

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Soutenue publiquement le 22 octobre 2021
Par M. Simon PESCHARD**

Titre

**Étude de la barrière intestinale dans un modèle murin de stéatohépatite
non alcoolique (NASH)**

Membres du jury :

Président :

Pr. Delphine Allorge – Professeur des Universités – Praticien Hospitalier – Université de Lille – CHU Lille

Directeur, conseiller de thèse :

Pr. Sophie Lestavel – Professeur des Universités – Université de Lille

Assesseur(s) :

Dr. Aurélien Mary – Maître de conférences des Universités – Praticien Hospitalier – Université de Picardie Jules Verne – CHU Amiens-Picardie

Dr. Sylvie Brice – Praticien Hospitalier – CHU Lille

Faculté de Pharmacie de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

Faculté de Pharmacie de Lille



3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>



Université de Lille

Président :	Jean-Christophe CAMART
Premier Vice-président :	Nicolas POSTEL
Vice-présidente formation :	Lynne FRANJIE
Vice-président recherche :	Lionel MONTAGNE
Vice-président relations internationales :	François-Olivier SEYS
Vice-président stratégie et prospective	Régis BORDET
Vice-présidente ressources	Georgette DAL
Directeur Général des Services :	Pierre-Marie ROBERT
Directrice Générale des Services Adjointe :	Marie-Dominique SAVINA

Faculté de Pharmacie

Doyen :	Bertrand DÉCAUDIN
Vice-doyen et Assesseur à la recherche :	Patricia MELNYK
Assesseur aux relations internationales :	Philippe CHAVATTE
Assesseur aux relations avec le monde professionnel :	Thomas MORGENROTH
Assesseur à la vie de la Faculté :	Claire PINÇON
Assesseur à la pédagogie :	Benjamin BERTIN
Responsable des Services :	Cyrille PORTA
Représentant étudiant :	Victoire LONG

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

M.	DEPREUX	Patrick	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie - Virologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire

Liste des Professeurs des Universités

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie - Biologie animale
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences Végétales et Fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences Végétales et Fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique et application de RMN
Mme	DEPREZ	Rebecca	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DEPREZ	Benoît	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences Végétales et Fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie - Virologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique

Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie industrielle
M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire
Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie thérapeutique
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PERROY	Anne-Catherine	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	ROMOND	Marie-Bénédicte	Bactériologie - Virologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Éric	Législation et Déontologie pharmaceutique
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle
M.	WILLAND	Nicolas	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants

Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique
Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	ODOU	Marie-Françoise	Bactériologie - Virologie

Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique
Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie - Biologie animale
M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
M.	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie - Virologie
M.	BELARBI	Karim-Ali	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BOSC	Damien	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie - Biologie animale
Mme	CHARTON	Julie	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique
Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie - Biologie animale

Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique
M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	FLIPO	Marion	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique
M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques
Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA KPAKPAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	KARROUT	Younes	Pharmacotechnie industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique

Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences Végétales et Fongiques
M.	MORGENROTH	Thomas	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique
M.	POURCET	Benoît	Biochimie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / service innovation pédagogique
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique
Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie - Virologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie - Biologie animale
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	WELTI	Stéphane	Sciences Végétales et Fongiques
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

Professeurs Certifiés

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
------	-----	--------	-------------

Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeur Associé - mi-temps

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	DAO PHAN	Haï Pascal	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DHANANI	Alban	Législation et Déontologie pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques
M.	DUFOSSEZ	François	Biomathématiques
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	GILLOT	François	Législation et Déontologie pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

AHU

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie
M.	GRZYCH	Guillaume	Biochimie
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
-----	-------	---------	---

ATER

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	GHARBI	Zied	Biomathématiques
Mme	FLÉAU	Charlotte	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
Mme	N'GUESSAN	Cécilia	Parasitologie - Biologie animale
M.	RUEZ	Richard	Hématologie
M.	SAIED	Tarak	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
Mme	VAN MAELE	Laurye	Immunologie

Enseignant contractuel

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les membres du jury qui ont en la gentillesse d'accepter d'évaluer ce travail.

Merci au Professeur Sophie Lestavel pour l'encadrement au laboratoire, pour l'accompagnement pour ce projet de thèse et ses corrections. Un grand merci pour la confiance que vous m'avez accordé depuis 4 ans dans l'équipe, au laboratoire et pour la thèse d'université.

Merci au Professeur Delphine Allorge pour avoir présidé ce jury. Nous avons eu l'occasion d'échanger à de nombreuses reprises durant mon parcours et je garde en mémoire nos discussions pour l'association des internes lorsque j'étais représentant IPR et votre implication au sein de cette filière hélas en bout de course.

Merci au Docteur Aurélien Mary pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Mon bref passage par le CHU d'Amiens m'a permis de travailler avec vous et d'apprécier votre implication dans le développement de la pharmacie clinique.

Merci au Docteur Sylvie Brice pour avoir accepté d'évaluer ce travail. J'avais beaucoup apprécié mon passage par le service des essais cliniques au CHU de Lille lorsque j'étais externe. Je garde en mémoire cette rigueur dans l'écriture de procédures qui me sert encore aujourd'hui au laboratoire.

Remerciements

Je remercie le Professeur Bart Staels pour m'avoir accueilli et accepté au sein de l'unité UMR1011 qu'il dirige, pour y réaliser ce travail et celui de thèse d'université.

Je renouvelle mes remerciements au le Professeur Sophie Lestavel pour sa disponibilité, son encadrement et la confiance qu'elle m'accorde pour mes travaux au laboratoire.

Je remercie tout particulièrement Margaux Nawrot pour toutes ces années de collaboration. J'ai commencé comme ton stagiaire, l'expérience m'a montré que ça n'a pas dû être facile ! Sans toi, ce travail de thèse n'aurait clairement pas été le même, et je te souhaite de garder cette énergie, cet enthousiasme et cet humour qui te définissent si bien.

Un grand merci à Véronique Touche pour la collaboration au sein de l'équipe intestin. Merci pour les nombreux conseils, pour l'aide que tu m'as accordée, et pour la cohésion au sein du groupe que tu maintiens. Désolé si parfois je te charrie un peu trop, n'hésite pas à me rappeler que je suis un petit *** !

Je remercie mes collègues enseignants du laboratoire de Biochimie de la Faculté de Pharmacie de Lille, et en particulier le Professeur Anne Muhr-Tailleux et le Docteur Olivier Briand. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir accueilli dans l'équipe pour l'année à venir.

Je remercie mes autres collègues doctorants, post-doctorants et ingénieurs au laboratoire pour le soutien (même quand je rale !), et pour la bonne ambiance durant ces années de thèse. Merci à Ludivine, Lucie, Sarah, Dani, Clémence, Christina, Arielle, Emilie, Mickael, Mélusine, Manjula, Yann, Alexia... On arrose quand vous voulez !

Merci aux autres collègues de l'unité avec qui j'ai pu collaborer, et en particulier à Emmanuelle Vallez et Emilie Dorchies pour toute la gestion des expériences *in vivo*, au Docteur Joel Haas pour l'expertise et les conseils sur la NASH et au Docteur David Dombrowicz pour les conseils immunologie. Merci aux Docteurs Olivier Molendi-Coste et Laurent Pineau pour l'aide au cytomètre (et encore désolé pour les appels à des heures incongrues). Je remercie également les collègues avec lesquels je travaille pour le projet de thèse d'université, et en particulier Bruno Derrudas et le Docteur Céline Gheeraert pour la collaboration sur le projet ABOS, le docteur Julie Chevalier pour l'aide et les conseils biostatistiques. Merci également à tous les autres collègues que je n'ai pas encore cité pour la bonne humeur et les échanges que nous avons pu avoir.

Remerciements

Je remercie ma famille du fond du cœur pour le soutien durant ces études.

Je remercie ma mère pour m'avoir toujours soutenu et poussé toujours plus haut vers la réussite.

Merci à ma grand-mère pour son amour. Merci à mon grand-père qui n'est malheureusement plus là pour voir l'aboutissement de ces études.

Merci à mes oncles Christian et François, à ma tante Karine, et à mes cousins Axel et Eve.

Je remercie également mes amis au-delà du laboratoire. Nos chemins se sont peut-être éloignés mais je vous garde toujours dans mon cœur et mes dans mes souvenirs.

Merci à Valentin & Mélanie. Peut-être mes plus vieux amis, mais évitons de nous déprimer en faisant le calcul !

Merci à Alexandre, cher ami cardiologue. Merci de perdre si souvent au billard, ça aide beaucoup mon complexe de supériorité !

Merci à Clément, mon lapin. Je repense avec nostalgie à ces nombreux souvenirs de nos discussions et rires en amphi. Et merci à Caroline de ne pas me l'avoir volé !

Merci à mon autre Clément, pour toutes ces après-midi à jouer, discuter et cuisiner. Merci de m'aider à me vider la tête et me permettre de me changer les idées. Merci à Jeanne & Guillaume pour nos soirées, nos discussions.

Merci à Quentin et Geoffrey, mes collègues pharmaciens ex-internes, pour ce temps passé ensemble à travailler pour l'internat.

Merci à Thibault et Samir pour nos échanges depuis toutes ces années

Merci Alexandra pour le soutien et le temps, en particulier pendant mes premières années dans les études de pharmacie.

Merci à mes amis amiénois Frédéric – Fredou –, Arnaud – Nono –, Emilie, Pierre, Margaux, Amaury, Sarah. Il faut que je descende plus souvent vous embêter !

Merci aux collègues de l'AIPBL pour ces quatre ans dans l'association. Et en particulier merci à Alexandre, Erwin, Fethi, Quentin et Matthieu.

Résumé

Introduction : La stéatohépatite non alcoolique (NASH) est une pathologie fréquemment associée au diabète de type 2 et à l'obésité. Elle se caractérise par une atteinte hépatique chronique en l'absence de consommation excessive d'alcool. Malgré de nombreuses molécules en cours d'évaluation pour le traitement de la NASH, son seul traitement actuel est la perte de poids. Dans le contexte de NASH chez l'homme et dans les modèles animaux, les fonctions de l'intestin sont modifiées avec en particulier une altération des jonctions intercellulaires, de l'immunité intestinale et une dysbiose. L'objectif de ce travail est de caractériser la barrière intestinale dans un modèle murin de NASH associée à l'obésité et à l'insulinorésistance.

Matériel et Méthodes : Des souris ont été ou non soumises à un régime induisant la NASH. Après 24 semaines, l'état du foie et de la barrière intestinale ont été évalués par une étude histologique et génique. La caractérisation de la barrière immunologique intestinale a été réalisée par cytométrie en flux.

Résultats : Les résultats montrent que conformément à la littérature, le régime a bien induit en 24 semaines la NASH chez nos souris, avec une stéatose, une inflammation et une fibrose hépatique. Nous ne mettons pas en évidence de modification du tissu intestinal mais l'expression des 2 protéines de jonction cellulaires Zo-1 et Jam-a est diminuée dans le jéjunum des animaux sous régime NASH. En parallèle, nous montrons une diminution des lymphocytes T CD8⁺ dans la *lamina propria* de l'intestin grêle des souris NASH.

Discussion : Bien que les mécanismes moléculaires de l'altération de la barrière immune intestinale ne soient pas encore identifiés, nos résultats renforcent l'idée que la NASH est aussi une pathologie intestinale. Cibler la barrière intestinale pourrait s'avérer intéressant pour limiter la pathologie hépatique.

Sommaire

Introduction.....	17
Les NAFLD.....	17
Traitement des NAFLD.....	20
1. Les molécules utilisées dans le traitement du diabète de type 2	21
Metformine	21
Liraglutide.....	22
Sémaglutide.....	22
Pioglitazone	23
MSDC-0602K.....	23
2. Autres molécules ciblant les récepteurs nucléaires de la famille PPAR.....	24
Elafibranor	24
Saroglitazar	24
3. Supplémentation en vitamines pour le traitement de la NASH.....	25
Vitamine D	25
Vitamine E	25
4. Molécules ciblant la voie FXR	25
Acide obéticholique.....	25
NGM282 - Aldafermin	26
5. Inhibiteurs d'ASK1	27
Selonsertib.....	27
6. Inhibiteurs de THR- β	27
Resmetirom (MGL-3196)	27
7. Autres molécules évaluées dans le traitement des NAFLD.....	28
Acides gras omega-3 : Omacor®	28
Pentoxifylline	28
L'intestin	29
Les fonctions de l'intestin et leurs modifications dans le contexte pathologique des NAFLD	31
1. La fonction d'absorption	31
2. La fonction endocrine.....	33
3. La fonction barrière	34
Les jonctions inter-cellulaires.....	34
Le mucus et les cellules caliciformes.....	35
Objectifs du travail de thèse	39
Matériel et méthodes.....	41

Protocoles animaux.....	41
Extraction et dosage des lipides hépatiques.....	42
Isolement des cellules immunitaires intestinales	42
Marquage et cytométrie en flux.....	43
Fixation des tissus pour l’histologie	43
Inclusion et coloration des coupes en paraffine	44
Inclusion et coloration des coupes cryoconservées.....	45
Immunohistochimie CD3	46
Quantification de la stéatose hépatique.....	46
Extraction d’ARN	47
RT-PCR	47
qPCR	47
Statistiques.....	48
Résultats.....	49
Validation du modèle	49
Suivi du poids.....	49
Evaluation du poids du foie et de la cytolysé hépatique	49
Stéatose hépatique	51
Inflammation hépatique.....	52
Fibrose hépatique.....	54
Altérations de l’intestin	55
Impact du régime sur l’intégrité de la barrière intestinale	55
Impact du régime sur la barrière immunologique intestinale	57
Discussion.....	63
Bibliographie.....	67

Introduction

Les NAFLD

Les maladies du foie gras non alcoolique (NAFLD) regroupent un spectre de pathologies hépatiques induites par l'alimentation. L'absence totale de consommation d'alcool étant difficile à affirmer chez ces patients, la différenciation avec les pathologies hépatiques liées à l'alcool se fait sur la définition de l'alcoolisme de l'organisation mondiale de la santé. Pour qu'une maladie hépatique soit qualifiée de NAFLD, la consommation d'alcool doit être inférieure à 3 verres standards d'alcool par jour pour un homme et de 2 pour une femme (1,2). Fortement liées aux autres pathologies du métabolisme énergétique comme l'obésité et le diabète de type 2, ces maladies s'inscrivent dans un contexte de syndrome métabolique. Certaines publications parlent désormais des MAFLD, les maladies du foie gras associées à une dysfonction métabolique (3) même si les NAFLD existent aussi chez des personnes sans autre comorbidité (4). D'autres facteurs de risques sont connus, comme l'âge, le sexe masculin, les dyslipidémies ou l'hypertension artérielle (5). Les NAFLD entraînent un sur-risque de mortalité pour les patients, en particulier de causes cardiovasculaires (6).

Les NAFLD ont une prévalence importante à travers le monde, estimée jusqu'à 25 % de la population mondiale (7), et constituent la pathologie hépatique la plus fréquente à travers le monde (8,9). Sous l'acronyme NAFLD, on retrouve l'évolution de la dégradation du foie en différents stades pathologiques identifiés sur la base de critères histologiques sur une biopsie hépatique (10) : le stade de foie gras (NAFL), de stéatohépatite non alcoolique (NASH), de cirrhose hépatique et de carcinome hépatocellulaire.

L'histoire naturelle des NAFLD débute par un déséquilibre de l'apport énergétique alimentaire. Un régime alimentaire trop calorique, avec un apport important de graisses, de sucres et en particulier de fructose, entraîne un sur-risque de développement des NAFLD (11). Cet apport énergétique trop important sera stocké d'abord dans le tissu adipeux blanc sous forme de triglycérides et d'esters de cholestérol, induisant une obésité ainsi qu'une insulino-résistance (12). L'insulino-résistance du tissu adipeux blanc aura pour conséquence une augmentation de la lipolyse, et donc une augmentation de la concentration des lipides dans la circulation périphérique. Cet excès d'acide gras sera capté par le foie, induisant la synthèse hépatique des triglycérides, qui aura pour conséquence une augmentation de la stéatose hépatique et une aggravation de la NAFL en NASH (figure 1).

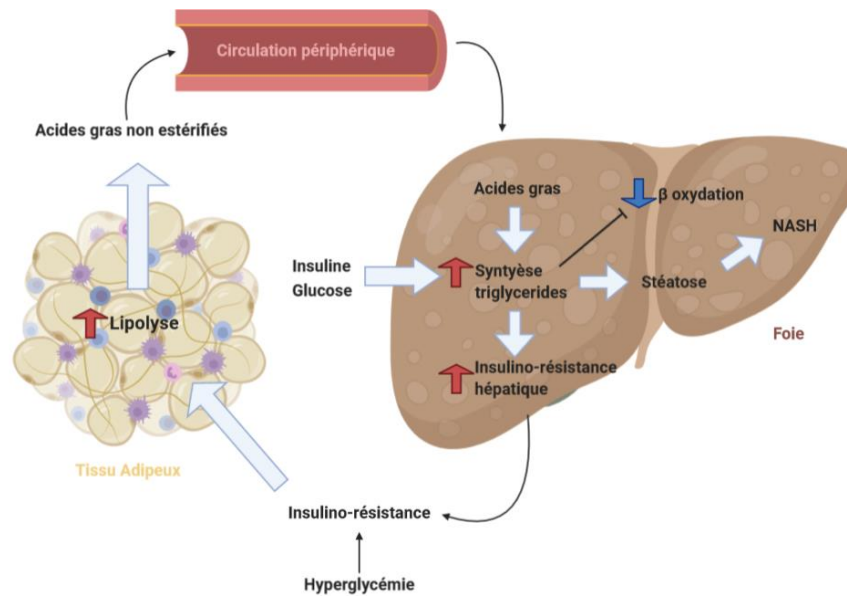


Figure 1 : Conséquences de l'hyperglycémie sur le foie et le tissu adipeux. Adapté d'après (13).

La stéatose sera d'abord qualifiée de micro-stéatose, c'est-à-dire des petites gouttelettes lipidiques qui fusionneront à mesure que la pathologie s'aggrave pour former une macro-stéatose (14). Progressivement, la stéatose hépatique se compliquera des autres altérations histologiques qui caractérisent la NASH. Certains hépatocytes présenteront une morphologie altérée, vus comme gonflés en histologie : ce sont les cellules ballonnées.

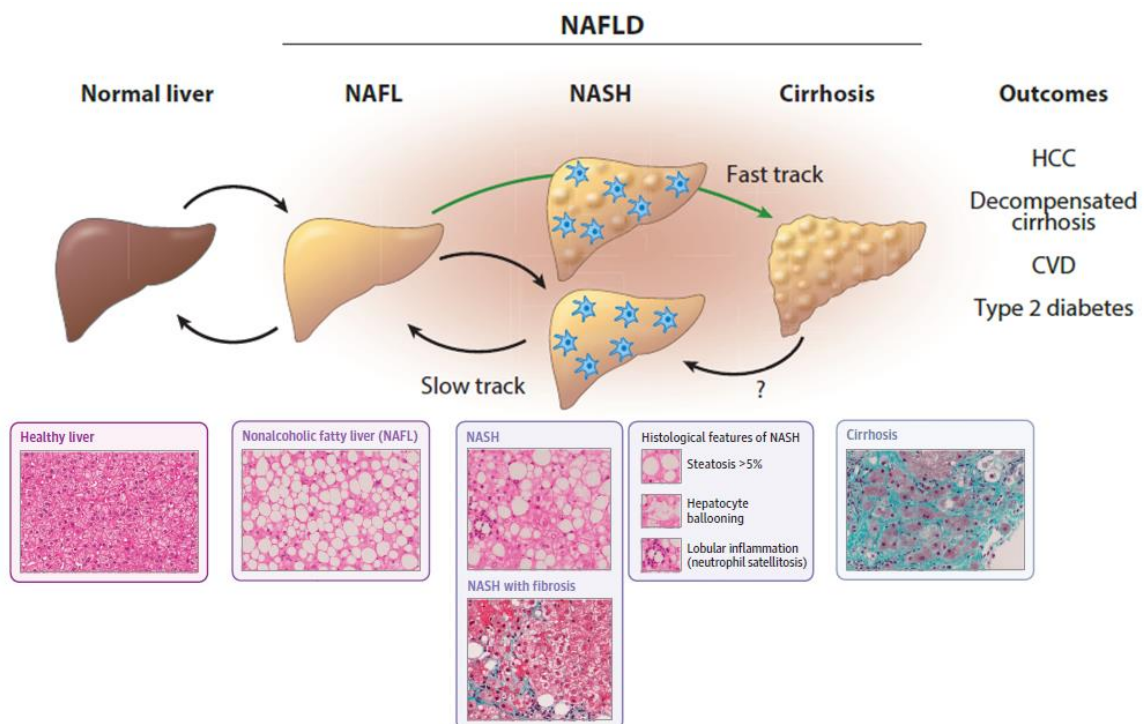


Figure 2 : Les NAFLD - évolution de la pathologie et critères histologiques. Adapté d'après (9,10).

La présence importante de ces lipides induira également une augmentation du stress oxydatif et une inflammation localisée, caractérisée en histologie par le recrutement localisé de cellules immunes (10). Si cette inflammation devient chronique, la NASH s'installe et se complique d'une fibrose hépatique : les cellules stellaires, autre type cellulaire retrouvé dans le foie, sont activées dans la pathologie car synthétisent des fibres de collagène en réponse au stress oxydatif et à l'inflammation (10). La fibrose pourra évoluer jusqu'aux stades de cirrhose ou de carcinome hépatocellulaire, et entraîner le besoin pour les patients d'une transplantation hépatique (figure 2) (15).

Différents critères sont évalués sur la biopsie hépatique et permettent de catégoriser la maladie de chaque patient. Différents scores existent, mais le plus utilisé reste le *NAFLD activity score*, ou NAS Score (16). Il repose sur l'évaluation, par champ observé, du pourcentage de stéatose hépatique, du nombre de foyers de cellules inflammatoires, et du nombre de cellules ballonnées. Ces différents critères sont regroupés dans le tableau 1. Un NAS Score supérieur ou égal à 5 correspond à un diagnostic de NASH, un score de 2 ou moins correspond à un stade NAFL.

Tableau 1 : Calcul du NAS score. Adapté d'après (9).

Critère histologique	Valeur	Score
Pourcentage de stéatose	< 5%	0
	Compris entre 5 et 33%	1
	Compris entre 33 et 66%	2
	> 66%	3
Inflammation lobulaire	Absente	0
	< 2 foci par champ x200	1
	Comprise entre 2 et 4 foci par champ x200	2
	> 4 foci par champ x200	3
Cellules ballonnées	Aucune	0
	Rares	1
	Abondantes	2
Somme des scores		NAS score

La fibrose est également évaluée (tableau 2) mais n'entre pas dans la composition de ce score (tableau 1), mais participe à d'autres scores diagnostic comme le score SAF (17). Des scores plus spécifiques de la fibrose existent comme le score Metavir® ou le Fibrotest® mais ne sont pas développés pour la fibrose liée à ce contexte métabolique particulier.

Tableau 2 : Gradation de la fibrose. Adapté d'après (9).

Critère histologique	Grade de la fibrose
Aucun	0
Fibrose péri-sinusoïdale ou Péri-portale	1
Légère, zone 3, péri-sinusoïdale	1A
Modérée, zone 3, péri-sinusoïdale	1B
Portale, péri-portale	1C
Fibrose péri-sinusoïdale et péri-portale	2
Présence de ponts fibrotiques	3
Cirrhose	4

D'autres techniques moins invasives que la biopsie, basées sur de l'imagerie par résonance magnétique, sont également utilisées et fortement corrélées à l'histologie du foie (18). La stéatose hépatique peut être mesurée par ultrasonographie ou par IRM (18,19), alors que les mesures d'élastographie permettent d'évaluer l'élasticité du foie, mesure indirecte de la fibrose (20). De nombreuses recherches sont en cours sur l'évaluation de biomarqueurs présents dans la circulation sanguine périphérique pour le diagnostic et le suivi des NAFLD. Certaines études évaluent l'évolution et l'amélioration de l'état du foie dans les NAFLD par le dosage sanguin périphérique de la concentration en alanine aminotransférase, mais cela reste peu spécifique. Parmi les différents tests non invasifs mis au point, le score NIS4 basé sur le dosage de l'HbA1c, du miR-34a-5p, de l' α 2 macroglobuline et du YKL-40 pourrait être une solution pour limiter les biopsies hépatiques chez les patients à risque, avec sa valeur prédictive positive à 79,2 % et sa valeur prédictive négative à 77,9 % (21). Le gold standard pour le diagnostic reste aujourd'hui la biopsie hépatique, associée à l'expertise de l'anatomopathologiste pour l'attribution de scores.

Traitement des NAFLD

Le traitement recommandé pour les NAFLD est une réduction du poids corporel par l'instauration de règles hygiéno-diététiques. Une perte de poids de 7 à 10 % liée à une diminution de l'apport calorique combinée à de l'exercice physique est aujourd'hui le traitement de choix des NAFLD (9).

La perte de poids liée à une intervention de chirurgie bariatrique montre également des résultats dans la réversion de la NASH (22). Une équipe lilloise a pu montrer une réversion de la NASH un an après la chirurgie chez 70 parmi 82 patients obèses morbides opérés par *roux-en-y gastric bypass*, réversion confirmée par une nouvelle biopsie chez ces patients (23). Cette régression de la NASH est durable, les patients présentant un foie toujours sain 5 ans après la chirurgie (24). La NASH fait partie, avec le diabète de type 2, des comorbidités permettant aux personnes ayant un IMC compris entre 35 et 40

d'accéder à cette chirurgie, alors qu'en l'absence de comorbidités un IMC supérieur à 40 est nécessaire (25).

Avant le stade cirrrose, les NAFLD sont des pathologies réversibles (10). Une fois ce stade atteint, la transplantation hépatique est nécessaire. La NASH est devenue aux Etats-Unis la seconde indication à la transplantation hépatique des patients souffrant de carcinome hépatocellulaire, derrière les carcinomes survenus chez des patients atteints d'hépatites virales (15). Elle devient même en 2019 la première indication à la transplantation chez les femmes ne souffrant pas de carcinomes hépatocellulaires. Cette indication, d'importance croissante, est en passe de devenir la plus importante indication à la transplantation hépatique aux États-Unis (15).

De nombreuses molécules sont actuellement en essai clinique pour le traitement des NAFLD. Parmi les molécules en phase II et III chez l'homme, certaines présentent des résultats publiés de leur phase II et peuvent être classées dans différentes catégories.

1. Les molécules utilisées dans le traitement du diabète de type 2

Comme l'insulino-résistance est une des composantes majeures des NAFLD, des thérapeutiques disposant déjà d'une Autorisation de Mise sur le Marché dans le traitement du diabète de type 2 sont en cours d'évaluation dans le traitement de la NASH.

Metformine

La metformine est le traitement de première intention du diabète de type 2 après échec des règles hygiéno-diététiques seules (26). Antidiabétique oral, elle fait partie de la classe pharmacologique des biguanides. Elle agit en réduisant la néoglucogenèse et la glycogénolyse hépatique, en augmentant la sensibilité à l'insuline des cellules musculaires et en limitant l'absorption intestinale du glucose.

Une première étude a montré chez 26 patients atteints de NASH et sous 2000 mg de metformine une diminution significative du nombre de patients NASH après 2 ans (27). Cette amélioration de l'histologie est supposée en lien avec la perte de poids induite par la metformine car les patients ayant perdu le plus de poids sont ceux qui ont eu la plus nette amélioration de la pathologie hépatique.

Dans le contexte plus général des NAFLD, ce traitement a été évalué chez 24 patients et comparé à 24 patients sous placebo pendant 6 mois. Seuls 8 patients du groupe placebo et 4 du groupe metformine étaient diabétiques à l'inclusion. Les doses quotidiennes de metformine étaient de 500 mg et augmentées à 2500 ou 3000 mg en cas de poids corporel supérieur à 90 kg. Aucune amélioration de la stéatose hépatique, critère de validité principal de l'étude, n'a été rapportée après 6 mois de traitement, qu'elle soit évaluée sur une nouvelle biopsie ou par imagerie (28). Les auteurs restent

prudents quant à leurs conclusions, pointant le fait que la perte de poids, la diminution de la cholestérolémie et du LDL cholestérol ainsi que celle de la glycémie à jeun et de l'hémoglobine glyquée (HbA1c) constituent dans leur ensemble des éléments intéressants pour la prévention des risques cardiovasculaires chez ces patients.

Liraglutide

Le liraglutide est un analogue du *glucagon-like peptide 1* (GLP-1) humain, incrétine qui a pour effet la diminution de la glycémie par une augmentation de la sécrétion d'insuline par le pancréas de façon glucose-dépendante. Il est indiqué en association d'autres thérapeutiques et de règles hygiéno-diététiques dans le traitement du diabète de type 2, même s'il peut être administré seul en cas de contre-indications à la metformine. L'étude LEAN (*Liraglutide Efficacy and Action in NASH*) a montré chez 9 des 23 patients traités au liraglutide pendant 48 semaines une résolution de la NASH sans aggravation de la fibrose, contre 2 des 22 patients traités au placebo (29). Cette amélioration de l'histologie hépatique s'est accompagnée chez les patients traités au liraglutide d'une perte de poids, ainsi que d'une diminution de la glycémie à jeun, de l'HbA1c et des γ -glutamyl-transférases plasmatiques.

Une seconde étude s'est intéressée à la diminution de la stéatose hépatique induite par la perte de poids, qu'elle soit liée à la prise de liraglutide ou à une restriction calorique alimentaire associée à de l'exercice physique. Chez 30 patients atteints de NAFLD, 15 ont pris du liraglutide pendant 26 semaines, contre 15 patients qui ont suivi un programme de limitation des apports énergétique associé à du sport. La diminution de la quantité de masse grasse hépatique n'a pas été montrée comme différente entre ces deux groupes après ces 26 semaines, indiquant que le traitement médicamenteux est aussi efficace que les modifications de l'hygiène de vie des patients NAFLD. Cependant, les bénéfices obtenus avec le traitement au liraglutide ne sont pas pérennes dans le temps et perdus après 26 semaines sans traitement (30), ce qui souligne l'importance des règles hygiéno-diététiques dans le traitement des NAFLD.

Sémaglutide

Le sémaglutide est, comme le liraglutide, un analogue du GLP-1. Il est indiqué dans le traitement du diabète de type 2 en troisième intention après les règles hygiéno-diététiques et la metformine seule. L'efficacité par rapport au placebo du sémaglutide injecté a été évaluée pendant 72 semaines sur 320 patients. La dose de 0,4 mg par semaine, la plus forte des trois doses évaluées, a montré son efficacité pour guérir la NASH (OR 6,87 ; IC95% : 2,60-17,63), mais n'a pas montré d'effet bénéfique sur la fibrose hépatique (31). Cependant, nous ne pouvons pas exclure que cette amélioration de l'histologie hépatique soit liée à l'effet bénéfique apporté par le sémaglutide sur la réduction de l'HbA1c ou la

réduction du poids corporel des patients traités. Ce traitement est intéressant car il possède désormais l'avantage pour le patient d'être formulé et disponible par voie orale.

Pioglitazone

La pioglitazone est un agoniste du récepteur nucléaire *peroxysome proliferator activated receptor γ* (PPAR γ) de la famille des thiazolidinediones. Elle cible également les protéines de la famille des transporteurs mitochondriaux du pyruvate (MPC1 et MPC2) (32). Elle permet une augmentation de la sensibilité à l'insuline au niveau hépatique, musculaire et adipeux. Elle n'est plus disponible en France depuis 2011, retirée du marché à cause d'un risque accru de développement de cancer de la vessie, mais est toujours approuvée par la *food and drug administration* en monothérapie aux États-Unis pour le traitement du diabète de type 2 en association avec des règles hygiéno-diététiques, ou en combinaison avec d'autres traitements du diabète. Une étude a été menée cherchant à montrer une réduction des critères histologiques définissant la NASH après 18 mois de traitement chez 50 patients traités par pioglitazone contre 51 patients sous placebo. Vingt-neuf patients du groupe pioglitazone ont montré une amélioration histologique de leur NASH, contre 9 seulement dans le groupe placebo, montrant une efficacité du traitement dans la résolution de la pathologie hépatique (33). Les patients traités présentent également une meilleure sensibilité à l'insuline, une HbA1c plus basse malgré un poids corporel plus important.

Une seconde étude, menée chez des patients diabétiques traités par 2 g/jour de metformine et diagnostiqués NAFLD par des scores non invasifs, a montré une efficacité supérieure de la pioglitazone aux sulfamides hypoglycémiants pour réduire la souffrance hépatique à 1 an (34). Les scores *Liver Fat Equation* (LFE), *Hepatic Steatosis Index* (HSI) et *Index of NASH* (ION) qui servaient au diagnostic de NAFLD ainsi que les concentrations plasmatiques en transaminases sont réduits uniquement dans le groupe traité à la pioglitazone.

MSDC-0602K

Le MSDC-0602K est une thiazolidinedione de seconde génération, modulant préférentiellement les transporteurs MPC plutôt que PPAR γ (35). L'efficacité de 3 doses du composé sur la résolution histologique de la NASH a été évaluée sur des groupes d'environ 100 patients atteints d'une NASH prouvée sur biopsie hépatique contre 94 patients traités par un placebo pendant 12 mois. Sur les paramètres glucidiques, on peut noter une diminution à 12 mois de la glycémie à jeun et de l'HbA1c, ainsi qu'une augmentation de la sensibilité à l'insuline évaluée par le calcul de l'HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment of insulin resistance*) chez les patients traités (36). Sur la pathologie hépatique, le critère d'évaluation principal n'a pas été atteint, malgré une diminution du NAS Score dans les groupes

traités par les doses les plus importantes de MSDC-0602K essentiellement due à une diminution de la stéatose hépatique, en particulier pour la dose 250 mg du composé.

2. Autres molécules ciblant les récepteurs nucléaires de la famille

PPAR

Elafibranor

L'elafibranor est un agoniste des récepteurs PPAR α et δ . C'est une molécule de la classe des fibrates utilisés comme hypotriglycéridémiants avec un effet modéré sur la diminution des LDL cholestérol circulants et un effet modeste sur l'augmentation du HDL cholestérol circulant. Une étude pilote sur 6 patients a montré que l'activation de PPAR δ diminue le contenu lipidique du foie (37). Puis, l'étude GOLDEN-505 a cherché à évaluer la réversion de la NASH sans aggravation de la fibrose chez 93 patients traités par 80 mg d'elafibranor une fois par jour et 91 patients traités par 120 mg une fois par jour par rapport à un traitement placebo pendant un an. Seuls les patients ayant une NASH modérée ou sévère (NAS score ≥ 4) traités par une dose quotidienne de 120 mg d'elafibranor ont montré une rémission de leur pathologie avec disparition des cellules ballonnisées et une absence de forte inflammation hépatique après un an de traitement (38). Les patients des deux bras de l'étude traités avec l'elafibranor présentent cependant une amélioration de leur bilan lipidique, avec une diminution de leur concentration plasmatique en LDL cholestérol et en triglycérides et une augmentation de leur concentration plasmatique de HDL cholestérol. Ils présentent une amélioration de leur bilan glucidique avec une glycémie à jeun, une HbA1c et une insulino-résistance plus basses que les patients traités au placebo. Cependant, le laboratoire a communiqué des résultats de l'essai clinique de phase 3 indiquant que ce composé ne permettait pas une résolution de la NASH sans aggravation de la fibrose hépatique par rapport au placebo (39).

Saroglitazar

Le saroglitazar est un agoniste des récepteurs PPAR α et γ . Il possède les mêmes propriétés hypolipidémiantes que les autres fibrates, alors que l'agonisme de PPAR γ les rapproche des thiazolidinediones avec des effets positifs sur la NASH. Il est actuellement en phase III dans le traitement de la NASH, sans que les résultats des phases précédentes soient disponibles. Cependant, les résultats chez la souris montrent une amélioration de toutes les composantes du NAS score et de la fibrose hépatique après 1 an de traitement, ainsi qu'une réduction du poids et une amélioration des paramètres métaboliques des animaux traités (40).

3. Supplémentation en vitamines pour le traitement de la NASH

Vitamine D

La vitamine D possède de nombreux rôles décrits dans la littérature, bien au-delà de son rôle dans le remodelage osseux. Des carences en vitamines D ont été montrées chez les patients atteints de pathologies entrant dans le spectre du syndrome métabolique (41). Chez les patients atteints de NAFLD, les carences en vitamine D sont associées à un risque plus élevé d'aggravation de la fibrose hépatique (42). Un essai clinique de phase II a cherché à évaluer l'efficacité sur les NAFLD d'un traitement quotidien à 1000UI de vitamine D chez 201 patients par rapport à 110 patients traités avec un placebo pendant 6 ou 12 mois. Par élastographie (Fibroscan®), le traitement a prouvé une réduction de la stéatose hépatique et de la fibrose chez les patients du groupe traité par rapport au groupe placebo dès 6 mois de traitement (43). Chez les patients du groupe traité par la vitamine D, une diminution de la glycémie à jeun et de l'HOMA-IR sont également rapportées.

Vitamine E

Sous le terme vitamine E sont regroupés différents composés chimiques dont la forme naturellement la plus courante est l' α -tocophérol. Elle est utilisée pour le traitement des carences dans des contextes de malabsorption, ainsi que dans les préparations pour la nutrition entérale et parentérale. Elle est principalement utilisée en France pour ses propriétés anti-oxydantes, et dispose du statut de complément alimentaire pour les formes orales. Son efficacité seule ou en association avec la pioglitazone a été évaluée sur la réduction du NAS score chez des patients atteints de NAFLD et de diabète de type 2. Les 36 patients traités par deux prises quotidiennes de 400 UI de vitamine E seule ne présentent pas d'amélioration de leur histologie hépatique mais présentent une diminution de leur glycémie à jeun ainsi qu'une diminution de leur contenu hépatique en triglycérides évalué en IRM. Les 37 patients traités par une bithérapie avec la pioglitazone présentent, quant à eux, une amélioration de leur histologie hépatique (44). L'essai clinique ne possédant pas de groupe de patients traités uniquement par la pioglitazone, on ne peut pas savoir si la vitamine E améliore les résultats obtenus par rapport à un traitement à la pioglitazone seule.

4. Molécules ciblant la voie FXR

Acide obéticholique

L'acide obéticholique est un agoniste de FXR, récepteur nucléaire aux acides biliaires exprimé notamment dans le foie et l'intestin. Il dispose d'une autorisation de mise sur le marché en France

pour le traitement de la cirrhose biliaire primitive chez l'adulte, en seconde ligne associé avec l'acide ursodéoxycholique. FXR est connu pour son implication dans l'homéostasie des acides biliaires, mais son activation a été montrée comme réduisant chez l'animal la synthèse *de novo* des acides gras, la synthèse des VLDL par le foie, et permet une augmentation de l'hydrolyse des triglycérides. L'activation de FXR a également un rôle dans l'insulino-résistance, permettant une réduction de la néoglucogenèse et de la glycolyse hépatique, et favorisant la glycogénogenèse (45). Outre ces rôles métaboliques, il a été montré que chez la souris sous régime NASHogène, un traitement avec un agoniste de FXR permet une diminution de l'inflammation hépatique (46). En clinique humaine dans l'étude FLINT, 283 patients atteints de NASH ont été randomisés en deux groupes, traitement à l'acide obéticholique contre traitement avec un placebo pendant 72 semaines, pour une amélioration de leurs paramètres histologiques d'au moins 2 points sans aggravation de leur fibrose hépatique. Parmi les patients ayant complété l'étude, 50 % ont amélioré leurs paramètres histologiques sous traitement à l'acide obéticholique, contre 21 % dans le groupe placebo (47). Les paramètres mesurés pour la NASH, stéatose, inflammation lobulaire hépatique, nombre de cellules ballonnées et fibrose, sont tous réduits chez les patients du groupe traités. Les patients traités avec l'acide obéticholique perdent plus de poids que les patients sous placebo, mais présentent une concentration plasmatique de LDL cholestérol circulant ainsi qu'un HOMA-IR plus importants (47). Une seconde étude a également montré une amélioration de la fibrose hépatique et des paramètres histologiques de la NASH (48). Une dose quotidienne de 25 mg d'acide obéticholique chez des patients souffrant de NASH avec fibrose hépatique diagnostiquée sur une biopsie permet une diminution significative du score de fibrose d'au moins un point, ainsi qu'une réduction des scores histologiques d'inflammation lobulaire et de ballonnisation hépatique (48).

NGM282 - Aldafermin

Le NGM282 est un analogue de l'hormone intestinale *Fibroblast Growth Factor 19* (FGF19) synthétisée lorsque FXR intestinal est activé par ses ligands. Au niveau hépatique, FGF19 est un régulateur de la synthèse des acides biliaires, agissant comme inhibiteur de l'activité du cytochrome P450 7A1, enzyme nécessaire à la synthèse des acides biliaires à partir du cholestérol (49). L'efficacité sur la réduction de la stéatose a été évaluée par IRM sur deux doses de NGM282 (3 et 6 mg par jour) chez des patients atteints d'une NASH diagnostiquée sur une biopsie hépatique. A 12 et 24 semaines, les patients traités avec ce composé montraient une diminution significative du pourcentage de graisse hépatique par rapport aux patients traités au placebo (50,51). Le traitement permet une diminution du cholestérol total liée à une diminution du LDL cholestérol, ainsi qu'une diminution de la concentration sérique des triglycérides uniquement chez les patients traités avec 6 mg de NGM282. Le traitement ne montre aucun effet sur l'insulino-sensibilité ni sur la glycémie à jeun. Le laboratoire NGMBio, qui développe ce

produit, a décidé de ne pas poursuivre les essais de cette molécule pour la résolution de la NASH car le critère principal d'évaluation, la diminution du score de fibrose hépatique d'au moins un point, n'a pas été atteint (52).

5. Inhibiteurs d'ASK1

Selonsertib

Le selonsertib est un inhibiteur de la kinase ASK1, *Apoptosis signal-regulating kinase 1*. La voie d'activation d'ASK1 est connue pour être induite chez les patients atteints de NASH, et corrélée avec la fibrose hépatique (53). Quand le selonsertib est associé au simtuzumab, un anticorps monoclonal ciblant l'enzyme *lysyl oxydase-like molecule 2* impliquée dans le remodelage de la matrice extracellulaire, il a montré en phase II une diminution de la fibrose chez les patients traités par rapport aux patients n'ayant reçu que le simtuzumab (54). En phase III, l'efficacité du selonsertib seul sur la réduction de la fibrose hépatique avancée (F3 – essai STELLAR-3) et de la cirrhose compensée (Fibrose F4 – essai STELLAR-4) associée à la NASH a été évaluée. D'une durée initiale de 240 semaines, les deux doses de traitement ont été arrêtées après 48 semaines car les patients traités au selonsertib (320 patients par dose dans STELLAR-3, 350 dans STELLAR-4) ne présentaient aucune régression histologique de leur fibrose par rapport aux patients traités par un placebo (159 patients dans STELLAR-3, 174 dans STELLAR-4) (55). Les patients traités ne présentent pas d'amélioration de leur bilan lipidique ou de leurs paramètres glycémiques.

6. Inhibiteurs de THR- β

Resmetirom (MGL-3196)

Le resmetirom est candidat médicament ciblant spécifiquement le foie et qui agit comme agoniste du *thyroid receptor β* (THR- β). Ce récepteur est connu pour être impliqué dans les voies métaboliques altérées dans le contexte pathologique des NAFLD (56). Le critère d'évaluation principal a été la diminution du pourcentage de graisse hépatique évalué par IRM après 12 semaines de traitement, mais des critères d'évaluation secondaires se sont intéressés à l'impact du traitement à 36 semaines et à la diminution du NAS score des patients traités au resmetirom par rapport au placebo. A 12 semaines, les 78 patients sous resmetirom ont présenté une diminution du pourcentage de graisse hépatique en moyenne de l'ordre de 36%, contre 10% pour les 38 patients sous placebo, avec un intervalle de confiance à 95% de la différence égal à -22,5% [-32,9% ; -12,2%] (57). Cette diminution de la stéatose hépatique sous traitement agoniste THR- β reste vraie à 36 semaines. Le traitement permet également une diminution de la concentration plasmatique de LDL cholestérol et de

triglycérides. On retrouve également à 36 semaines une diminution de la concentration sérique des transaminases ainsi que de la fibrose chez les patients qui en présentaient une au début de l'étude (57).

7. Autres molécules évaluées dans le traitement des NAFLD

Acides gras omega-3 : Omacor®

Les acides gras polyinsaturés de type eicosapentanoïque et docosahexanoïque sont utilisés dans le traitement de certaines dyslipidémies, associées ou non à des statines. Ils agissent par diminution de la synthèse hépatique des VLDL, permettant une diminution de la triglycéridémie. L'étude WELCOME a cherché à évaluer l'efficacité d'une prise quotidienne pendant 15 à 18 mois de 4 g d'omacor® par rapport à une prise d'huile d'olive (placebo) sur la réduction des lipides hépatiques mesurés par spectroscopie à résonance magnétique. La diminution de la fibrose, évaluée par le NAFLD fibrosis score basé sur des biomarqueurs, a également été étudiée. Chez les patients traités, aucune diminution du pourcentage de lipides hépatiques induite par le traitement n'a été observée. L'augmentation de la richesse en oméga-3 érythrocytaire retrouvée chez les patients traités est corrélée négativement avec la stéatose hépatique, montrant un effet modéré sur ce paramètre hépatique de NAFLD (58). Le traitement avec l'omacor® n'a pas permis d'amélioration des scores de fibrose hépatique. Aucun suivi des autres paramètres cliniques n'a été évalué au cours de l'étude.

Pentoxifylline

La pentoxifylline est un médicament utilisé comme vasodilatateur périphérique dans le traitement des artérites au cours de la marche ainsi que dans les troubles du comportement et de la mémoire liés au vieillissement. Le mécanisme d'action de la pentoxifylline est lié à un effet vasodilatateur artériel, à une diminution du taux de fibrinogène et à une augmentation de la déformabilité érythrocytaire. Ces effets seraient en partie expliqués par un effet anti-TNF α . Un traitement de patients atteints de NASH à la pentoxifylline 400 mg 3 fois par jour a été évalué pendant un an. Le critère d'évaluation principal était la diminution des ALAT, mais l'un des critères secondaires était la diminution du NAS score. Chez les 19 patients traités, aucune diminution du taux d'ALAT n'a été observée par rapport aux 7 patients traités au placebo (59). Cependant, le traitement montre des effets positifs sur la réduction des composantes du NAS score, avec une diminution de la stéatose hépatique ainsi que de l'inflammation lobulaire. Ni le poids ni les paramètres du bilan lipidique n'ont été améliorés par le traitement à la pentoxifylline.

L'intestin

L'intestin est un organe constitutif du tube digestif subdivisé en quatre parties (figure 3) :

- Le duodénum : la partie proximale de l'intestin grêle. Il est situé juste après le pylore, qui fait la jonction avec l'estomac ;
- Le jéjunum : la partie médiane de l'intestin grêle. Il est situé après la partie ascendante du duodénum, appelée partie D4 ;
- L'iléon : la partie distale de l'intestin grêle. La séparation jéjunum-iléon est anatomiquement peu claire. L'iléon se termine par la valve iléo-caecale, sa jonction avec le caecum, qui donnera suite au gros intestin ;
- Le gros intestin : il est composé du côlon (ascendant, transverse et descendant) et du rectum.

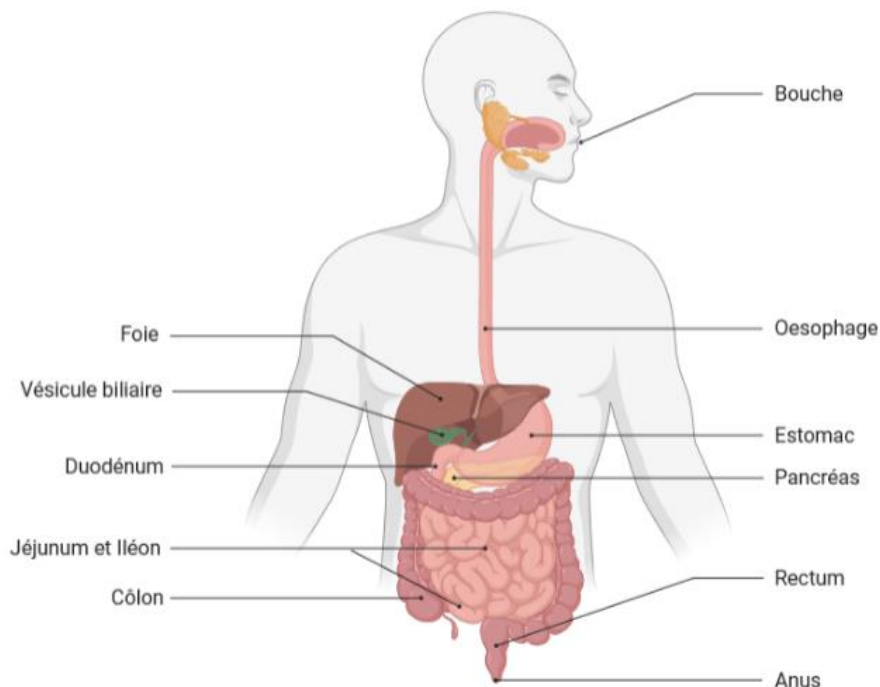


Figure 3 : Tractus gastro-intestinal.

Macroscopiquement, c'est une structure faite de nombreux replis permettant une augmentation de sa surface. Au niveau microscopique, l'intestin grêle contrairement au côlon est formé de villosités, replis de l'épithélium dans la lumière du tube digestif permettant également une augmentation de la surface d'échange avec le lumen (figure 3). Ces villosités sont plus nombreuses et plus grandes dans le jéjunum, partie de l'intestin dont la fonction principale est l'absorption des nutriments. A la base de ces villosités, on retrouve des cryptes intestinales, où sont retrouvées les cellules souches permettant le renouvellement du tissu.

L'intestin est composé de plusieurs types cellulaires, comme présenté en figure 4 :

- Les entérocytes

Ce sont les cellules majoritaires de l'épithélium, ayant pour fonction principale l'absorption des nutriments et de l'eau. Ce sont des cellules polarisées, disposant d'un pôle apical tourné vers la lumière intestinale et d'un pôle basolatéral tourné vers la lame basale de l'épithélium.

- Les cellules entéro-endocrines

Sous cette dénomination, on retrouve un ensemble de cellules dont la fonction est la sécrétion d'hormones vers leur pôle basolatéral. On estime qu'elles composent environ 1% de l'épithélium. Historiquement, ces cellules étaient classées en fonction des hormones sécrétées (Cellule L sécrétant GLP-1, cellule K sécrétant GIP...). Elles possèdent, en fonction des hormones, des rôles variés comme le contrôle de la vidange gastrique, la potentialisation de la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques, la contraction de la vésicule biliaire, la régulation de l'appétit...

- Les cellules caliciformes à mucus

Appelées également *goblet cell*, le rôle des cellules caliciformes à mucus est la sécrétion de mucus du côté luminal, une couche glycoprotéique hydratée servant à la protection de l'épithélium.

- Les cellules de Paneth

Situées au fond des cryptes intestinales, les cellules de Paneth ont pour rôle la protection de l'épithélium par la sécrétion de peptides anti-microbiens.

- Les cellules Tuft

De découverte plus récente, les *tuft cells* sont des cellules impliquées dans l'immunité anti-parasitaire. Elles sécrètent également l'interleukine 25 impliquée dans le développement de certaines populations immunes de l'épithélium.

- Les cellules M

Les cellules M sont des cellules permettant l'éducation et la tolérance du système immunitaire au niveau de l'intestin. Elles permettent le passage d'antigènes captés dans la lumière intestinale jusqu'aux cellules dendritiques du tissu. Ces cellules peuvent ensuite présenter ces antigènes via les molécules du CMH afin d'induire une tolérance immunitaire ou une réponse inflammatoire.

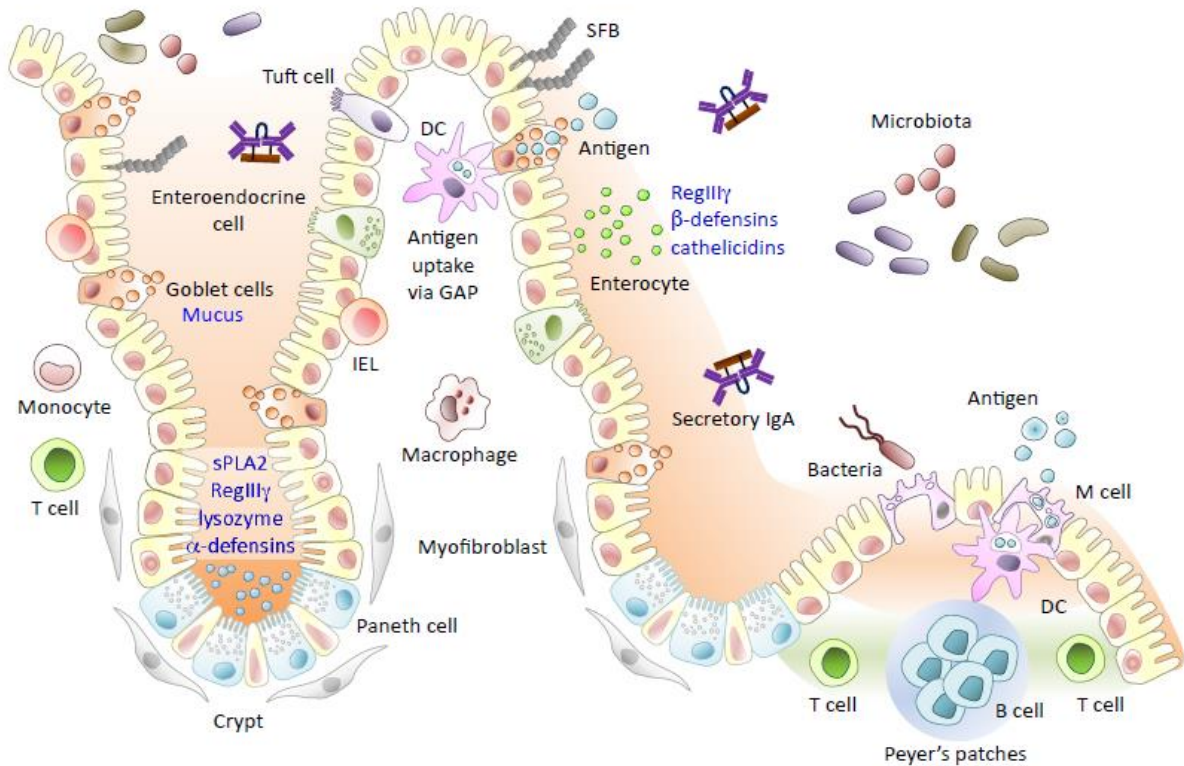


Figure 4 : Structure de l'intestin grêle. (60)

Les fonctions de l'intestin et leurs modifications dans le contexte pathologique des NAFLD

1. La fonction d'absorption

La fonction première de l'intestin grêle est l'absorption des nutriments provenant de l'alimentation lors de la digestion. L'eau, quant à elle, est principalement réabsorbée au niveau du côlon où les entérocytes ont une morphologie un peu différente, avec peu de microvillosités, et sont appelés colonocytes (61).

a. L'absorption des glucides

Durant la digestion, les glucides sont hydrolysés par des enzymes en oses simples, comme le glucose et le fructose. Leur transport à travers l'épithélium se fait via des transporteurs, comme SGLT1 pour le glucose ou GLUT5 pour le fructose, qui permettent un transport de ces sucres simples de la lumière intestinale vers l'entérocyte. Ils passent ensuite dans la circulation porte par un autre transporteur de monosaccharides, GLUT2.

b. L'absorption des graisses

Afin de pouvoir absorber les lipides provenant de l'alimentation, une étape enzymatique préalable est nécessaire et requiert l'action d'enzymes de type lipases, majoritairement d'origine pancréatique. Les acides biliaires sécrétés lors de la prise alimentaire au niveau du duodénum permettent une émulsification des lipides dans la lumière intestinale sous forme de micelles, permettant leur absorption (62). Les vitamines liposolubles (A, D, E et K) sont absorbées de manière concomitante par les entérocytes. Le cholestérol est quant à lui absorbé de manière sélective par le transporteur NPC1L1 présent au pôle apical des entérocytes. Des transporteurs d'efflux (ABCG5 et ABCG8) rejettent le cholestérol dans la lumière apicale, ce qui permet d'en limiter l'absorption.

Les entérocytes synthétisent des lipoprotéines, en particulier les chylomicrons qui permettent le transport des lipides alimentaires vers le foie. L'intestin est également capable de synthétiser des HDL. Il est responsable de la concentration élevée en HDL cholestérol dans la circulation portale (63). Ces HDL ont un rôle protecteur en séquestrant le LPS, endotoxine bactérienne responsable en particulier de l'initiation de la réponse inflammation hépatique (63).

c. L'absorption des acides aminés

Les peptides provenant des protéines de l'alimentation sont hydrolysés par l'acidité gastrique ainsi que par les nombreuses protéases présentes dans l'intestin. Les acides aminés, les di- et les tripeptides sont absorbés majoritairement via le transporteur PEPT1 *peptide transporter 1*. Ils sont ensuite excrétés du côté basolatéral par différents transporteurs, en fonction du type d'acides-amino, pour rejoindre la circulation porte (61).

d. L'absorption des vitamines

Les vitamines hydrosolubles sont transportées via les protéines de la famille SLC, *solute carrier family*. Chaque vitamine possède son transporteur spécifique.

e. Altérations de l'absorption intestinale dans le contexte des NAFLD

Dans le contexte pathologique de NAFLD, la fonction d'absorption de l'intestin a été décrite comme altérée. Les patients obèses et diabétiques de type 2, c'est-à-dire les patients à risque de développement de NAFLD, présentent une dyslipidémie post-prandiale, avec une augmentation de leur chylomicronémie, conséquence d'une augmentation de la production intestinale de ces lipoprotéines (64). L'absorption des triglycérides, reflétant le métabolisme lipidique de l'intestin, a été montrée comme augmentée chez les patients NAFLD, ce qui contribue à l'insulino-résistance des patients (65).

2. La fonction endocrine

a. Les cellules sécrétrices d'incrétines

Parmi la grande diversité de types de cellules entéro-endocrines, les cellules L et les cellules K ont un rôle important dans le métabolisme énergétique de leur hôte.

Les cellules L sont retrouvées plutôt au niveau de l'intestin distal, iléon et côlon. Lors d'une absorption de glucose, ces cellules vont pouvoir sécréter le GLP-1 dans la circulation porte pour permettre ensuite, après fixation sur son récepteur GLP-1R, une potentialisation de la sécrétion d'insuline par les cellules β des îlots de Langerhans pancréatiques (66). Cette sécrétion hormonale est également retrouvée par d'autres stimuli, comme les peptones, les acides biliaires, les lipides et les acides gras à chaîne courte (67). La conséquence de l'activation du GLP-1R, récepteur membranaire couplé aux protéines G, est une fusion membranaire des vésicules contenant l'insuline, et une diminution de la glycémie (68). Les cellules L sécrètent également le peptide PYY, autre entérohormone qui régule l'appétit par son action sur le système nerveux central et qui agit aussi sur la contraction du pylore (69).

Les cellules K sont retrouvées dans l'intestin grêle proximal, au niveau du duodénum. Elles sécrètent l'hormone GIP (*gastric inhibitory polypeptide*) en réponse à une prise alimentaire, au glucose, mais surtout à une ingestion de lipides (69,70). La fixation du GIP sur son récepteur (GIP-R) situé également sur les cellules β de Langerhans permet aussi un effet incrétine par un mécanisme identique à la voie GLP-1 (68).

b. Altérations de la voie incrétine dans les NAFLD

Chez les patients atteints de NAFLD, l'insulino-résistance est un élément central et un élément ciblé par beaucoup de molécules en cours d'évaluation pour soigner la pathologie hépatique (voir chapitre précédent). La stéatose hépatique a en effet été montrée comme plus importante chez les patients insulino-résistants que chez les patients normoglycémiques (71). La sécrétion de GLP-1 mais pas celle de GIP en réponse à une prise orale de glucose a été montrée comme diminuée chez les patients atteints de NAFLD par rapport à des patients sains (72). Cependant, des données précliniques ont montré une diminution de l'expression pancréatique du GIP récepteur chez le rat diabétique, expliquant peut être la faible exploration en thérapeutique des agonistes du récepteur du GIP par rapport aux agonistes du récepteur du GLP-1 (73).

3. La fonction barrière

a. La barrière physique

Pour limiter le passage paracellulaire du contenu intestinal, l'épithélium se doit d'être une barrière sélectivement « imperméable ».

Les jonctions inter-cellulaires

Des complexes multi-protéiques entre les cellules permettent la délimitation entre le pôle apical et le pôle basolatéral des cellules : les jonctions serrées. On y retrouve différentes classes de protéines (figure 5) :

- Occludine

C'est une protéine transmembranaire qui interagit par son extrémité C-terminale avec le cytosquelette d'actine via ZO-1. Elle est formée de deux boucles extracellulaires qui interagissent avec l'occludine d'une cellule adjacente pour former la jonction inter-cellulaire (74).

- Claudines

Les claudines représentent une famille d'au moins 24 molécules différentes participant aux jonctions serrées. Protéines transmembranaires, l'expression de chacune diffère selon les sections de l'intestin. Elles peuvent laisser sélectivement passer les cations (claudine 2 et 15) ou les anions (claudine 17) permettant de conférer à l'intestin une résistance électrique transépithéliale (75).

- *Junctional adhesion molecules* JAMs

Les trois protéines de la famille JAM (JAM-A, JAM-B et JAM-C) sont des protéines transmembranaires disposant d'un domaine extracellulaire de type immunoglobuline-like. Seule JAM-A semble participer à la régulation de la formation des jonctions serrées dans l'intestin (76).

- *Zonula Occludens proteins*

Ce sont les protéines intracellulaires ZO-1, ZO-2 et ZO-3. Elles assurent l'interaction entre les protéines transmembranaires des jonctions serrées et le cytosquelette des entérocytes.

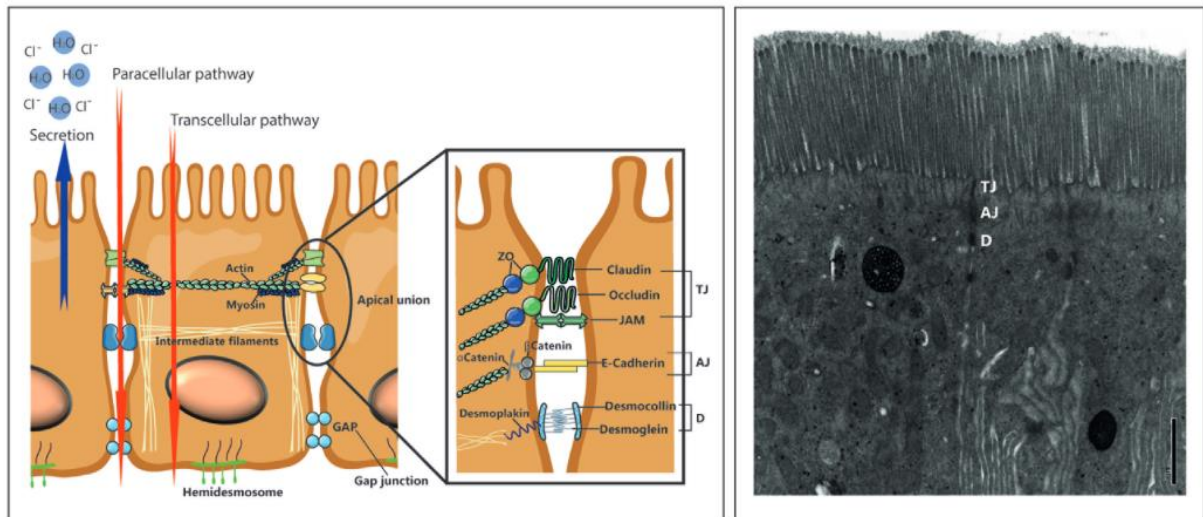


Figure 5 : Structure des jonctions serrées. (77)

Le mucus et les cellules caliciformes

Le mucus est synthétisé par les cellules caliciformes. Son organisation est différente selon la partie de l'intestin à laquelle on s'intéresse, constitué d'une mono-couche dans l'intestin grêle alors qu'il est constitué de deux couches dans le colon (78). Il est composé de glycoprotéines de la famille des mucines, avec en particulier la protéine MUC2 qui est synthétisée sous forme de polymères, puis clivée et hydratée pour former la protéine majoritaire du mucus. Le rôle principal du mucus est de protéger l'épithélium du bol alimentaire ainsi que du microbiote intestinal en régulant par exemple la taille de ses pores et son hydratation. Il participe également à la protection face aux bactéries, en limitant l'accès direct du microbiote intestinal à l'épithélium (78). Les cellules caliciformes dialoguent également avec le système immunitaire intestinal et sont sensibles aux cytokines de type Th2 et en particulier à l'IL-13. Cette interleukine induit une hyperplasie des goblet cells ainsi qu'une hyperproduction de MUC2, épaississant la couche de mucus (79).

b. La barrière immunologique intestinale

L'intestin possède un système immunitaire complexe, composé d'une richesse et d'une diversité importante en cellules immunes (figure 6). Organisées en structures macroscopiques ou simplement infiltrées dans le tissu, les cellules immunes contribuent à la défense de l'organisme contre les pathogènes extérieurs ainsi qu'à l'instauration d'une tolérance immunologique.

Apparentés aux lymphocytes, les *innate lymphoid cells* (ILC) peuplent également le tissu intestinal. Divisés en trois familles, ces ILCs ont des rôles distincts : les ILC1, apparentés aux cellules *natural killer* NK, ont un rôle de protection contre les virus et bactéries intracellulaires, les ILC2 jouent un rôle dans la protection face aux infections aux helminthes et les ILC3 participent à la protection contre les bactéries extracellulaires (84). Enfin, l'intestin possède également des populations de macrophages résidents qui participent à l'homéostasie du tissu, à sa vascularisation et au développement du système nerveux entérique (85).

c. Le microbiote intestinal

Le microbiote intestinal regroupe un ensemble de bactéries, virus, parasites, champignons, archées... non pathogènes vivants qui colonisent le tube digestif. Il est difficile de définir ce qu'est un microbiote intestinal sain, c'est pourquoi sous ce terme seront décrits les fonctions et la composition du microbiote des patients non atteints de pathologies métaboliques (86).

Les espèces bactériennes composant le microbiote intestinal sont nombreuses, rendant son étude complexe. Elle repose généralement sur l'évaluation de la richesse en certains *phyla* bactériens par le séquençage des séquences d'ARN 16S bactérien (86).

Le microbiote intestinal joue un rôle protecteur contre les bactéries pathogènes par de multiples mécanismes comme la compétition pour les nutriments et l'oxygène, la stimulation du système immunitaire de l'hôte ou l'élimination directe de ces bactéries pathogènes par la sécrétion de bactériocines (87).

Parmi les molécules produites par le microbiote qui régulent la virulence des pathogènes, on retrouve les acides gras à chaîne courte (*short chain fatty acid* - SCFA) acétate, propionate et butyrate (88). Issus de la dégradation des polysaccharides complexes (89), ils servent de substrat énergétique principalement pour les cellules de l'épithélium du côlon, là où ils sont majoritairement produits (90). Ils agissent également sur le métabolisme des individus, réduisant par exemple la néoglucogenèse hépatique (91) et augmentant la sécrétion du GLP-1 par les cellules L entéroendocrines, en particulier par l'activation du récepteur membranaire GPR43 (92). Les acides biliaires sécrétés dans le *lumen* intestinal lors de la digestion possèdent un effet antiseptique (93) et certaines bactéries expriment l'enzyme *Bile Salt Hydrolase* (BSH) et sont capables de transformer les acides biliaires primaires en acides biliaires secondaires (94). La grande diversité d'acides biliaires permet, au-delà de l'effet sur l'absorption des lipides, des modulations précises de récepteurs sensibles aux acides biliaires dans l'intestin comme FXR, TGR5 ou VDR (94). Le microbiote intestinal produit aussi d'autres métabolites comme l'éthanol endogène ou le lipopolysaccharide (LPS), constituant de la paroi bactérienne des bactéries GRAM négatives, qui influent sur la barrière intestinale (95).

d. Altérations de la barrière intestinale dans le contexte de NAFLD

Il apparaît assez clair dans la littérature que la perméabilité intestinale est augmentée dans le contexte de NAFLD, aussi bien chez l'homme que dans les modèles précliniques de la maladie (96,97). Chez la souris soumise à un régime pauvre en fibres, il a été montré que la couche de mucus dans le colon était plus fine, ce qui permet l'accès de certaines bactéries délétères à l'épithélium intestinal (98). Or, les régimes de type « western diet », riches en graisse et en saccharose qui induisent chez l'animal obésité et NAFLD, sont également pauvres en fibres ce qui suggère un impact sur l'épaisseur de la couche de mucus chez ces souris.

Chez la souris, la mesure de la fluorescence du plasma sanguin après un gavage au dextran-FITC, un polymère couplé à un marqueur fluorescent et peu absorbé par l'intestin en condition physiologique, est une technique courante de mesure de l'intégrité de la barrière intestinale. Par cette technique, Luther et ses collègues ont montré que dès les premières semaines de régime MCD, un régime déplété en choline et en méthionine qui induit une NASH sans insulino-résistance, la perméabilité intestinale des souris augmente (96). De plus, on retrouve chez ces souris une diminution de l'expression protéique de Zo-1, une des protéines constituant les jonctions serrées (96). Lorsqu'on soumet des souris invalidées pour Jam-a à un régime qui induit obésité et NAFLD, l'histologie hépatique est aggravée, démontrant l'importance de cette protéine des jonctions serrées dans la protection du foie (99).

Une modification de la barrière immunologique intestinale est également retrouvée dans le contexte des NAFLD. Chez la souris, un régime induisant l'obésité augmente le pool de macrophages pro-inflammatoires dans la *lamina propria* du côlon (100). On retrouve cette inflammation chez la souris soumise à un régime MCD pendant 5 semaines (101). Cette inflammation augmentée a pour conséquence une diminution de la profondeur des cryptes et une augmentation du passage du LPS pro-inflammatoire dans la circulation portale (100). Ce même type de régime induit également une diminution du nombre de plasmocytes producteurs d'IgA dans la *lamina propria* du côlon (102). Or, chez des souris déficientes en IgA soumise à ce régime gras, une augmentation de la perméabilité intestinale et de l'endotoxémie a été montrée (102).

Chez l'Homme, une évaluation indirecte de la perméabilité intestinale est possible grâce à un test à l'EDTA radiomarqué au chrome 51 par voie orale. Le comptage de la radioactivité des urines des patients avec une gamma-caméra a été montré comme positivement corrélé à la stéatose hépatique (97). L'expression des protéines de jonctions a également été étudiée, montrant notamment une diminution de l'expression de ZO-1 dans le duodénum de patients atteints de NAFLD (97). Une diminution de l'expression de JAM-A est retrouvée dans le côlon des patients atteints de NAFLD (99).

Au-delà des jonctions épithéliales, certains auteurs s'intéressent à la perméabilité de l'endothélium vasculaire. Mouries et ses collègues ont montré que l'endothélium vasculaire de souris sous régime gras était plus perméable, et donc plus propice au passage dans le système porte des endotoxines provenant de la lumière intestinale (103).

Le système immunitaire intestinal est également perturbé chez l'homme. Dans le contexte pathologique d'obésité, la densité en macrophages et en lymphocytes T dans le jéjunum est augmentée (104). Parmi les lymphocytes T dans le jéjunum des patients obèses, les CD4⁺ expriment plus d'IL-17 et d'IL-22, deux cytokines pro-inflammatoires et les CD8⁺ expriment plus de la forme CD8αβ du récepteur, montrant une augmentation de l'inflammation du tissu intestinal (104). Chez ces patients, le NAS score est corrélé positivement à la densité de lymphocytes T CD8⁺ dans l'épithélium (104).

La condition métabolique des patients a un impact sur leur microbiote intestinal. Il est cependant difficile d'extrapoler les données obtenues sur des modèles animaux à l'homme, car le microbiote intestinal et l'architecture de l'intestin sont différents selon l'espèce étudiée (105). Des expériences sur les souris *germ-free*, des souris dépourvues de microbiote nées en isolateur stérile, ont démontré un rôle causal du microbiote intestinal par leur protection contre l'obésité induite par un régime gras (106). De plus, après transplantation du microbiote provenant de donneurs sains, des patients atteints de syndrome métabolique présentent après 6 semaines une meilleure sensibilité à l'insuline, ce qui prouve qu'une approche centrée sur la modulation du microbiote intestinal est intéressante en dehors du traitement des infections à *Clostridium difficile* (107). La colonisation abondante par certaines bactéries particulières comme *Akkermansia muciniphila* est bénéfique pour le statut métabolique des patients (108). Dans le cadre des NAFLD, de nombreuses études rapportent des résultats parfois discordants sur les différences entre les populations bactériennes des patients sains et malades (105). Cependant, les facteurs dérivés du microbiote, LPS en tête, aggrave la pathologie hépatique (105).

Objectifs du travail de thèse

L'ensemble de ces arguments montrent que les fonctions intestinales sont altérées dans le contexte pathologique de NAFLD (figure 7). Un certain nombre de thérapeutiques évaluées en clinique humaine sont basées sur des mécanismes liées à l'axe intestin-foie (109).

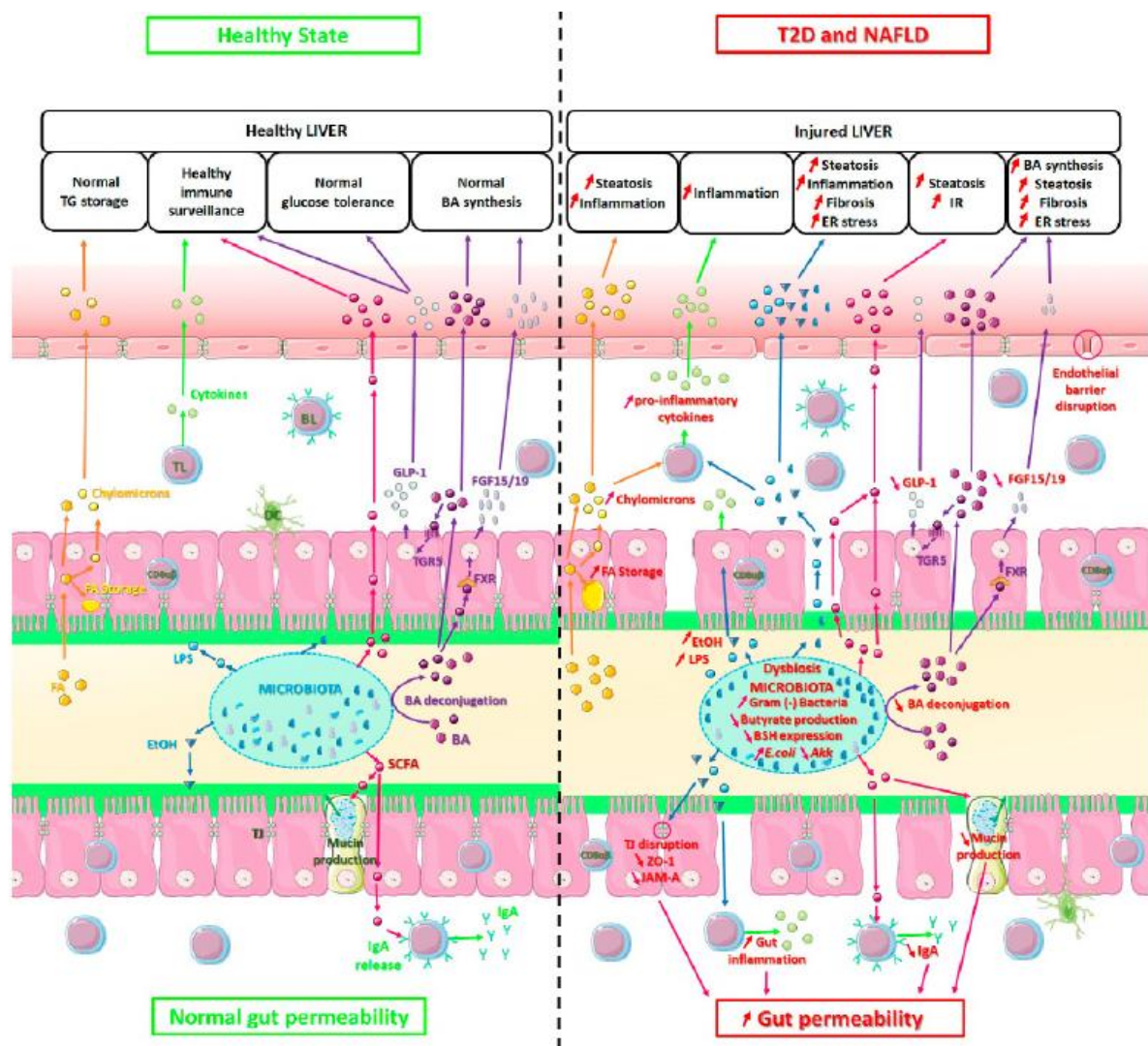


Figure 7 : Altérations des fonctions intestinales dans le contexte de NAFLD et de diabète de type 2. (109)

Or, pour mieux comprendre la pathologie, la caractérisation physiopathologique complète est nécessaire, et les modèles pré-cliniques de NASH s'intéressent rarement à l'ensemble des fonctions intestinales, indiquant parfois que l'intestin est une conséquence de la pathologie hépatique (96). Au laboratoire, nous travaillons sur l'hypothèse inverse, à savoir que l'altération des fonctions intestinales est préalable à la pathologie hépatique et que c'est par les défaillances de ses fonctions que la NASH s'aggrave. Afin de tester cette hypothèse, nous travaillons sur un modèle de NASH induite par un régime chez la souris, modèle déjà publié mais étudié du point de vue du foie uniquement (110). Ce travail de thèse s'intéressera à la caractérisation de ce modèle, d'abord par une caractérisation complète de la maladie hépatique, avant de s'intéresser aux altérations des fonctions de barrière intestinale.

Matériel et méthodes

Protocoles animaux

Les souris mâles de fond génétique C57Bl6/J sont obtenues auprès de Charles River. Reçues âgées de 7 semaines au maximum, les souris ont été maintenues à l'animalerie de l'Institut Pasteur de Lille, à une température contrôlée de 21°C et selon un cycle jour-nuit de 12h. A 8 semaines d'âge, les protocoles de régime sont débutés, en accord avec les autorisations éthiques (CEEA 02/2008). Après randomisation des souris selon leur poids, les animaux sont mis sous un régime connu pour induire la NASH (régime TD08811 + 1 % cholestérol – Takeda Custom Diet) pendant 24 semaines, temps nécessaire à l'établissement de la maladie pour ce régime (110) ou sous un régime standard (A04 – Safe). La prise de poids des animaux est réalisée toutes les semaines. Trois prélèvements sanguins rétro-orbitaux sont effectués dans des tubes traités à l'EDTA (20-1341 – Sarstedt) après 5h de mise à jeun et anesthésie à l'isoflurane (1000 mg/g, Axience) respectivement la première semaine de régime, à mi régime et au terme du régime. Ce sang prélevé est centrifugé 10 min à 4500 rpm pour en récupérer le plasma avant de le congeler à -20°C. Ce plasma est utilisé pour le dosage des transaminases, dosage effectué par un automate Konelab 20 (Thermo scientific).

Les animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale le matin à 7h, non à jeun pour les animaux utilisés pour l'immunophénotypage des cellules immunitaires intestinales ou à jeun pour les autres.

L'intestin est récupéré avant d'être séparé en différentes parties. Deux tronçons d'un demi centimètre sont prélevés et placés dans du paraformaldéhyde (P6148 – Sigma) 4 % à pH 7,3 pour les analyses histologiques. Les pièces intestinales sont ensuite nettoyées au PBS 1X froid avant prélèvement d'un segment mis en cryotube et congelé dans l'azote liquide pour les analyses d'expression génique. Les parties restantes de l'intestin grêle et du côlon ont été ouvertes longitudinalement, rincées au PBS 1X, pesées puis découpées en tronçons de 0,3 à 0,5 cm et placées dans des tubes Falcon® contenant du PBS 1X à 4°C. L'intestin grêle et le côlon sont gérés séparément.

Le contenu du caecum est récupéré et congelé dans l'azote liquide. Sa masse est estimée par calcul en retranchant le poids du caecum vide au poids du caecum plein.

Le foie des souris est également prélevé et pesé. Deux tranches du lobe gauche – le plus volumineux – sont immergées dans du paraformaldéhyde 4 % à pH 7,3 pour les analyses histologiques. Le lobe caudal est prélevé et découpé en morceaux puis congelé dans l'azote liquide pour les analyses d'expression génique.

Extraction et dosage des lipides hépatiques

Chaque échantillon de foie de 50 mg est broyé dans 1 mL de set buffer composé d'une solution à 250 mM de saccharose (477187 – Carlo Erba reagent), 2 mM d'EDTA (A15161 – Alfa Aesar) et 10 mM de TRIS base (T3253 – Sigma) dans de l'eau distillée. Ce broyat est placé dans l'azote liquide pendant 15 min, puis décongelé à température ambiante à deux reprises. Il est ensuite aspiré à l'aiguille 26 G avant deux nouveaux cycles de congélation-décongélation. Les échantillons sont ensuite dosés sur un Konelab 20 (Thermo scientific). Pour normaliser ces résultats, ils sont rapportés aux protéines extraites de chaque échantillon dosés par le kit BCA protein assay reagent kit (Interchim) sur un NanoQuant infinite M200 Pro (Tecan).

Isolement des cellules immunitaires intestinales

Le protocole d'isolement des cellules immunitaires intestinales pour immunophénotypage est une adaptation d'un protocole interne au laboratoire et du protocole publié par Qiu et Sheridan (111).

Trois séquences « agitation vigoureuse – centrifugation d'une minute à 4°C 1500 rpm – élimination du surnageant – remise en suspension » des pièces intestinales contenues dans le falcon® dans du PBS 1X froid sont réalisées pour l'intestin grêle, et deux seulement pour le côlon. Après la dernière séquence, le surnageant est éliminé. Sur les pièces intestinales, 20 mL d'une solution de DTE à 1mM (A10138 – Alfa Aesar) dans de l'HBSS (14170-088 – Gibco) avec 10% de SVF (500105H1 – Dutscher) et 15mM d'HEPES (H4034 – Sigma) à 37°C sont ajoutés et les tubes mis sous agitation à 110 rpm dans un incubateur orbital à 37°C pendant 20 minutes. Après 10 secondes de Vortex®, le surnageant est filtré sur des filtres 70 µm en prenant garde de ne pas perdre de pièces intestinales sur le filtre. Cette étape sera répétée une seconde fois.

Les tubes contenant le filtrat sont centrifugés à 400 g et 4°C pendant 5 minutes. Le surnageant est éliminé et les cellules re-suspendues dans du PBS 1X froid. Ces suspensions sont les fractions de cellules intra-épithéliales.

Après les deux filtrations permettant d'isoler les fractions de cellules intra-épithéliales, les pièces intestinales sont mises dans 20 mL de solution d'EDTA à 5 mM dans de l'HBSS avec 15mM d'HEPES à 37°C et 30 minutes sous agitation à 110 rpm avant élimination du surnageant. Cette étape sera répétée une fois. Dix mL de la solution de collagénase IV (17104-019 – Gibco) à 2 mg/mL dans de l'HBSS avec 10% de SVF et 15mM d'HEPES et sont ensuite ajoutés et les échantillons sont placés dans un incubateur orbital sous agitation à 220 rpm et 37°C pendant 1h30. Cette solution est ensuite filtrée à l'aide d'un filtre 70 µm. Ce filtre est ensuite lavé par 10 mL de PBS 1X froid. Les suspensions ainsi obtenues sont les fractions de cellules de la *lamina propria*.

Une fraction enrichie en cellules immunitaires est obtenue à l'aide d'un gradient de Percoll (17-0891-01 – Dutscher). Brièvement, après centrifugation à 1500 rpm pendant 10 minutes des fractions de cellules intra-épithéliales et de la *lamina propria*, le surnageant est éliminé. Une solution mère de percoll est préparée en ajoutant 10% de PBS 10X à la solution commerciale de percoll. Elle sera ensuite diluée avec du PBS 1X en deux solutions, à 40 % et à 80 % qui serviront à faire un gradient de séparation. Le culot cellulaire est re-suspendu dans 6 mL de la solution de Percoll 40%. Deux mL de la solution de Percoll 80 % sont injectés sous la suspension cellulaire afin de créer le gradient. Après 20 minutes de centrifugation à 1000 g et 4°C sans frein, la fraction enrichie en cellules immunitaires est visible à l'interphase du gradient. Elle est récupérée dans 2 mL de la phase supérieure du gradient et lavée dans 15 mL de PBS 1X froid. Un échantillon de cette solution sera prélevé et coloré au bleu trypan (15250-061 – Gibco) pour comptage sur cellule de Malassez. Le reste de la suspension sera centrifugé à nouveau 10 min à 1500 rpm. Le culot cellulaire sera resuspendu dans 100 µL de PBS 1X et déposé en plaque 96 puits à fond conique pour le marquage.

Marquage et cytométrie en flux

Les anticorps utilisés pour la cytométrie en flux ainsi que leur dilution sont détaillés dans le tableau 3. Après centrifugation à 1500 rpm 4°C pendant 3 minutes, les cellules sont marquées initialement au Zombie dilué au 1/100^{ème} dans du PBS 1X froid pendant 20 minutes à l'obscurité. Après un lavage au PBS, les cellules sont marquées à l'aide de l'anticorps anti CD16/30 non couplé dilué au 1/150^{ème} dans du PBS + 0,5 % de sérumalbumine bovine pendant 20 minutes à l'obscurité à 4°C. Les cellules sont ensuite marquées avec le cocktail regroupant tous les autres anticorps. Des billes (552845 et 552843 – BD CompBeads) seront marquées avec chaque anticorps individuellement à la même dilution que les cellules pour régler le cytomètre, exception faite des anticorps anti-chaines λ qui seront remplacés par d'autres anticorps couplés dans les mêmes canaux de fluorescence. Après centrifugation et un lavage, les cellules seront resuspendues dans 250 µL de PBS 1X + 0,5 % de sérumalbumine bovine (04-100-812-E – Euromedex) dans des tubes pour passage sur le cytomètre de flux (Fortessa X20 – BD). Les résultats sont exploités avec le logiciel FlowJo®.

Fixation des tissus pour l'histologie

Les biopsies hépatiques et intestinales sont conservées à 4°C une nuit dans la solution de paraformaldéhyde 4 % pH 7,3. Elles sont lavées à deux reprises au PBS 1X froid. Pour chaque animal, une biopsie de chaque organe est à destination d'une inclusion en paraffine et l'autre est utilisée pour des coupes congelées au cryostat.

Tableau 3 : Anticorps utilisés en cytométrie

Marqueur	Fluorochrome	Isotype	Dilution	Référence
CD11b	BUV 395	Rat IgG2b, κ	1/200 ^{ème}	BD Biosciences 563553
CD45.2	BUV 737	Humain IgG2a, κ	1/200 ^{ème}	BD Biosciences 564880
Zombie - UV	BUV 496	-	1/100 ^{ème}	Biolegend 423107/8
TCR γδ	BV 421	Hamster IgG	1/100 ^{ème}	Biolegend 118120
TCR β	BV 510	Hamster Ig, λ	1/100 ^{ème}	Biolegend 109233
CD4	BV 605	Rat IgG2a, κ	1/200 ^{ème}	Biolegend BLE100548
IA-IE	BV 650	Rat IgG2b, κ	1/1500 ^{ème}	Biolegend BLE107641
CD19	BV 711	Rat IgG2a, κ	1/200 ^{ème}	BD Biosciences 563157
F4/80	BV 786	Rat IgG2a, κ	1/200 ^{ème}	Biolegend BLE123141
CD11c	FITC	Hamster IgG, λ	1/100 ^{ème}	BD Biosciences 553801
CD103	PE – Cya7	Hamster IgG	1/200 ^{ème}	Biolegend 121426
Siglec F	PE – Texas Red	Rat IgG2a, κ	1/250 ^{ème}	BD Biosciences 562757
CD8b	APC	Rat IgG2a, κ	1/200 ^{ème}	Biolegend 140410
CD3	AF 700	Rat IgG2b, κ	1/100 ^{ème}	Biolegend BLE152316
CD8a	APC – Cya7	Rat IgG2a, κ	1/400 ^{ème}	Biolegend BLE100714
CD16/30	Non couplé	Rat IgG2b, κ	1/150 ^{ème}	BD Biosciences 553142
CD8a	BV510	Rat IgG2a, κ	1/100 ^{ème}	Biolegend 100752
CD4	FITC	Rat IgG2a, κ	1/100 ^{ème}	eBiosciences 11-0042-85

Inclusion et coloration des coupes en paraffine

Les biopsies fixées pour inclusion paraffine sont déshydratées par des bains d'éthanol de concentration croissante : 3 bains de 30 minutes d'éthanol 96° puis 3 bains de 30 minutes d'éthanol absolu. Les échantillons sont ensuite placés dans 3 bains successifs de xylène de 30 minutes, 1h et 1h30 avant d'être mis dans un bain de paraffine liquide à 60°C pendant 1h. Les biopsies seront ensuite laissées une nuit dans un second bain de paraffine liquide à 60°C avant inclusion avec un distributeur de paraffine (Leica – EG1150C).

Les blocs inclus en paraffine sont coupés à 5 µm d'épaisseur au microtome (RM2255 – Leica) sur des lames superfrost gold® (Fisher Scientific).

Les colorations sont réalisées au moins en partie à l'aide d'un automate de coloration (Autostainer XL – Leica). Elles débutent par des étapes de déparaffinage et de réhydratation. Les coupes sont plongées dans 2 bains successifs de Clearène® (3803600E – Leica) de 5 minutes, puis un bain d'éthanol absolu de 2 minutes et un bain d'eau osmosée de 2 minutes.

Pour la coloration à l'éosine et à l'hématoxyline, les lames sont immergées dans les bains successifs suivants : 3 minutes dans une solution d'hématoxyline (HHS128 – Sigma) pure, 2 minutes dans un bain d'eau osmosée, 6 secondes dans un bain d'éthanol 70° + 750 µL d'HCl (H/1196/PB08 – Fisher chemical), 2 minutes dans un bain d'éthanol 96°, 2 minutes dans un bain d'éosine alcoolique (HT1101128 – Sigma), 2 minutes dans un bain d'éthanol 96°, 2 minutes dans un bain d'éthanol absolu, 1 minute dans un bain de xylène.

Pour la coloration au sirius red fast green, les lames déparaffinées sont immergées manuellement 15 minutes dans un bain d'acide picrique saturé 1,3% (6744 – Sigma) + 0,4% de fast green (BP123-10 – Fisher bioreagents), 2 minutes dans un bain d'eau osmosée, 60 minutes dans une solution d'acide picrique saturé 1,3% + 0,1% de sirius red (363440-0005 – RAL reactifs) et 0,4% de fast green, 2 minutes dans un bain d'eau osmosée, 3 minutes dans un bain d'hématoxyline pure, 2 minutes dans un bain d'eau osmosée, 6 secondes dans un bain d'éthanol 70° + 750 µL d'HCl, 2 minutes dans un bain d'eau osmosée, 2 minutes dans un bain d'éthanol 96°, 2 minutes dans un bain d'éthanol absolu puis 1 minute dans un bain de xylène.

Les lames sont montées entre lame et lamelle une fois le xylène évaporé avec un milieu de montage xylène-soluble (Eukitt®).

Inclusion et coloration des coupes cryoconservées

Les biopsies fixées pour coupes congelées sont placées dans une solution de tris-HCL (T3253 – Sigma) à 12,1 g/L pH 6,5 et de saccharose (477187 – Carlo Erba reagents) à 30% pendant une journée. Les échantillons sont placés dans des moules remplis de milieu Neg-50 (6502B – Thermo Scientific) et congelés dans un fond de 2-méthylbutane (M32631 – Sigma) refroidi avec de la glace carbonique, avant d'être conservés à -80°C.

Les blocs inclus en Neg-50 sont coupés à 10 µm d'épaisseur au cryostat (CM3050S – Leica) et les coupes déposées sur des lames superfrost gold® (Fisher Scientific) gélatinées.

Pour le marquage Bodipy 493/503 (D3922 – Molecular probes), les lames sont hydratées 1 heure dans de l'eau osmosée à température ambiante. Les coupes sont ensuite entourées à l'aide d'un crayon hydrophobe avant marquage avec une solution de Bodipy reconstituée à 200 µg/mL puis diluée au 1/200^{ème} et de Dapi (H3569 – Invitrogen) au 1/1000^{ème} dans du PBS 1X à l'obscurité. Les lames sont ensuite lavées 3 fois au PBS 1X puis une fois à l'eau osmosée, avant le montage avec une lamelle et du milieu de montage aqueux (Dako fluorescent mounting medium – Dako).

Immunohistochimie CD3

L'immunomarquage des lymphocytes T a été réalisé sur des coupes en paraffine. Après déparaffinage, les lames sont réhydratées pendant 15 min dans de l'eau osmosée puis les coupes sont perméabilisées par une solution de PBS 1X + 0,2 % de triton (T8787 – Sigma) pendant 30 minutes. Une étape de démasquage des antigènes par immersion dans du tampon citrate (AP-9003-500 – Epredia) et chauffage au micro-ondes est réalisée, en suivant la séquence suivante : chauffage 5 min à 730 W, repos 1 minute à température ambiante, chauffage 10 minutes à 160 W avant de laisser refroidir 45 minutes. Les coupes sont ensuite détournées au crayon hydrophobe (A-PAP Pen – Daido Sangyo). Un blocage des peroxydases endogènes est réalisé par une incubation 10 min avec une solution de Bloxal (SP-6000 – Vector Laboratories). Après 3 lavages de 5 minutes avec une solution de lavage de PBS 1X à 0,1 % de tween20 (TB0560 – Bio Basic Canada Inc), le blocage des sites de fixation aspécifique des anticorps est réalisé pendant 1 heure à 4°C par dépôt d'une goutte de la solution *Normal Horse Serum* 2,5 % du kit de marquage (MP7401 – Vector Laboratories). L'anticorps anti CD3γ (ab134096 – Abcam) dilué au 1/500^{ème} dans la solution de *Normal Horse Serum* est utilisé pour marquer les lymphocytes T pendant une nuit à 4°C. Le lendemain, après 3 lavages, la solution d'anticorps secondaire couplé à la HRP est déposée sur chaque coupe pendant 1 heure à température ambiante. Après trois lavages, le substrat de la HRP reconstitué selon les instructions du fournisseur (SK-4800 – Vector Laboratories) est déposé sur les coupes pendant 7 minutes, avant trois autres lavages, une coloration des noyaux à l'hématoxyline pure (Sigma – HHS128) d'une minute, et un dernier lavage de 5 min à l'eau osmosée. Les lames sont ensuite déshydratées 10 secondes dans l'éthanol 96 %, 10 secondes dans l'éthanol 100 % et 1 minute dans du xylène. Les lames sont enfin montées entre lame et lamelle avec un milieu xylène-soluble (Eukitt®) avant observation.

Quantification de la stéatose hépatique

La quantification de la stéatose est réalisée en collaboration avec la plateforme d'histologie du CHU de Lille (UMS 2014 – Plateforme d'imagerie cellulaire – Faculté de Médecine de Lille Pôle Recherche). Sur des scans de lames colorées en éosine et hématoxyline, une macro codée en langage javascript compatible avec le logiciel ImageJ quantifie l'aire totale de chaque coupe ainsi que l'aire correspondant

aux zones optiquement vides, représentant la stéatose. Le rapport de ces deux mesures donne pour chaque coupe le pourcentage de stéatose hépatique. Pour éviter le biais des gros vaisseaux, les zones de taille supérieure à 1800 pixels, jugées comme trop importantes pour être de la stéatose, sont exclues du comptage.

Extraction d'ARN

Les pièces intestinales ou hépatiques sont broyées à l'aide d'un polytron (PT1600E) dans 1 mL de TRIzol® (15596018 – Ambion). Les broyats sont repris dans 200 µL de chloroforme (C/4920/15 – Fisher Chemical) puis centrifugés pendant 20 minutes à 13200 rpm à 4°C. La phase aqueuse est récupérée et un volume équivalent de propan-2-ol est ajouté. Les échantillons sont centrifugés à nouveau 20 minutes à 13200 rpm 4°C. Les culots contenant les ARN précipités sont lavés à deux reprises à l'éthanol 70°, puis laissés sécher hors glace avant d'être solubilisés dans 30 µL d'eau ultrapure et placés à -20°C jusqu'au lendemain. Les échantillons sont placés au bain marie 10 minutes à 65°C avant dosage par spectrométrie à l'aide d'un NanoDrop One (Fisher Scientific). Les rapports d'absorbance 260/280 nm et 260/230 nm, qui reflètent les contaminations respectivement par des protéines et des sels, doivent être supérieurs à 1,8 et 1,5 pour correspondre à des échantillons non contaminés.

RT-PCR

Un traitement à la DNase (kit Fisher Scientific) est réalisé. Brièvement, 1 µL d'ARN extrait est dilué dans 8 µL d'eau ultrapure avant ajout d'1 µL de solution de DNaseI et d'1 µL de tampon MgCl₂, et placé dans un thermocycleur (Mastercycler gradient – Eppendorf) pendant 30 minutes à 37°C. La réaction est ensuite stoppée par ajout d'1 µL d'EDTA et un nouveau cycle d'incubation au thermocycleur de 10 minutes à 65 °C. La rétrotranscription des ARN est réalisée avec un kit commercial (High capacity cDNA reverse transcription kit, Applied Biosystems). A chaque échantillon est ajouté un mix de réactifs provenant du kit commercial composé de 2 µL de RT Buffer 10X, 0,8 µL de dNTP mix 25X à 100mM, 2 µL de random primers 10X, 1 µL de multiple reverse transcriptase, 1 µL de RNAsin et 3,2 µL de nuclease-free H₂O. Les échantillons sont ensuite placés dans un thermocycleur pour un cycle en trois étapes : 10 minutes à 25°C, 120 minutes à 37°C puis 5 minutes à 85°C. L'ADNc ainsi obtenu est dilué au 1/10^{ème} et stocké à -20°C.

qPCR

Les qPCR sont réalisées à l'aide du kit low ROX SYBR® (Takyon®). Pour chaque puits contenant un échantillon de 2 µL de dilution d'ADNc, un mix constitué de 10 µL de Low ROX SYBR®, de dilution des oligonucléotides pour chaque gène d'intérêt (tableau 4) qsp 18 µL avec de l'eau ultrapure est déposé. Le mélange réactionnel est ensuite placé dans une machine qPCR (MX3005 – Agilent) et suit un

programme de 3 minutes à 95°C, 40 cycles d'amplification de 30 secondes à 60°C et d'extension d'1 minute à 95°C, 30 secondes à 60°C et 30 secondes à 95°C. Les résultats sont analysés à l'aide du logiciel MXpro (Stratagene – version 4.10).

Tableau 4 : Séquence des oligonucléotides utilisés en qPCR

Gène	Amorce 5' à 3' – Amorce sens	Amorce 3' à 5' – Amorce anti-sens
Tnf- α	AGCACAGAAAGCATGATCCG	CCCGAAGTTCAGTAGACAGAAGAG
Il-1 β	GCCACCTTTTGACAGTGATGAG	CCTGAAGCTCTTGTTGATGTGC
F4/80	CTTTGGCTATHHHCTTCCAGTC	GCAAGGAGGACAGAGTTTATCGTG
Col1a1	AGGCATAAAGGGTCATCGTGG	GAGACCGTTGAGTCCGTXTTT
Col3a1	TGGCAATGTAAAGAAGTCTC	CCCAGTGTGTTTAGTACAGC
Zo-1	CGCTAAGAGCACAGCA	AGGATTATCTCTCCACCAG
Jam-a	AGCCGGGAGGAAACTGTTGT	GCAGGTCAATTTGATGGACTCGT
Occludine	AAGAGCTTACAGGCAGAACT	CTGCAGATCCCTTAACTTG

Statistiques

Les figures ainsi que les analyses statistiques des protocoles animaux sont réalisées avec le logiciel GraphPad Prism® (version 6). Le test statistique de Mann-Withney est utilisé pour les comparaisons entre deux groupes, et considéré significatif lorsque la p-value est inférieure à 0,05. Pour l'analyse du gain de poids des souris en fonction du temps, un *two-way* ANOVA a été utilisé, et sa p-value a été considérée comme significative si inférieure à 0,05.

Résultats

Afin d'obtenir un bon modèle préclinique de pathologie NASH, des souris sauvages adultes ont été mises sous un régime NASH, riche en graisse, en glucides dont surtout le saccharose et supplémenté en cholestérol pendant 24 semaines, et comparées à des souris de même portée sous un régime standard. Elles ont été suivies et pesées toutes les semaines pendant toute la durée du régime (24 semaines). La première étape de ce travail est de pouvoir confirmer qu'on se trouve dans les mêmes conditions que celles déjà publiées par le laboratoire (110).

Validation du modèle

Suivi du poids

Le premier paramètre de suivi de ces souris est la prise de poids en réponse au régime. Nous retrouvons une prise de poids significativement plus importante après 24 semaines de régime NASH que la prise de poids des souris sous régime contrôle, reproduisant ainsi l'induction de l'obésité (figure8).

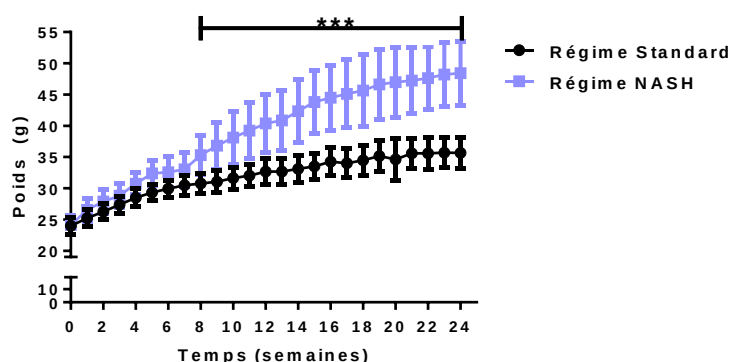


Figure 8 : Suivi de la prise de poids des souris

Les données sont exprimées en moyenne +/- écart type. n = 18-19 souris par groupe. 2-way ANOVA. P-value : *** < 0,001

Evaluation du poids du foie et de la cytolysé hépatique

La souffrance hépatique de ces souris est également évaluée. Au sacrifice, la pesée du poids du foie nous permet de conclure que les souris NASH présentent une hépatomégalie (figure 9A). Cette augmentation importante du poids du foie reste vraie lorsqu'il est normalisé au poids de la souris (figure 9B).

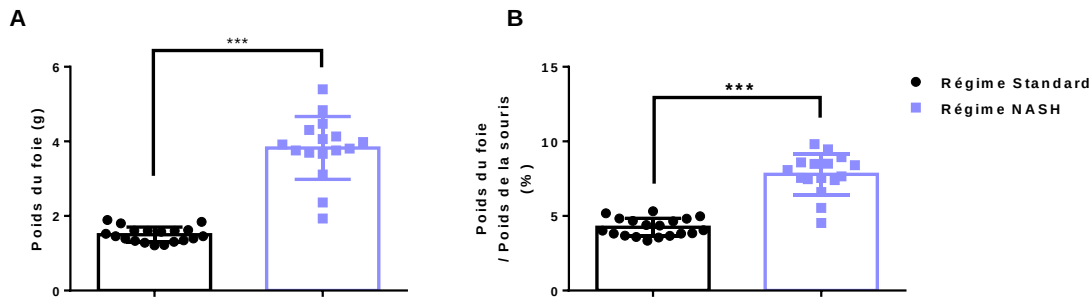


Figure 9 : Suivi hépatique des souris sous régime

A : Poids du foie au moment du sacrifice. B : Poids du foie normalisé par le poids de chaque souris. n = 16-19 souris par groupe. Données exprimées en nuage de points +/- écart type. Test de Mann-Withney. p-value : *** < 0,001.

De plus, la concentration plasmatique des transaminases, signe d'une cytolysé hépatique, est retrouvée significativement plus importante chez les souris obèses dès 12 semaines de régime. Cette cytolysé hépatique est encore plus importante après 24 semaines de régime (figure 10A-B).

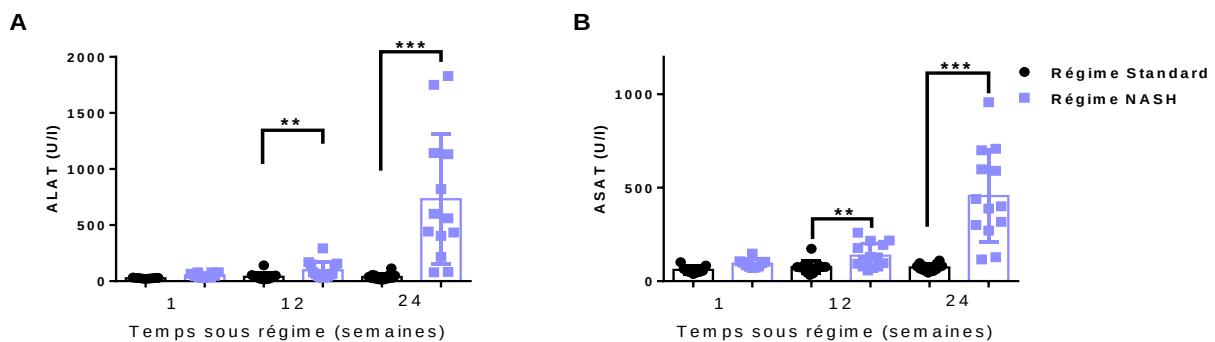


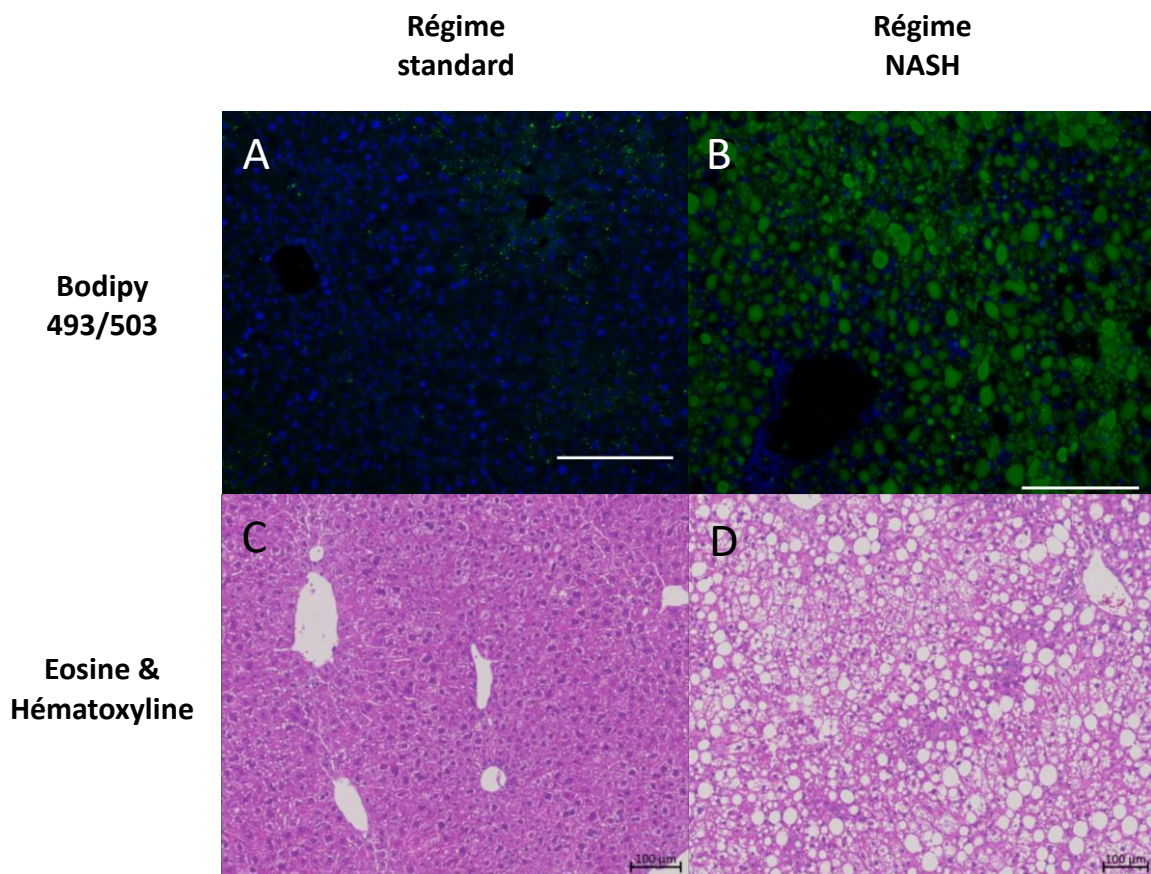
Figure 10 : Suivi hépatique des souris sous régime

A : Concentration sérique en Alanine Aminotransférase. B : Concentration sérique en Aspartate Aminotransférase. n = 9-14 souris par groupe. Données exprimées en nuage de points +/- écart type. Test de Mann-Withney. p-value : ** < 0,01 ; *** < 0,001.

Les paramètres d'évaluation de la pathologie, comme la stéatose, l'inflammation hépatique ou la fibrose sont également contrôlés dans ce modèle afin de vérifier l'induction de la pathologie hépatique. Cependant, d'autres altérations histologiques sont plus difficiles à mettre en évidence chez la souris, comme les corps de Mallory Denk, agrégats protéiques de kératine 8/18 ubiquitinyllées retrouvés dans la NASH (112), ou comme la ballonnisation, absente de ce modèle de souris (110).

Stéatose hépatique

Pour confirmer la stéatohépatite, l'histologie du foie a été réalisée. La présence de lipides, évaluée par la coloration au Bodipy 493/503 en microscopie à fluorescence, est confirmée chez les souris sous régime (figure 11A-B). Sur la coloration éosine et hématoxyline, on retrouve un tissu d'aspect très différent entre les deux conditions de régime (figure 11C-D). Les zones optiquement vides sont de tailles différentes, correspondant à des zones de micro- et de macro-stéatose telles que décrites dans la pathologie humaine. L'évaluation de la quantité de stéatose confirme l'aspect histologique, avec une très forte augmentation chez les souris NASH (figure 11E). Les concentrations tissulaires hépatiques de triglycérides (figure 11F) et de cholestérol (figure 11G) sont également augmentées chez ces souris, confirmant par un dosage biochimique ces observations histologiques.



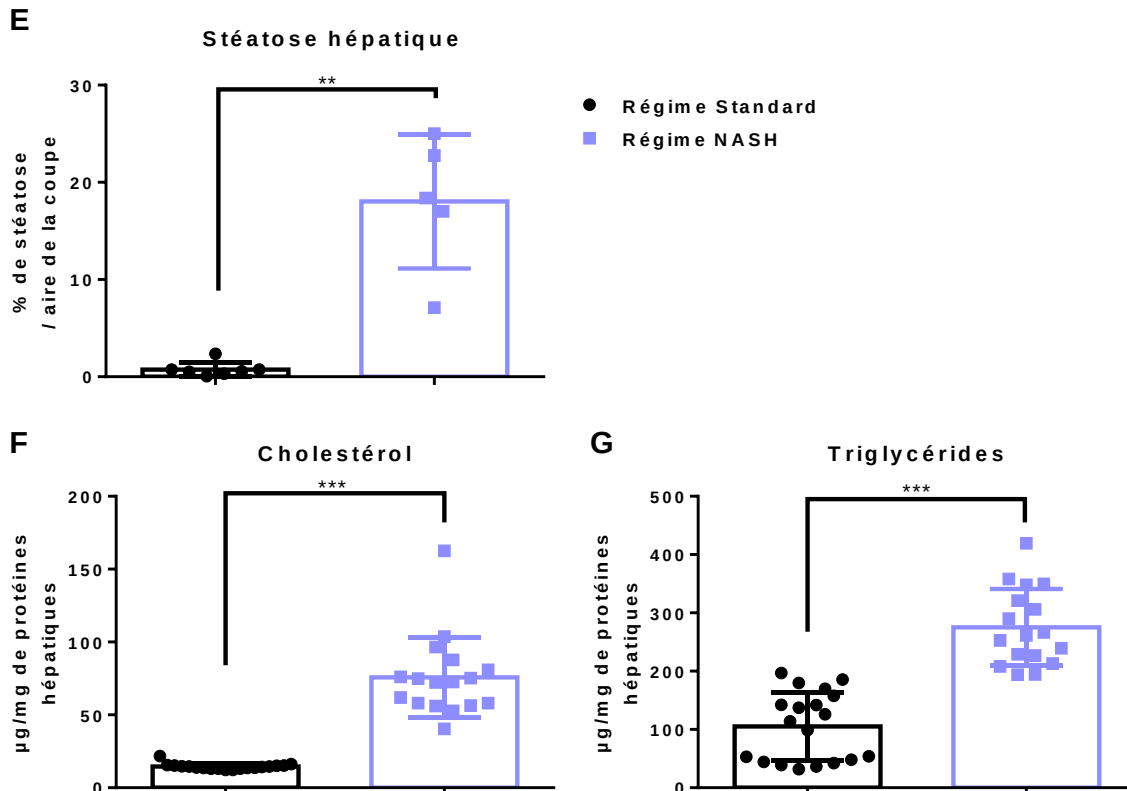


Figure 11 : Evaluation de la stéatose hépatique

A-B : Image représentative de la coloration de sections du foie d'une souris sous régime contrôle (A) ou NASH (B) au Bodipy 493/503 (vert) et au DAPI (bleu). Echelle 200 µm. C-D : Image représentative de la coloration de sections de foie d'une souris sous régime contrôle (C) ou NASH (D) à l'éosine et hématoxyline. Echelle 100 µm. E : Quantification de la stéatose sur les images de coloration à l'éosine et hématoxyline. n = 5-7 souris par groupe, 1 à 4 réplicas par souris. F-G : Mesure de la quantité de cholestérol (F) et de triglycérides (G) dans le foie des souris sous régime standard ou régime contrôle, normalisée par la quantité de protéines totales extraites. n = 16-19 souris par groupe. Test de Mann Withney. p-value : ** < 0,01 ; *** < 0,001

Inflammation hépatique

Au-delà de la stéatose, l'inflammation hépatique a également été évaluée dans ce modèle. D'abord, on retrouve chez les animaux NASH une induction de l'expression génique par RT-qPCR de gènes impliqués dans les processus inflammatoires. En particulier, on retrouve une augmentation de l'expression de *Tnf-α* (figure 12A), de *Il-1β* (figure 12B), et de *F4/80* (figure 12C). On retrouve également des *foci* inflammatoires sur les coupes colorées en éosine et hématoxyline des souris NASH, absentes des coupes de souris sous régime contrôle (figure 12D-E).

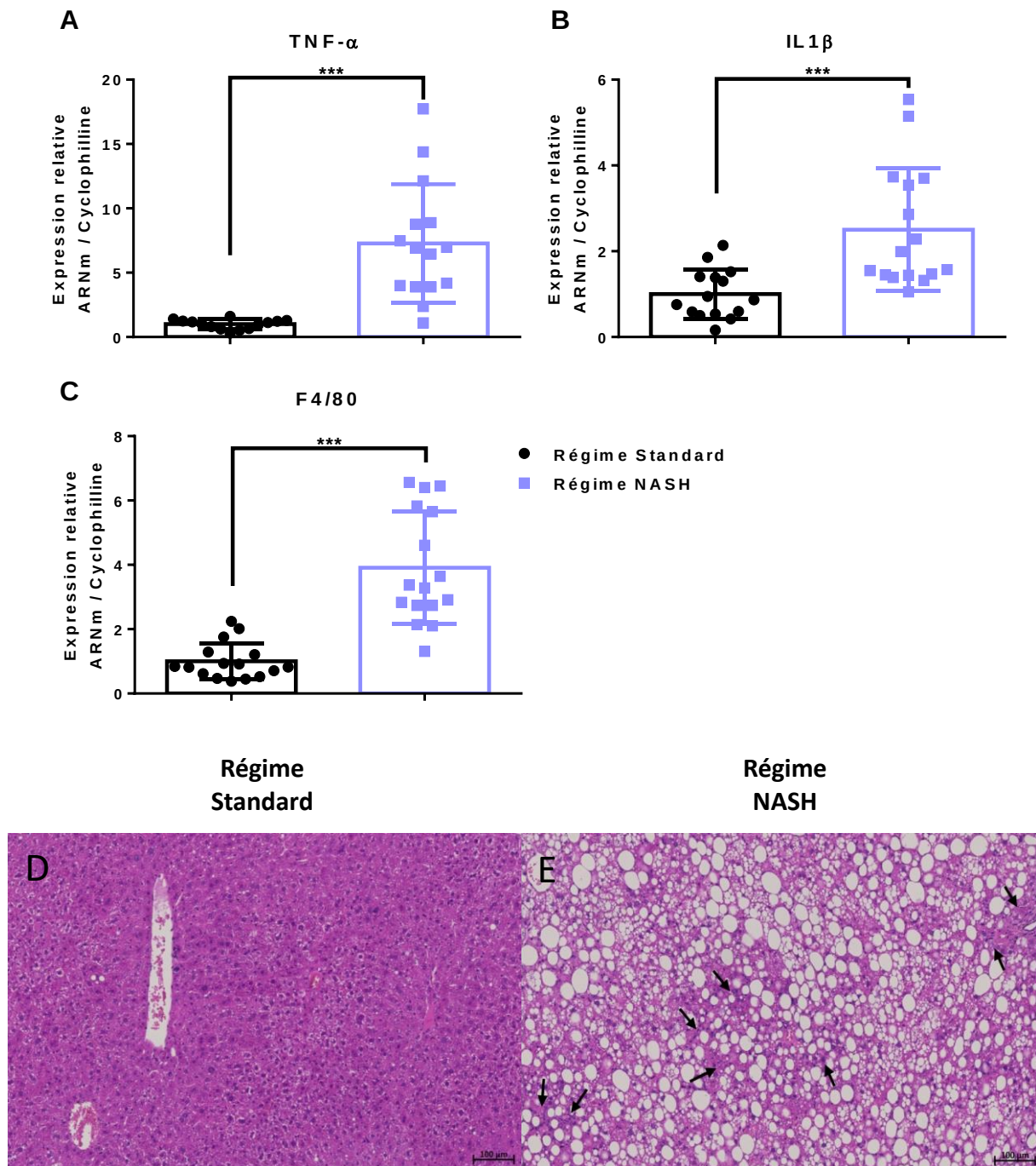


Figure 12 : Evaluation de l'inflammation hépatique

A-C : Quantification de l'expression relative par qPCR de Tnf- α (A), Il-1 β (B) et F4/80 (C) dans le foie des souris sous régime standard ou NASH, normalisée par rapport à l'expression de la cyclophiline. n = 16-19 souris par groupe. Test de Mann Withney. p-value : *** < 0,001. D-E : Images représentatives des colorations éosine et hématoxyline du foie des souris sous régime standard (D) ou NASH (E). Les flèches correspondent à des *foci* inflammatoires. Echelle : 100 μ m.

Fibrose hépatique

La fibrose hépatique est également induite par ce régime. L'expression des gènes Col1a1 (figure 13A) et Col1a3 (figure 13B), deux gènes codant pour des types de collagène, est induite chez toutes les souris sous régime NASHogène par rapport à leurs contrôles. Chez les souris sous régime contrôle, aucune fibrose n'est visible hormis les fibres autour des vaisseaux des triades porte (veine porte, artère centro-lobulaire et canalicule biliaire) (figure 13C-D). Chez les souris NASH, la fibrose est très hétérogène sur les coupes et entre les différents individus (figure 13C-D).

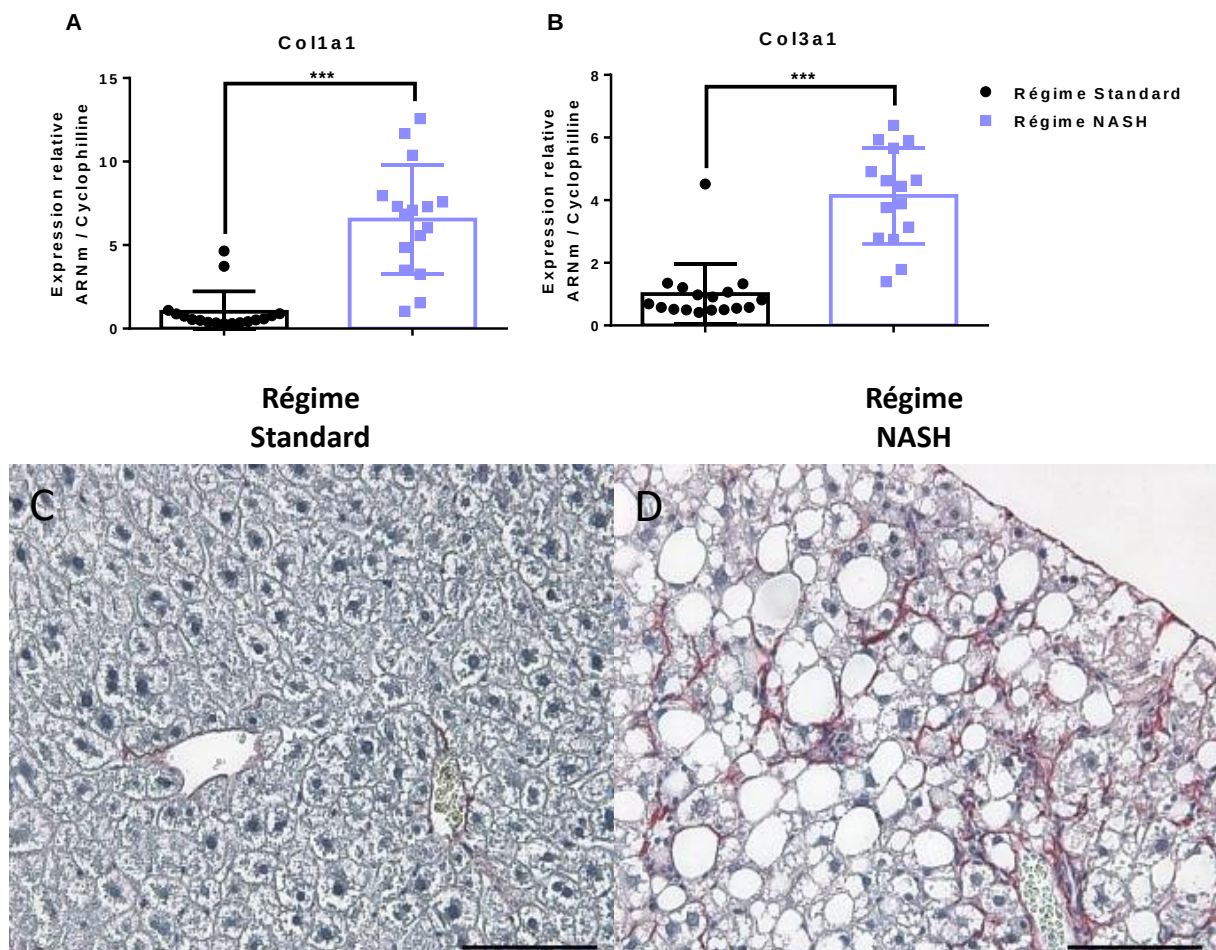


Figure 13 : Evaluation de la fibrose hépatique

A-B : Quantification de l'expression relative par qPCR de Col1a1 (A) et Col3a1 β (B) dans le foie des souris sous régime standard ou NASH, normalisées par rapport à l'expression de la cyclophiline. $n = 16-19$ souris par groupe. Test de Mann Withney. p -value : *** $< 0,001$. C-D : Image représentative des colorations Sirius Red Fast Green du foie des souris sous régime standard (C) ou NASH (D). En rouge : la fibrose ; en vert : contre-coloration du cytoplasme des cellules ; en violet : les noyaux. Echelle 200 μm .

Altérations de l'intestin

Cet ensemble d'expériences nous permettent de confirmer que nous nous trouvons dans les conditions de NASH, comme publiées au laboratoire (110). Cependant, l'impact au niveau de la barrière intestinale d'un régime riche en graisse, en saccharose et en cholestérol n'a pas été décrit dans la littérature.

Impact du régime sur l'intégrité de la barrière intestinale

L'intégrité du tissu intestinal a été évaluée par une coloration à l'éosine et à l'hémaloxiline. Dans le jéjunum, une différence est observée quant à la structure de l'épithélium, montrant des vacuoles optiquement vides, probables gouttelettes lipidiques, au niveau des pointes des villosités intestinales des souris NASH (figure 14 A-B). Cette observation n'est faite que dans le jéjunum, l'iléon et le côlon de ces souris présentent une structure identique entre les souris contrôle et les souris sous régime NASH (figure 14C-D). Il serait intéressant de comparer la profondeur des cryptes intestinales et la longueur des villosités pour savoir si le régime influe sur ces deux paramètres.

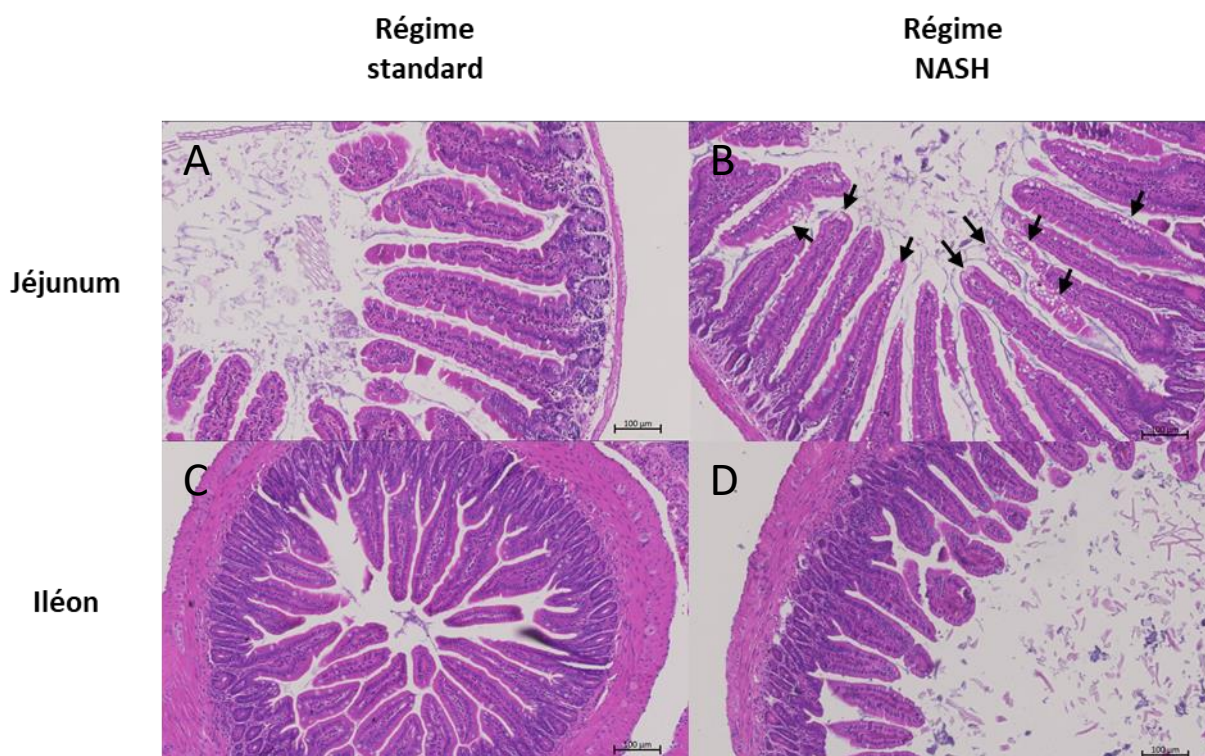


Figure 14 : Structure de l'intestin de souris sous régime contrôle ou sous régime NASH

A-B : Images représentatives de la coloration éosine et hémaloxiline des coupes de jéjunum des souris sous régime standard (A) ou NASH (B). C-D : Images représentatives de la coloration éosine et hémaloxiline des coupes de jéjunum des souris sous régime standard (C) ou NASH (D). Echelle 100 µm

Par marquage au Bodipy 493/503 et observation au microscope à fluorescence, nous pouvons confirmer que les vacuoles observées en lumière blanche sont de nature lipidique. Elles ne sont retrouvées que dans l'épithélium des souris NASH, montrant une augmentation de l'absorption ou du stockage des lipides chez ces souris (figure 15A-B).

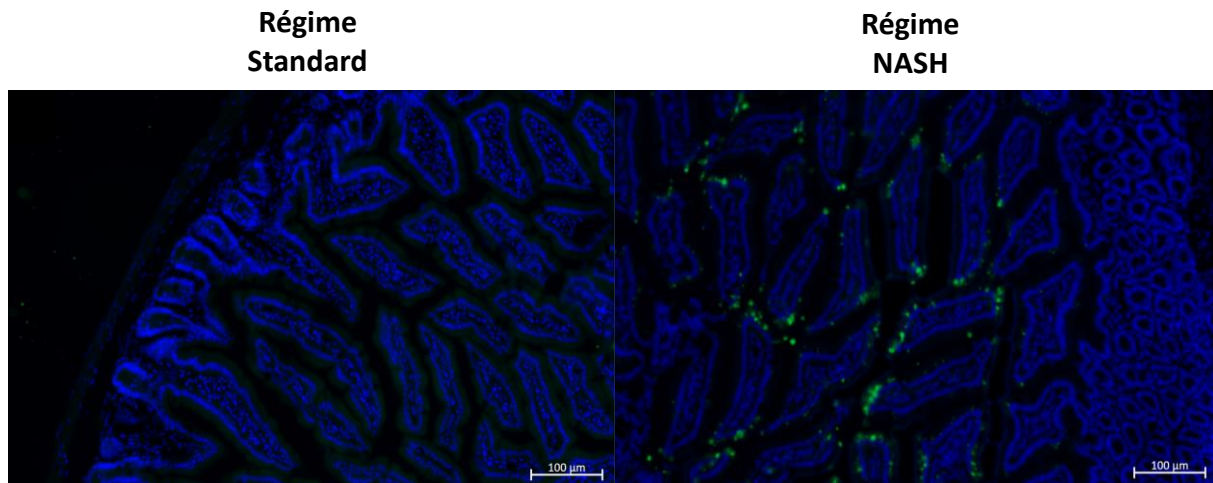


Figure 15 : Absorption des lipides dans l'intestin

A-B : Images représentatives de la coloration bodipy des coupes de jéjunum des souris sous régime standard (A) ou NASH (B). En bleu : DAPI, les noyaux ; en vert : bodipy, les lipides neutres. Echelle 100 µm.

L'expression des gènes codant pour les protéines des jonctions serrées a été quantifiée par qPCR. Dans le jéjunum et l'iléon, une diminution de l'expression génique de Zo-1 chez les souris sous régime NASH est retrouvée (figure 16A-D), alors que ce régime ne semble réduire l'expression de Jam-A que dans le jéjunum (figure 16B-E). Le régime ne semble pas modifier l'expression de l'occludine dans le jéjunum ni dans l'iléon (figure 16C-F).

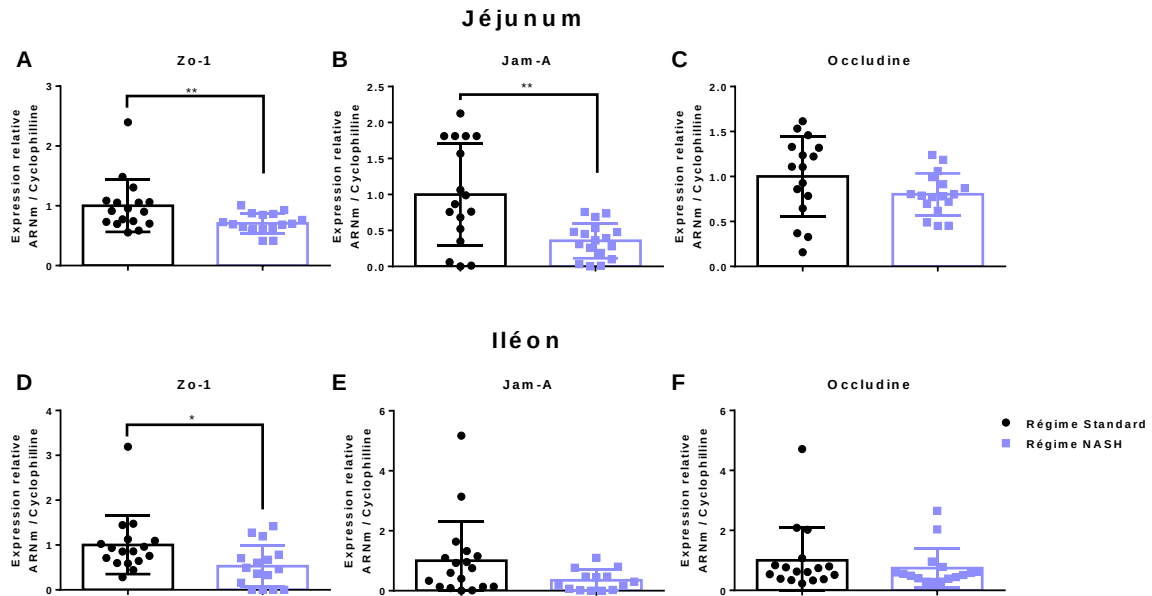


Figure 16 : Impact du régime NASH sur l'expression des protéines des jonctions serrées dans l'intestin grêle

A-F : Quantification de l'expression relative par qPCR dans le jéjunum de Zo-1 (A), Jam-A (B), Occludine (C) et dans l'iléon de Zo-1 (D), Jam-A (E) et Occludine (F) normalisées par rapport à l'expression de la cyclophiline. n = 16-19 souris par groupe. Test de Mann Withney. p-value : * < 0,05 ; ** < 0,01.

Impact du régime sur la barrière immunologique intestinale

Par cytométrie, nous avons cherché à évaluer les modifications de la barrière immunologique intestinale dans le contexte de NASH. L'arbre de décision qui permet l'identification des différentes populations immunitaires est disponible en figure 17.

Dans l'intestin grêle, les populations immunitaires infiltrées entre les cellules épithéliales sont très différentes des cellules de la *lamina propria*, c'est pourquoi elles sont traitées séparément dans les analyses. La fraction de cellules immunes dans l'épithélium du côlon étant très faible, nous nous sommes concentrés exclusivement sur les populations de la *lamina propria* dans cette partie de l'intestin.

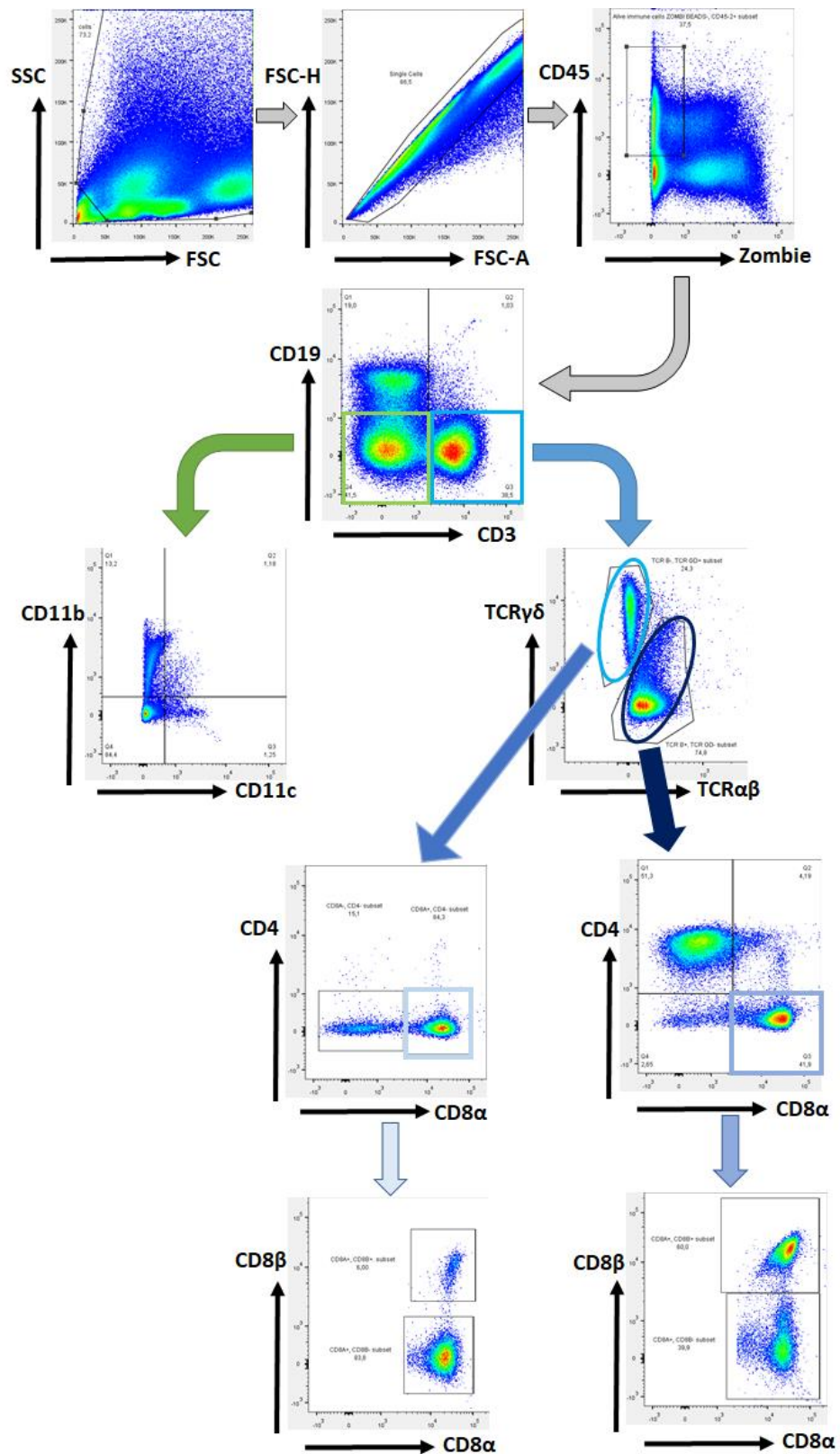


Figure 17 : Arbre de décision FlowJo® pour l'identification des populations immunitaires à partir des données de cytométrie en flux

Dans la *lamina propria* de l'intestin grêle après 24 semaines de régime, on observe une diminution de la proportion des lymphocytes T par rapport à l'ensemble des leucocytes vivants, ainsi qu'une augmentation de la proportion des autres cellules non lymphocytes, et une tendance à l'augmentation de la proportion des lymphocytes B (figure 18A). On ne retrouve pas de différences sur ces familles de cellules dans l'épithélium de l'intestin grêle ni dans la *lamina propria* du côlon (figure 18B-C).

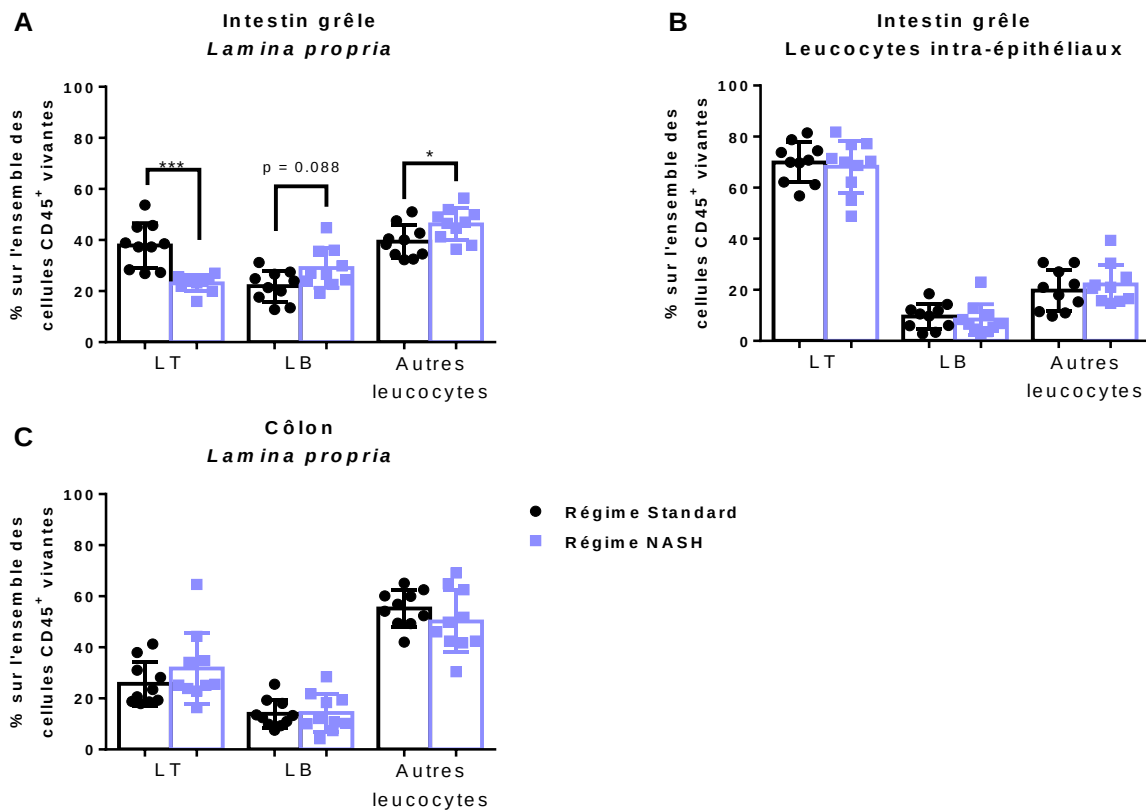


Figure 18 : Proportions des grandes familles de cellules immunitaires dans l'intestin

A-C : Proportions des lymphocytes T CD3⁺ (LT), lymphocytes B CD19⁺ (LB) et des autres leucocytes CD3⁻ CD19⁻ parmi l'ensemble des cellules immunitaires vivantes isolées (CD45⁺ Zombie⁻) dans la *lamina propria* de l'intestin grêle (A), l'épithélium de l'intestin grêle (B) et la *lamina propria* du côlon (C). n = 10 souris par groupe. Test de Mann Withney. p-value : * < 0,05 ; *** < 0,001.

Afin de confirmer nos résultats de cytométrie et de s'assurer que ces diminutions de nombre de lymphocytes T ne sont pas liées à un biais technique, nous avons cherché à marquer ces cellules sur des coupes histologiques d'intestin. Des résultats préliminaires de marquage CD3 sur des coupes de jéjunum et d'iléon de ces souris montrent une diminution de l'infiltration lymphocytaire dans le tissu intestinal des souris sous régime NASH par rapport à leurs contrôles sous régime standard (figure 19). En particulier, on observe moins de cellules CD3⁺ marquées dans le jéjunum des souris NASH (figure 19A-B) que dans le jéjunum des souris contrôle. Pour l'iléon, cette différence est difficile à estimer, et en l'absence d'une quantification il n'est pas possible de dire si elle est présente ou non (figure 19C-D).

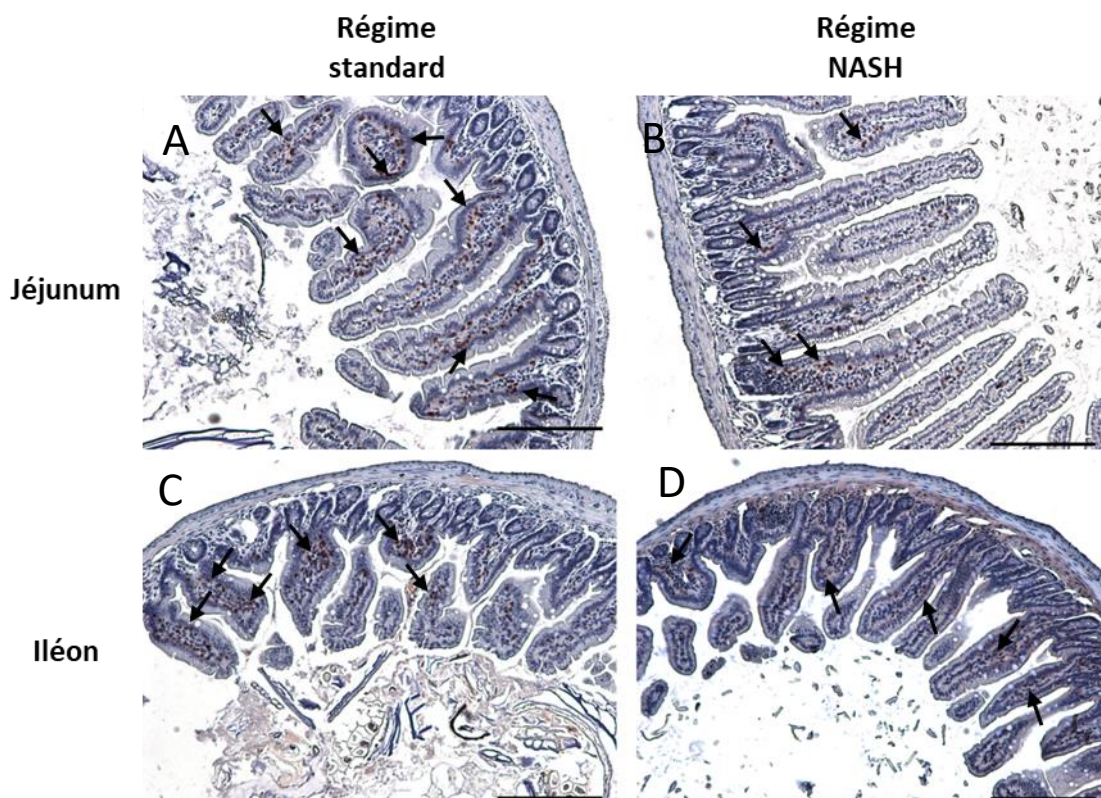


Figure 19 : Immunomarquage des lymphocytes T dans l'intestin

A-B : Images représentatives du marquage du CD3 γ en immunohistochimie sur des coupes de jéjunum des souris sous régime standard (A) ou NASH (B). C-D : Images représentatives du marquage du CD3 γ en immunohistochimie sur des coupes d'iléon des souris sous régime standard (C) ou NASH (D). En rouge : les lymphocytes T, en bleu : les cellules intestinales. Echelle 200 μ m.

Afin d'explorer plus précisément cette diminution de la proportion de lymphocytes T, l'étude de l'expression membranaire des TCR et des marqueurs CD4 et CD8 rend possible la caractérisation plus fine de ces cellules.

Parmi les lymphocytes exprimant l'isoforme TCR $\alpha\beta$, on ne retrouve aucun impact du régime sur les proportions de lymphocytes CD4⁺ qui sont les lymphocytes T *helper*, producteurs de cytokines pro- ou anti-inflammatoires selon leur orientation Th1, Th2 ou Th17 (figure 20A). Les proportions de cellules co-exprimant CD4 et CD8 ou n'exprimant aucun des deux, populations minoritaires dans l'intestin, ne semblent pas être différentes entre les deux conditions de régime (figure 20A). La différence de composition de la barrière immunitaire intestinale semble, pour les lymphocytes T TCR $\alpha\beta$, limitée aux cellules exprimant le CD8 seul.

Pour ce qui est des lymphocytes T exprimant le TCR $\gamma\delta$, dans la *lamina propria* de l'intestin grêle les proportions des deux sous-types de lymphocytes, CD8⁺ et CD4⁻ CD8⁻, diminuent chez les souris NASH (figure 20B).

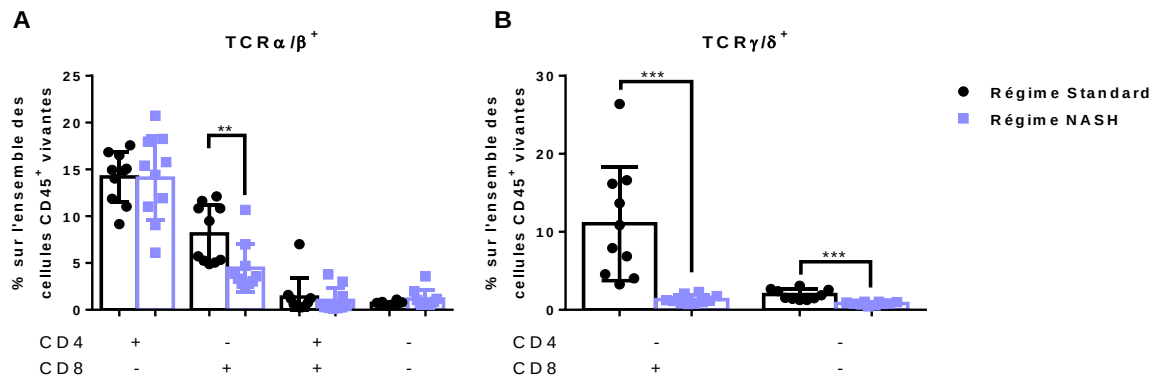


Figure 20 : Proportions des différents types de lymphocytes T dans la *lamina propria* de l'intestin grêle

A-B : Proportions des différents types de lymphocytes T (LT) en fonction de l'expression de leur TCR parmi l'ensemble des cellules immunitaires vivantes isolées à partir de la lamina propria de l'intestin grêle des souris sous régime standard ou sous régime NASH. A : LT exprimant le $TCR\alpha/\beta$. B : LT exprimant le $TCR\gamma/\delta$. n = 10 souris par groupe. Test de Mann Withney. p-value : ** < 0,01 ; *** < 0,001.

Grâce aux autres marqueurs du panel, l'analyse plus fine des populations permet d'identifier les sous-types de cellules immunes. Bien qu'il y ait au total une proportion de cellules immunitaires dans la *lamina propria* des souris sous régime NASH inférieure à celle des souris sous régime standard évaluée par comptage sur cellule de Malassez, la différence ne concerne, parmi les cellules identifiables avec le panel de marqueurs utilisé, que les lymphocytes T $CD3^+$ (figure 21).

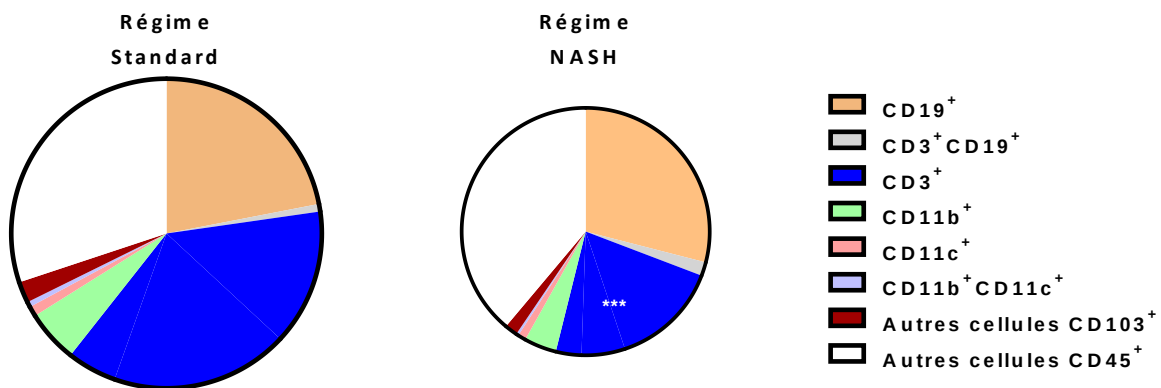


Figure 21 : Proportions des grandes familles de cellules immunitaires identifiables dans la *lamina propria* de l'intestin grêle

Chaque section du diagramme circulaire représente la moyenne de la proportion d'une famille de cellule immunitaire isolée de la *lamina propria* de l'intestin grêle de souris sous régime standard ou NASH. Ces proportions sont identifiées par l'expression de marqueurs membranaires représentatifs de familles de cellules immunes. n = 10 souris par groupe. Test de Mann Withney. p-value : *** < 0,001.

Avec une analyse plus fine des marqueurs membranaires des lymphocytes T $CD8^+$, nous pouvons en identifier les sous-types. En particulier, le co-récepteur CD8 est un hétérodimère composé de deux

chaines. Sur les lymphocytes T CD8⁺ dits conventionnels, il est formé d'une chaîne α et d'une chaîne β . Cependant, dans l'intestin certains lymphocytes CD8⁺ sont composés d'un co-récepteur formé de 2 chaines α , et agissent alors comme répresseurs de l'activation des lymphocytes T cytotoxiques conventionnels en diminuant l'affinité de la liaison entre le TCR et le CMH (83).

Parmi les lymphocytes T, les différences entre souris NASH et non NASH se retrouvent dans tous les types de cellules CD8⁺, qu'ils soient conventionnels (TCR $\alpha\beta$ CD8 $\alpha\beta$ ⁺, TCR $\gamma\delta$ CD8 $\alpha\beta$ ⁺) ou plus spécifiques du tissu intestinal (TCR $\alpha\beta$ CD8 $\alpha\alpha$ ⁺, TCR $\gamma\delta$ CD8 $\alpha\alpha$ ⁺, TCR $\gamma\delta$ CD4⁻CD8⁻) (figure 22).

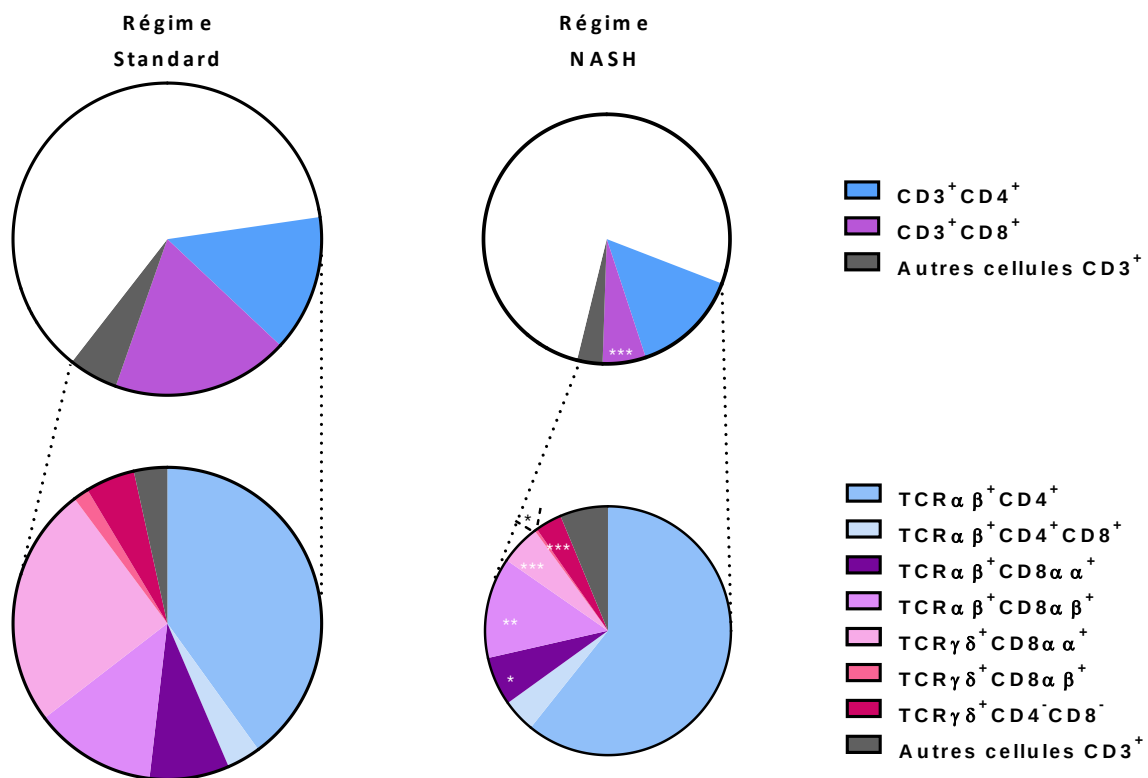


Figure 22 : Proportions des familles de lymphocytes T dans la *lamina propria* de l'intestin grêle

Chaque section du diagramme circulaire représente la moyenne de la proportion d'un type de lymphocyte T isolé de la *lamina propria* de l'intestin grêle de souris sous régime standard ou NASH. Ces proportions sont identifiées par l'expression du type de TCR, de l'expression du CD4 et par la nature du dimère formant le CD8. n = 10 souris par groupe. Test de Mann Withney. p-value : * < 0,05 ; ** < 0,01 ; *** < 0,001.

Discussion

L'étude du foie des souris après 24 semaines de régime NASH reproduit les résultats précédemment publiés par le laboratoire (110). L'insulino-résistance n'a pas été explorée dans ces expériences mais elle est attendue, car induite par des régimes gras qui induisent une obésité. Des tests de tolérance orale au glucose pourraient être réalisés, montrant ainsi l'impact potentiel de ce régime sur la sécrétion de GLP-1 intestinal, et donc sur l'effet incrétine dans ce modèle.

Comme en pathologie humaine, l'histologie a une place centrale dans l'évaluation de la NASH. Les souris sous régime présentent une stéatose et une inflammation hépatique, ainsi qu'une fibrose non homogène chez certains individus. Bien que beaucoup plus induite chez la souris que chez l'homme, on retrouve une augmentation de la concentration plasmatique en ALAT, marqueur fréquemment utilisé dans le développement des scores non invasifs de diagnostic de la NASH. Cependant, certains paramètres hépatiques de la NASH ne sont pas induits par ce régime, montrant les limites du modèle à reproduire l'ensemble des altérations de la pathologie humaine.

Dans l'intestin, l'étude de la fonction barrière reproduit également des données de la littérature dans d'autres modèles de NASH. La diminution de l'expression de certaines protéines de jonctions est reproduite dans le modèle. Ce n'est toutefois qu'un résultat d'analyse transcriptomique et il serait intéressant de savoir si ces diminutions de l'expression en ARN sont corrélées à l'expression protéique de ces gènes. Pour ce faire, des techniques de western-blot ou d'immunofluorescence pourraient être mises en œuvre.

De même, l'impact du régime sur la couche de mucus est en cours d'exploration. Sur des coupes histologiques, une coloration à l'acide périodique et au réactif de Schiff permet de colorer le mucus ainsi que les cellules caliciformes. Une mesure de l'épaisseur du mucus ainsi que du nombre de cellules caliciformes par villosité intestinale est possible. Ces mesures nécessitent encore des optimisations quant à la normalisation des résultats, c'est pourquoi elles ne font pas partie de ce travail.

Les résultats obtenus par l'immunophénotypage intestinal sont contre-intuitifs par rapport à la littérature. Les publications qui s'intéressent à l'inflammation intestinale dans la NASH montrent plutôt une augmentation de celle-ci (101). Cependant, les auteurs travaillent dans un modèle de NASH non métabolique, induite par un régime carencé en choline et en méthionine qui n'induit ni insulino-résistance, ni obésité. Ce régime est conçu pour induire un carcinome hépatocellulaire, et ne reproduit chez la souris que l'histologie hépatique de la NASH et non la pathologie dans son ensemble. Il est donc difficile d'interpréter les résultats obtenus avec ce modèle et de les rapprocher de ce qui se passe chez l'homme atteint de NASH. Chez l'homme obèse, une corrélation positive entre le NAS score et la

densité de lymphocytes T CD8⁺ a été démontrée (104). Ces patients ne présentent toutefois qu'un NAS score moyen maximum de 3 pour le groupe de patient obèse et diabétique, démontrant que très peu d'entre eux ont une NASH établie (104). Il serait intéressant de regarder si des résultats équivalents sont trouvés chez des patients ayant une NASH établie prouvée par une biopsie hépatique.

Nos résultats montrent une diminution de la proportion de lymphocytes T CD8⁺ dans l'intestin grêle des souris NASH en cytométrie en flux. Les premiers résultats d'immunomarquage des lymphocytes T sur coupe histologique nous rendent confiants sur le fait que cette diminution n'est pas un artefact technique rencontré lors de l'isolement des cellules. Afin d'explorer cette diminution, des expériences seront menées pour évaluer le recrutement à l'intestin des lymphocytes T. L'équipe de Rai a publié l'été dernier les résultats de cytométrie en flux sur les cellules immunitaires circulantes. Les auteurs montrent chez des souris invalidées pour Jam-a sous régime NASH une augmentation du recrutement à l'intestin des lymphocytes T CD4⁺ par une augmentation de la population exprimant l'intégrine CD103, intégrine qui permet le recrutement dans l'épithélium intestinal des lymphocytes (113). Une stratégie équivalente peut être mise en place au laboratoire, mais en s'intéressant cette fois aux lymphocytes T CD8⁺. Nous prélèverons le sang de souris soumises à un régime NASH ou à un régime standard et, après lyse des hématies et marquage avec un cocktail d'anticorps, nous comparerons les proportions de lymphocytes T CD8⁺CD103⁺ obtenues après passage au cytomètre.

Afin d'étudier la pertinence humaine de ces données, nous travaillons en collaboration avec l'UMR 1190 dirigée par le Pr. Pattou au CHU de Lille. Cette équipe pratique en routine des opérations de chirurgie bariatrique chez l'homme, un ensemble d'opérations destinées à faire perdre du poids aux patients obèses sévères. Par un essai clinique (NCT01129297, ClinicalTrials.gov), ils ont fondé la bio-banque ABOS – Atlas Biologique de l'Obésité Sévère - en récupérant les données cliniques et certains tissus de patients opérés. Nous avons pu obtenir via cette banque de tissu des biopsies de jéjunum d'un peu plus de 500 patients, ainsi que leurs données clinico-biologiques. Au laboratoire, nous avons obtenu par technologie Affymetrix les données transcriptomiques de l'ensemble de ces patients. Mon projet de thèse d'université s'intéresse au transcriptome intestinal du patient obèse et cherche à répondre à la question suivante : le jéjunum d'un patient obèse métaboliquement sain est-il différent du jéjunum d'un patient obèse et atteint de NASH et/ou diabétique de type 2 ? Par des analyses avec et sans *a priori*, nous avons pu obtenir des données montrant un lien entre histologie hépatique et immunité intestinale T, montrant qu'au sein du phénotype obèse les patients NAFLD présentent une barrière immunologique intestinale altérée. Nous pourrions obtenir d'autres échantillons biologiques afin de confirmer ces résultats par d'autres techniques (immunohistochimie, cytométrie en flux...) et de relier les résultats que nous avons obtenus chez la souris à réalité clinique humaine. Cela permettrait de

considérer de nouvelles approches thérapeutiques dans la NASH, en ciblant directement la fonction barrière immunologique intestinale pour limiter ou guérir la pathologie hépatique.

Bibliographie

1. Sanyal AJ, Brunt EM, Kleiner DE, Kowdley KV, Chalasani N, Lavine JE, et al. Endpoints and clinical trial design for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2011;54(1):344-53.
2. SFA - Société Française d'Alcoologie [Internet]. [cité 16 sept 2021]. Disponible sur: <http://www.sfalcoologie.asso.fr/page.php?choix=A10>
3. Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, Anstee QM, Targher G, Romero-Gomez M, et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. *J Hepatol*. juill 2020;73(1):202-9.
4. Ahadi M, Molooghi K, Masoudifar N, Namdar AB, Vossoughinia H, Farzanehfar M. A review of non-alcoholic fatty liver disease in non-obese and lean individuals. *J Gastroenterol Hepatol*. 2021;36(6):1497-507.
5. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther*. août 2011;34(3):274-85.
6. 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*. janv 2018;67(1):328-57.
7. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. juill 2016;64(1):73-84.
8. 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*. janv 2018;15(1):11-20.
9. Sheka AC, Adeyi O, Thompson J, Hameed B, Crawford PA, Ikramuddin S. Nonalcoholic Steatohepatitis: A Review. *JAMA*. 24 mars 2020;323(12):1175-83.
10. Haas JT, Francque S, Staels B. Pathophysiology and Mechanisms of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Annu Rev Physiol*. 2016;78:181-205.
11. Marchesini G, Petta S, Dalle Grave R. Diet, weight loss, and liver health in nonalcoholic fatty liver disease: Pathophysiology, evidence, and practice. *Hepatology*. juin 2016;63(6):2032-43.
12. 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*. 10 mai 2013;5(5):1544-60.
13. Smith BW, Adams LA. Nonalcoholic fatty liver disease and diabetes mellitus: pathogenesis and treatment. *Nat Rev Endocrinol*. 10 mai 2011;7(8):456-65.
14. Parthasarathy G, Revelo X, Malhi H. Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis: An Overview. *Hepatology*. avr 2020;74(4):478-92.

15. Younossi ZM, Stepanova M, Ong J, Trimble G, AlQahtani S, Younossi I, et al. Nonalcoholic Steatohepatitis Is the Most Rapidly Increasing Indication for Liver Transplantation in the United States. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc.* mars 2021;19(3):580-589.e5.
16. 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. *Hepatol Baltim Md.* juin 2005;41(6):1313-21.
17. Bedossa P, FLIP Pathology Consortium. Utility and appropriateness of the fatty liver inhibition of progression (FLIP) algorithm and steatosis, activity, and fibrosis (SAF) score in the evaluation of biopsies of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Baltim Md.* août 2014;60(2):565-75.
18. Patel J, Bettencourt R, Cui J, Salotti J, Hooker J, Bhatt A, et al. Association of noninvasive quantitative decline in liver fat content on MRI with histologic response in nonalcoholic steatohepatitis. *Ther Adv Gastroenterol.* sept 2016;9(5):692-701.
19. Xia M-F, Yan H-M, He W-Y, Li X-M, Li C-L, Yao X-Z, et al. Standardized ultrasound hepatic/renal ratio and hepatic attenuation rate to quantify liver fat content: an improvement method. *Obes Silver Spring Md.* févr 2012;20(2):444-52.
20. Kwok R, Tse Y-K, Wong GL-H, Ha Y, Lee AU, Ngu MC, et al. Systematic review with meta-analysis: non-invasive assessment of non-alcoholic fatty liver disease--the role of transient elastography and plasma cytokeratin-18 fragments. *Aliment Pharmacol Ther.* févr 2014;39(3):254-69.
21. Harrison SA, Ratziu V, Boursier J, Francque S, Bedossa P, Majd Z, et al. A blood-based biomarker panel (NIS4) for non-invasive diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis and liver fibrosis: a prospective derivation and global validation study. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* nov 2020;5(11):970-85.
22. Vilar-Gomez E, Martinez-Perez Y, Calzadilla-Bertot L, Torres-Gonzalez A, Gra-Oramas B, Gonzalez-Fabian L, et al. Weight Loss Through Lifestyle Modification Significantly Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology.* août 2015;149(2):367-378.e5; quiz e14-15.
23. 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.* août 2015;149(2):379-88; quiz e15-16.
24. Lassailly G, Caiazzo R, Ntandja-Wandji L-C, Gnemmi V, Baud G, Verkindt H, et al. Bariatric Surgery Provides Long-term Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis and Regression of Fibrosis. *Gastroenterology.* oct 2020;159(4):1290-1301.e5.
25. Chirurgie bariatrique : quel patient opérer ? [Internet]. FMC-HGE. 2010 [cité 16 sept 2021]. Disponible sur: <https://www.fmcgastro.org/postu-main/archives/postu-2010-paris/chirurgie-bariatrique-quel-patient-operer-2/>
26. Stratégie médicamenteuse du contrôle glycémique du diabète de type 2 [Internet]. Haute Autorité de Santé. [cité 16 sept 2021]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/c_1022476/fr/strategie-medicamenteuse-du-controle-glycemique-du-diabete-de-type-2

27. Loomba R, Lutchman G, Kleiner DE, Ricks M, Feld JJ, Borg BB, et al. Clinical trial: pilot study of metformin for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther.* janv 2009;29(2):172-82.
28. Haukeland JW, Konopski Z, Eggesbø HB, von Volkmann HL, Raschpichler G, Bjørro K, et al. Metformin in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomized, controlled trial. *Scand J Gastroenterol.* 2009;44(7):853-60.
29. Armstrong MJ, Hull D, Guo K, Barton D, Hazlehurst JM, Gathercole LL, et al. Glucagon-like peptide 1 decreases lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol.* févr 2016;64(2):399-408.
30. Khoo J, Hsiang JC, Taneja R, Koo S-H, Soon G-H, Kam CJ, et al. Randomized trial comparing effects of weight loss by liraglutide with lifestyle modification in non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver.* mai 2019;39(5):941-9.
31. Newsome PN, Buchholtz K, Cusi K, Linder M, Okanoue T, Ratzu V, et al. A Placebo-Controlled Trial of Subcutaneous Semaglutide in Nonalcoholic Steatohepatitis. *N Engl J Med.* 25 mars 2021;384(12):1113-24.
32. Colca JR, McDonald WG, Cavey GS, Cole SL, Holewa DD, Brightwell-Conrad AS, et al. Identification of a mitochondrial target of thiazolidinedione insulin sensitizers (mTOT)--relationship to newly identified mitochondrial pyruvate carrier proteins. *PloS One.* 2013;8(5):e61551.
33. Cusi K, Orsak B, Bril F, Lomonaco R, Hecht J, Ortiz-Lopez C, et al. Long-Term Pioglitazone Treatment for Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis and Prediabetes or Type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized Trial. *Ann Intern Med.* 6 sept 2016;165(5):305-15.
34. Della Pepa G, Russo M, Vitale M, Carli F, Vetrani C, Masulli M, et al. Pioglitazone even at low dosage improves NAFLD in type 2 diabetes: clinical and pathophysiological insights from a subgroup of the TOSCA.IT randomised trial. *Diabetes Res Clin Pract.* 1 août 2021;178:108984.
35. Colca JR, Tanis SP, McDonald WG, Kletzien RF. Insulin sensitizers in 2013: new insights for the development of novel therapeutic agents to treat metabolic diseases. *Expert Opin Investig Drugs.* janv 2014;23(1):1-7.
36. Harrison SA, Alkhouri N, Davison BA, Sanyal A, Edwards C, Colca JR, et al. Insulin sensitizer MSDC-0602K in non-alcoholic steatohepatitis: A randomized, double-blind, placebo-controlled phase IIb study. *J Hepatol.* avr 2020;72(4):613-26.
37. Risérus U, Sprecher D, Johnson T, Olson E, Hirschberg S, Liu A, et al. Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) δ Promotes Reversal of Multiple Metabolic Abnormalities, Reduces Oxidative Stress, and Increases Fatty Acid Oxidation in Moderately Obese Men. *Diabetes.* 1 févr 2008;57(2):332-9.
38. Ratzu V, Harrison SA, Francque S, Bedossa P, Leher 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.* mai 2016;150(5):1147-1159.e5.
39. GENFIT: Announces Results from Interim Analysis of RESOLVE-IT Phase 3 Trial of Elafibranor in Adults with NASH and Fibrosis | GENFIT [Internet]. [cité 16 sept 2021]. Disponible sur:

<https://ir.genfit.com/news-releases/news-release-details/genfit-announces-results-interim-analysis-resolve-it-phase-3/>

40. Kumar DP, Caffrey R, Marioneaux J, Santhekadur PK, Bhat M, Alonso C, et al. The PPAR α/γ Agonist Saroglitazar Improves Insulin Resistance and Steatohepatitis in a Diet Induced Animal Model of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Sci Rep*. 9 juin 2020;10(1):9330.
41. Pacifico L, Anania C, Osborn JF, Ferraro F, Bonci E, Olivero E, et al. Low 25(OH)D3 levels are associated with total adiposity, metabolic syndrome, and hypertension in Caucasian children and adolescents. *Eur J Endocrinol*. oct 2011;165(4):603-11.
42. Targher G, Bertolini L, Scala L, Cigolini M, Zenari L, Falezza G, et al. Associations between serum 25-hydroxyvitamin D3 concentrations and liver histology in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 1 sept 2007;17(7):517-24.
43. Lukenda Zanko V, Domislovic V, Trkulja V, Krznaric-Zrnic I, Turk-Wensveen T, Krznaric Z, et al. Vitamin D for treatment of non-alcoholic fatty liver disease detected by transient elastography: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Diabetes Obes Metab*. nov 2020;22(11):2097-106.
44. Bril F, Biernacki DM, Kalavalapalli S, Lomonaco R, Subbarayan SK, Lai J, et al. Role of Vitamin E for Nonalcoholic Steatohepatitis in Patients With Type 2 Diabetes: A Randomized Controlled Trial. *Diabetes Care*. août 2019;42(8):1481-8.
45. Stofan M, Guo GL. Bile Acids and FXR: Novel Targets for Liver Diseases. *Front Med*. 2020;7:544.
46. Zhang S, Wang J, Liu Q, Harnish DC. Farnesoid X receptor agonist WAY-362450 attenuates liver inflammation and fibrosis in murine model of non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*. août 2009;51(2):380-8.
47. 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 Lond Engl*. 14 mars 2015;385(9972):956-65.
48. 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. *Lancet Lond Engl*. 14 déc 2019;394(10215):2184-96.
49. Kliewer SA, Mangelsdorf DJ. Bile Acids as Hormones: The FXR-FGF15/19 Pathway. *Dig Dis Basel Switz*. 2015;33(3):327-31.
50. Harrison SA, Rinella ME, Abdelmalek MF, Trotter JF, Paredes AH, Arnold HL, et al. NGM282 for treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Lond Engl*. 24 mars 2018;391(10126):1174-85.
51. Harrison SA, Neff G, Guy CD, Bashir MR, Paredes AH, Frias JP, et al. Efficacy and Safety of Aldafermin, an Engineered FGF19 Analog, in a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*. janv 2021;160(1):219-231.e1.

52. NGM Bio to Host Conference Call to Discuss Topline Results from 24-Week Phase 2b ALPINE 2/3 Study of Aldafermin in NASH | NGM Biopharmaceuticals, Inc. [Internet]. [cité 16 sept 2021]. Disponible sur: <https://ir.ngmbio.com/news-releases/news-release-details/ngm-bio-host-conference-call-discuss-topline-results-24-week/>
53. Budas G, Karnik S, Jonnson T, Shafizadeh T, Watkins S, Breckenridge D, et al. Reduction of Liver Steatosis and Fibrosis with an Ask1 Inhibitor in a Murine Model of Nash is Accompanied by Improvements in Cholesterol, Bile Acid and Lipid Metabolism. *J Hepatol*. 1 janv 2016;64(2):S170.
54. 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. *Hepatol Baltim Md*. févr 2018;67(2):549-59.
55. 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*. juill 2020;73(1):26-39.
56. Sinha RA, Bruinstroop E, Singh BK, Yen PM. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Hypercholesterolemia: Roles of Thyroid Hormones, Metabolites, and Agonists. *Thyroid Off J Am Thyroid Assoc*. sept 2019;29(9):1173-91.
57. Harrison SA, Bashir MR, Guy CD, Zhou R, Moylan CA, Frias JP, et al. Resmetirom (MGL-3196) for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Lond Engl*. 30 nov 2019;394(10213):2012-24.
58. Scorletti E, Bhatia L, McCormick KG, Clough GF, Nash K, Hodson L, et al. Effects of purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in nonalcoholic fatty liver disease: results from the Welcome* study. *Hepatol Baltim Md*. oct 2014;60(4):1211-21.
59. Van Wagner LB, Koppe SWP, Brunt EM, Gottstein J, Gardikiotes K, Green RM, et al. Pentoxifylline for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a randomized controlled trial. *Ann Hepatol*. sept 2011;10(3):277-86.
60. Allaire JM, Crowley SM, Law HT, Chang S-Y, Ko H-J, Vallance BA. The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. *Trends Immunol*. sept 2018;39(9):677-96.
61. Kiela PR, Ghishan FK. Physiology of Intestinal Absorption and Secretion. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. avr 2016;30(2):145-59.
62. Lambert G, Chetiveaux M, Sénard G, Drui D, Krempf M. [Intestinal cholesterol absorption and NPC1-L1]. *Med Sci MS*. juill 2004;20(6-7):636-8.
63. Han Y-H, Onufer EJ, Huang L-H, Sprung RW, Davidson WS, Czepielewski RS, et al. Enterically derived high-density lipoprotein restrains liver injury through the portal vein. *Science* [Internet]. 23 juill 2021 [cité 29 août 2021];373(6553). Disponible sur: <https://science.sciencemag.org/content/373/6553/eabe6729>
64. Nogueira J-P, Maraninchi M, Béliard S, Padilla N, Duvillard L, Mancini J, et al. Absence of acute inhibitory effect of insulin on chylomicron production in type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. avr 2012;32(4):1039-44.

65. Nass KJ, van den Berg EH, Faber KN, Schreuder TCMA, Blokzijl H, Dullaart RPF. High prevalence of apolipoprotein B dyslipoproteinemias in non-alcoholic fatty liver disease: The lifelines cohort study. *Metabolism*. juill 2017;72:37-46.
66. Reimann F, Habib AM, Tolhurst G, Parker HE, Rogers GJ, Gribble FM. Glucose sensing in L cells: a primary cell study. *Cell Metab*. déc 2008;8(6):532-9.
67. Ducastel S. Le récepteur nucléaire FXR dans les cellules L entéroendocrines : régulateur de la réponse aux acides gras à chaîne courte, métabolites du microbiote intestinal. Université de Lille; 2019. 207 p. (Thèse d'université).
68. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*. mai 2007;132(6):2131-57.
69. Gribble FM, Reimann F. Function and mechanisms of enteroendocrine cells and gut hormones in metabolism. *Nat Rev Endocrinol*. avr 2019;15(4):226-37.
70. Vollmer K, Holst JJ, Baller B, Ellrichmann M, Nauck MA, Schmidt WE, et al. Predictors of Incretin Concentrations in Subjects With Normal, Impaired, and Diabetic Glucose Tolerance. *Diabetes*. 1 mars 2008;57(3):678-87.
71. Kantartzis K, Machann J, Schick F, Fritsche A, Häring H-U, Stefan N. The impact of liver fat vs visceral fat in determining categories of prediabetes. *Diabetologia*. mai 2010;53(5):882-9.
72. Bernsmeier C, Meyer-Gerspach AC, Blaser LS, Jeker L, Steinert RE, Heim MH, et al. Glucose-Induced Glucagon-Like Peptide 1 Secretion Is Deficient in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *PLOS ONE*. 29 janv 2014;9(1):e87488.
73. Lynn FC, Pamir N, Ng EH, McIntosh CH, Kieffer TJ, Pederson RA. Defective glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor expression in diabetic fatty Zucker rats. *Diabetes*. mai 2001;50(5):1004-11.
74. Cummins PM. Occludin: one protein, many forms. *Mol Cell Biol*. janv 2012;32(2):242-50.
75. Lu Z, Ding L, Lu Q, Chen Y-H. Claudins in intestines: Distribution and functional significance in health and diseases. *Tissue Barriers*. 1 juill 2013;1(3):e24978.
76. Luissint A-C, Nusrat A, Parkos CA. JAM-related proteins in mucosal homeostasis and inflammation. *Semin Immunopathol*. mars 2014;36(2):211-26.
77. Salvo Romero E, Alonso Cotoner C, Pardo Camacho C, Casado Bedmar M, Vicario M. The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease. *Rev Espanola Enfermedades Dig Organo Of Soc Espanola Patol Dig*. nov 2015;107(11):686-96.
78. Birchenough GMH, Johansson MEV, Gustafsson JK, Bergström JH, Hansson GC. New developments in goblet cell mucus secretion and function. *Mucosal Immunol*. juill 2015;8(4):712-9.
79. Finkelman FD, Shea-Donohue T, Morris SC, Gildea L, Strait R, Madden KB, et al. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. *Immunol Rev*. oct 2004;201:139-55.

80. Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *Lancet Lond Engl*. 3 nov 2012;380(9853):1590-605.
81. Reboldi A, Arnon TI, Rodda LB, Atakilit A, Sheppard D, Cyster JG. IgA production requires B cell interaction with subepithelial dendritic cells in Peyer's patches. *Science*. 13 mai 2016;352(6287):aaf4822.
82. Olivares-Villagómez D, Van Kaer L. Intestinal Intraepithelial Lymphocytes: Sentinels of the Mucosal Barrier. *Trends Immunol*. avr 2018;39(4):264-75.
83. Cheroutre H, Lambolez F, Mucida D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nat Rev Immunol*. 17 juin 2011;11(7):445-56.
84. Artis D, Spits H. The biology of innate lymphoid cells. *Nature*. 15 janv 2015;517(7534):293-301.
85. De Schepper S, Verheijden S, Aguilera-Lizarraga J, Viola MF, Boesmans W, Stakenborg N, et al. Self-Maintaining Gut Macrophages Are Essential for Intestinal Homeostasis. *Cell*. 4 oct 2018;175(2):400-415.e13.
86. Fan Y, Pedersen O. Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nat Rev Microbiol*. janv 2021;19(1):55-71.
87. Kamada N, Chen GY, Inohara N, Núñez G. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat Immunol*. juill 2013;14(7):685-90.
88. Sun Y, O'Riordan MXD. Regulation of bacterial pathogenesis by intestinal short-chain Fatty acids. *Adv Appl Microbiol*. 2013;85:93-118.
89. Tremaroli V, Bäckhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*. 13 sept 2012;489(7415):242-9.
90. Bindels LB, Dewulf EM, Delzenne NM. GPR43/FFA2: physiopathological relevance and therapeutic prospects. *Trends Pharmacol Sci*. avr 2013;34(4):226-32.
91. den Besten G, van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud D-J, Bakker BM. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res*. sept 2013;54(9):2325-40.
92. Ducastel S, Touche V, Trabelsi M-S, Boulinguez A, Butruille L, Nawrot M, et al. The nuclear receptor FXR inhibits Glucagon-Like Peptide-1 secretion in response to microbiota-derived Short-Chain Fatty Acids. *Sci Rep*. 13 janv 2020;10(1):174.
93. Hofmann AF, Eckmann L. How bile acids confer gut mucosal protection against bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 21 mars 2006;103(12):4333-4.
94. 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*. mai 2017;152(7):1679-1694.e3.
95. Chu H, Duan Y, Yang L, Schnabl B. Small metabolites, possible big changes: a microbiota-centered view of non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*. 1 févr 2019;68(2):359-70.

96. Luther J, Garber JJ, Khalili H, Dave M, Bale SS, Jindal R, et al. Hepatic Injury in Nonalcoholic Steatohepatitis Contributes to Altered Intestinal Permeability. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. mars 2015;1(2):222-32.
97. Miele L, Valenza V, La Torre G, Montalto M, Cammarota G, Ricci R, et al. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Baltim Md*. juin 2009;49(6):1877-87.
98. Desai MS, Seekatz AM, Koropatkin NM, Kamada N, Hickey CA, Wolter M, et al. A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. *Cell*. 17 nov 2016;167(5):1339-1353.e21.
99. Rahman K, Desai C, Iyer SS, Thorn NE, Kumar P, Liu Y, et al. Loss of Junctional Adhesion Molecule A Promotes Severe Steatohepatitis in Mice on a Diet High in Saturated Fat, Fructose, and Cholesterol. *Gastroenterology*. oct 2016;151(4):733-746.e12.
100. Kawano Y, Nakae J, Watanabe N, Kikuchi T, Tateya S, Tamori Y, et al. Colonic Pro-inflammatory Macrophages Cause Insulin Resistance in an Intestinal Ccl2/Ccr2-Dependent Manner. *Cell Metab*. 9 août 2016;24(2):295-310.
101. Matthews DR, Li H, Zhou J, Li Q, Glaser S, Francis H, et al. Methionine- and Choline-Deficient Diet-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis Is Associated with Increased Intestinal Inflammation. *Am J Pathol*. 7 juill 2021;S0002-9440(21)00302-3.
102. Luck H, Khan S, Kim JH, Copeland JK, Revelo XS, Tsai S, et al. Gut-associated IgA+ immune cells regulate obesity-related insulin resistance. *Nat Commun*. 13 août 2019;10(1):3650.
103. Mouries J, Brescia P, Silvestri A, Spadoni I, Sorribas M, Wiest R, et al. Microbiota-driven gut vascular barrier disruption is a prerequisite for non-alcoholic steatohepatitis development. *J Hepatol*. déc 2019;71(6):1216-28.
104. Monteiro-Sepulveda M, Touch S, Mendes-Sá C, André S, Poitou C, Allatif O, et al. Jejunal T Cell Inflammation in Human Obesity Correlates with Decreased Enterocyte Insulin Signaling. *Cell Metab*. 7 juill 2015;22(1):113-24.
105. Aron-Wisnewsky J, Vigliotti C, Witjes J, Le P, Holleboom AG, Verheij J, et al. Gut microbiota and human NAFLD: disentangling microbial signatures from metabolic disorders. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. mai 2020;17(5):279-97.
106. Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 16 janv 2007;104(3):979-84.
107. Vrieze A, Nood EV, Holleman F, Salojärvi J, Kootte RS, Bartelsman JFW, et al. Transfer of Intestinal Microbiota From Lean Donors Increases Insulin Sensitivity in Individuals With Metabolic Syndrome. *Gastroenterology*. 1 oct 2012;143(4):913-916.e7.
108. Cani PD, de Vos WM. Next-Generation Beneficial Microbes: The Case of *Akkermansia muciniphila*. *Front Microbiol*. 2017;8:1765.
109. Nawrot M, Peschard S, Lestavel S, Staelens B. Intestine-liver crosstalk in Type 2 Diabetes and non-alcoholic fatty liver disease. *Metabolism*. 1 août 2021;123:154844.

110. 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.* juin 2019;1(6):604-14.
111. Qiu Z, Sheridan BS. Isolating Lymphocytes from the Mouse Small Intestinal Immune System. *J Vis Exp JoVE.* 28 févr 2018;(132).
112. Kucukoglu O, Guldiken N, Chen Y, Usachov V, El-Heliebi A, Haybaeck J, et al. High-fat diet triggers Mallory-Denk body formation through misfolding and crosslinking of excess keratin 8. *Hepatology Baltim Md.* juill 2014;60(1):169-78.
113. Rai RP, Liu Y, Iyer SS, Liu S, Gupta B, Desai C, et al. Blocking integrin $\alpha 4\beta 7$ -mediated CD4 T cell recruitment to the intestine and liver protects mice from western diet-induced non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol.* nov 2020;73(5):1013-22.

Université de Lille
FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Année Universitaire 2020/2021

Nom : PESCHARD
Prénom : Simon

Titre de la thèse : Étude de la barrière intestinale dans un modèle murin de stéatohépatite non alcoolique (NASH)

Mots-clés : Maladies du foie gras non alcoolique, Intestin, Axe intestin-foie, Maladies métaboliques, Barrière intestinale, Système immunitaire intestinal

Résumé :

Introduction : La stéatohépatite non alcoolique (NASH) est une pathologie fréquemment associée au diabète de type 2 et à l'obésité. Elle se caractérise par une atteinte hépatique chronique en l'absence de consommation excessive d'alcool. Malgré de nombreuses molécules en cours d'évaluation pour le traitement de la NASH, son seul traitement actuel est la perte de poids. Dans le contexte de NASH chez l'homme et dans les modèles animaux, les fonctions de l'intestin sont modifiées avec en particulier une altération des jonctions intercellulaires, de l'immunité intestinale et une dysbiose. L'objectif de ce travail est de caractériser la barrière intestinale dans un modèle murin de NASH associée à l'obésité et à l'insulinorésistance.

Matériel et Méthodes : Des souris ont été ou non soumises à un régime induisant la NASH. Après 24 semaines, l'état du foie et de la barrière intestinale ont été évalués par une étude histologique et génique. La caractérisation de la barrière immunologique intestinale a été réalisée par cytométrie en flux.

Résultats : Les résultats montrent que conformément à la littérature, le régime a bien induit en 24 semaines la NASH chez nos souris, avec une stéatose, une inflammation et une fibrose hépatique. Nous ne mettons pas en évidence de modification du tissu intestinal mais l'expression des 2 protéines de jonction cellulaires Zo-1 et Jam-a est diminuée dans le jéjunum des animaux sous régime NASH. En parallèle, nous montrons une diminution des lymphocytes T CD8⁺ dans la *lamina propria* de l'intestin grêle des souris NASH.

Discussion : Bien que les mécanismes moléculaires de l'altération de la barrière immune intestinale ne soient pas encore identifiés, nos résultats renforcent l'idée que la NASH est aussi une pathologie intestinale. Cibler la barrière intestinale pourrait s'avérer intéressant pour limiter la pathologie hépatique.

Membres du jury :

Président :	Pr. Delphine Allorge – Professeur des Universités – Praticien Hospitalier – Université de Lille – CHU Lille
Assesseur(s) :	Dr. Aurélien Mary – Maître de conférences des Universités – Praticien Hospitalier – Université de Picardie Jules Verne – CHU Amiens-Picardie Dr. Sylvie Brice – Praticien Hospitalier – CHU Lille
Membre(s) extérieur(s) :	Pr. Sophie Lestavel – Professeur des Universités – Université de Lille