

Main Outcome Measures: Fasting plasma BCAA concentrations were measured by tandem mass spectrometry using the aTRAQ™ method.

Results: In the study cohort, a modest positive correlation was observed between plasma BCAA concentrations and NAFLD severity, as well as a strong effect of sex on plasma BCAA levels. Subgroup analysis by sex revealed that while plasma BCAA concentrations increased with severity of NAFLD in women, they tended to decrease in men. Additionally, only women displayed significantly increased plasma BCAAs with increasing fibrosis.

Conclusion: Plasma BCAA concentrations display sex-dimorphic changes with increasing severity of NAFLD, independently of BMI, IR, and age. Additionally, plasma BCAA are associated with significant fibrosis in women, but not in men. These results highlight the importance of a careful consideration of sex as a major confounding factor in cross-sectional studies of NAFLD. (*J Clin Endocrinol Metab* 105: 1–11, 2020)

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197
Printed in USA

© Endocrine Society 2020. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

Received 12 December 2019. Accepted 8 April 2020.

First Published Online 9 April 2020.

Corrected and Typeset 25 May 2020.

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a major global public health problem. NAFLD covers a spectrum of conditions from simple hepatic triglyceride accumulation, termed nonalcoholic fatty liver (NAFL), to more

*These authors co-supervised the study.

severe nonalcoholic steatohepatitis (NASH), which combines NAFL with hepatic necroinflammation (1). Patients with NASH are at high risk for progressive liver fibrosis, hepatocellular carcinoma, and cardiovascular disease (2). Recent studies indicate that NAFLD progression and incidence are significantly influenced by sex, suggesting NAFLD may be a sexually dimorphic disease (3,4).

Development of noninvasive diagnostic markers for NAFLD remains a major challenge. Current guidelines for accurate NAFLD diagnosis require liver biopsy (5,6), which is invasive and susceptible to interobserver discrepancies (7,8). Noninvasive imaging, individual biochemical markers, and combined clinical and biochemical score-based methods are being developed but have not yet been accepted as a valid substitute for histological diagnosis. Thus, there is an urgent need to identify accurate markers of NAFLD stages, especially NASH and fibrosis, to simplify disease staging for diagnosis and monitoring treatment response. Moreover, as biological plausibility is an important feature of these noninvasive markers, their identification often yields insight into disease mechanisms.

The branched chain amino acids (BCAA) leucine, valine, and isoleucine are essential amino acids whose plasma concentrations are increased in metabolic diseases such as obesity and type 2 diabetes (9–11). Recently, plasma BCAA were also found to be increased in NAFLD patients compared to patients without NAFLD (12–14). Interestingly, a recent large-scale population study demonstrated that plasma BCAA and their degradation products were elevated in men compared to women (15). Given the known discrepancies between men and women in metabolic disease susceptibility and the interaction between obesity, insulin resistance (IR), and NAFLD (9,11,16–20), it is currently unclear whether changes in plasma BCAA are specifically related to NAFLD progression or rather to accompanying metabolic alterations.

Consequently, the aim of this study was to determine whether changes in plasma BCAA concentrations are specifically associated with severity of NAFLD in humans. We measured plasma BCAA concentrations in a well-characterized patient cohort with histologically assessed NAFLD. Our results show that plasma BCAA levels vary with increasing severity from NAFL to NASH in a sex-dependent manner, independently of alterations in glucose metabolism.

Methods

Description of the patients

Patients were consecutively recruited at the metabolic unit of the obesity clinic of the Antwerp University Hospital (a tertiary referral facility) from October 2006 to May 2014.

The study protocol, part of the HEPADIP protocol (Belgian registration number B30020071389), was approved by the Ethical Committee of the Antwerp University Hospital (file 6/25/125) and required written informed consent of the patient. Inclusion criteria were previously described (21). Briefly, patients underwent extensive metabolic characterization and systematic noninvasive screening for the presence of NAFLD (e.g., plasma alanine transaminase, aspartate transaminase, and gamma glutamyltransferase measurements and ultrasound features) and proposed for liver biopsy upon suspicion of NAFLD. Liver biopsy was performed percutaneously (16G Menghini), transjugularly (16G transjugular liver biopsy needle), or perioperatively (16G Trucut needle) for patients who subsequently underwent bariatric surgery. The herein described assessment, including liver biopsy, was performed before any treatment initiation or consideration.

Clinical assessment and biological assay

Fasting plasma glucose and insulin were measured as previously described (22). IR was estimated using both the homeostatic model assessment of IR (HOMA-IR) calculated by $(\text{insulin [mU/L]} \times \text{glucose [mmol/L]})/22.5$ and using the updated homeostasis model assessment (HOMA2) from Levy et al (23), which estimates insulin resistance (HOMA2-IR), steady state beta cell function (HOMA2-B), and insulin sensitivity (HOMA2-S), as percentages of a normal reference population.

Liver histology

Hematoxylin and eosin, Sirius red, reticulin, and Perls iron stains were routinely performed on all liver biopsies and analyzed in batch by 2 experienced pathologists blinded to clinical data. The histological features of NAFLD (steatosis, ballooning, lobular inflammation and fibrosis) were assessed using the NASH Clinical Research Network Scoring System (5). According to biopsy evaluation, patients were divided in 4 groups: healthy, NAFL, NASH, and NASH with significant fibrosis. The healthy group was defined as steatosis = 0, ballooning = 0, lobular inflammation = 0, and fibrosis = 0. The NAFL group included patients with steatosis > 0 and allowing some presence of either ballooning or lobular inflammation, but not meeting the criteria for NASH. NASH diagnosis required the combined presence of steatosis, ballooning, and lobular inflammation, according to current guidelines (24,25). Patients with NASH were subsequently divided according to fibrosis stage: NASH without significant fibrosis (fibrosis ≤ 1) and NASH with significant fibrosis (NASH-F; fibrosis ≥ 2).

Plasma amino acid measurements

Blood samples were collected in ethylenediamine tetraacetate-coated tubes after an overnight fast. Isolated plasma was aliquoted, immediately frozen, and stored at -80°C until analysis. Targeted metabolomics was performed to quantify plasma amino acids using the aTRAQ™ Kit (Sciex, Framingham, MA, US) as described previously (26). Briefly, plasma amino acids were amine-modified using the aTRAQ™ labeling reagent, which provides a specific mass tag for tandem mass spectrometry (MS). The tag is identified by MS/MS fragmentation of samples and standards while in multiple reaction monitoring mode. An internal

standard (IS) set of aTRAQ™ labeled amino acids was used for detection and quantification by high performance liquid chromatography (Shimadzu C18 column, Kyoto, Japan) associated with MS/MS (Sciex 3200 Qtrap, Framingham, MA, US). Quantification was performed dividing the peak area for each analyte by the peak area of the corresponding IS and multiplying by the IS concentration.

Rationale of study group composition

As outlined in the previous discussion, BCAA metabolism and concentrations are influenced by body mass index (BMI), diabetes, and sex. These factors are poorly accounted for when studying the relationship between BCAA concentrations and presence and severity of NAFLD. To unequivocally study the relation between plasma BCAA concentrations and NAFLD severity, the following approach was used. Patients were first classified into clearly distinct groups (NAFLD stages) based on their liver histological phenotype as follows: healthy liver, NAFL, NASH, and NASH-F (see histology section) or unclassified (i.e., patients not clearly falling into one of the previously defined categories). Patients were subsequently selected from the 4 well-defined NAFLD stages to compose groups of equal size that were further matched for the following parameters: BMI, fasting plasma glucose (FPG), HOMA-IR, hemoglobin A1c (HbA1c), and age. Finally, an equal number of men and women was included in each study group when possible.

Statistical analysis

Patient selection was performed using regression-based matching in R (*matchit* package R-project) considering clinical parameters as previously described. Values are expressed as mean \pm standard deviation (mean \pm SD) or median \pm interquartile range (IQR) as indicated in the figure legends. Statistical differences in clinical and biological parameters were assessed by Mann-Whitney or analysis of variance test for quantitative values and Chi-squared test for categorical values. The Spearman rank test was used to determine correlation between variables. All univariate correlations were then verified in a linear model adjusting for BMI, HOMA-IR, and sex. P-values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

Patient selection and matching

Among all consecutively recruited patients with available clinical information ($n = 408$) and fasting plasma samples, 4 study groups corresponding to different stages of NAFLD were established (study cohort) as described in the methods section. This process resulted in 4 clearly distinct liver phenotypical groups of about 30 patients, matched for BMI, FPG, HOMA-IR, HbA1c, and age. For the healthy liver group, a lower number of patients who met both the histological phenotype and all matching criteria was available ($n = 23$). As outlined in the methods section, an equal number of men and women was included in each study group when possible. The clinical, biological, and liver histological characteristics of the patients are shown in Table 1. Overall, 112 patients were divided over the 4 groups as follows: 23 healthy liver (15 women and 8 men), 30 with NAFL (15 women and 15 men), 30 with NASH (15 women and 15 men), and 29 with NASH-F (14 women and 15 men). As per the matching protocol, the 4 groups did not show significant differences in sex, age, BMI, FPG, HOMA-IR, and HbA1c (Table 1).

Plasma BCAA concentrations highly associate with sex but not with NAFLD stages

Plasma concentrations of the 3 BCAA in the study cohort were measured, and correlations between plasma BCAA concentrations and NAFLD stage were assessed. In agreement with previous studies (12–14), plasma leucine and, to a greater extent, plasma isoleucine correlated with NAFLD stage (Spearman coefficient: $\rho = 0.17$, $P = 0.06$ and $\rho = 0.25$, $P < 0.01$, respectively) (Fig. 1A, 1C). However, plasma valine concentrations did not significantly correlate with NAFLD stage (Fig. 1B).

Table 1. Clinical, biological and liver histological characteristics of patients according to NAFLD stage

NAFLD Stage	All Patients	Healthy	NAFL	NASH	NASH-F	P-value
n	112	23	30	30	29	
Sex (women/men)	59/53	15/8	15/15	15/15	14/15	0.61
Age (years)	42.6 \pm 12.5	40 \pm 12	43 \pm 11	43 \pm 13	43 \pm 13	0.75
BMI (kg/m ²)	40.5 \pm 6.5	38 \pm 4.9	42 \pm 6.5	39 \pm 4.5	41 \pm 5.7	0.11
Fasting plasma glucose (mg/dL)	86 \pm 10	85 \pm 9.9	86 \pm 13.6	87 \pm 11.9	89 \pm 8.8	0.23
HbA1c (%)	5.6 \pm 0.5	5.4 \pm 0.3	5.6 \pm 0.4	5.6 \pm 0.4	5.5 \pm 0.6	0.32
HOMA-IR	4.1 \pm 2.8	4.2 \pm 4.7	3.5 \pm 1.8	4.0 \pm 2.4	4.3 \pm 1.5	0.32
HOMA2-B (%)	181 \pm 69	177 \pm 65	186 \pm 80	185 \pm 73	174 \pm 58	0.82
HOMA2-S (%)	57 \pm 36	64 \pm 46	48 \pm 24	58 \pm 28	60 \pm 37	0.95
HOMA2-IR	2.3 \pm 1.4	1.9 \pm 0.9	2.8 \pm 2	2.3 \pm 1.2	2.1 \pm 0.8	0.64
Steatosis grade (0,1,2,3)	23/39/25/25	23/0/0/0	0/22/8/0	0/12/6/12	0/5/11/13	<0.0001
Ballooning (0,1,2)	43/46/23	23/0/0	20/7/3	0/18/12	0/21/8	<0.0001
Lobular inflammation (0,1,2,3)	41/44/21/6	23/0/0/0	18/10/2/0	0/20/8/2	0/14/11/4	<0.0001
Fibrosis stage (0,1,2,3,4)	69/12/23/8/0	23/0/0/0/0	2/6/2/2/0/0	20/10/0/0/0	0/0/21/8/0	<0.0001

Data are expressed as mean \pm standard deviation. P-values are obtained using the Chi-square test for qualitative data and the analysis of variance test for quantitative data. P-values < 0.05 are considered statistically significant (bold).

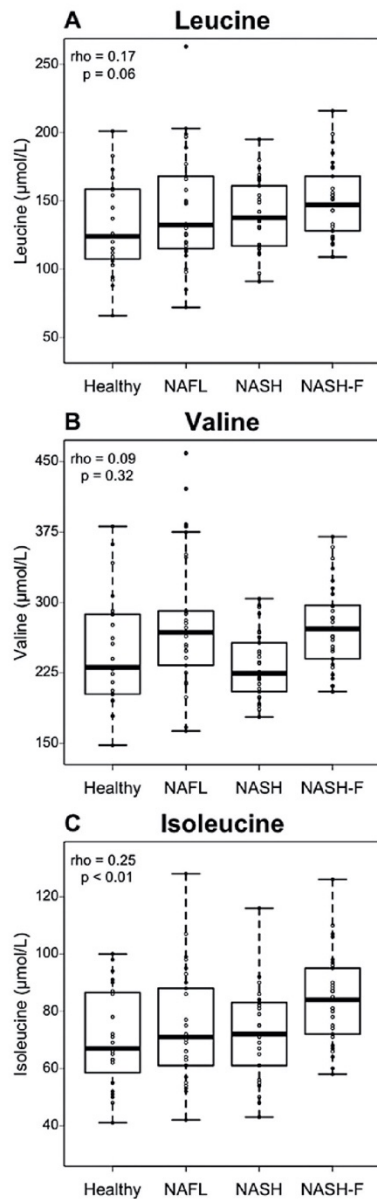


Figure 1. Plasma leucine and isoleucine but not valine are positively correlated to NAFLD stage. Plasma BCAA concentrations according to NAFLD stage in healthy ($n = 23$), NAFL ($n = 30$), NASH ($n = 30$), and NASH-F ($n = 29$) patients. Data are expressed as median \pm IQR. Rho coefficients and P -values are obtained using the Spearman rank test.

To assess which factor most contributed to plasma BCAA variation in the study cohort, we calculated the correlations between BCAA and several known

confounding factors (ie, age, BMI, HOMA-IR, and sex). Interestingly, sex showed the strongest association with plasma BCAA concentrations when compared to age, BMI, HOMA-IR, and NAFLD stage (Fig. 2). As expected based on the patient stratification strategy, no or minor correlations were observed between BCAA and age, BMI, and HOMA-IR. Moreover, we calculated the Spearman correlation coefficient between plasma BCAA and HOMA2 parameters (HOMA2-IR) and no significant correlations were observed (Fig. 2).

To confirm this specific correlation of plasma BCAA with sex, independently of BMI, age, and glucose homeostasis parameters, a linear model including age, BMI, HOMA-IR, NAFLD stage, and sex was developed. This model confirmed an independent association between the 3 BCAA plasma concentrations and sex ($P < 0.001$). We consequently analyzed the BCAA concentrations in the study cohort separating men and women, irrespective of NAFLD status. The plasma concentrations of the 3 BCAA were higher in men compared to women ($P < 0.001$) (Fig. 3A–C), indicating that sex is a major determinant of plasma BCAA concentrations.

Sex differentially influences the correlation of plasma BCAA with NAFLD severity

Due to the strong effect of sex on plasma BCAA concentrations, men and women were subsequently analyzed separately. Clinical, biological, and liver histological characteristics of the patients separated according to sex (53 men and 59 women) and NAFLD stage are

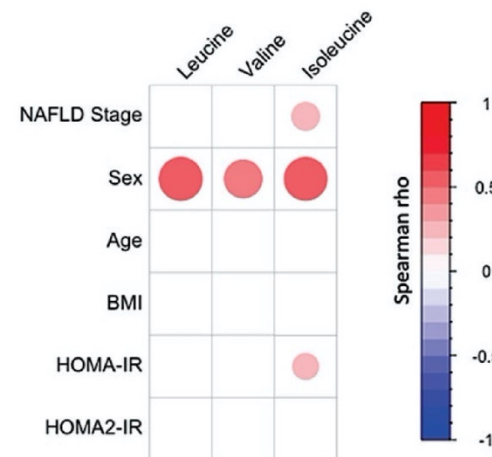


Figure 2. Plasma BCAA concentrations are strongly associated with sex. Spearman correlations between plasma BCAA concentrations and NAFLD stage, sex, age, BMI, and HOMA-IR and HOMA2-IR in the study cohort ($n = 112$). Colors and area of circles reflect the Spearman rho values (red for positive, blue for inverse correlations). Only correlations with significant P -value ($P < 0.05$) were represented.

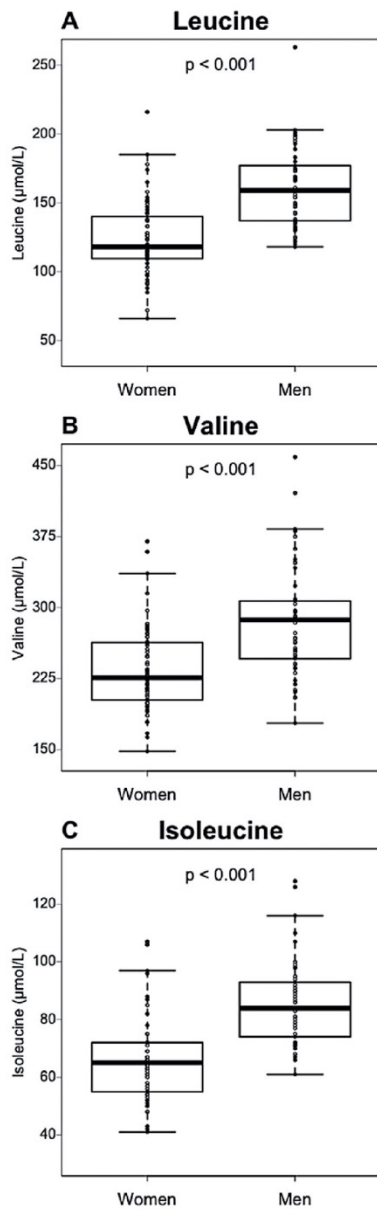


Figure 3. Plasma BCAA are affected by sex. BCAA concentrations in women ($n = 59$) and men ($n = 53$). Data are expressed as median \pm IQR. P-values are obtained using the Mann–Whitney test.

shown in Table 2. The NAFLD subgroups stratified by sex remained matched according to age, BMI, and glucose homeostasis parameters (Table 2), as was the case for the 4 initial groups (Table 1). Moreover, average

age, BMI, FPG, HOMA-IR, HbA1c, and liver histological characteristics were not different between men and women (Table 3). For women, menopause status was collected, and the proportion of postmenopausal women did not differ with NAFLD severity (Table 2). Moreover, for women with NASH ($n = 29$), we observed no significant differences in the plasma BCAA concentrations between pre menopausal ($n = 18$) and postmenopausal ($n = 11$) women (data not shown). The low numbers of postmenopausal patients in the healthy and NAFL groups did not permit the same comparison. Still, these results suggest that menopause alone is unlikely to lead to a major difference in plasma BCAA levels in the context of NAFLD.

Interestingly, plasma BCAA showed an inverse relation to NAFLD depending on patient sex. In men, plasma leucine and valine negatively correlated with increasing NAFLD stage (Fig. 4A and B), whereas plasma isoleucine did not correlate with NAFLD stage (Fig. 4C). Conversely, in women, plasma leucine, valine, and isoleucine concentrations all positively correlated with NAFLD severity (plasma leucine: Spearman $\rho = 0.43$, $P < 0.01$; plasma valine: Spearman $\rho = 0.39$, $P < 0.01$; plasma isoleucine: Spearman $\rho = 0.43$, $P < 0.01$; Fig. 4D–F). These results indicate a sex-specific signature of plasma BCAA in NAFLD.

Sex-dependent association of plasma BCAA with NAFLD features

To better understand the specific disease features associated with plasma BCAA changes, plasma BCAA concentrations were correlated with each NAFLD histological characteristic separately in men and women. In men ($n = 53$), with the exception of a modest inverse correlation of plasma valine with lobular inflammation ($\rho = -0.33$, $P = 0.02$), plasma BCAA concentrations did not significantly associate with any of the parameters tested (Fig. 5). Conversely, in women, the 3 plasma BCAA correlated positively with steatosis and fibrosis. Additionally, plasma leucine and isoleucine concentrations significantly correlated with the histological ballooning score (leucine: $\rho = 0.36$, $P = 0.004$; isoleucine: $\rho = 0.33$, $P = 0.009$) (Fig. 5).

Interestingly, all 3 plasma BCAA most strongly correlated with fibrosis in women only (Fig. 5). To investigate whether BCAA could discriminate early from more advanced stages of fibrosis in patients with NASH, women and men were subgrouped in 2 fibrosis stages: no or low fibrosis (F0–F1) and significant fibrosis ($F \geq 2$). In men, no significant association was found between plasma BCAA and fibrosis group (Fig. 6A–C). Conversely, women displayed a significant increase of all 3 plasma

Table 2. Clinical, biological, and liver histological characteristics of the patients according to sex and NAFLD stage

Characteristics	Healthy	NAFL	NASH	NASH-F	p-value
Men					
n	8	15	15	15	
Age	38 ± 15	45 ± 11	41 ± 13	40 ± 11	0.48
BMI (kg/m ²)	39 ± 4.6	41 ± 8.5	38 ± 4.6	39 ± 4.1	0.38
Fasting Plasma Glucose (mg/dL)	89 ± 12	88 ± 14	85 ± 6	89 ± 9	0.99
HbA1c (%)	5.5 ± 0.3	5.6 ± 0.5	5.6 ± 0.3	4.9 ± 0.3	0.99
HOMA-IR	5.8 ± 7.3	3.4 ± 1.2	3.6 ± 2.2	4 ± 1.3	0.95
HOMA2-B (%)	169 ± 33	162 ± 59	216 ± 79	171 ± 59	0.51
HOMA2-S (%)	56 ± 21	55 ± 26	51 ± 35	56 ± 23	0.94
HOMA2-IR	1.9 ± 0.6	2.3 ± 4.6	2.6 ± 1.2	2.1 ± 0.8	0.91
Steatosis grade (0,1,2,3)	8/0/0/0	0/11/4/0	0/7/3/5	0/1/6/8	<0.0001
Ballooning (0,1,2)	8/0/0	7/6/2	0/10/5	0/11/4	<0.0001
Lobular inflammation (0,1,2,3)	8/0/0/0	11/3/1/0	0/10/4/1	0/8/5/2	<0.0001
Fibrosis stage (0,1,2,3,4)	8/0/0/0/0	12/1/2/0/0	10/5/0/0/0	0/0/11/4/0	<0.0001
Women					
n	15	15	15	14	
Age	41 ± 11	42 ± 13	46 ± 14	45 ± 15	0.28
BMI (kg/m ²)	38 ± 5.2	42 ± 4.8	39 ± 4.4	42 ± 6.8	0.13
Fasting plasma glucose (mg/dL)	83 ± 8	86 ± 13	89 ± 16	90 ± 9	0.16
HbA1c (%)	5.4 ± 0.4	5.6 ± 0.4	5.6 ± 0.6	5.6 ± 0.8	0.25
HOMA-IR	3.2 ± 1.6	3.6 ± 2.1	4.4 ± 2.7	4.7 ± 1.8	0.06
HOMA2-B (%)	181 ± 78	211 ± 93	154 ± 52	177 ± 59	0.42
HOMA2-S (%)	68 ± 56	41 ± 21	65 ± 41	64 ± 48	0.85
HOMA2-IR	2.0 ± 1.1	3.3 ± 2.4	2 ± 1.1	2.1 ± 0.8	0.54
Menopause (no/yes)	13/2	12/3	9/6	9/5	0.31
Steatosis grade (0,1,2,3)	15/0/0/0	0/11/4/0	0/5/3/7	0/4/5/5	<0.0001
Ballooning (0,1,2)	15/0/0	13/1/1	0/8/7	0/10/4	<0.0001
Lobular inflammation (0,1,2,3)	15/0/0/0	7/7/1/0	0/10/4/1	0/6/6/2	<0.0001
Fibrosis stage (0,1,2,3,4)	15/0/0/0/0	14/1/0/0/0	10/5/0/0/0	0/0/10/4/0	<0.0001

Data are expressed as mean ± standard deviation. P-values are obtained using the Chi-square test for qualitative data and the analysis of variance test for quantitative data. P-values < 0.05 are considered statistically significant (bold).

Table 3. Clinical, biological, and liver histological characteristics of the patients according to sex

	Men	Women	P-value
n	53	59	
Age	41 ± 12	43 ± 12	0.89
BMI (kg/m ²)	39 ± 5.5	40 ± 5.5	0.24
Fasting plasma glucose (mg/dL)	87 ± 9	86 ± 10	0.29
HbA1c (%)	5.5 ± 0.4	5.5 ± 0.5	0.58
HOMA-IR	4.2 ± 3.5	4.0 ± 2.1	0.77
HOMA2-B (%)	181 ± 65	181 ± 73	0.87
HOMA2-S (%)	54 ± 26	60 ± 44	0.93
HOMA2-IR	2.2 ± 1.2	2.3 ± 1.5	0.93
Steatosis grade (0,1,2,3)	8/19/13/13	15/20/12/12	0.58
Ballooning (0,1,2)	15/2/7/11	28/19/12	0.08
Lobular inflammation (0,1,2,3)	19/21/10/3	22/23/11/3	0.99
Fibrosis stage (0,1,2,3,4)	30/6/13/4/0	39/6/10/4/0	0.74

Data are expressed as mean ± standard deviation. P-values are obtained using the Chi-square test for qualitative data and the Mann-Whitney test for quantitative data. P-values < 0.05 are considered statistically significant.

BCAAs with the presence of significant fibrosis (F0-F1 vs F ≥ 2: leucine: 117 ± 21 μmol/L vs 147 ± 31 μmol/L; valine: 221 ± 34 μmol/L vs 278 ± 50 μmol/L; isoleucine: 61 ± 10 μmol/L vs 81 ± 16 μmol/L (Fig. 6D-F). Moreover, as expected from the initial matching strategy, HOMA-IR, BMI, age, and glucose homeostasis parameters were not significantly different between the fibrosis subgroups.

Discussion

Here, we investigated the correlation of plasma BCAA levels with NAFLD severity and fibrosis in patient groups from a cross-sectional NAFLD cohort. To account for their potential confounding effects, groups were matched for age, BMI, glucose metabolism parameters, and sex. Our results indicate that plasma BCAA

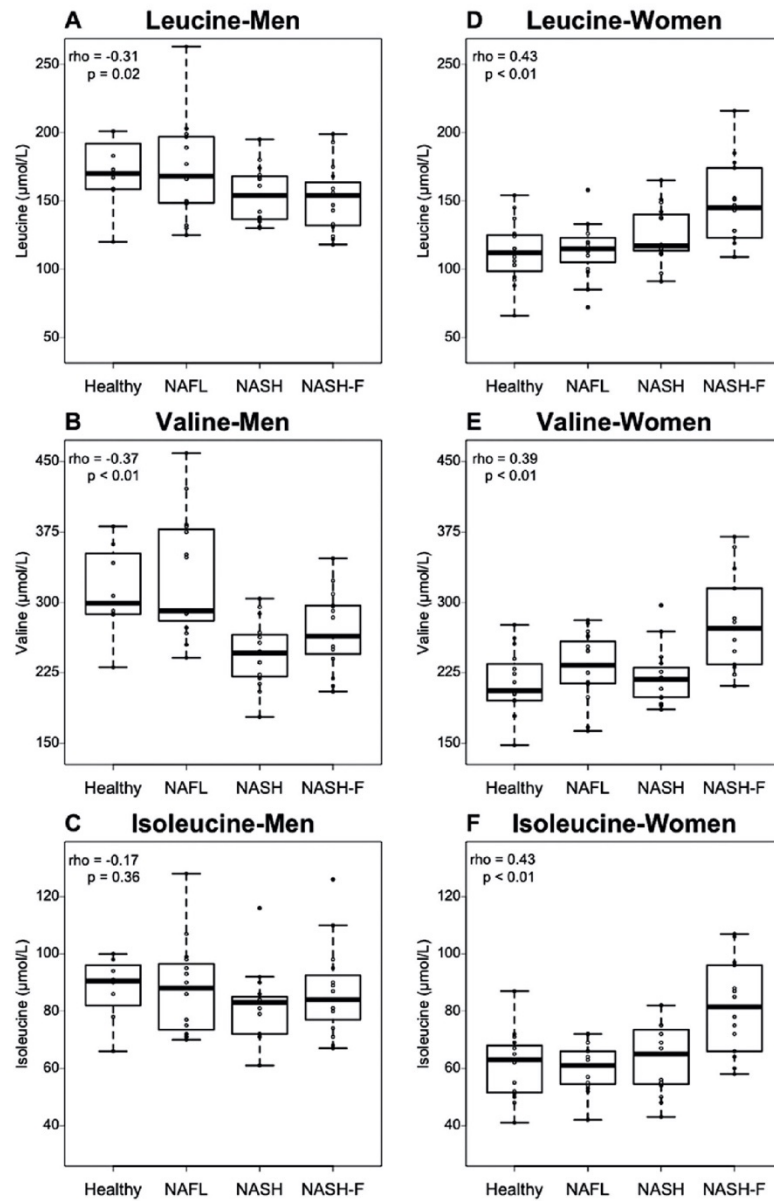


Figure 4. Plasma BCAA variations related to NAFLD stage are sex dependent. (A-C) BCAA concentrations according to NAFLD stage for men in Healthy (n = 8), NAFL (n = 15), NASH (n = 15), and NASH-F (n = 15) patients. (D-F) BCAA concentrations according to NAFLD stage for women in healthy (n = 15), NAFL (n = 15), NASH (n = 15), and NASH-F (n = 14) patients. Data are expressed as median \pm IQR. Rho coefficients and P-values are obtained using the Spearman rank test.

correlate with severity of NAFLD independently of known confounders, but in a sex-dependent manner, increasing from NAFL to fibrotic NASH in women, while decreasing in NASH in men.

Our results extend recent findings from Gaggini et al (14), who found a positive association of plasma BCAA with increasing NAFLD severity and fibrosis in a cohort of both obese and nonobese NAFLD patients. However,

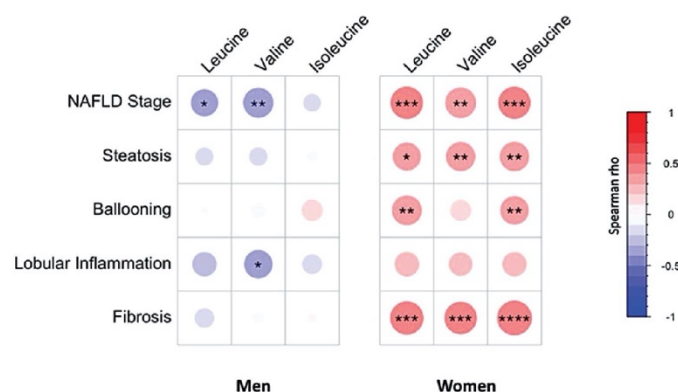


Figure 5. Association between plasma BCAA concentrations and liver histological characteristics are sex dependent. Spearman correlations between plasma BCAA concentrations and liver histological characteristics in the men ($n = 53$) and the women ($n = 59$) patients. Colors and area of circles reflect the Spearman rho values (red for positive, blue for inverse correlations). P-values are obtained by Spearman rank test, *P-value < 0.05, **P-value < 0.01, ***P < 0.001, and ****P-value < 0.0001.

in this study, sex ratio imbalances were present between the disease groups (14). Indeed, there was a higher proportion of men in the obese NAFLD group, whereas in the control group, there was a higher proportion of women. Our results suggest this may have exaggerated the association of elevated BCAA with NAFLD. Lake et al also found a positive association between plasma BCAA and NAFLD stages with limited numbers of patients (12). However, nonstandard NAFLD classification criteria were used, and no data on sex distribution nor insulin-resistance were provided. Finally, our findings in women are in agreement with a third study reporting a positive association of plasma BCAA with increasing NAFLD severity in a cohort of obese, nondiabetic women (13).

There are numerous sources of seeming discordance in the literature among cohort studies of metabolite changes in NAFLD. These can arise from the definition of experimental groups (ie, NAFLD vs healthy, NASH vs NAFL, etc.) or differences in confounding parameters between experimental and control groups. For example, we found that alterations in circulating bile acids, previously reported to be elevated in NAFLD (27,28), may be due to differences in IR rather than NASH per se in a cohort of nondiabetic NASH patients (29). The present study, with clearly distinct groups based on their liver phenotype but matched for several potential confounders, allowed specific assessment of the association of histological liver alterations with plasma metabolites (ie, BCAA). Therefore, studies designed to identify specific associations with NAFLD presence and severity should, in our opinion, always be controlled for known confounding factors, especially sex, as shown in the present study.

The effect of sex in cohort studies of NAFLD has recently been highlighted, as prevalence and severity of NAFLD is higher in men than in premenopausal women (3,30,31). Hence, a specific metabolic signature dependent on patient sex may be expected in NAFLD. To our knowledge, the present study is the first to reveal sex-dependent associations of plasma metabolites with NAFLD severity. Indeed, plasma BCAA concentrations increased with NAFLD severity in women whereas they decreased in men, independent of glucose metabolism parameters. With respect to other clinical variables, we observed no significant differences between men and women for plasma triglycerides, plasma total cholesterol, aspartate amino transferase, or alanine amino transferase (data not shown). As expected, plasma high-density lipoprotein cholesterol was lower in men than in women and tended to decrease in both sexes with increasing NAFLD severity (data not shown). Based on the strong influence of patient sex in the determination of plasma metabolite composition (15), we believe that untargeted metabolomic studies may reveal further examples of such metabolic changes that may be key to explanations of divergent disease phenotypes between men and women. The fact that NAFLD is associated with changes in sex hormone concentrations such as sex hormone-binding globulin or testosterone may provide a potential explanation for sex susceptibility differences in NAFLD (32,33). Our data suggest that BCAA measurement could be useful to evaluate disease progression in women and thus be integrated in future noninvasive scores for NAFLD screening. However, large-scale prospective studies with paired biopsies, such as currently ongoing clinical trials, will be necessary to fully test the applicability of such a strategy.

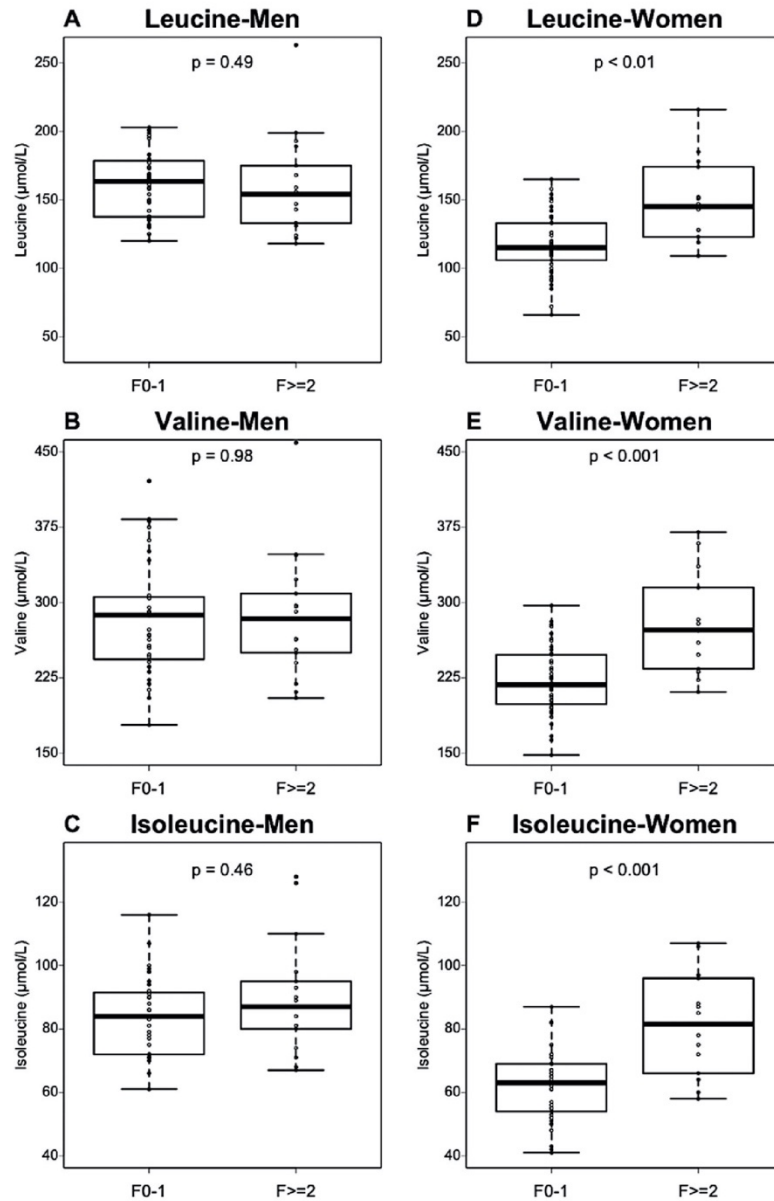


Figure 6. The association of plasma BCAA concentrations with fibrosis is sex dependent. (A-C) BCAA concentrations according to fibrosis stage (low fibrosis, F0-F1, $n = 36$; high fibrosis $F \geq 2$, $n = 17$) in men group. (D-F) BCAA concentrations according to fibrosis stage (low fibrosis, F0-F1, $n = 36$; high fibrosis $F \geq 2$, $n = 17$) in women group. Data are expressed as median \pm IQR. P -values are obtained using the Mann-Whitney test.

Whether BCAA are markers or actors in NAFLD progression remains unclear. BCAA metabolism plays an important role in many cellular functions and signaling (34). Plasma BCAA levels reflect net differences in BCAA intake from the diet and their catabolism. The first 2 steps

of BCAA catabolism, catalyzed by branched-chain amino acid transaminase in peripheral tissues and branched-chain α -ketoacid dehydrogenase mainly in liver, respectively, are reduced in IR and obesity (35). The reductions in these enzymatic activities limit the availability of

BCAA-derived succinyl-coenzyme A and acetyl-coenzyme A, which would otherwise feed the tricarboxylic acid cycle. The combination of these changes could lead to lower hepatic mitochondrial activity. Interestingly, BCAA (especially leucine) are well-known activators of the mammalian target of rapamycin pathway (36–38), whose activation may further drive insulin resistance and abnormal lipid accumulation. In line, feeding obese mice with BCAA was associated with chronic phosphorylation of mammalian target of rapamycin and enhanced liver injury in this model (39). However, the involvement of BCAA in liver injury in humans appears to be inconsistent with these preclinical models. For example, in patients with cirrhosis, long-term oral BCAA supplementation reduced liver injury and related complications (40–42). Consequently, elevated plasma BCAA in humans may be a protective mechanism to reduce further hepatic injury in a chronic setting.

Although our findings do not prove causality of the observed association, they highlight that patient sex must be considered when developing metabolite-based diagnostic/evaluation scores for NAFLD.

Acknowledgments

We thank Magali Defevre, Laurence George and Alain Kerckhove (Centre de Biologie et Pathologie Génétique, CHU Lille, France) for help with plasma amino acid measurements.

Financial support: This work was supported by the French Agence Nationale pour la Recherche (ANR-10-LABX-0046 and ANR-16-RHUS-0006) and grants from the European Commission: HEPADIP (Contract LSHM-CT-2005–018734) and RESOLVE (Contract FP7-305707) projects. BS is a recipient of an ERC Advanced Grant (694717). SF has a senior clinical research mandate from the Fund for Scientific Research (FWO) Flanders (1802154N).

Additional Information

Correspondence and Reprint Requests: Joel T. Haas, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du professeur Calmette, BP245, 59019 Lille, France. E-mail: joel.haas@pasteur-lille.fr

Disclosure Summary: BS and SF are consultants for Genfit S.A. SF and LV are consultants for Inventiva. All other authors have nothing to declare.

Data Availability: The datasets generated during and/or analyzed during the current study are not publicly available but are available from the corresponding author on reasonable request.

References

- Haas JT, Francque S, Staelens B. Pathophysiology and mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease. *Annu Rev Physiol*. 2016;78:181–205.
- Kleiner DE, Brunt EM, Wilson LA, et al. Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Association of histologic disease activity with progression of nonalcoholic fatty liver disease. *JAMA Netw Open*. 2019;2(10):e1912565.
- Lonardo A, Nascimbeni F, Ballestri S, et al. Sex differences in nonalcoholic fatty liver disease: state of the art and identification of research gaps. *Hepatology*. 2019;70(4):1457–1469.
- Villanueva-Ortega E, Garcés-Hernández MJ, Herrera-Rosas A, et al. Gender-specific differences in clinical and metabolic variables associated with NAFLD in a Mexican pediatric population. *Ann Hepatol*. 2019;18(5):693–700.
- Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;41(6):1313–1321.
- Bedossa P. Current histological classification of NAFLD: strength and limitations. *Hepatol Int*. 2013;7 Suppl 2:765–770.
- Rousselet MC, Michalak S, Dupré F, et al. Hepatitis Network 49. Sources of variability in histological scoring of chronic viral hepatitis. *Hepatology*. 2005;41(2):257–264.
- Gawrieh S, Knoedler DM, Saeian K, Wallace JR, Komorowski RA. Effects of interventions on intra- and interobserver agreement on interpretation of nonalcoholic fatty liver disease histology. *Ann Diagn Pathol*. 2011;15(1):19–24.
- Laferrère B, Reilly D, Arias S, et al. Differential metabolic impact of gastric bypass surgery versus dietary intervention in obese diabetic subjects despite identical weight loss. *Sci Transl Med*. 2011;3(80):80re2.
- She P, Van Horn C, Reid T, Hutson SM, Cooney RN, Lynch CJ. Obesity-related elevations in plasma leucine are associated with alterations in enzymes involved in branched-chain amino acid metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;293(6):E1552–E1563.
- Newgard CB, An J, Bain JR, et al. A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell Metab*. 2009;9(4):311–326.
- Lake AD, Novak P, Shipkova P, et al. Branched chain amino acid metabolism profiles in progressive human nonalcoholic fatty liver disease. *Amino Acids*. 2015;47(3):603–615.
- Hoyle L, Fernández-Real JM, Federici M, et al. Molecular phenomics and metagenomics of hepatic steatosis in non-diabetic obese women. *Nat Med*. 2018;24(7):1070–1080.
- Gaggini M, Carli F, Rosso C, et al. Altered amino acid concentrations in NAFLD: Impact of obesity and insulin resistance. *Hepatology*. 2018;67(1):145–158.
- Krumsiek J, Mittelstrass K, Do KT, et al. Gender-specific pathway differences in the human serum metabolome. *Metabolomics*. 2015;11(6):1815–1833.
- Ballestri S, Nascimbeni F, Baldelli E, Marrazzo A, Romagnoli D, Lonardo A. NAFLD as a sexual dimorphic disease: role of gender and reproductive status in the development and progression of nonalcoholic fatty liver disease and inherent cardiovascular risk. *Adv Ther*. 2017;34(6):1291–1326.
- Li L, Liu DW, Yan HY, Wang ZY, Zhao SH, Wang B. Obesity is an independent risk factor for non-alcoholic fatty liver disease: evidence from a meta-analysis of 21 cohort studies. *Obes Rev*. 2016;17(6):510–519.
- Koves TR, Ussher JR, Noland RC, et al. Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metab*. 2008;7(1):45–56.
- Zhou M, Shao J, Wu CY, et al. Targeting bcaa catabolism to treat obesity-associated insulin resistance. *Diabetes*. 2019;68(9):1730–1746.
- Neinast MD, Jang C, Hui S, et al. Quantitative analysis of the whole-body metabolic fate of branched-chain amino acids. *Cell Metab*. 2019;29(2):417–429.e4.

21. Francque S, Verrijken A, Caron S, et al. PPAR α gene expression correlates with severity and histological treatment response in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*. 2015;63(1):164-173.
22. Verrijken A, Beckers S, Francque S, et al. A gene variant of PNPLA3, but not of APOC3, is associated with histological parameters of NAFLD in an obese population. *Obesity (Silver Spring)*. 2013;21(10):2138-2145.
23. Levy JC, Matthews DR, Hermans MP. Correct homeostasis model assessment (HOMA) evaluation uses the computer program. *Diabetes Care*. 1998;21(12):2191-2192.
24. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2018;67(1):328-357.
25. European Association for the Study of the Liver, European Association for the Study of Diabetes, European Association for the Study of Obesity. Clinical practice guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2016;64(6):1388-1402.
26. Filee R, Schoos R, Boemer F. Evaluation of physiological amino acids profiling by tandem mass spectrometry. *JIMD Rep*. 2014;13:119-128.
27. Lake AD, Novak P, Shpikova P, et al. Decreased hepatotoxic bile acid composition and altered synthesis in progressive human nonalcoholic fatty liver disease. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013;268(2):132-140.
28. Puri P, Daita K, Joyce A, et al. The presence and severity of nonalcoholic steatohepatitis is associated with specific changes in circulating bile acids. *Hepatology*. 2018;67(2):534-548.
29. Legry V, Francque S, Haas JT, et al. Bile acid alterations are associated with insulin resistance, but not with NASH, in obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(10):3783-3794.
30. Tapper EB, Krajewski K, Lai M, et al. Simple non-invasive biomarkers of advanced fibrosis in the evaluation of non-alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterol Rep (Oxf)*. 2014;2(4):276-280.
31. Wang Z, Xu M, Hu Z, Hultström M, Lai E. Sex-specific prevalence of fatty liver disease and associated metabolic factors in Wuhan, south central China. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2014;26(9):1015-1021.
32. Sarkar M, Wellons M, Cedars MI, et al. Testosterone levels in premenopausal women are associated with nonalcoholic fatty liver disease in midlife. *Am J Gastroenterol*. 2017;112(5):755-762.
33. Sarkar M, VanWagner LB, Terry JG, et al.; Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Cohort. Sex hormone-binding globulin levels in young men are associated with nonalcoholic fatty liver disease in Midlife. *Am J Gastroenterol*. 2019;114(5):758-763.
34. Zhang S, Zeng X, Ren M, Mao X, Qiao S. Novel metabolic and physiological functions of branched chain amino acids: a review. *J Anim Sci Biotechnol*. 2017;8:art.1.
35. Lynch CJ, Adams SH. Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10(12):723-736.
36. Um SH, D'Alessio D, Thomas G. Nutrient overload, insulin resistance, and ribosomal protein S6 kinase 1, S6K1. *Cell Metab*. 2006;3(6):393-402.
37. Krebs M, Brunmair B, Brehm A, et al. The mammalian target of rapamycin pathway regulates nutrient-sensitive glucose uptake in man. *Diabetes*. 2007;56(6):1600-1607.
38. Wolfson RL, Chantranupong L, Saxton RA, et al. Sestrin2 is a leucine sensor for the mTORC1 pathway. *Science*. 2016;351(6268):43-48.
39. Zhang F, Zhao S, Yan W, et al. Branched chain amino acids cause liver injury in obese/diabetic mice by promoting adipocyte lipolysis and inhibiting hepatic autophagy. *Ebiomedicine*. 2016;13:157-167.
40. Marchesini G, Bianchi G, Merli M, et al.; Italian BCAA Study Group. Nutritional supplementation with branched-chain amino acids in advanced cirrhosis: a double-blind, randomized trial. *Gastroenterology*. 2003;124(7):1792-1801.
41. Muto Y, Sato S, Watanabe A, et al.; Long-Term Survival Study Group. Effects of oral branched-chain amino acid granules on event-free survival in patients with liver cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2005;3(7):705-713.
42. Fukui H, Saito H, Ueno Y, et al. Evidence-based clinical practice guidelines for liver cirrhosis 2015. *J Gastroenterol*. 2016;51(7):629-650.

Hypothèses mécanistiques et perspectives :

Après la parution de notre article, une étude a été publiée au sein de l'unité de recherche qui lui fait écho. Il s'agit d'une analyse à grande échelle des profils transcriptomiques de foies de patients atteints de NASH (165). La principale découverte concerne un dimorphisme sexuel dans la signature moléculaire hépatique de la NASH. Par des approches statistiques de *random forest* (RF), des expressions géniques différentielles selon le sexe ont été identifiées dans le contexte de la NASH. De plus, l'expression de certains gènes a pu être identifiée comme prédictive de la NASH, et ce de manière différente selon le sexe. Il est intéressant de noter que *BCAT1* est un des gènes prédicteur important de la NASH chez les femmes dans cette étude. Pour rappel, *BCAT1* est la première enzyme impliquée dans le métabolisme des BCAA, qui les transforme en leurs dérivés α -cétoacides (**Figure 18**). Cette dérégulation transcriptionnelle hépatique de *BCAT1* est une piste potentielle pour expliquer les variations de BCAA dans notre étude. Chez l'Homme, la variation hépatique de *BCAT1* a déjà été étudiée précédemment (87), avec une augmentation dans le cas de la NASH, mais dans cette même étude, la variable sexe n'avait pas été prise en compte et nécessite donc une réévaluation supplémentaire avec prise en compte de la variable sexe. Une autre étude rapporte que le gène *BCAT1* hépatique est surexprimé et hypométhylé lors des complications cardiovasculaires et des décompensation hépatiques (incluant la fibrose hépatique) de la NAFLD (avec notamment une proportion de femmes d'environ 70% plus importante dans l'étude) (166).

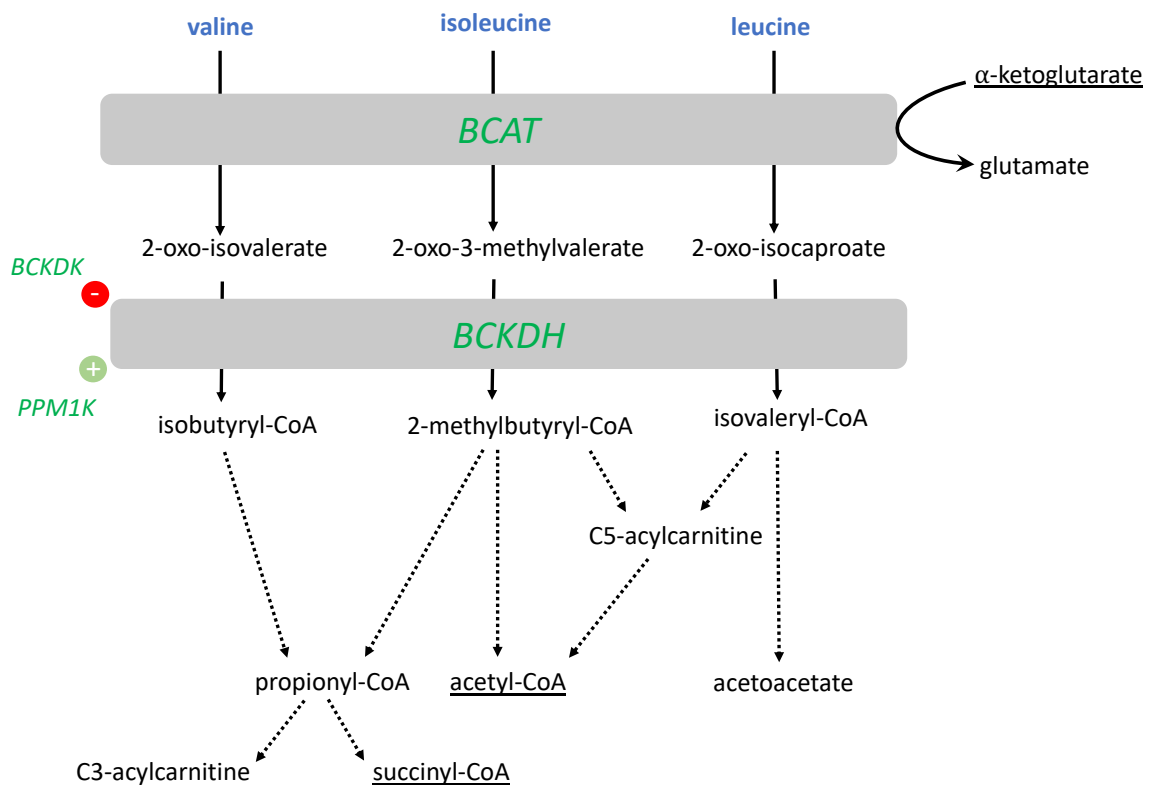


Figure 18. Représentation schématique du catabolisme des acides aminés ramifiés (BCAA). Enzymes communes : BCAT : branched chain amino transferase1/2 ; **BCKDH** : branched-chain α -ketoacid dehydrogenase complex; **Régulateurs de BCKDH** : **BCKDK** : Branched Chain Keto Acid Dehydrogenase Kinase; **PPM1K** : Protein Phosphatase, Mg²⁺/Mn²⁺ Dependent 1K. Les flèches en pointillés correspondent à des transformations métaboliques simplifiées. Les métabolites soulignés sont des intermédiaires du cycle de Krebs.

Nos conclusions sont donc complémentaires aux travaux de Vandel *et al.* et suggèrent que l'altération du métabolisme des BCAA dans la NASH pourrait être due au dimorphisme sexuel de l'expression hépatique du gène *BCAT1*.

D'un point de vue métabolique, *BCAT1* catalyse la transformation de l'alpha-cétoglutarate en glutamate et il a été montré que le ratio alpha-cétoglutarate/glutamate témoin de cette transformation est corrélé à la gravité de la NAFLD (167). De plus, une inhibition

pharmacologique de *BCAT1* dans un modèle cellulaire de monocytes, a montré une diminution de l'expression des gènes proinflammatoire ainsi qu'une diminution de l'activation des monocytes (168). La dérégulation de *BCAT1* est donc peut être en lien avec le métabolisme du glutamate et l'inflammation observée dans la NASH mais demande des investigations complémentaires afin de comprendre la pathogénie associée.

3. Autres acides aminés

Dans notre étude de métabolome ciblé sur le plasma de 112 patients issus de la cohorte Resolve, en plus des 3 AA ramifiés, 37 AA ont été dosés par le kit aTRAQ au Centre de Biologie et Pathologie du CHRU Lille (169). Les patients sélectionnés et la méthodologie analytique et statistique utilisés sont similaires au projet BCAA décrit précédemment (détaillé dans le **manuscrit 4**). Le traitement post-analytique a permis d'identifier des variations d'AA impliqués dans des voies métaboliques pouvant révéler un intérêt dans l'étude de la NAFLD (**Tableau 4**).

Acide Aminé ($\mu\text{mol/L}$)	Sains (n=23)	NAFL (n=30)	NASH (n=30)	NASH avec fibrose (n=29)
Alloisoleucine	2.4 \pm 1.1	2.2 \pm 1.0	2.5 \pm 1.2	2.7 \pm 0.8
Alanine	403.6 \pm 57.1	402.5 \pm 79.8	408.1 \pm 74.7	495.3 \pm 99.7
Arginine	46.1 \pm 19.4	50.1 \pm 21.4	40.9 \pm 13.0	45.9 \pm 16.7
Asparagine	55.0 \pm 9.2	51.4 \pm 13.1	50.2 \pm 9.4	54.8 \pm 9.2
Aspartic acid	7.9 \pm 4.1	6.7 \pm 1.7	7.5 \pm 2.2	7.0 \pm 1.4
Cysteine	7.8 \pm 3.9	7.5 \pm 4.0	7.7 \pm 7.2	7.5 \pm 5.4
Glutamine	605.0 \pm 149.6	556.9 \pm 133.4	486.8 \pm 80.7	624.7 \pm 112.7
Glutamic acid	96.9 \pm 38.1	109.7 \pm 29.5	128.6 \pm 64.4	121.8 \pm 37.4
Glycine	211.8 \pm 76.8	201.3 \pm 54.8	186.3 \pm 37.5	188.6 \pm 36.6
Histidine	83.4 \pm 15.9	80.3 \pm 16.1	77.5 \pm 9.4	83.8 \pm 13.5
Isoleucine	70.5 \pm 17.2	72.9 \pm 19.6	73.5 \pm 15.6	85.2 \pm 17.3
Leucine	133.3 \pm 37.2	139.4 \pm 42.9	141.6 \pm 24.3	151.9 \pm 29.1
Lysine	208.5 \pm 41.6	211.7 \pm 46.3	187.1 \pm 26.3	236.0 \pm 31.3
Methionine	24.4 \pm 5.1	24.6 \pm 6.7	23.6 \pm 3.8	26.7 \pm 3.8
Phenylalanine	67.3 \pm 16.7	65.6 \pm 12.1	60.5 \pm 5.8	71.2 \pm 15.6
Proline	202.7 \pm 65.0	222.9 \pm 85.6	192.5 \pm 56.9	220.1 \pm 85.5
Sarcosine	3.9 \pm 1.2	3.6 \pm 1.2	3.4 \pm 0.9	4.5 \pm 1.4
Serine	114.8 \pm 30.3	98.4 \pm 24.2	94.9 \pm 14.0	103.9 \pm 16.7
Threonine	139.2 \pm 22.9	131.0 \pm 34.8	123.5 \pm 22.8	133.2 \pm 28.3
Tryptophan	44.5 \pm 15.6	44.6 \pm 11.1	47.9 \pm 7.9	51.3 \pm 9.7
Tyrosine	68.5 \pm 19.1	72.4 \pm 19.5	66.8 \pm 11.5	78.7 \pm 14.5
Valine	250.4 \pm 62.2	275.3 \pm 74.5	236.1 \pm 33.5	278.2 \pm 47.4

Tableau 4. Concentrations plasmatiques d'AA obtenus dans la cohorte Résolve (n=219) en fonction du degré de gravité des NAFLD, moyenne +/-sd

Nous avons étudié les AA impliqués dans différentes voies métaboliques identifiées dans la rédaction du **manuscrit 3** : la voie du glutathion (**Figure 19**) et le cycle de la méthionine (ou voie de la reméthylation) (**Figure 19**).

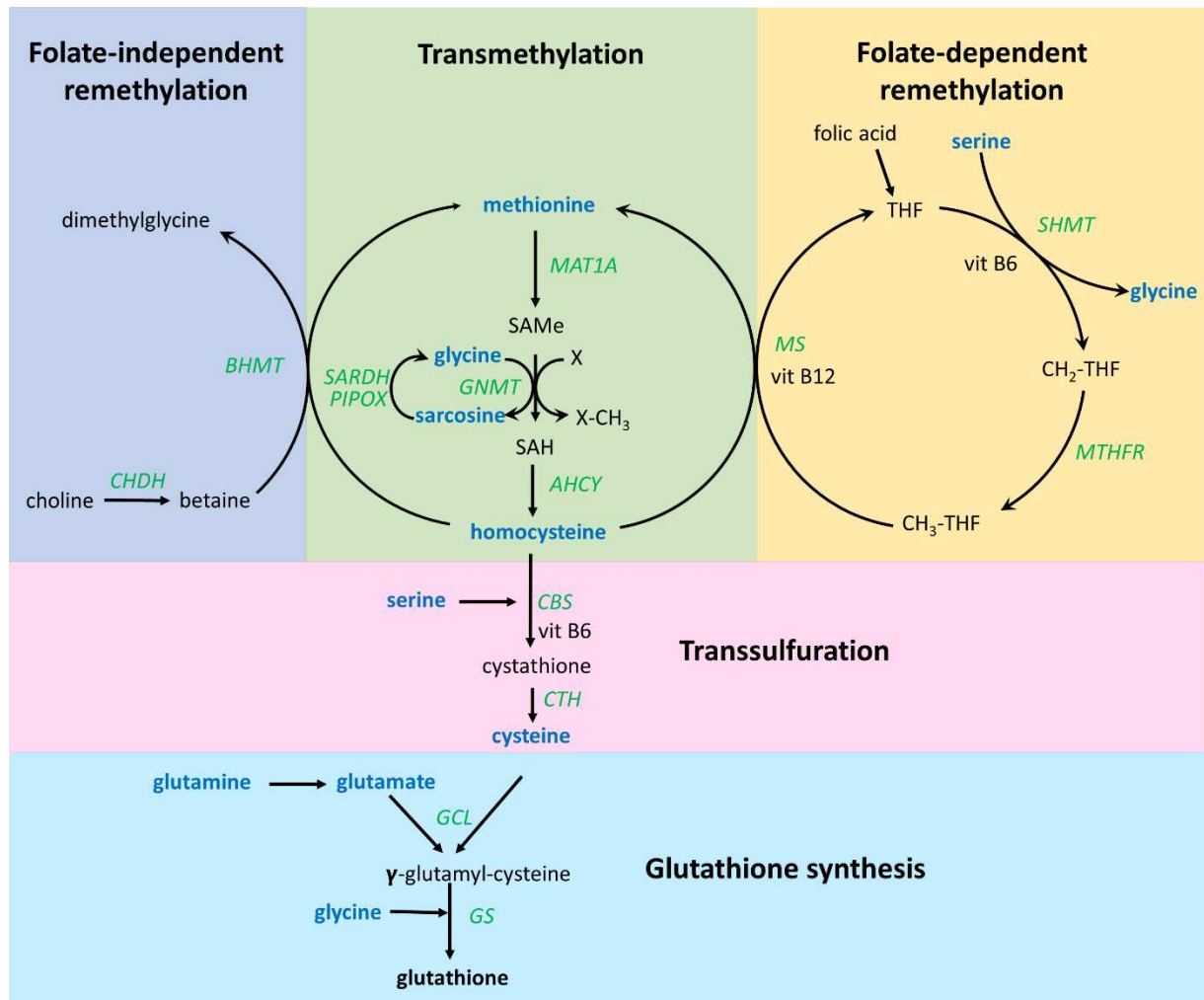


Figure 19. Représentation schématique du cycle de la méthionine (voie de la transméthylation, voie de reméthylation dépendante du folate, voie de reméthylation indépendante du folate et voie de transsulfuration et de la voie de synthèse du glutathion).

Les acides aminés et dérivés d'acides aminés sont en bleu.

Métabolites : *SAMe* : S-Adénosyl Méthionine ; *SAH* : S-Adénosyl Homocystéine, *THF* : Tétrahydro-folate. *X* : composé à méthylé, *X-CH₃* : composé méthylé ; *vit B6* : vitamine B6 ; *vit B12* : vitamine B12

Enzymes (en vert) : *MAT1A* : Méthionine adenosyltransferase; *AHCY* : S-adenosylhomocysteine hydrolase; *BHMT* : Betaine-homocysteine methyltransferase; *CHDH* : Choline oxidase ; *SARDH* : Sarcosine dehydrogenase or *PIPOX* : Pipecolic acid oxidase; *GNMT* : Glycine methyltransferase; *MS* : Méthionine synthase; *SHMT* : Serine hydroxymethyltransferase; *MTHFR* : 5,10-méthylentétrahydrofolate reductase; *CBS* : Cystathionine β-synthase; *CTH* : Cystathionase ; *GCL* : Glutamate-cysteine ligase; *GS* : Glutathione synthetase.

a. Ratio de Fisher

L'analyse du métabolome ciblé complet des AA nous a permis de déterminer le ratio de Fisher qui est le rapport de la somme des acides aminés ramifiés (leucine, isoleucine et valine) sur la somme des AA aromatiques (phénylalanine et tyrosine). La littérature rapporte que ce ratio est diminué dans les maladies hépatiques en général (170). Nous avons évalué ce ratio chez les patients de la cohorte Résolve et celui-ci n'est ni corrélé aux lésions de NAFLD ni à la fibrose (**Figure 20A et 21A**). Il ne semble donc pas pertinent d'utiliser ce ratio dans le suivi de la NAFLD.

b. Voie du glutathion

Le glutathion est formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine. Il intervient dans l'élimination d'espèces réactives de l'oxygène pouvant être produites entre autres lors de désordres mitochondriaux et de l'apparition du stress oxydant. L'équipe de Gaggini a déterminé un ratio d'acides aminés plasmatiques pouvant être le reflet de la production de glutathion (88). Ce ratio, appelé GSG correspond au rapport de la glutamine sur la somme sérine et glycine. Gaggini a montré que ce ratio diminue avec les stades de NAFLD et plus particulièrement avec la fibrose. Nous avons mesuré ce ratio chez les patients de notre cohorte et avons montré une corrélation positive avec les stades de pathologie (**Figure 20B**), en cohérence avec les travaux de Gaggini, mais pas de corrélation forte avec la fibrose (**Figure 21B**), contrairement aux travaux de Gaggini. La corrélation retrouvée sur la fibrose par Gaggini pourrait être liée à un effet confondant de l'insulino-résistance dans leur cohorte qui est plus importante chez les patients avec des stades avancés de fibrose. En effet, la littérature rapporte une augmentation entre glutathion et insulino-résistance, ce qui peut donc induire

une augmentation du GSG. Nous émettons donc l'hypothèse que dans nos conditions expérimentales, la dérégulation des voies de production du glutathion sont associées avec le développement de la NAFLD indépendamment de la progression de la fibrose.

c. Cycles des folates, de reméthylation et de transsulfuration.

Une récente étude a montré que les taux plasmatiques de vitamine B9 chez l'humain étaient inversement corrélés avec les grades histologiques de NAFLD (171). Ces résultats peuvent être le reflet d'une dérégulation au niveau du cycle des folates (produit à partir de la vitamine B9) mais également au niveau des voies métaboliques adjacentes telles que le cycle de la méthionine (ou voie de la reméthylation) (**Figure 19**). Le cycle de la méthionine a récemment montré un intérêt dans la physiopathologie de la NAFLD dans des modèles murins (172). Chez des souris MAT1KO (enzyme impliquée dans la voie de la reméthylation), un régime pauvre en choline induit le développement spontané de stéatose (173). Une autre voie métabolique adjacente au cycle des folates concerne la synthèse du glutathion (décrit dans le paragraphe précédent) via la voie de reconversion de l'homocystéine et pourrait être également impliquée dans la physiopathologie de la NAFLD.

Etant donné ces arguments de la littérature, nous nous sommes intéressés aux concentrations des AA (sérine, sarcosine, méthionine et glycine) de ces voies (voie de la reméthylation, voie de reconversion de l'homocystéine). Les analyses ont révélé une altération des taux de sarcosine et de glycine en fonction des stades de NAFLD (**Figures 20C, 20D**) et plus particulièrement pour les stades de fibrose (**Figures 21C et 21D**). L'étude des ratio Glycine/Sarcosine et Sérine/Sarcosine montrent que ceux-ci diminuent dans les stades avancés de NAFLD suggérant une dérégulation au niveau de certaines enzymes (**Figure 19** :

SARDH, Sarcosine dehydrogenase or PIPOX, Pipecolic acid oxidase; GNMT, Glycine methyltransferase; SHMT1, Serine hydroxymethyltransferase 1). Des études de transcriptomes hépatiques ayant été réalisées antérieurement chez les patients de la cohorte Resolve, nous nous sommes alors intéressés à l'expression génique de ces enzymes dans le foie des patients de notre étude.

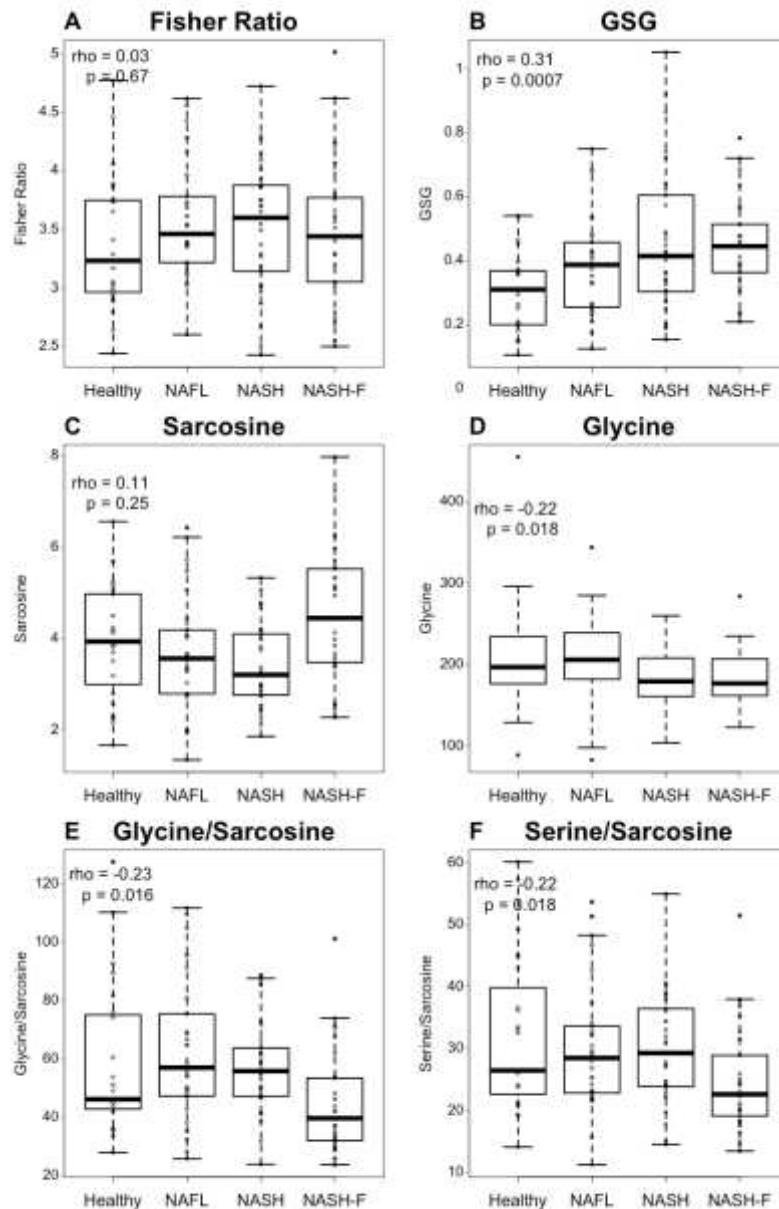


Figure 20. Concentrations en $\mu\text{mol/L}$ et rapport de concentrations d'acides aminés plasmatiques chez les patients issus de la cohorte Resolve en fonction des stades de NAFLD; Groupes de patients = healthy : foie sain (n=23); NAFL : foie stéatosique (n=30); NASH : foie stéatosique avec inflammation (n=30); NASH-F : foie stéatosique avec inflammation et fibrose avancée (n=29). Boxplot de répartition des concentrations d'acides aminés ou des ratios d'acides aminés (médianes +/- IQR). Les coefficients Rho et les p-values sont obtenus en utilisant le test des rangs de Spearman.

A : Rapport de Fisher plasmatique

B : Ratio GSG plasmatique (rapport de la glutamine sur sérine et glycine)

C : Concentrations plasmatiques de sarcosine

D : Concentrations plasmatiques de glycine

E : Rapport des concentrations de glycine/sarcosine plasmatique

F : Rapport des concentrations de sérine/sarcosine plasmatique.

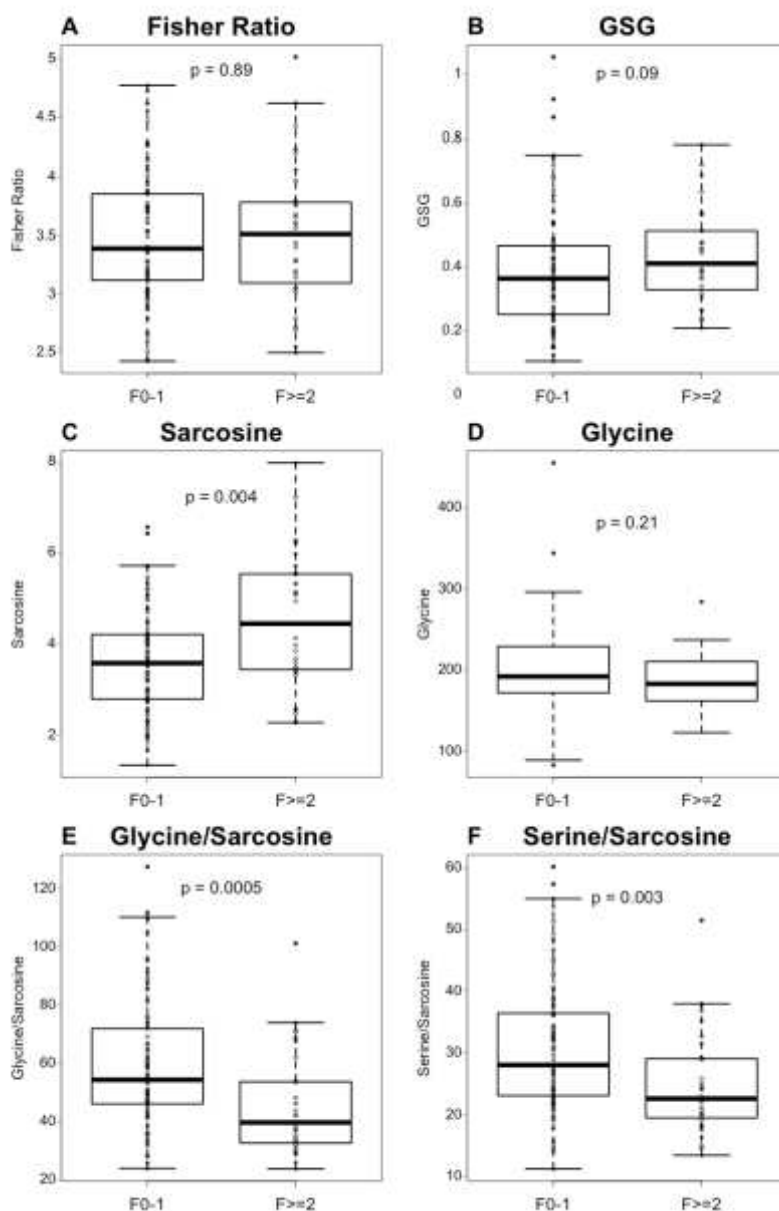


Figure 21. Concentrations en $\mu\text{mol/L}$ et rapport de concentrations d'acides aminés plasmatiques chez les patients issus de la cohorte Resolve en fonction des stades de fibrose hépatique,; Groupes de patients = F0-1 : pas ou peu de fibrose (n=81); F>=2 : fibrose avérée ou avancée (n=31). Boxplot de répartition des concentrations d'acides aminés ramifiés ou des ratios d'acides aminés (médianes +/- IQR). Les p-values sont obtenues en utilisant le test non paramétrique de Mann-Whitney.

A : Rapport de Fisher plasmatique

B : Ratio GSG plasmatique (rapport de la glutamine sur sérine et glycine)

C : Concentrations plasmatiques de sarcosine,

D : Concentrations plasmatiques de glycine

E : Rapport des concentrations de glycine/sarcosine plasmatique

F : Rapport des concentrations de sérine/sarcosine plasmatique

4. Exploration mécanistique des modifications du cycle de la méthionine.

Notre étude de cohorte a mis en évidence des **modifications des acides aminés plasmatiques** impliqués dans le **cycle de la méthionine**. Les modifications plasmatiques sont un reflet global du métabolisme et ne peuvent donc pas être imputées à une altération spécifique du métabolisme hépatique. Nous avons premièrement étudié une partie du transcriptome hépatique de patients issus de la cohorte Resolve puis nous avons analysé ces profils d'AA dans un modèle murin de NASH induit par régime, afin de voir si le modèle murin est pertinent pour les études mécanistiques. Pour cela, nous avons réalisé la mise au point du dosage des acides aminés à la fois sur plasma et sur tissu hépatique de souris.

i. Analyse d'expression génique

Nous souhaitons explorer les variations plasmatiques observées au stade de NASH afin de comprendre les mécanismes hépatiques qui sous-tendent le passage de stéatose simple à stéato-hépatite. Nous nous sommes donc focalisés sur la présence ou non de NASH en excluant les stades avancés de fibrose (soit 83 patients répartis ainsi : foie sain (n=23); NAFL : foie stéatosique (n=30); NASH : foie stéatosique avec inflammation (n=30)). Nos résultats montrent que la sarcosine plasmatique a tendance à diminuer chez les patients NASH avec un rapport glycine/sarcosine et sérine/glycine qui a tendance à augmenter avec la NASH par rapport aux patients sans NASH. Ces changements pourraient être liés à plusieurs enzymes impliquées dans le métabolisme de la sarcosine : *SARDH*, *PIPOX*, *GNMT* et *SHMT* (**Figure 22**). Des extraits de tissus hépatiques ont permis de réaliser le transcriptome de 80 patients sur les 112 issus de la cohorte Resolve (48 NASH et 32 No NASH).

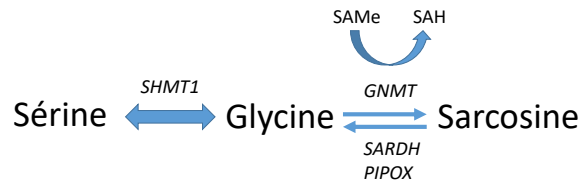


Figure 22. Métabolisme de la sarcosine et gènes impliqués. SAMe : S-adenosyl-methionine, SAH : S-adenosyl-homocysteine

L'expression de *SHMT1* n'est pas significativement différente entre les patients sans et avec NASH (**Figure 23D**), ce qui suggère une absence de modulation de la transformation glycine/sérine au niveau du foie qui pourrait expliquer la baisse du ratio plasmatique sérine/sarcosine observée. Les variations de glycine sont alors peut être le reflet de la modulation d'une voie impliquant la sarcosine. Nos résultats ne retrouvent pas de différences significatives entre les patients avec et sans NASH concernant l'expression des gènes *SARDH* et *PIPOX* (**Figure 23A et 23B**), suggérant une indépendance de **la voie d'oxydation de la glycine et de la sarcosine**. En revanche, l'expression de *GNMT* (**Figure 19 et Figure 22**) est significativement diminué chez les patients présentant une NASH (**Figure 23C**) suggérant que les modulations plasmatiques observées pourraient être liées à une dérégulation de la méthylation. La baisse de *GNMT* suggère également une diminution de la méthylation pouvant être en lien avec des dérégulations épigénétiques impliquées dans la physiopathologie de la NASH.

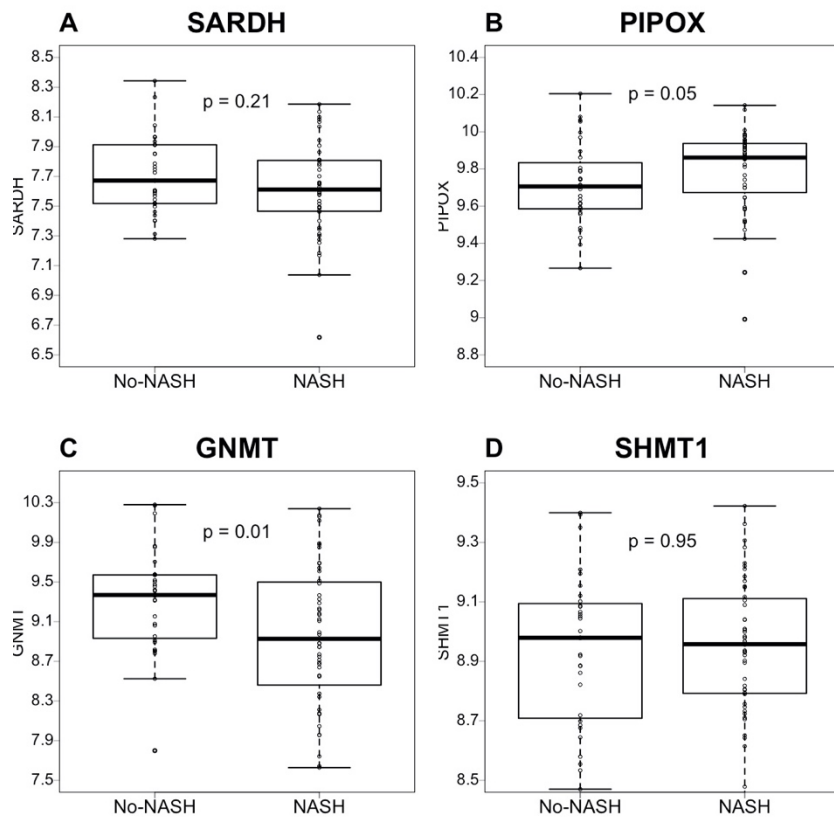


Figure 23. Expression de gènes dans le foie de patients issus de la cohorte Resolve ; Groupes de patients = No-NASH (n=32) ; NASH (n=48). Boxplot de répartition de l'expression de gènes (médianes +/- IQR). Les p-values sont obtenues en utilisant le test non paramétrique de Mann-Whitney.

Cependant, ces résultats observationnels ne peuvent confirmer le mécanisme sous-jacent hypothétique évoqué, les niveaux d'expression des gènes étant mesurés dans le foie alors que les acides aminés sont mesurés dans le plasma. Il est donc nécessaire de réaliser les dosages de métabolites dans le foie en regard des variations des gènes impliqués.

ii. Etude du métabolome dans un modèle murin de NASH

Nous avons pour objectif d'étudier les modulations métaboliques plasmatiques et hépatiques dans un modèle de rongeur NASH induit par régime. Pour cela, nous avons tout d'abord mis au point le dosage du pool d'AA sur les milieux d'intérêt dans le modèle murin. Nous avons ensuite réalisé les dosages à la fois chez des souris contrôles et des souris avec NASH induit par régime afin de valider les modulations spécifiques d'AA observées dans la cohorte sur le modèle utilisé.

a) Mise au point du dosage des AA chez la souris

Nous avons adapté le protocole de dosage des AA plasmatique utilisé chez l'Homme sur le modèle murin afin de réduire le volume de plasma nécessaire de moitié. L'adaptation du protocole nous permet maintenant de travailler sur un volume réduit de 20µL de plasma au lieu des 40µL recommandés par le fournisseur.

Pour doser l'ensemble du pool des AA dans le foie, nous nous sommes basés sur le protocole utilisé pour le dosage plasmatique que nous avons adapté. Les étapes de mises au point ont consisté à définir le protocole d'extraction des AA dans le tissu hépatique, puis réaliser des gammes de linéarité sur broyat de foie homogène. Nous avons également réalisé le dosage du pool des AA sur foie perfusé ou non perfusé afin de s'assurer de l'absence d'interférence du dosage hépatique par la circulation sanguine.

Les tissus sont broyés dans l'azote liquide à l'aide d'un pilon et d'un mortier et 50 mg de tissu ont été dissous dans 75 µl méthanol/eau glacée (1/1 v/v). Les échantillons sont centrifugés à 10.000 g pendant 10 min. Quarante µl du surnageant obtenu sont mélangés avec 10 µl d'acide

sulfosalicylique (contenant de la norleucine en tant qu'étalon interne) pour précipiter les protéines. Le mélange est ensuite centrifugé pendant 2,5 min à 10 000 g. Dix µl du surnageant sont ensuite homogénéisés avec 40 µl de tampon de marquage (contenant de la norvaline comme second étalon interne) pour maintenir un pH basique pendant la dérivation. Ensuite, 10 µl de ce mélange sont mélangés avec 5 µl de réactif aTraQ en vue de la dérivation des AA pendant 30 min à température ambiante. La réaction de dérivation est arrêtée par l'ajout de 5 µl hydroxylamine. L'ensemble du mélange est séché sous vide dans un concentrateur et ensuite mélangé avec un étalon interne contenant tous les acides aminés de la méthode prémarqués avec le réactif aTraQ Δ0 (ne contenant aucun atome marqué par un isotope stable). Dix µl sont ensuite injectés et la séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne HPLC C18 (longueur 150 mm, diamètre interne 4,6 mm, taille des particules 3 µm, Sciex, USA). La phase mobile était constituée d'acide formique à 0,1%, d'acide acétique d'ammonium et d'acide heptafluorobutyrique à 0,01% dans l'eau (phase mobile A) ou d'acide formique à 0,1%, et d'acide heptafluorobutyrique à 0,01% dans le méthanol (phase mobile B). La détection par spectrométrie de masse a été effectuée à l'aide du système QTRAP5500 LC-MS/MS (AB SCIEX | 500 Old Connecticut Path, Framingham, MA 01701, USA) avec ionisation positive par pulvérisation d'électrons et fonctionnant en surveillance de réactions multiples (MRM). L'intégration des pics et la quantification a été effectuée à l'aide du logiciel Analyst 1.5® (AB SCIEX | 500 Old Connecticut Path, Framingham, MA 01701, USA). Les concentrations obtenues sont relatives au volume de foie utilisé pour l'extraction (calculé en nanomol/g de foie).

b) Modèle de rongeur NASH

Des souris mâles C57BL/6J sont nourries avec un régime riche en graisses, complété par du saccharose et du cholestérol (ci-après dénommé "régime NASH", ND pour NASH Diet) pendant 24 semaines. Ces souris ND sont comparées à des souris avec régime normal (CD pour Chow Diet) composé de 83,9% céréales, de 4% protéines animales et 8% de protéines végétales et 4,1% de vitamines et minéraux (Référence de régime SAFE A04, Safe-Lab, Augy, France). Les caractéristiques de ce modèle murins ont précédemment été publié au laboratoire (48). L'alimentation ND entraîne une augmentation significative du poids corporel par rapport aux souris nourries au régime normal (CD pour Chow Diet) (**Figure 24A**). Elle entraîne également une augmentation significative de la taille du foie (hépatomégalie) (**Figure 24B et 24C**). L'analyse histologique du foie montre que les souris nourries au ND présentent les principales caractéristiques du NASH : micro- et macro-stéatose, infiltrats immunitaires dans le tissu parenchymateux (foyers inflammatoires), et hépatocytes amorphes dépourvus de structure hexagonale normale, semblables aux hépatocytes ballonnés (**Figure 24D**). Conformément à l'analyse histologique, les souris ND présentent des taux de triglycérides hépatiques (TG) significativement plus élevés que les souris CD. De plus, les caractéristiques histologiques des hépatocytes stressés sont accompagnées d'une augmentation significative de l'alanine aminotransférase (ALT) sérique, indiquant des dommages aux hépatocytes, chez les souris ND par rapport aux souris.

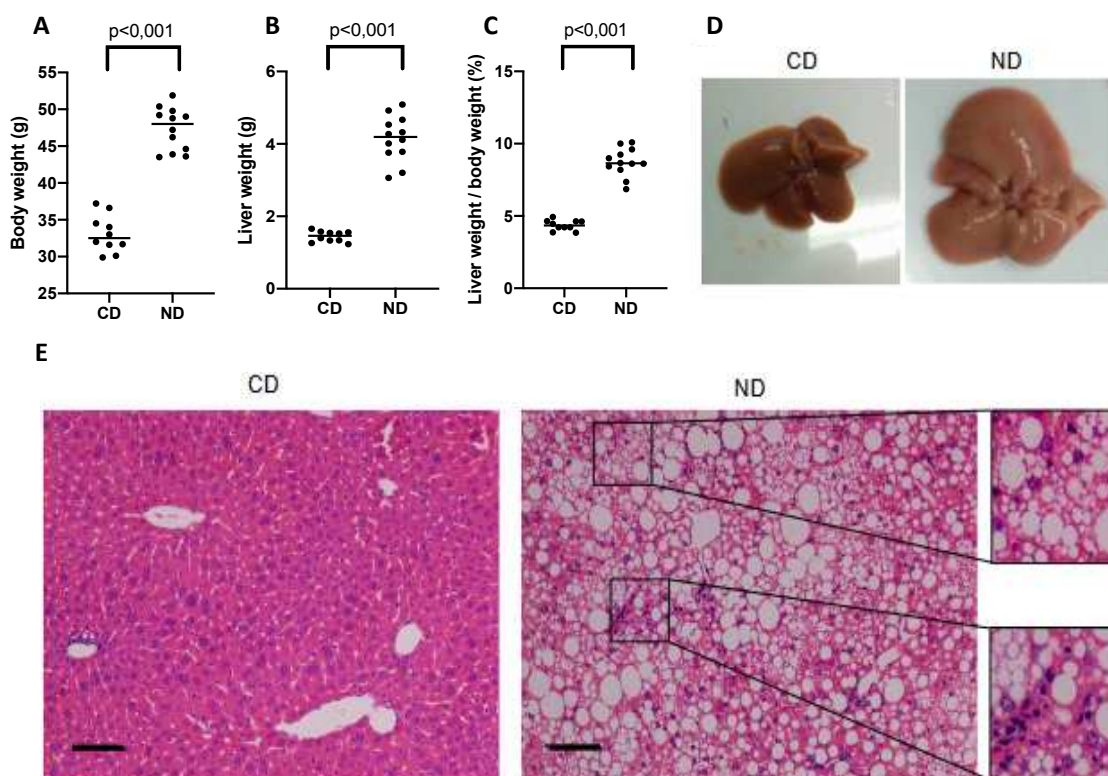


Figure 24. Modèle de souris NASH utilisé. Des souris males C57BL/6J sont nourries avec un régime alimentaire conventionnel (CD, n=10) ou un régime NASH (ND, n=12) pendant 24 semaines. Les données sont exprimées en médiane et nuages de points. La signification statistique des différences a été évaluée par un test de wilcoxon non apparié (48).

A : Poids corporel après 24 semaines d'alimentation

B : Poids du foie après 24 semaines d'alimentation

C : Poids relatif du foie après 24 semaines d'alimentation

D : Morphologie représentative du foie après 24 semaines d'alimentation

E : Histologie hépatique représentative, coloration H&E. Une souris par régime alimentaire provenant du même lot de souris est montrée à partir de trois lots indépendants de souris ayant des résultats histologiques similaires.

c) Pool des AA dans le plasma du modèle murin de NASH

Nous avons évalué tout d'abord évalué le rapport de Fisher, ce rapport comme chez les patients de la cohorte Resolve (**Figure 20A**) ne montre pas de différence significative entre les souris ND et les souris CD (**Figure 25A**), nos conditions expérimentales ne semblent donc pas y montrer un intérêt particulier dans le contexte de la NASH.

Nous avons évalué le ratio GSG plasmatique sur notre modèle et celui-ci ne montre pas de différences significatives entre les conditions expérimentales (**Figure 25B**) alors que celui-ci était augmenté dans le plasma des patients présentant une NASH (**Figure 20B**).

Concernant les AA impliqués dans le cycle de la méthionine, tout comme les patients avec NASH, la sarcosine plasmatique est significativement plus basse pour les souris ND (**Figure 25C**) et sans différence significative sur les concentrations de glycine sarcosine (**Figure 25D**). Les rapports glycine/sarcosine (**Figure 25E**) et sérine/sarcosine (**Figure 25F**) sont augmentées chez les souris ND alors qu'ils avaient seulement une tendance non significative à augmenter chez les patients NASH (**Figure 20E et 20F**).

Les variations des AA ciblés retrouvées dans le plasma des souris avec régime NASH sont donc similaires à celles retrouvées chez les patients avec NASH issus de la cohorte Resolve. Nous avons ensuite étudié ces variations métaboliques directement sur le tissu hépatique dans ce modèle murin.

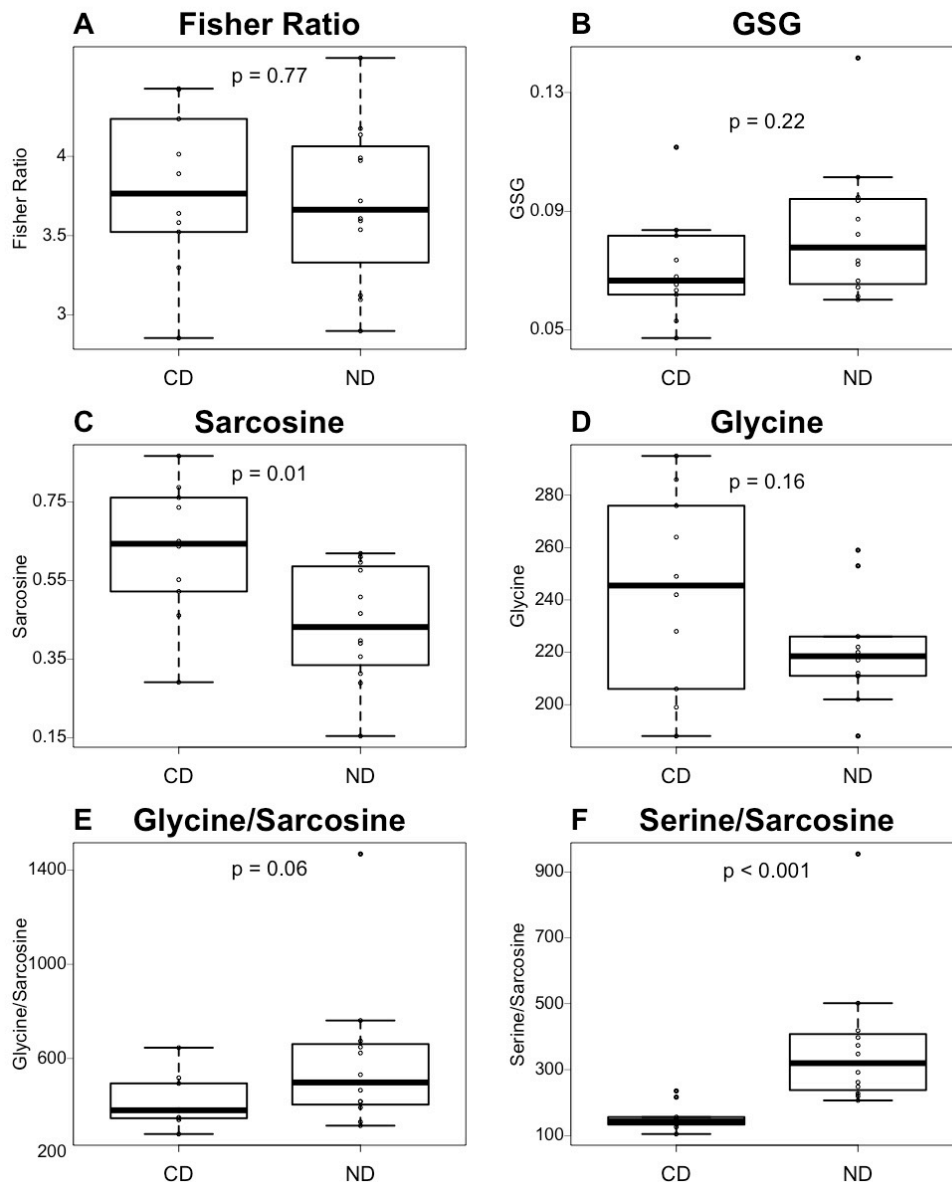


Figure 25. Concentrations en $\mu\text{mol/L}$ et rapport de concentrations d'acides aminés plasmatiques dans un modèle de souris NASH induit par régime ; Groupes de souris : régime normal « Chow Diet » (CD (n=10) ; régime NASH « NASH Diet » (ND n=12). Boxplot de répartition des concentrations d'acides aminés ramifiés ou des ratios d'acides aminés (médianes +/- IQR). Les p-values sont obtenus en utilisant le test non paramétrique de Mann-Whitney.

- A : Rapport de Fisher plasmatique en fonction du régime,
- B : Ratio GSG plasmatique en fonction du régime,
- C : Concentrations plasmatiques de sarcosine en fonction du régime
- D : Concentrations plasmatiques de glycine en fonction du régime
- E : Rapport des concentration de glycine/sarcosine plasmatique en fonction du régime,
- F : Rapport des concentration de sérine/sarcosine plasmatique en fonction du régime.

d) Pool des AA dans le foie du modèle murin de NASH

Nous avons évalué tout d'abord évalué le rapport de Fisher, comme dans le plasma des patients de la cohorte Resolve et le plasma du modèle murin (**Figure 20A et 25A**). Il n'y a pas de différence significative entre les souris ND et les souris CD (**Figure 26A**). Concernant le ratio GSG, celui-ci est significativement plus élevé dans le foie des souris CD comparé aux souris ND (**Figure 26B**), ce qui est en accord à la fois avec les données plasmatiques des patients de la cohorte Resolve et les données de la littérature sur plasma de patients atteints de NASH (88). Bien que les augmentations du GSG ne sont pas significativement pas augmentées dans le plasma des souris CD par rapport aux souris ND (**Figure 25B**), l'augmentation de ce ratio dans le foie oriente vers une implication de la synthèse du glutathion dans la physiopathologie de la NASH, ce qui est en accord avec la littérature.

Les variations des AA impliquées dans le cycle de la méthionine sont en accord à la fois avec les variations retrouvées dans le plasma des patients ainsi que dans le plasma des souris utilisées. Les variations sont par ailleurs plus importantes dans le foie par rapport au plasma avec une baisse importante des concentrations de sarcosine (**Figure 26C**) et de glycine (**Figure 26D**) chez les souris ND par rapport aux souris CD. Les rapports glycine/sarcosine (**Figure 26E**) et sérine/sarcosine (**Figure 26F**) sont également significativement plus augmentées chez les souris ND ce qui est en accord avec les hypothèses que nous avons formulées sur l'implication probable du métabolisme de la sarcosine et de la méthylation dans la physiopathologie de la NASH.

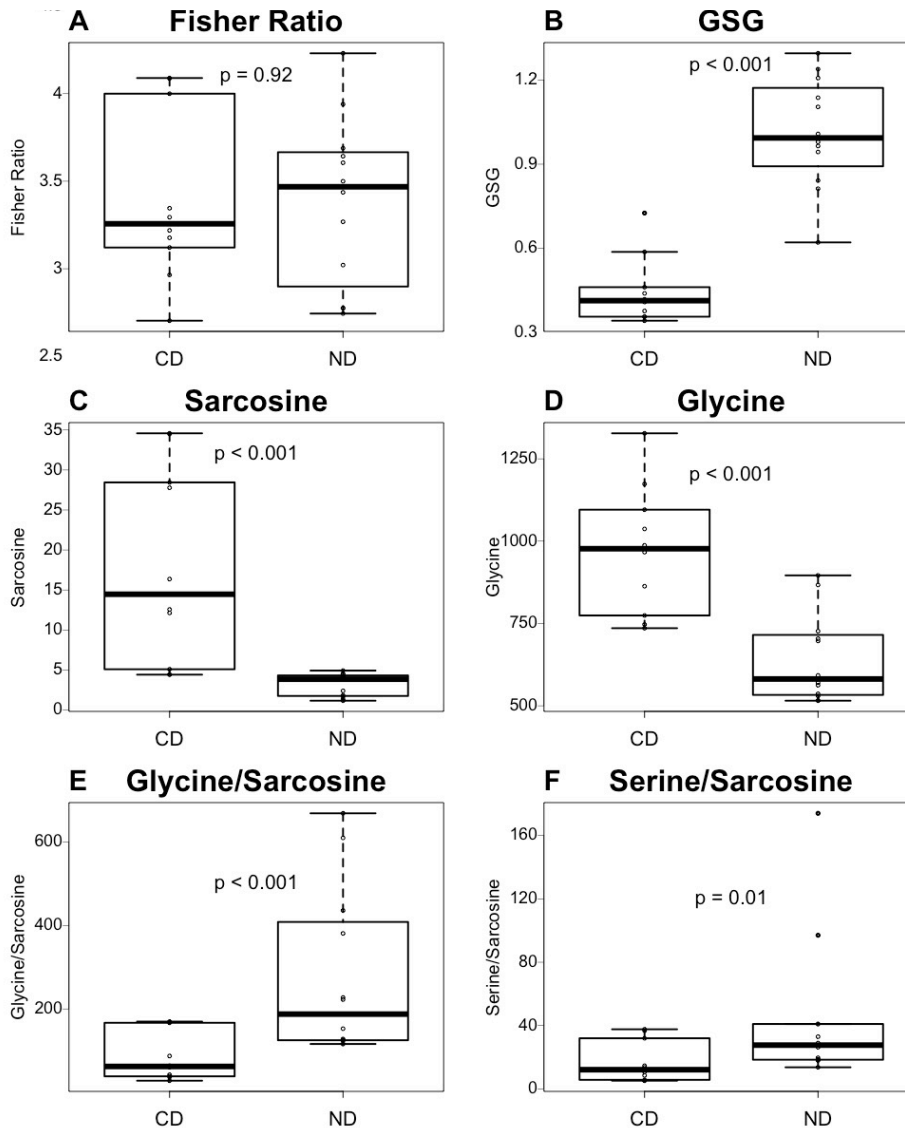


Figure 26. Concentrations en nmol/g de foie et rapport de concentrations d'acides aminés hépatique dans un modèle de souris NASH induit par régime ; Groupes de souris : régime normal « Chow Diet » (CD (n=10) ; régime NASH « NASH Diet » (ND n=12). Boxplot de répartition des concentrations d'acides aminés ou des ratios d'acides aminés (médianes +/- IQR). Les p-values sont obtenus en utilisant le test non paramétrique de Mann-Whitney.

- A : Rapport de Fisher hépatique en fonction du régime
- B : Ratio GSG plasmatique en fonction du régime
- C : Concentrations hépatiques de sarcosine en fonction du régime
- D : Concentrations hépatiques de glycine en fonction du régime
- E : Rapport des concentrations de glycine/sarcosine hépatiques en fonction du régime
- F : Rapport des concentrations de sérine/sarcosine hépatiques en fonction du régime.

Au total, les variations des AA retrouvées dans le plasma et dans le foie du modèles de souris sont en accord à la fois avec les variations retrouvées chez les patients ainsi qu'avec les données de la littérature. Ce modèle présente donc un intérêt dans l'étude des variations du cycle de la méthionine dans un contexte de NASH.

e) Hypothèses et perspectives

Tout d'abord, les données de métabolomique hépatiques sur rongeurs seront à confronter aux données de métabolomique hépatiques qui seront réalisées dans la cohorte de patients ABOS (**Partie VI** du manuscrit). Nous prévoyons également de réaliser le transcriptome hépatique ciblée sur le modèle de rongeurs afin de confirmer l'implication des mêmes gènes dans la dérégulation hépatique observée (*GNMT*). Ensuite, des intermédiaires métaboliques supplémentaires d'intérêt seront dosés afin de permettre une exploration complète du cycle de la méthionine. D'une part le rapport SAMe/SAH permettra une évaluation directe de la méthylation et d'autre part le dosage du glutathion évaluera l'impact sur sa synthèse. Nous prévoyons de mettre au point ces dosages grâce à une adaptation du kit aTraQ (dont le réactif permet de dériver les composés comportant des amines primaires et ou secondaires).

Nous souhaitons également réaliser les dosages de l'homocystéine sur plasma et tissu hépatique dans le contexte des explorations des métabolites du cycle de la méthionine. En effet, des variations d'homocystéine ont été rapportées dans les études de cohortes dans le contexte de la NASH mais les résultats sont discordants entre les études (**Manuscrit 3**). Par ailleurs, l'activation de PPAR α par le fénofibrate a montré dans un modèle murin et chez l'Homme une augmentation de l'homocystéine plasmatique indépendante d'une altération de la fonction rénale (174) (**Figure 27**). De plus, une diminution de l'expression hépatique du

récepteur nucléaire PPAR α est observée chez les patients présentant une NASH (33) (**Figure 27**). L'homocystéine étant un paramètre central dans le cycle de la méthionine, nous émettons l'hypothèse que ce changement puisse être le reflet d'une dysfonction du cycle de la méthionine. Nous souhaitons donc déterminer si les modifications du cycle de la méthionine observées dans un contexte de NASH sont régulées par PPAR α (**Figure 27**).

Dans ce but, nous souhaitons étudier d'une part les modifications d'acides aminés plasmatiques et hépatiques impliqués dans le cycle de la méthionine sur des modèles murins NASH induits par régime avec perte d'expression spécifique de PPAR α dans le foie en regard des modifications d'expression des gènes impliqués dans ce métabolisme (**Figure 27**).

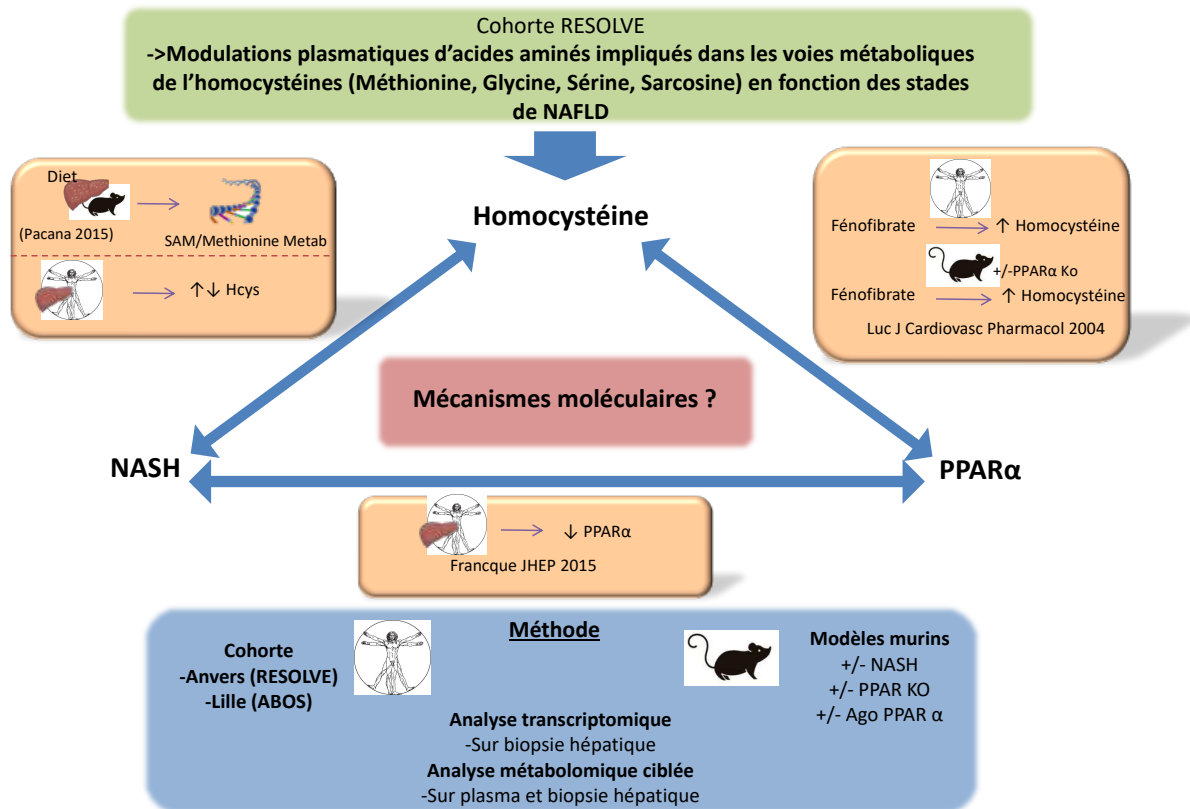


Figure 27. Hypothèses de travail sur le lien entre PPARα, NASH et cycle de la méthionine. Nous souhaitons déterminer si les modifications du cycle de la méthionine observées dans un contexte de NASH sont régulées par PPARα. Nous souhaitons étudier les modifications d'acides aminés plasmatiques et hépatiques impliqués dans le cycle de la méthionine à la fois sur cohorte humaine et à la fois sur des modèles murins NASH induits par régime avec perte d'expression spécifique de PPARα dans le foie en regard des modifications d'expression des gènes impliqués dans ce métabolisme.

Nous prévoyons également d'explorer chez les patients et dans nos modèles, les données de métabolomique ciblée en regard des données de transcriptomique hépatique en rapport avec les autres cycles métaboliques impliquant les AA et ayant un intérêt dans la NAFLD tels que le cycle de l'urée (avec glutamine, ornithine, citrulline et arginine) et le cycle de Krebs (via les AA anaplérotiques et cataplérotiques).

C. Métabolomique non ciblée

1. Objectifs

La métabolomique non ciblée est une approche dite holistique ou globale sans a priori dont le but est de détecter le maximum de métabolites possibles. La méthode analytique est donc très large, doit être très résolutive et nécessite des étapes de normalisation entre les échantillons (175). Cette approche a été utilisée dans plusieurs études afin de mettre en avant des profils métaboliques particuliers dans la pathogénie de la NASH (176–180). Certaines de ces études sont néanmoins limitées par le faible effectif de patients étudiés, par une caractérisation des patients NASH pouvant induire des biais (notamment les patients NASH dits « borderline » selon le NAS score), et également par l'insulino-résistance très souvent augmentée chez les patients présentant une NASH, IR qui *per se*, peut induire des modifications métaboliques. Les résultats métabolomiques peuvent donc être imputés à ces différents biais. Nous souhaitons donc entreprendre une analyse métabolomique globale sur une cohorte bien caractérisée.

Ce travail s'inscrit dans du projet PreciNASH. Ce projet est porté par la fédération hospitalo-universitaire INTEGRA et rassemble des équipes de l'EGID (dont le laboratoire d'accueil est membre fondateur) et de Sanofi. Le but est l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques dans la NASH. L'étude PreciNASH permet l'accès à un nombre important d'échantillons de foie et de sérum issus de cohortes de plus de 1000 patients couvrant le spectre complet de la maladie, depuis le foie normal jusque l'hépatite stéatosique. Dans le projet PreciNASH, nous souhaitons réaliser des analyses métabolomiques non ciblées à la fois sur plasma et sur biopsies hépatiques humaines issues de la cohorte ABOS. Ces analyses rentrent dans le cadre

d'un projet global qui comprend également des analyses génomiques et transcriptomiques sur des biopsies hépatiques réalisées par d'autres équipes du consortium. Ces données seront combinées ensemble en approche « trans-omics » afin de contribuer à la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la NASH.

2. Méthodes

a. Cohorte

Les patients ont été sélectionnés parmi les échantillons disponibles dans la cohorte ABOS. Les patients sont sélectionnés selon les données clinico-biologiques afin que les individus soient comparables pour l'homéostasie glucidique et l'IMC.

b. Méthodologie analytique

Le choix de la plateforme analytique a été l'objet d'un appel offre européen en vue d'identifier un prestataire capable de réaliser de la métabolomique non ciblée sur plasma et foie humain et capable d'identifier plus de 600 métabolites différents. Suite à la parution de l'appel d'offre et aux analyses des différentes offres reçues, et après 14 mois de démarche, l'analyse sera réalisée par LC-MS en collaboration avec la plateforme de métabolomique « Metabolon » basée aux USA. Un contrôle de qualité sera préparé en prélevant une petite partie de chaque échantillon pour élaborer un pool global. Cet échantillon est analysé à intervalles réguliers tout au long de l'analyse en tant que contrôle de qualité interne.

c. Analyses statistiques

Les analyses statistiques seront effectuées à l'aide du logiciel statistique R version 3.4.3 (R Core Team, Vienna, Austria). Les comparaisons intergroupes de variables quantitatives seront

effectuées à l'aide du test paramétrique de l'ANOVA et du test non paramétrique de Kruskal-Wallis. La signification statistique est considérée lorsque $P < 0,05$. Les analyses multivariées seront réalisées selon deux méthodologies statistiques. La première méthodologie est l'analyse en composantes principales obtenue grâce aux modules R *FactoMineR* et *factoextra*. Elle permet une analyse globale de l'ensemble des métabolites afin d'identifier des groupes de métabolites permettant de discriminer les groupes de patients. La seconde méthodologie repose sur l'utilisation des arbres de régression en forêt aléatoire obtenue grâce au module R *randomForest*. A l'inverse de la première méthodologie, elle permet une analyse globale qui identifie un à un les métabolites les plus discriminants des groupes choisis. Concernant la modélisation trans-omics, le module R *mixOmics* sera utilisé. Il s'agit d'un *package* développé à Toulouse, qui combine 17 méthodologies multivariées.

IV. Conclusion générale

L'utilisation de la métabolomique nous a permis d'une part de mieux caractériser les interactions complexes autour de la NASH telles que l'impact de l'IR et du sexe sur les variations métaboliques concernant les AB et les AA à la fois en qualité de biomarqueur. Cependant nos travaux montrent la difficulté d'utiliser ces métabolites en qualité de biomarqueur. En effet, dans des modèles ou des cohortes contrôlées, nous observons les variations escomptées mais ces variations peuvent être biaisées par de nombreux facteurs confondants dans la population générale. Leur utilisation peut cependant être utile en intégration dans des scores diagnostics tels que ceux présentés en introduction. D'autre part, grâce à la métabolomique nous avons pu identifier des variations plasmatiques d'AA en cas de NASH chez des patients qui ont été confirmées dans un modèle murin et permet de tester des hypothèses mécanistiques quant à la progression de la NAFLD. Ces mécanismes en lien avec les perturbations du cycle de la reméthylation pourront alors être explorés au laboratoire dans des modèles pré-cliniques.

L'utilisation de la métabolomique permet une analyse à un temps donné sur un nombre précis de métabolites. Nous avons cependant constaté des connexions nombreuses entre cycles métaboliques (notamment les AA). Ce constat nous incite à considérer l'étude du métabolome à la fois dans son ensemble par des techniques non ciblées mais également par des processus dynamiques tels que la fluxomics et l'intégrations aux autres données omics.

V. Références

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(1):73–84.
2. 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 Jan;15(1):11–20.
3. Sheka AC, Adeyi O, Thompson J, Hameed B, Crawford PA, Ikramuddin S. Nonalcoholic Steatohepatitis: A Review. *JAMA*. 2020 Mar 24;323(12):1175–83.
4. La santé de 200 000 volontaires suivie par l'Inserm [Internet]. Salle de presse | Inserm. 2019 [cited 2020 Sep 11]. Available from: <https://presse.inserm.fr/la-sante-de-200-000-volontaires-suivie-par-linserm/34933/>
5. Younossi Z, Tacke F, Arrese M, Sharma BC, Mostafa I, Bugianesi E, et al. Global Perspectives on Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology*. 2019;69(6):2672–82.
6. Younossi ZM. Non-alcoholic fatty liver disease – A global public health perspective. *J Hepatol*. 2019 Mar 1;70(3):531–44.

7. Younossi ZM, Golabi P, Avila L de, Paik JM, Srishord M, Fukui N, et al. The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol*. 2019 Oct 1;71(4):793–801.
8. Fabbrini E, Sullivan S, Klein S. Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Biochemical, Metabolic and Clinical Implications. *Hepatol Baltim Md*. 2010 Feb;51(2):679–89.
9. Musso G, Gambino R, Cassader M, Pagano G. Meta-analysis: Natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. *Ann Med*. 2011 Dec 1;43(8):617–49.
10. Leake I. NAFLD and risk of cardiovascular disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019 Dec;16(12):706–706.
11. Lonardo A, Ballestri S, Targher G, Loria P. Diagnosis and management of cardiovascular risk in nonalcoholic fatty liver disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015 May 4;9(5):629–50.
12. Armstrong MJ, Adams LA, Canbay A, Syn W-K. Extrahepatic complications of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2014;59(3):1174–97.
13. Lonardo A, Nascimbeni F, Mantovani A, Targher G. Hypertension, diabetes, atherosclerosis and NASH: Cause or consequence? *J Hepatol*. 2018 Feb 1;68(2):335–52.
14. Sirota JC, McFann K, Targher G, Chonchol M, Jalal DI. Association between Nonalcoholic Liver Disease and Chronic Kidney Disease: An Ultrasound Analysis from NHANES 1988–1994. *Am J Nephrol*. 2012;36(5):466–71.

15. Herinirina NF, Rajaonarison LHNON, Herijoelison AR, Ahmad A. Epaisseur de l'intima-média carotidienne et facteurs de risque cardio-vasculaires. *Pan Afr Med J.* 2015 Jun 24;21.
16. 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 Baltim Md.* 2018 Jan;67(1):123–33.
17. Haas JT, Francque S, Staels B. Pathophysiology and Mechanisms of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Annu Rev Physiol.* 2016;78(1):181–205.
18. Rinella ME. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review. *JAMA.* 2015 Jun 9;313(22):2263–73.
19. Eslam M, Sanyal AJ, George J. MAFLD: A consensus-driven proposed nomenclature for metabolic associated fatty liver disease. *Gastroenterology.* 2020 Feb 7;0(0).
20. Parker R. The role of adipose tissue in fatty liver diseases. *Liver Res.* 2018 Mar 1;2(1):35–42.
21. Chiu S, Mulligan K, Schwarz J-M. Dietary carbohydrates and fatty liver disease: de novo lipogenesis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2018 Jul;21(4):277–282.
22. Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest.* 2008 Mar 3;118(3):829–38.

23. Martin S, Parton RG. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 May;7(5):373–8.
24. Baumann K. Lipid droplets from the inside. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018 Aug;19(8):486–7.
25. Jarc E, Petan T. A twist of FATE: Lipid droplets and inflammatory lipid mediators. *Biochimie.* 2020 Feb 1;169:69–87.
26. Olzmann JA, Carvalho P. Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019 Mar;20(3):137–55.
27. Gluchowski NL, Becuwe M, Walther TC, Farese RV. Lipid droplets and liver disease: from basic biology to clinical implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017 Jun;14(6):343–55.
28. Pougovkina O, te Brinke H, Ofman R, van Cruchten AG, Kulik W, Wanders RJA, et al. Mitochondrial protein acetylation is driven by acetyl-CoA from fatty acid oxidation. *Hum Mol Genet.* 2014 Jul 1;23(13):3513–22.
29. McDonnell E, Crown SB, Fox DB, Kitir B, Ilkayeva OR, Olsen CA, et al. Lipids Reprogram Metabolism to Become a Major Carbon Source for Histone Acetylation. *Cell Rep.* 2016 Nov 1;17(6):1463–72.
30. Lee JH, Friso S, Choi S-W. Epigenetic Mechanisms Underlying the Link between Non-Alcoholic Fatty Liver Diseases and Nutrition. *Nutrients.* 2014 Aug 21;6(8):3303–25.

31. Tailleux A, Wouters K, Staels B. Roles of PPARs in NAFLD: Potential therapeutic targets. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids*. 2012 May 1;1821(5):809–18.
32. Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, Remaley AT, Neve B, Torra IP, et al. PPAR- α and PPAR- γ activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat Med*. 2001 Jan;7(1):53–8.
33. Francque S, Verrijken A, Caron S, Prawitt J, Paumelle R, Derudas B, et al. PPAR α gene expression correlates with severity and histological treatment response in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*. 2015 Jul 1;63(1):164–73.
34. Régnier M, Polizzi A, Smati S, Lukowicz C, Fougerat A, Lippi Y, et al. Hepatocyte-specific deletion of Ppar α promotes NAFLD in the context of obesity. *Sci Rep*. 2020 Apr 16;10(1):6489.
35. Nan Y-M, Han F, Kong L-B, Zhao S-X, Wang R-Q, Wu W-J, et al. Adenovirus-mediated peroxisome proliferator activated receptor gamma overexpression prevents nutritional fibrotic steatohepatitis in mice. *Scand J Gastroenterol*. 2011 Mar 1;46(3):358–69.
36. Wu CW, Chu ESH, Lam CNY, Cheng ASL, Lee CW, Wong VWS, et al. PPAR γ is essential for protection against nonalcoholic steatohepatitis. *Gene Ther*. 2010 Jun;17(6):790–8.
37. Peterson TR, Sengupta SS, Harris TE, Carmack AE, Kang SA, Balderas E, et al. mTOR Complex 1 Regulates Lipin 1 Localization to Control the SREBP Pathway. *Cell*. 2011 Aug 5;146(3):408–20.

38. Chen H. Nutrient mTORC1 signaling contributes to hepatic lipid metabolism in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Res.* 2020 Mar 1;4(1):15–22.
39. Eslam M, Valenti L, Romeo S. Genetics and epigenetics of NAFLD and NASH: Clinical impact. *J Hepatol.* 2018 Feb 1;68(2):268–79.
40. Sliz E, Sebert S, Würtz P, Kangas AJ, Soininen P, Lehtimäki T, et al. NAFLD risk alleles in PNPLA3, TM6SF2, GCKR and LYPLAL1 show divergent metabolic effects. *Hum Mol Genet.* 2018 Jun 15;27(12):2214–23.
41. Prill S, Caddeo A, Baselli G, Jamialahmadi O, Dongiovanni P, Rametta R, et al. The TM6SF2 E167K genetic variant induces lipid biosynthesis and reduces apolipoprotein B secretion in human hepatic 3D spheroids. *Sci Rep.* 2019 Aug 12;9(1):11585.
42. Machado MV, Michelotti GA, Pereira T de A, Boursier J, Kruger L, Swiderska-Syn M, et al. Reduced lipoapoptosis, hedgehog pathway activation and fibrosis in caspase-2 deficient mice with non-alcoholic steatohepatitis. *Gut.* 2015 Jul 1;64(7):1148–57.
43. Peng K-Y, Watt MJ, Rensen S, Greve JW, Huynh K, Jayawardana KS, et al. Mitochondrial dysfunction-related lipid changes occur in nonalcoholic fatty liver disease progression. *J Lipid Res.* 2018 Jan 10;59(10):1977–86.
44. Masarone M, Rosato V, Dallio M, Gravina AG, Aglitti A, Loguercio C, et al. Role of Oxidative Stress in Pathophysiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2018 Jun 11;2018.

45. Vercesi AE, Castilho RF, Kowaltowski AJ, de Oliveira HCF, de Souza-Pinto NC, Figueira TR, et al. Mitochondrial calcium transport and the redox nature of the calcium-induced membrane permeability transition. *Free Radic Biol Med*. 2018 Dec 1;129:1–24.
46. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. *Antioxid Redox Signal*. 2014 Mar 1;20(7):1126–67.
47. Oates JR, McKell MC, Moreno-Fernandez ME, Damen MSMA, Deepe GS, Qualls JE, et al. Macrophage Function in the Pathogenesis of Non-alcoholic Fatty Liver Disease: The Mac Attack. *Front Immunol*. 2019 Dec 12;10.
48. Haas JT, Vonghia L, Mogilenko DA, Verrijken A, Molendi-Coste O, Fleury S, et al. Transcriptional Network Analysis Implicates Altered Hepatic Immune Function in NASH development and resolution. *Nat Metab*. 2019 Jun;1(6):604–14.
49. Hoffmann C, Djerir NEH, Danckaert A, Fernandes J, Roux P, Charrueau C, et al. Hepatic stellate cell hypertrophy is associated with metabolic liver fibrosis. *Sci Rep*. 2020 Mar 2;10.
50. Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017 Jul;14(7):397–411.
51. Hou W, Syn W-K. Role of Metabolism in Hepatic Stellate Cell Activation and Fibrogenesis. *Front Cell Dev Biol*. 2018;6.
52. Bobowski-Gerard M, Zummo FP, Staels B, Lefebvre P, Eeckhoutte J. Retinoids Issued from Hepatic Stellate Cell Lipid Droplet Loss as Potential Signaling Molecules Orchestrating a Multicellular Liver Injury Response. *Cells*. 2018 Sep 13;7(9).

53. Schuster S, Cabrera D, Arrese M, Feldstein AE. Triggering and resolution of inflammation in NASH. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018 Jun;15(6):349–64.
54. Challa TD, Wueest S, Lucchini FC, Dedual M, Modica S, Borsigova M, et al. Liver ASK1 protects from non-alcoholic fatty liver disease and fibrosis. *EMBO Mol Med*. 2019 Oct;11(10).
55. Wang Y, Shi M, Fu H, Xu H, Wei J, Wang T, et al. Mammalian target of the rapamycin pathway is involved in non-alcoholic fatty liver disease. *Mol Med Rep*. 2010 Nov 1;3(6):909–15.
56. Afonso MB, Rodrigues PM, Carvalho T, Caridade M, Borralho P, Cortez-Pinto H, et al. Necroptosis is a key pathogenic event in human and experimental murine models of non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Sci*. 2015 Oct 1;129(8):721–39.
57. Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Predictors of Nonalcoholic Steatohepatitis and Liver Fibrosis in the Severely Obese. *Gastroenterology*. 2001 Jul 1;121(1):91–100.
58. Brunt EM, Janney CG, Bisceglie AMD, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol*. 1999 Sep;94(9):2467–74.
59. 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 Jun 1;41(6):1313–21.

60. Bedossa P. Current histological classification of NAFLD: strength and limitations. *Hepatology Int.* 2013 Dec 1;7(2):765–70.
61. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 1996;24(2):289–93.
62. Takahashi Y, Fukusato T. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol.* 2014 Nov 14;20(42):15539–48.
63. Campos GM, Bambha K, Vittinghoff E, Rabl C, Posselt AM, Ciovica R, et al. A clinical scoring system for predicting nonalcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Hepatology.* 2008;47(6):1916–23.
64. Bedossa P, Poitou C, Veyrie N, Bouillot J-L, Basdevant A, Paradis V, et al. Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology.* 2012;56(5):1751–9.
65. Winkfield B, Aubé C, Burtin P, Calès P. Inter-observer and intra-observer variability in hepatology. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2003 Sep;15(9):959–966.
66. Pournik O, Alavian SM, Ghalichi L, Seifizarei B, Mehrnoush L, Aslani A, et al. Inter-observer and Intra-observer Agreement in Pathological Evaluation of Non-alcoholic Fatty Liver Disease Suspected Liver Biopsies. *Hepat Mon.* 2014 Jan 3;14(1).
67. Ratziu V, Charlotte F, Heurtier A, Gombert S, Giral P, Bruckert E, et al. Sampling Variability of Liver Biopsy in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology.* 2005 Jun 1;128(7):1898–906.

68. Li Q, Dhyani M, Grajo JR, Sirlin C, Samir AE. Current status of imaging in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol.* 2018 Aug 27;10(8):530–42.
69. Shannon A, Alkhouri N, Carter-Kent C, Monti L, Devito R, Lopez R, et al. Ultrasonographic Quantitative Estimation of Hepatic Steatosis in Children with Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2011 Aug;53(2):190–5.
70. Pickhardt PJ, Hahn L, del Rio AM, Park SH, Reeder SB, Said A. Natural History of Hepatic Steatosis: Observed Outcomes for Subsequent Liver and Cardiovascular Complications. *Am J Roentgenol.* 2014 Mar 24;202(4):752–8.
71. Fritz GA, Schoellnast H, Deutschmann HA, Wiltgen M, Brader P, Berghold A, et al. Density Histogram Analysis of Unenhanced Hepatic Computed Tomography in Patients With Diffuse Liver Diseases. *J Comput Assist Tomogr.* 2006 Apr;30(2):201–205.
72. Friedrich-Rust M, Wunder K, Kriener S, Sotoudeh F, Richter S, Bojunga J, et al. Liver Fibrosis in Viral Hepatitis: Noninvasive Assessment with Acoustic Radiation Force Impulse Imaging versus Transient Elastography. *Radiology.* 2009 Aug 1;252(2):595–604.
73. Lee HW, Park SY, Kim SU, Jang JY, Park H, Kim JK, et al. Discrimination of Nonalcoholic Steatohepatitis Using Transient Elastography in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *PLOS ONE.* 2016 Jun 10;11(6):e0157358.
74. Caussy C, Chen J, Alquraish MH, Cepin S, Nguyen P, Hernandez C, et al. Association Between Obesity and Discordance in Fibrosis Stage Determination by Magnetic Resonance

- vs Transient Elastography in Patients With Nonalcoholic Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2018 Dec 1;16(12):1974-1982.e7.
75. Wong VW-S, Adams LA, de Lédinghen V, Wong GL-H, Sookoian S. Noninvasive biomarkers in NAFLD and NASH — current progress and future promise. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018 Aug;15(8):461–78.
76. Mamas M, Dunn WB, Neyses L, Goodacre R. The role of metabolites and metabolomics in clinically applicable biomarkers of disease. *Arch Toxicol*. 2011 Jan;85(1):5–17.
77. Cheah MC, McCullough AJ, Goh GB-B. Current Modalities of Fibrosis Assessment in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *J Clin Transl Hepatol*. 2017 Jun 24;5(3):261–71.
78. 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 Dec;6(1):1–7.
79. Fedchuk L, Nascimbeni F, Pais R, Charlotte F, Housset C, Ratziu V. Performance and limitations of steatosis biomarkers in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014;40(10):1209–22.
80. Lee J-H, Kim D, Kim HJ, Lee C-H, Yang JI, Kim W, et al. Hepatic steatosis index: A simple screening tool reflecting nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Liver Dis*. 2010 Jul 1;42(7):503–8.

81. Poynard T, Lassailly G, Diaz E, Clement K, Caiazzo R, Tordjman J, et al. Performance of Biomarkers FibroTest, ActiTest, SteatoTest, and NashTest in Patients with Severe Obesity: Meta Analysis of Individual Patient Data. *PLoS ONE*. 2012 Mar 14;7(3).
82. Angulo P, Hui JM, Marchesini G, Bugianesi E, George J, Farrell GC, et al. The NAFLD fibrosis score: A noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology*. 2007;45(4):846–54.
83. Feldstein AE, Wieckowska A, Lopez AR, Liu Y-C, Zein NN, McCullough AJ. Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarker for nonalcoholic steatohepatitis: A multicenter validation study. *Hepatology*. 2009 Oct;50(4):1072–8.
84. 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 Jan 1;60(1):167–74.
85. Ajmera V, Perito ER, Bass NM, Terrault NA, Yates KP, Gill R, et al. Novel plasma biomarkers associated with liver disease severity in adults with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2017;65(1):65–77.
86. Puri P, Daita K, Joyce A, Mirshahi F, Santhekadur PK, Cazanave S, et al. The presence and severity of nonalcoholic steatohepatitis is associated with specific changes in circulating bile acids. *Hepatology*. 67(2):534–48.

87. Lake AD, Novak P, Shipkova P, Aranibar N, Robertson DG, Reily MD, et al. Branched chain amino acid metabolism profiles in progressive human nonalcoholic fatty liver disease. *Amino Acids*. 2015 Mar;47(3):603–15.
88. Gaggini M, Carli F, Rosso C, Buzzigoli E, Marietti M, Latta VD, et al. Altered amino acid concentrations in NAFLD: Impact of obesity and insulin resistance. *Hepatology*. 2018 Jan 1;67(1):145–58.
89. Newgard CB, An J, Bain JR, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Lien LF, et al. A Branched-Chain Amino Acid-Related Metabolic Signature that Differentiates Obese and Lean Humans and Contributes to Insulin Resistance. *Cell Metab*. 2009 Apr;9(4):311–26.
90. Chávez-Talavera O, Haas J, Grzych G, Tailleux A, Staels B. Bile acid alterations in nonalcoholic fatty liver disease, obesity, insulin resistance and type 2 diabetes: what do the human studies tell? *Curr Opin Lipidol*. 2019 Jun;30(3):244–54.
91. Francque S, Vonghia L. The future of diagnosing NASH - could a simple blood test be the key? *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017 Sep 1;0(0):1–3.
92. Peoc'h K, Castera L. Les marqueurs non invasifs de fibrose pour le dépistage des patients atteints de stéatopathie métabolique (NAFLD) : un rôle majeur pour tous les biologistes. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2019 Mar 1;77(2):125–7.
93. Wang X, Li J, Riaz DR, Shi G, Liu C, Dai Y. Outcomes of Liver Transplantation for Nonalcoholic Steatohepatitis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014 Mar 1;12(3):394-402.e1.

94. Wong VW-S, Chan RS-M, Wong GL-H, Cheung BH-K, Chu WC-W, Yeung DK-W, et al. Community-based lifestyle modification programme for non-alcoholic fatty liver disease: a randomized controlled trial. *J Hepatol.* 2013 Sep;59(3):536–42.
95. Schauer PR, Bhatt DL, Kirwan JP, Wolski K, Aminian A, Brethauer SA, et al. Bariatric Surgery versus Intensive Medical Therapy for Diabetes — 5-Year Outcomes. *N Engl J Med.* 2017 Feb 15;376(7):641–51.
96. Salminen P, Helmiö M, Ovaska J, Juuti A, Leivonen M, Peromaa-Haavisto P, et al. Effect of Laparoscopic Sleeve Gastrectomy vs Laparoscopic Roux-en-Y Gastric Bypass on Weight Loss at 5 Years Among Patients With Morbid Obesity: The SLEEVEPASS Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2018 Jan 16;319(3):241–54.
97. Cornejo-Pareja I, Clemente-Postigo M, Tinahones FJ. Metabolic and Endocrine Consequences of Bariatric Surgery. *Front Endocrinol.* 2019 Sep 19;10.
98. Verhaeghe R, Zerrweck C, Hubert T, Tréchet B, Gmyr V, D’Herbomez M, et al. Gastric Bypass Increases Postprandial Insulin and GLP-1 in Nonobese Minipigs. *Eur Surg Res.* 2014;52(1–2):41–9.
99. Baud G, Daoudi M, Hubert T, Raverdy V, Pigeyre M, Hervieux E, et al. Bile Diversion in Roux-en-Y Gastric Bypass Modulates Sodium-Dependent Glucose Intestinal Uptake. *Cell Metab.* 2016 Mar 8;23(3):547–53.
100. Samczuk P, Ciborowski M, Kretowski A. Application of Metabolomics to Study Effects of Bariatric Surgery. *J Diabetes Res.* 2018 Mar 11;2018.

101. Luo P, Yu H, Zhao X, Bao Y, Hong CS, Zhang P, et al. Metabolomics Study of Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery (RYGB) to Treat Type 2 Diabetes Patients Based on Ultraperformance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J Proteome Res*. 2016 Apr 1;15(4):1288–99.
102. Bojsen-Møller KN, Jacobsen SH, Dirksen C, Jørgensen NB, Reitelseder S, Jensen J-EB, et al. Accelerated protein digestion and amino acid absorption after Roux-en-Y gastric bypass. *Am J Clin Nutr*. 2015 Sep 1;102(3):600–7.
103. Magkos F, Bradley D, Schweitzer GG, Finck BN, Eagon JC, Ilkayeva O, et al. Effect of Roux-en-Y Gastric Bypass and Laparoscopic Adjustable Gastric Banding on Branched-Chain Amino Acid Metabolism. *Diabetes*. 2013 Aug 1;62(8):2757–61.
104. Bariatric surgery [Internet]. ENT Wellbeing Sydney. 2015 [cited 2020 Sep 18]. Available from: <https://www.entwellbeing.com.au/bariatric-surgery/>
105. Lassailly G, Caiazzo R, Buob D, Pigeyre M, Verkindt H, Labreuche J, et al. Bariatric Surgery Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis in Morbidly Obese Patients. *Gastroenterology*. 2015 Aug 1;149(2):379–88.
106. Laursen TL, Hagemann CA, Wei C, Kazankov K, Thomsen KL, Knop FK, et al. Bariatric surgery in patients with non-alcoholic fatty liver disease - from pathophysiology to clinical effects. *World J Hepatol*. 2019 Feb 27;11(2):138–49.
107. Alvarez-Leite JI. Nutrient deficiencies secondary to bariatric surgery. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2004 Sep;7(5):569–575.

108. Nielsen JB, Pedersen AM, Gribsholt SB, Svensson E, Richelsen B. Prevalence, severity, and predictors of symptoms of dumping and hypoglycemia after Roux-en-Y gastric bypass. *Surg Obes Relat Dis*. 2016 Sep 1;12(8):1562–8.
109. Nagem RG, Lázaro-da-Silva A, de Oliveira RM, Morato VG. Gallstone-related complications after Roux-en-Y gastric bypass: a prospective study. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2012 Dec 1;11(6):630–5.
110. Coffin B, Maunoury V, Pattou F, Hébuterne X, Schneider S, Coupaye M, et al. Impact of Intra-gastric Balloon Before Laparoscopic Gastric Bypass on Patients with Super Obesity: a Randomized Multicenter Study. *Obes Surg*. 2017 Apr 1;27(4):902–9.
111. Justinussen T, Madsbad S, Holst JJ, Bojsen-Møller KN. Pros and cons of Roux en-Y gastric bypass surgery in obese patients with type 2 diabetes. *Expert Rev Endocrinol Metab*. 2019 Jul 4;14(4):243–57.
112. Bettini S, Belligoli A, Fabris R, Busetto L. Diet approach before and after bariatric surgery. *Rev Endocr Metab Disord*. 2020 Jul 31;3(21):297–306.
113. Esteban JPG, Asgharpour A. Pharmacologic Treatment Strategies for Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterol Clin North Am*. 2020 Mar 1;49(1):105–21.
114. Neuschwander-Tetri BA, Loomba R, Sanyal AJ, Lavine JE, Van Natta ML, Abdelmalek MF, et al. Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2015 Mar 14;385(9972):956–65.

115. Younossi ZM, Ratziu V, Loomba R, Rinella M, Anstee QM, Goodman Z, et al. Obeticholic acid for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: interim analysis from a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *The Lancet*. 2019 Dec 14;394(10215):2184–96.
116. Carbone LJ, Angus PW, Yeomans ND. Incretin-based therapies for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2016;31(1):23–31.
117. Armstrong MJ, Gaunt P, Aithal GP, Barton D, Hull D, Parker R, et al. Liraglutide safety and efficacy in patients with non-alcoholic steatohepatitis (LEAN): a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 study. *The Lancet*. 2016 Feb 13;387(10019):679–90.
118. Loomba R, Lawitz E, Mantry PS, Jayakumar S, Caldwell SH, Arnold H, et al. The ASK1 inhibitor selonsertib in patients with nonalcoholic steatohepatitis: A randomized, phase 2 trial. *Hepatology* Baltim Md. 2018 Feb;67(2):549–59.
119. Harrison SA, Wong VW-S, Okanoue T, Bzowej N, Vuppalanchi R, Younes Z, et al. Selonsertib for patients with bridging fibrosis or compensated cirrhosis due to NASH: Results from randomized phase III STELLAR trials. *J Hepatol*. 2020 Jul;73(1):26–39.
120. Ratziu V, Harrison SA, Francque S, Bedossa P, Lehert P, Serfaty L, et al. Elafibranor, an Agonist of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α and - δ , Induces Resolution

of Nonalcoholic Steatohepatitis Without Fibrosis Worsening. *Gastroenterology*. 2016 May 1;150(5):1147-1159.e5.

121. Genfit. GENFIT annonce les résultats de l'analyse intermédiaire de l'étude de Phase 3 RESOLVE-IT évaluant elafibranor chez des adultes atteints de NASH avec fibrose [Internet]. Available from: <https://ml-eu.globenewswire.com/Resource/Download/953d5d6a-2d4b-400b-82fc-1697c44c8761>
122. Belfort R, Harrison SA, Brown K, Darland C, Finch J, Hardies J, et al. A Placebo-Controlled Trial of Pioglitazone in Subjects with Nonalcoholic Steatohepatitis. *N Engl J Med*. 2006 Nov 30;355(22):2297–307.
123. Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, McCullough A, Diehl AM, Bass NM, et al. Pioglitazone, Vitamin E, or Placebo for Nonalcoholic Steatohepatitis. *N Engl J Med*. 2010 May 6;362(18):1675–85.
124. Usman M, Bakhtawar N. Vitamin E as an Adjuvant Treatment for Non-alcoholic Fatty Liver Disease in Adults: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Cureus*. 2020 Jul;12(7).
125. Staiger H, Keuper M, Berti L, Hrabě de Angelis M, Häring H-U. Fibroblast Growth Factor 21—Metabolic Role in Mice and Men. *Endocr Rev*. 2017 Oct 1;38(5):468–88.
126. Sanyal A, Charles ED, Neuschwander-Tetri BA, Loomba R, Harrison SA, Abdelmalek MF, et al. Pegbelfermin (BMS-986036), a PEGylated fibroblast growth factor 21 analogue, in

- patients with non-alcoholic steatohepatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2a trial. *The Lancet*. 2018 Dec 22;392(10165):2705–17.
127. Perito ER, Rodriguez LA, Lustig RH. Dietary treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Curr Opin Gastroenterol*. 2013 Mar;29(2):170–176.
128. Xu Y, Guo W, Zhang C, Chen F, Tan HY, Li S, et al. Herbal Medicine in the Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Diseases-Efficacy, Action Mechanism, and Clinical Application. *Front Pharmacol*. 2020;11:601.
129. Keating SE, Hackett DA, George J, Johnson NA. Exercise and non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol*. 2012 Jul 1;57(1):157–66.
130. Hallsworth K, Adams LA. Lifestyle modification in NAFLD/NASH: Facts and figures. *JHEP Rep*. 2019 Nov 5;1(6):468–79.
131. Luukkonen PK, Sädevirta S, Zhou Y, Kayser B, Ali A, Ahonen L, et al. Saturated Fat Is More Metabolically Harmful for the Human Liver Than Unsaturated Fat or Simple Sugars. *Diabetes Care*. 2018 Aug;41(8):1732–9.
132. Mardinoglu A, Wu H, Bjornson E, Zhang C, Hakkarainen A, Räsänen SM, et al. An Integrated Understanding of the Rapid Metabolic Benefits of a Carbohydrate-Restricted Diet on Hepatic Steatosis in Humans. *Cell Metab*. 2018 Mar 6;27(3):559-571.e5.
133. Watanabe M, Tozzi R, Risi R, Tuccinardi D, Mariani S, Basciani S, et al. Beneficial effects of the ketogenic diet on nonalcoholic fatty liver disease: A comprehensive review of the literature. *Obes Rev*. 2020 Aug 1;21(8):e13024.

134. Nakao R, Abe T, Yamamoto S, Oishi K. Ketogenic diet induces skeletal muscle atrophy via reducing muscle protein synthesis and possibly activating proteolysis in mice. *Sci Rep.* 2019 Dec 23;9.
135. Si W, Chen YP, Zhang J, Chen Z-Y, Chung HY. Antioxidant activities of ginger extract and its constituents toward lipids. *Food Chem.* 2018 Jan 15;239:1117–25.
136. Zhu X, Bian H, Wang L, Sun X, Xu X, Yan H, et al. Berberine attenuates nonalcoholic hepatic steatosis through the AMPK-SREBP-1c-SCD1 pathway. *Free Radic Biol Med.* 2019 Sep 1;141:192–204.
137. Liu K, Luo M, Wei S. The Bioprotective Effects of Polyphenols on Metabolic Syndrome against Oxidative Stress: Evidences and Perspectives. *Oxid Med Cell Longev.* 2019 Nov 30;2019.
138. Solhi H, Ghahremani R, Kazemifar AM, Hoseini Yazdi Z. Silymarin in treatment of non-alcoholic steatohepatitis: A randomized clinical trial. *Casp J Intern Med.* 2014;5(1):9–12.
139. Bujak R, Struck-Lewicka W, Markuszewski MJ, Kaliszan R. Metabolomics for laboratory diagnostics. *J Pharm Biomed Anal.* 2015 Sep 10;113:108–20.
140. Yugi K, Kubota H, Hatano A, Kuroda S. Trans-Omics: How To Reconstruct Biochemical Networks Across Multiple ‘Omic’ Layers. *Trends Biotechnol.* 2016 Apr;34(4):276–90.
141. Lu W, Bennett BD, Rabinowitz JD. Analytical strategies for LC-MS-based targeted metabolomics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2008 Aug 15;871(2):236–42.

142. Patti GJ, Yanes O, Siuzdak G. Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012 Apr;13(4):263–9.
143. Li H, Wang L, Yan X, Liu Q, Yu C, Wei H, et al. A Proton Nuclear Magnetic Resonance Metabonomics Approach for Biomarker Discovery in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Proteome Res.* 2011 Jun 3;10(6):2797–806.
144. Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom Rev.* 2007;26(1):51–78.
145. Ritchie MD, Holzinger ER, Li R, Pendergrass SA, Kim D. Methods of integrating data to uncover genotype–phenotype interactions. *Nat Rev Genet.* 2015 Feb;16(2):85.
146. Goldansaz SA, Guo AC, Sajed T, Steele MA, Plastow GS, Wishart DS. Livestock metabolomics and the livestock metabolome: A systematic review. *PLOS ONE.* 2017 May 22;12(5):e0177675.
147. Barupal DK, Fan S, Fiehn O. Integrating bioinformatics approaches for a comprehensive interpretation of metabolomics datasets. *Curr Opin Biotechnol.* 2018 Dec 1;54:1–9.
148. Salek R, Wehrens R. *Metabolomics : Practical Guide to Design and Analysis* [Internet]. Chapman and Hall/CRC; 2019. Available from: <https://www.taylorfrancis.com/books/e/9781315370583>
149. Monte MJ, Marin JJ, Antelo A, Vazquez-Tato J. Bile acids: Chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol.* 2009 Feb 21;15(7):804–16.

150. Nagahashi M, Yuza K, Hirose Y, Nakajima M, Ramanathan R, Hait NC, et al. The roles of bile acids and sphingosine-1-phosphate signaling in the hepatobiliary diseases. *J Lipid Res.* 2016 Sep;57(9):1636–43.
151. Potthoff MJ, Kliewer SA, Mangelsdorf DJ. Endocrine fibroblast growth factors 15/19 and 21: from feast to famine. *Genes Dev.* 2012 Feb 15;26(4):312–24.
152. Chávez-Talavera O, Tailleux A, Lefebvre P, Staels B. Bile Acid Control of Metabolism and Inflammation in Obesity, Type 2 Diabetes, Dyslipidemia, and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology.* 2017 May 1;152(7):1679-1694.e3.
153. Verbeke L, Mannaerts I, Schierwagen R, Govaere O, Klein S, Vander Elst I, et al. FXR agonist obeticholic acid reduces hepatic inflammation and fibrosis in a rat model of toxic cirrhosis. *Sci Rep.* 2016 Sep 16;6(1):33453.
154. Griffiths WJ, Sjövall J. Bile acids: analysis in biological fluids and tissues. *J Lipid Res.* 2010 Jan;51(1):23–41.
155. Danese E, Salvagno GL, Negrini D, Brocco G, Montagnana M, Lippi G. Analytical evaluation of three enzymatic assays for measuring total bile acids in plasma using a fully-automated clinical chemistry platform. *PLOS ONE.* 2017 Jun 8;12(6):e0179200.
156. Arab JP, Karpen SJ, Dawson PA, Arrese M, Trauner M. Bile acids and nonalcoholic fatty liver disease: Molecular insights and therapeutic perspectives. *Hepatology.* 2017;65(1):350–62.

157. Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB, Bajaj JS. Bile acids and the gut microbiome. *Curr Opin Gastroenterol*. 2014 May;30(3):332–338.
158. Legry V, Francque S, Haas JT, Verrijken A, Caron S, Chávez-Talavera O, et al. Bile Acid Alterations Are Associated With Insulin Resistance, but Not With NASH, in Obese Subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017 Oct 1;102(10):3783–94.
159. Jensen T, Abdelmalek MF, Sullivan S, Nadeau KJ, Green M, Roncal C, et al. Fructose and Sugar: A Major Mediator of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Hepatol*. 2018 May;68(5):1063–75.
160. Petersen MC, Vatner DF, Shulman GI. Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2017 Oct;13(10):572–87.
161. Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Cheng J, Duncan AE, Kau AL, et al. Gut Microbiota from Twins Discordant for Obesity Modulate Metabolism in Mice. *Science*. 2013 Sep 6;341(6150).
162. Gaggini M, Morelli M, Buzzigoli E, DeFronzo RA, Bugianesi E, Gastaldelli A. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and Its Connection with Insulin Resistance, Dyslipidemia, Atherosclerosis and Coronary Heart Disease. *Nutrients*. 2013 May 10;5(5):1544–60.
163. Laferrère B, Reilly D, Arias S, Swerdlow N, Gorroochurn P, Bawa B, et al. Differential Metabolic Impact of Gastric Bypass Surgery Versus Dietary Intervention in Obese Diabetic Subjects Despite Identical Weight Loss. *Sci Transl Med*. 2011 Apr 27;3(80):80re2.

164. Grzych G, Vonghia L, Bout M, Weyler J, Verrijken A, Dirinck E, et al. Plasma BCAA changes in Patients with NAFLD are Sex Dependent. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020 Jul;105(7).
165. Vandel J, Dubois-Chevalier J, Gheeraert C, Derudas B, Raverdy V, Thuillier D, et al. Hepatic molecular signatures highlight the sexual dimorphism of Non-Alcoholic SteatoHepatitis (NASH). *Hepatology.* n/a(n/a).
166. Wegermann K, Henao R, Diehl AM, Murphy SK, Abdelmalek MF, Moylan CA. Branched chain amino acid transaminase 1 (BCAT1) is overexpressed and hypomethylated in patients with non-alcoholic fatty liver disease who experience adverse clinical events: A pilot study. *PLOS ONE.* 2018 Sep 28;13(9):e0204308.
167. Du K, Chitneni SK, Suzuki A, Wang Y, Henao R, Hyun J, et al. Increased Glutaminolysis Marks Active Scarring in Nonalcoholic Steatohepatitis Progression. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2020 Jan 1;10(1):1–21.
168. Papathanassiou AE, Ko J-H, Imprialou M, Bagnati M, Srivastava PK, Vu HA, et al. BCAT1 controls metabolic reprogramming in activated human macrophages and is associated with inflammatory diseases. *Nat Commun.* 2017 Jul 12;8(1):16040.
169. Boemer F, Schoos R, Deberg M. Quantification des acides aminés physiologiques par le kit aTRAQ® : évaluation et implémentation de nouveaux paramètres. *Ann Biol Clin (Paris).* 2015 Jul 1;73(4):427–42.

170. Ishikawa T. Branched-chain amino acids to tyrosine ratio value as a potential prognostic factor for hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol WJG*. 2012 May 7;18(17):2005–8.
171. Mahamid M, Mahroum N, Bragazzi NL, Shalaata K, Yavne Y, Adawi M, et al. Folate and B12 Levels Correlate with Histological Severity in NASH Patients. *Nutrients*. 2018 Apr 2;10(4).
172. Alonso C, Fernández-Ramos D, Varela-Rey M, Martínez-Arranz I, Navasa N, Van Liempd SM, et al. Metabolomic Identification of Subtypes of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2017 May 1;152(6):1449-1461.e7.
173. Lu SC, Alvarez L, Huang Z-Z, Chen L, An W, Corrales FJ, et al. Methionine adenosyltransferase 1A knockout mice are predisposed to liver injury and exhibit increased expression of genes involved in proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 May 8;98(10):5560–5.
174. Luc G, Jacob N, Bouly M, Fruchart J-C, Staels B, Giral P. Fenofibrate Increases Homocystinemia Through a PPAR α -Mediated Mechanism. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004 Mar;43(3):452–3.
175. Broadhurst D, Goodacre R, Reinke SN, Kuligowski J, Wilson ID, Lewis MR, et al. Guidelines and considerations for the use of system suitability and quality control samples in mass spectrometry assays applied in untargeted clinical metabolomic studies. *Metabolomics*. 2018;14(6).

176. Tokushige K, Hashimoto E, Kodama K, Tobarí M, Matsushita N, Kogiso T, et al. Serum metabolomic profile and potential biomarkers for severity of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol*. 2013;48(12):1392.
177. Ferslew BC, Xie G, Johnston CK, Su M, Stewart PW, Jia W, et al. Altered Bile Acid Metabolome in Patients with Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Dig Dis Sci*. 2015 Nov;60(11):3318–28.
178. Kalhan SC, Guo L, Edmison J, Dasarathy S, McCullough AJ, Hanson RW, et al. Plasma Metabolomic Profile in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Metabolism*. 2011 Mar;60(3):404–13.
179. Rodríguez-Gallego E, Guirro M, Riera-Borrull M, Hernández-Aguilera A, Mariné-Casadó R, Fernández-Arroyo S, et al. Mapping of the circulating metabolome reveals α -ketoglutarate as a predictor of morbid obesity-associated non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Obes*. 2015 Feb;39(2):279–87.
180. Barr J, Alonso C, Vázquez-Chantada M, Cormenzana MP-, Mayo R, Galán A, et al. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC/MS)-based parallel metabolic profiling of human and mouse model serum reveals putative biomarkers associated with the progression of non-alcoholic fatty liver disease. *J Proteome Res*. 2010 Sep 3;9(9):4501.