

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

**Soutenue publiquement le lundi 7 février 2022
Par Mme Lucie BERNARD**

**La stéato-hépatite non alcoolique (NASH) :
stratégies thérapeutiques actuelles
et piste de la protéine FAT10**

Membres du jury :

Présidente :

Le Professeur MUHR-TAILLEUX Anne, Professeur des Universités à la faculté de pharmacie de Lille

Directrice de Thèse :

Le Professeur PAUMELLE-LESTRELIN Réjane, Professeur des Universités à la faculté de pharmacie de Lille

Assesseurs :

Le Docteur MARY Aurélien, Pharmacien Clinicien, Maître de Conférences des Universités à la faculté de pharmacie d'Amiens

Le Docteur DUCASTEL Sarah, Pharmacien Chercheur à l'INSERM UMR1011

Le Docteur CAPPE Arnaud, Assistant Pharmacien Hospitalier à Montdidier-Roye



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	Laurie	Immunologie

Enseignant contractuel

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

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.

Remerciements

A la présidente du jury, Madame le Professeur Anne Muhr-Tailleux, je vous remercie d'avoir accepté de présider cette thèse. Soyez assurée de ma gratitude et de mon profond respect.

A Monsieur le Docteur Aurélien Mary, je vous remercie d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Soyez certain de ma plus grande considération.

A Monsieur le Docteur Arnaud Cappe, merci de faire partie de mon jury de thèse. Sois sûr de toute ma reconnaissance.

A Madame le Docteur Sarah Ducastel, merci d'être présente comme membre de mon jury en ce grand jour. Sois assurée de toute mon amitié.

Je tiens à remercier Le Professeur Bart Staels de m'avoir accueillie au sein de son unité, l'INSERM UMR1011 / Institut Pasteur / EGID / Université de Lille, depuis mon (très lointain) stage de Master 1. Merci pour vos conseils et pour le partage de votre savoir, qui sont une aide précieuse dans la réalisation de ma thèse universitaire.

Je remercie tout particulièrement Madame le Professeur Réjane Paumelle-Lestrelin, ma directrice de thèse d'exercice mais aussi de thèse universitaire. J'espère que vous savez l'immense respect que j'ai pour vous. Merci pour votre encadrement, votre pédagogie, votre confiance. Merci pour votre sympathie, votre bienveillance, et votre bonne humeur indéfectible. Merci de croire en moi et de m'avoir menée jusqu'ici.

Je remercie également tous les enseignants-chercheurs de l'unité 1011, pour nos échanges scientifiques et nos discussions constructives. Je remercie aussi chaleureusement tous mes collègues du laboratoire, répartis sur J&K, sur Pasteur et sur EGID (je ne vous cite pas tous mais le cœur y est !), pour tous vos précieux conseils, pour nos échanges formels et informels et pour votre souci de l'excellence dans la recherche. Merci tout particulièrement à Nathalie, pour l'aide immense que tu nous apportes au sein de l'équipe (et pour tes délicieux gâteaux !).

Un immense merci à Madame le Docteur Alexia Cotte (je mets les formes !), qui m'aura tout appris des secrets de l'expérimentation en laboratoire de recherche, et à qui je dois énormément. Merci de m'avoir transmis ton savoir, ton professionnalisme et ta rigueur. En espérant te revoir bientôt pour que tu nous racontes tes péripéties au pays du caribou.

Un très grand merci à Ludivine Clavreul, ma co-thésarde dans la *team FAT10*, mais surtout une amie très précieuse. Merci pour tout ce que tu fais dans l'équipe, tu es absolument brillante. Je ne sais pas comment j'aurais fait sans toi au quotidien, sans ta bonne humeur, sans nos « racontages » de vie, sans ta générosité. Merci pour tout et plus encore.

Je remercie énormément ma fidèle camarade de laboratoire depuis le Master 2, Clémence Boulet. Mon amie, ma copine de pause-café (même si depuis notre premier capuccino vanille beaucoup de monde nous accompagne maintenant !). J'espère que tu sais toute l'amitié que j'ai pour toi. Merci pour les moments de décompression au laboratoire, pour les fous rires et pour toute la bienveillance et la gentillesse que tu as envers moi et envers tous.

A toute la bande restante du laboratoire J&K : un immense merci ! Sarah (encore toi !), nouvelle recrue dans l'équipe FAT10 mais déjà une amie depuis bien longtemps ; Margaux, ma partenaire de bêtises en tout genre (la cucaracha !) dont le bulletin horoscope du jour ne se trompe jamais (enfin, si, tout le temps) ; Simon, mon cher co-interne IPR qui répond toujours présent pour moi et pour les autres, et dont le niveau de blagues atteint des sommets inégalés ; et puis (par ordre de bureau, allons-y) Mickaël, Mélusine, Christina, Chloé, Emilie, Dani, Arielle, vous m'avez tous apporté énormément, chacun à votre manière et j'ai passé des moments inoubliables à vos côtés. Bref, vous tous, que j'adore littéralement, merci ! Je remercie également tous mes camarades sur Pasteur et EGID, vivement notre prochaine raclette pour tous se retrouver.

A mes parents, Monique et David, pour qui tous les remerciements du monde ne suffiraient pas. Vous avez toujours été là pour me soutenir, pour m'aider, pour me consoler, et aussi pour supporter mon petit côté clown de la famille. Vous savez combien je vous aime, et combien je suis fière de vous.

A ma (petite) grande sœur Mathilde, merci pour ton soutien et ta présence à mes côtés depuis toujours. Merci de veiller sur moi à ta manière, sache que tu es et que tu seras toujours mon modèle.

A ma petite sœur Agathe, merci d'enseigner ma vie depuis que tu es venue au monde. Ta présence me remonte toujours le moral. Et le fait que tu ris à toutes mes blagues (plus ou moins pourries) aussi !

A ma Mamie Léone, mon Papy Michel, qui ont toujours cru en moi. Merci pour votre amour et pour le dévouement que vous portez à votre famille.

A ma Mamie Thérèse et mon Papy Michel, qui me regardent de là-haut et à qui je pense très fort.

Merci à tout le reste de ma famille, avec une attention particulière à ma cousine Jeanne, présente depuis toujours pour me suivre dans mes moments de folie.

A mon meilleur ami depuis 25 ans (ça fait mal d'écrire ça !), Kévin. Te savoir à mes côtés depuis toutes ces années me donne la confiance et la force de tout affronter.

A ma bande du lycée, que j'aime à la folie : Gaëlle, Michelle, Sophie, Capucine, Fanny, Vivien, Pauline. Grâce à votre amitié, je peux tout réaliser, et même survivre à 10 000 ans d'étude. Je sais que je peux compter sur vous, que vous répondrez toujours présents, et cette confiance n'a pas de prix (vous êtes ma famille de cœur !).

A mes très chers amis que j'adore, connus grâce aux études de pharmacie : Lucile, Anne, Antoine, Claire, Charlotte, Hélène, Camille, Nawel, Geoffrey, et tous les autres... Ces études n'auraient jamais été les mêmes sans vous, vous m'avez apporté tellement de rires et de bonheur, nos souvenirs ensemble sont tous plus fous les uns que les autres et tellement précieux ! Je vous garde pour toujours dans mon cœur.

Et enfin, un merci tout particulier à Thomas. Merci d'être là, de me soutenir et de m'aimer depuis bientôt 7 ans. Tu es mon meilleur ami, mon amoureux, ma plus belle rencontre. Tu es toujours présent pour moi, pour m'écouter, me remonter le moral, me remotiver, et surtout pour me faire rire. Merci pour tout. Et merci aussi à Réglisse, notre petit chat trop chou !

Résumé

Les maladies du foie gras non alcooliques (NAFLD) correspondent à un spectre évolutif de pathologies hépatiques, allant de la simple stéatose jusqu'à la cirrhose voire le carcinome hépatocellulaire. Elles se développent avec l'âge et l'obésité, et sont associées à de nombreuses comorbidités métaboliques et cardio-vasculaires. La stéatohépatite non alcoolique (NASH) correspond à une forme sévère des NAFLD, caractérisée par une stéatose, une inflammation, un ballonnement des hépatocytes et éventuellement une fibrose. Actuellement, près de 25% de la population générale est atteinte de NAFLD, or il n'existe aucun traitement pharmacologique, faisant des NAFLD/NASH un enjeu de santé publique. Néanmoins, de nombreuses molécules différentes ciblant les multiples acteurs impliqués dans le développement de la NASH sont en cours d'étude.

Cette thèse vise à faire l'état des lieux des essais cliniques montrant des effets prometteurs dans le traitement de la NASH, par l'administration de composés en monothérapie ou en association.

De plus, de premiers résultats obtenus au sein du laboratoire INSERM UMR1011 y sont présentés. Grâce à des données obtenues chez l'Homme dans une cohorte de patients obèses atteints de NASH, *in vivo* dans un modèle de souris NASH et *in vitro* dans une lignée d'hépatocytes humains, il est montré que FAT10 (*HLA-F adjacent transcript 10*), une protéine *ubiquitin-like* induite par l'inflammation, est surexprimée au cours de la NASH, et qu'elle est impliquée dans l'altération du métabolisme des lipides dans les hépatocytes. Ainsi, FAT10 constituerait une nouvelle cible thérapeutique potentielle dans le traitement de la NASH.

Abréviations

AAV : *adeno-associated virus*

ACC ou ACC1 : acétyl-CoA carboxylase

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc ou cDNA : ADN complémentaire

AGA : anneau gastrique ajustable

ALAT : alanines aminotransférases

ALD : *alcoholic liver disease*

AMP : adénosine mono-phosphate

APOB : apolipoprotein B

APR : réponse en phase aiguë

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messager

ASAT : aspartates aminotransférases

ASH : *alcoholic steatohepatitis*

ASK1 : *apoptosis signal-regulatine*

ATP : adénosine triphosphate

AVC : accident vasculaire cérébral

BCA : *bicinchoninic acid assay*

BPG : by-pass gastrique « roux-en-y »

BSA : *bovine serum albumin*

CAP : *controlled attenuation parameter*

CAT : catalase

CB1 : cannabinoïdes 1

CCL24 : *chemokine (C-C) motif ligand 24*

CCR : récepteur aux chimiokines C-C

CD36 : *fatty acid translocase CD36*

CDAA : *choline deficient, low methionine, L-amino acid-defined*

COX-1 : cyclo-oxygénase 1

CpG : cytosine puis guanine

CPT1 : carnitine palmitoyltransférase 1

CSAA : *choline-sufficient L-amino acid-defined*

CXCL : chimiokine motif C-X-C

CYP7A1 : *cholesterol 7 α -hydroxylase*

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

DASH : *dietary approach to stop hypertension*

DGAT2 : diacylglycérol acyltransférase 2

DNL : lipogénèse de novo

DNMT : ADN méthyl-transférase

DPP4 : dipeptidyl peptidase 4

EASD : *european association for the study of diabetes*

EASL : *european association for the study of the liver*

EASO : *european association for the study of obesity*

EDTA : éthylène diamine tétra acétique

eEF1A1 : *eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1*

EGTA : *ethylene glycol-bis (β -aminoethyl ether)-N,N',N'-tetraacetic acid*

ELF : *enhanced liver fibrosis*

ENPP1 : *ectonucleotide pyrophosphatase /phosphodiesterase 1*

FA : *fatty acids* ou acide gras

FAS ou FASN : *fatty acid synthase*

FAT10 : *HLA-F adjacent transcript 10*

FATP1 : *fatty acid transport portein 1*

FCCP : carbonyl cyanide-4 trifluoromethoxy phenylhydrazone

FGF : *fibroblast growth factor*

FGFR : récepteur aux FGF

FIB-4 : *fibrosis-4 index*

FLI : *fatty liver index*

FXR : *farnesoid X receptor*

G6Pc : *glucose-6-phosphatase catalytic subunit*

GCGR : récepteur au glucagon

GCKR : *glucokinase regulator*

GFP : *green fluorescent protein*

GGT : gamma-glutamyltransférase

GIP : *glucose-dependent insulin releasing polypeptide*

GLP1 : *glucagon-like peptide 1*

GSK3 β : glycogène synthase kinase 3 bêta

H&E : hématoxyline et éosine

HBSS : *Hank's balanced salt solution*

HCC : carcinome hépatocellulaire

HDAC : histone déacétylase

HDL : *high density lipoprotein*

HER2 : *human epidermal growth factor receptor 2*

HMG-CoA-réductase : hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase

HNF4a : *hepatocyte nuclear factor 4*

HOXB9 : homeobox 9

HSC : cellules stellaires hépatiques

HSI : *hepatic steatosis index*

IFNL3 : interféron lambda 3

IFN γ : interféron gamma

IgG : immunoglobuline G

IKK β : *inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit beta*

IL6/8 : interleukines 6 et 8

IMC : indice de masse corporelle

IRS1 : *insulin receptor substrate 1*

I κ B α : *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha*

JNK : c-Jun N-terminal kinase

KC : macrophages résiduels

kDa : kilo Dalton

KLB : récepteur beta-klotho

KO : *knock out*

LD : *lipid droplets*

LDL : *low density lipoprotein*

LIPA : *lysosomal acid lipase*

lncARN : ARN long non codant

Low-CHO : faible en carbohydrates

LPIN1 : *lipin 1*

LPS : lipopolysaccharide

MAD2 : *mitotic arrest deficient 2*

MAP : *mitogen-activated protein*

MBOAT7 : *membrane bound*

MCAD : *medium-chain acyl-coA dehydrogenase*

MCP-1 : *monocyte chemoattractant*

MEM : milieu essentiel minimum d'Eagle

MERTK : *myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase*

MHC : complexe d'histocompatibilité majeur

miARN : micro ARN

MIP-1 α : *macrophage inflammatory protein 1 alpha*

MPC : transporteur mitochondrial du pyruvate

MRE : *magnetic resonance elastography*

MRI-PDFF : *magnetic resonance imaging-estimated proton density fat fraction*

MRS-PDFF : *magnetic resonance spectrometry-estimated proton density fat fraction*

MTTP : *microsomal triglyceride transfer protein*

MUFA : *monounsaturated fatty acid*

M ϕ : macrophages résidents

NADH : nicotinamide adénine dinucléotide

NAFL : *non alcoholic fatty liver*

NAFLD : *non alcoholic fatty liver disease*

NAS : *NAFLD activity score*

NASH : *non alcoholic steatohepatitis*

NEFA : *nonesterified fatty acid*
 NFkB : *nuclear factor kappa B*
 NFS : *NAFLD fibrosis score*
 NKT : *natural killer T*
O-acyltransferase domain-containing 7
 OCA : *acide obétiologique*
 OCR : *taux de consommation d'oxygène*
 OGTT : *oral glucose tolerance test*
 PAF : *paraformaldéhyde*
 pAkt : *protéine kinase B phosphorylée*
 PBS : *phosphate buffer solution*
 PCNA : *proliferating cell nuclear antigen*
 PGC1 α : *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha*
 PIIINP : *procollagen III amino-terminal peptide*
 PMSF : *phénylméthylsulfonyl fluoride*
 PNPLA3 : *patatin-like phospholipase domain-containing protein 3*
 PPAR : *peroxisome proliferator activated receptor*
 PPRE : *peroxisome proliferator response element protein 1*
 pSMAD2 : *phosphorylated mothers against decapentaplegic homolog 2*
 RE : *réticulum endoplasmique*
 RIPA : *radioimmunoprecipitation assay*
 ROS : *espèces réactives de l'oxygène*
 RT-QPCR : *retro-transcription quantitative polymerase chain reaction*
 RXR : *retinoid X receptor*
 SAA : *serum amyloid A*
 SAF : *stéatose, activité, fibrose*
 SCD1 : *stearoyl CoA desaturase 1*
 SDS : *sodium dodécyl sulfate*
 SG : *gastrectomie sleeve*

SGLT1/2 : *sodium-dependent glucose cotransporter-1/2*
 shARN : *short hairpin ARN*
 siARN : *small interfering ARN*
 Sirt1 : *sirtuine 1*
 sncARN : *ARN court non codant*
 SOD2 : *superoxyde dismutase 2*
 SPPARM : *modulateurs sélectifs du récepteur PPAR*
 SREBP1c : *sterol regulatory element-binding protein 1c*
 SREBP2 : *steroid respinse element-binding protein 2*
 SSI : *supersonic imaging aixplorer*
 STAT3 : *signal transducer and activator of transcription 3*
 TBS : *tris buffered saline*
 TBST : *TBS et triton*
 TCF4 : *transcription factor 4*
 TG : *triglycéride*
 TGF- β : *transforming growth factor beta*
 THR β : *récepteur β -sélectif aux hormones thyroïdiennes*
 TIMP1 : *tissue inhibitor of metalloproteinases 1*
 TM6SF2 : *transmembrane 6 superfamily member 2*
 TNF α : *tumor necrosis factor alpha*
 TRIB1 : *tribble 1*
 TZD : *thiazolidinedione*
 Ub : *ubiquitine*
 UBA6 : *ubiquitin-like modifier-activating enzyme 6*
 UBC : *ubiquitin conjugating enzyme E2 domain*
 UBD : *ubiquitin D*
 UBL : *ubiquitin-like*
 UCP2 : *uncoupling protein 2*

UFD : *ubiquitin-fold domain*

USE1 : *UBA6-specific E2 enzyme 1*

VIH : *virus immunodéficient humain*

VLDL : *very low density lipoprotein*

Table des matières

A.	Introduction	21
I.	Le foie	21
1)	Fonctions et propriétés du foie.....	21
2)	Structure du foie.....	22
3)	Les pathologies hépatiques.....	23
II.	Les maladies du foie gras non alcooliques (NAFLD)	25
1)	Définition et prévalence des NAFLD.....	25
2)	Mécanismes de développement.....	26
a)	La stéatose	26
b)	La lipotoxicité	27
c)	Altération des fonctions mitochondriales, stress oxydatif et stress du réticulum endoplasmique	27
d)	Le microbiote intestinal	28
e)	L'activation du système immunitaire	28
f)	L'activation des cellules stellaires hépatiques	29
g)	L'altération des récepteurs nucléaires impliqués dans le métabolisme	31
3)	Facteurs de risque physiologiques et environnementaux.....	33
4)	Facteurs de risque génétiques et épigénétiques	34
a)	Génétique et développement des NAFLD	34
b)	Epigénétique et développement des NAFLD	37
c)	Les ARN non codants dans le développement de la NASH	38
5)	Diagnostic des NAFLD.....	40
a)	La méthode de diagnostic actuelle	40
b)	Les autres scores de diagnostic mis au point	43
c)	La recherche de biomarqueurs spécifiques	44
III.	Objectifs de la thèse	45
B.	Prise en charge thérapeutique de la NASH	47
I.	Les règles hygiéno-diététiques	47
II.	La chirurgie bariatrique	48
1)	Principe de la chirurgie bariatrique	48
2)	Effets bénéfiques et délétères de l'intervention.....	49
3)	La transplantation hépatique	49
III.	Les molécules en essais cliniques pour traiter la NASH	50
1)	Les molécules utilisées dans le traitement des maladies métaboliques	50
a)	L'Orlistat	50
b)	La Pioglitazone	51
c)	La vitamine E	52
d)	La voie du GLP1	54

e) Les inhibiteurs du co-transporteur SGLT1/2.....	56
f) Les Statines	57
g) Les antagonistes du récepteur aux minéralocorticoïdes	58
2) Les agonistes de FXR.....	59
3) Les nouveaux agonistes PPAR	60
4) Les analogues FGF	63
5) Le Cenicriviroc.....	64
6) Les agonistes du THR β	65
7) L'Aramchol	65
8) Les inhibiteurs de la Galectin-3	65
9) Les inhibiteurs DGAT2	66
10) Les anticorps	66
11) Cibler le microbiote intestinal.....	67
C. FAT10 : une nouvelle piste dans le traitement de la NASH ?	73
I. Introduction	73
1) FAT10.....	73
a) Structure et localisation	73
b) Mécanisme d'action	73
c) FAT10 dans le cancer.....	74
d) FAT10 dans le métabolisme	76
2) FAT10 et NASH	77
II. Premiers résultats.....	77
1) Données chez l'Homme (cohorte RESOLVE).....	78
a) Matériels et méthodes	78
b) Résultats.....	79
2) Données <i>in vivo</i> chez la souris	81
a) L'effet du régime CDAA supplémenté	81
b) Résultats.....	82
3) Expériences <i>in vitro</i> : FAT10 et métabolisme des lipides dans les hépatocytes.....	84
4) Discussion et perspectives	87
D. Conclusion.....	89
I. La problématique du diagnostic	89
II. La NASH : comprendre les mécanismes pour trouver des cibles thérapeutiques.....	89
1) L'efficacité de certaines monothérapies	89
2) Les possibilités d'association de molécules	90
3) D'autres pistes thérapeutiques à suivre	91
4) La piste de la protéine FAT10.....	92
E. Bibliographie	93
Annexes.....	103

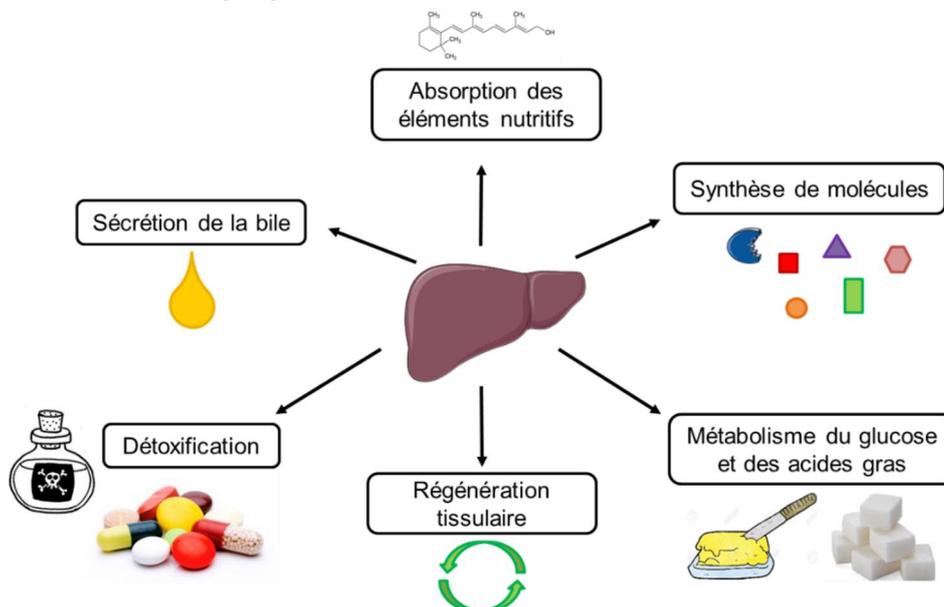
A. Introduction

I. Le foie

1) Fonctions et propriétés du foie

Le foie constitue un organe central de l'appareil digestif (**Schéma 1**). La sécrétion de la bile par le foie permet la digestion du bol alimentaire et l'absorption des éléments nutritifs. A partir des aliments digérés, le foie peut synthétiser de nombreuses molécules essentielles à l'organisme : le cholestérol, les globines, les facteurs de croissance, l'albumine ou encore les lipoprotéines. De plus, le foie joue un rôle de détoxifiant, grâce à ses enzymes capables de dégrader de nombreuses substances toxiques, tel que l'éthanol, ainsi que les substances actives des médicaments, provoquant alors l'effet de premier passage hépatique décrit en pharmacocinétique. A ces différents rôles, s'ajoute celui de régulateur du métabolisme. En effet, le foie assure l'homéostasie du glucose de par ses capacités de stockage, de production et d'utilisation du glucose (glycogénèse, néoglucogénèse, glycolyse et glycogénolyse). Il assure également le stockage, ainsi que la production et l'utilisation des lipides et acides gras (lipogénèse, lipolyse et β -oxydation des acides gras). Ainsi, en réponse aux besoins énergétiques des autres organes, le foie est capable de libérer du glucose et des acides gras, utilisés comme sources d'ATP (adénosine triphosphate) par la mitochondrie. Le foie est également capable de se régénérer suite à une lésion tissulaire.

Schéma 1 : Fonctions et propriétés du foie.



2) Structure du foie

Chez l'Homme, le foie est constitué de 4 lobes : le lobe droit, le lobe gauche, le lobe carré et le lobe caudé. Entre le lobe carré et le lobe droit se trouve la vésicule biliaire. Les lobes sont également divisés en segments, 8 au total.

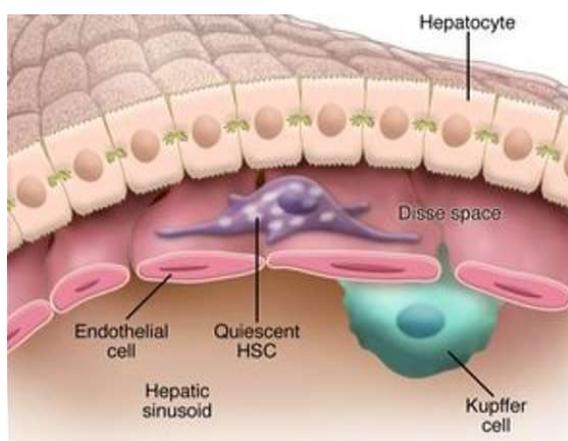
Le foie est un organe richement vascularisé. Chez l'Homme adulte, il contient plus de 10% du volume sanguin corporel. Entre le lobe carré et le lobe caudé se trouve le hile du foie, sillon au niveau duquel les deux vaisseaux principaux de l'organe, la veine porte et l'artère hépatique, entrent dans le foie. Ces vaisseaux se divisent ensuite en un réseau vasculaire irrigant l'ensemble du foie, afin d'alimenter les millions de lobules hépatiques constituant l'organe. C'est également par le hile que les canaux biliaires majeurs circulent.

Les lobules hépatiques se composent de plusieurs types cellulaires (**Schéma 2**), assurant les différentes fonctions du foie :

- **Les hépatocytes**, qui représentent 70% des cellules du foie. Ils assurent *via* leurs enzymes et leurs organites les principales fonctions de l'organe : digestion (sécrétion de la bile et des sels biliaires), synthèse et dégradation des protéines (hémoglobine, facteurs de coagulation), détoxification et fonctions métaboliques (prise en charge du glucose et des lipides).
- **Les cellules stellaires hépatiques (HSC)**, qui permettent le stockage de la vitamine A et sont capables de synthétiser la matrice extracellulaire suite à leur activation.
- **Les cellules de Küppfer**, qui correspondent aux macrophages spécifiques du foie et participent aux fonctions d'épuration du foie. Suite à leur activation, notamment par des cytokines pro-inflammatoires ($TNF\alpha$ (*tumor necrosis factor alpha*), $IFN\gamma$ (interféron gamma), IL6 (interleukine 6) et IL8), des endotoxines (LPS (lipopolysaccharide)), des produits de la peroxydation lipidique ou encore par le facteur $NF\kappa B$ (*nuclear factor kappa B*), ces cellules permettent l'élimination des microbes et des déchets métaboliques.
- **Les cellules endothéliales**, au contact des vaisseaux sanguins et assurant les échanges de substances nutritives.
- **Les cellules dendritiques**, participant à la réponse immunitaire.

- **Les lymphocytes hépatocytaires**, majoritairement représentés par les NKT (*natural killer T*), qui sécrètent de nombreuses cytokines et chimiokines (IFN γ , TNF, IL4, IL2).
- **Les cholangiocytes**, qui correspondent aux cellules des canaux biliaires collectant la bile.
- **Les cellules ovales**, responsables de la régénération des hépatocytes et des cellules endothéliales.

Schéma 2 : Structure cellulaire d'un lobule hépatique.



Le foie est constitué de lobules hépatiques, correspondant aux unités fonctionnelles de l'organe. Les lobules se composent de travées d'hépatocytes, qui s'organisent autour des capillaires du foie appelés sinusoides. Les sinusoides renferment notamment des vaisseaux sanguins, abritant les cellules endothéliales, et des cellules de Küppfer. Entre les vaisseaux sanguins et les hépatocytes se trouve l'espace de Disse, où se logent les cellules stellaires hépatiques (HSC).

Schéma issu de : Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of

inflammation and repair in a solid organ. J Clin Invest. 2007 Mar;117(3):539-48. doi: 10.1172/JCI30542. PMID: 17332881; PMCID: PMC1804370.

3) Les pathologies hépatiques

Il existe de multiples pathologies hépatiques, pouvant être divisées en deux classes : les formes aiguës et les formes chroniques.

Parmi les formes aiguës sont décrites les hépatites. Elles peuvent être d'origine virale, médicamenteuse ou alcoolique, et correspondent à une inflammation aiguë du foie. Celle-ci est due à la réaction du système immunitaire face à l'entrée du pathogène ou du composé toxique dans l'organisme. Les hépatites peuvent être asymptomatiques, ou provoquer une fatigue intense, des troubles digestifs (nausées, vomissements, douleurs), et éventuellement une fièvre, un ictère (jaunissement des yeux, de la peau), des urines foncées et des selles décolorées. Les hépatites aiguës peuvent devenir fulminantes lorsqu'apparaît une encéphalopathie, c'est-à-dire lorsqu'apparaissent des troubles neuropsychiatriques. Les hépatites virales peuvent se guérir avec le temps par la simple action du système immunitaire (hépatites A et E), ou être traitées par des antiviraux permettant de guérir la pathologie (pour plus de

95% des hépatites C) ou de la ralentir (hépatite B). Il existe également un vaccin contre l'hépatite B, permettant une protection contre l'infection pour au moins 10 ans chez 90% des personnes vaccinées et une prévention efficace contre la survenue de complications graves. Pour les hépatites médicamenteuses et alcooliques, l'arrêt de l'exposition aux composés toxiques permet dans la plupart des cas un rétablissement du foie. Mais, une hépatite aiguë peut également évoluer vers une hépatite chronique, en cas d'absence de traitement ou d'exposition continue au composé toxique, ou dans le cas des hépatites auto-immunes, correspondant à une agression constante du système immunitaire du patient contre son propre foie, qui peut être traitée par corticothérapie et immunosuppresseurs.

Les hépatites chroniques peuvent se compliquer en maladies hépatiques graves, telle que la cirrhose. Un foie cirrhotique est riche en tissus fibrosés, durcis, non-fonctionnels et correspond à un stade irréversible. La cirrhose peut provoquer une augmentation de la pression sanguine de la veine porte, définissant une hypertension portale, pouvant aboutir à une ascite, c'est-à-dire à la présence de liquide dans l'abdomen, susceptible de s'infecter. L'hypertension portale peut aussi provoquer des hémorragies digestives. Egalement, la cirrhose peut être responsable d'une encéphalopathie hépatique, pouvant aller jusqu'au coma, suite à la libération de substances neurotoxiques et à une altération de la neurotransmission. Enfin, la cirrhose, mais aussi l'hémolyse (la destruction excessive de globules rouges), la cholestase (la diminution voire l'arrêt de la production de la bile) et l'insuffisance hépatique, peuvent provoquer un excès de bilirubine dans le sang, causant ainsi un ictère. Cet excès peut être responsable d'un prurit, c'est-à-dire de démangeaisons cutanées plus ou moins sévères, susceptibles de s'infecter. La cirrhose peut évoluer en cancer du foie, appelé carcinome hépatocellulaire (HCC), ces deux états pathologiques ne pouvant être traités que par une transplantation hépatique.

Les formes chroniques peuvent également être dues à des maladies génétiques, responsables d'un dysfonctionnement du foie. Mais elles peuvent aussi être dues à l'environnement, comme pour les maladies du foie gras non alcooliques (NAFLD : *non-alcoholic fatty liver diseases*), qui se développent avec l'obésité et l'âge. Lorsqu'un stade sévère de cette maladie est atteint, on parle de stéato-hépatite non alcoolique (NASH : *non-alcoholic steatohepatitis*). A terme, cette pathologie peut s'accompagner d'une fibrose, évoluant jusqu'à la cirrhose, voire jusqu'au HCC. Une physiopathologie identique à celle des NAFLD peut également être observée lors d'une consommation chronique et excessive d'alcool : il s'agit des maladies du foie alcooliques (ALD :

alcoholic liver diseases), pouvant elles aussi aller jusqu'à la stéato-hépatite alcoolique (ASH : *alcoholic steatohepatitis*), la cirrhose et le HCC.

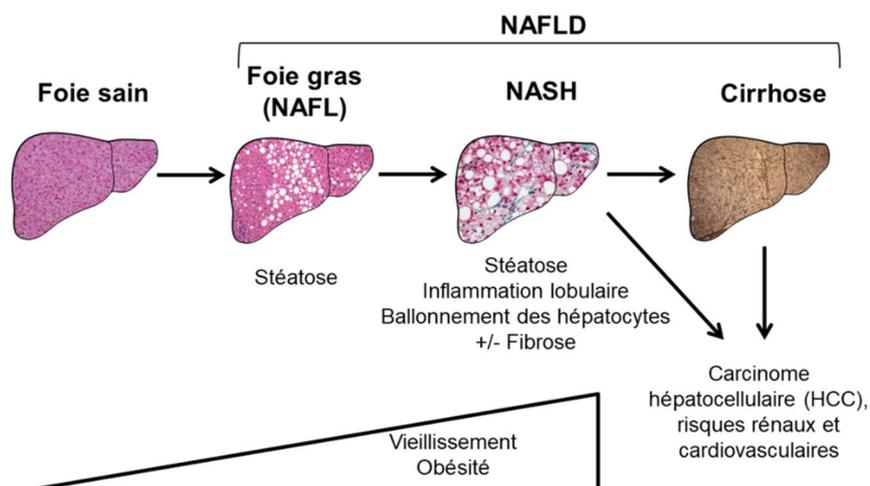
II. Les maladies du foie gras non alcooliques (NAFLD)

1) Définition et prévalence des NAFLD

Les NAFLD débutent par une stéatose hépatique, c'est-à-dire une accumulation de graisses dans plus de 5% des hépatocytes, correspondant au stade NAFL (*non-alcoholic fatty liver*) (**Schéma 3**). L'âge et l'obésité favorisent leur développement, ainsi 25% de la population générale adulte est concernée (Younossi *et al.*, 2016), dont 55% sont des sujets obèses et/ou diabétiques (Younossi *et al.*, 2019a). Dans les formes les plus graves, les NAFL évoluent vers la NASH, caractérisée par une stéatose, une inflammation lobulaire, une souffrance hépatocytaire (ballonnement des hépatocytes) et possiblement une fibrose, c'est-à-dire un remplacement des cellules hépatiques endommagées par un tissu cicatriciel. Seulement 5% de la population générale évolue vers la NASH, contre 25 à 30% pour les sujets obèses et/ou diabétiques et 40% pour les personnes de plus de 70 ans. Au stade de la NAFL et de la NASH précoce, les dommages au foie sont réversibles. Lorsque la NASH est avancée, et présente une fibrose de stade sévère, elle peut évoluer de manière irréversible vers la cirrhose, voire vers le HCC dans 14% des cas (Younossi *et al.*, 2015). Les NAFLD sont également l'étiologie majeure de maladie du foie chronique chez les enfants, concernant plus de 7% de la population pédiatrique globale et plus de 34% des enfants atteints d'obésité (Anderson *et al.*, 2015).

Schéma 3 : Le développement des maladies du foie gras non alcooliques (NAFLD).

NAFLD : *non-alcoholic fatty liver disease* ; NAFL : *non-alcoholic fatty liver* ; NASH : *non-alcoholic steatohepatitis*.



Dans la majorité des cas (80%), les patients NAFLD présentent des troubles du métabolisme : obésité, symptômes du syndrome métabolique, dyslipidémie, insulino-résistance voire diabète de type 2. D'autres facteurs de risque accompagnent souvent ces troubles : une hypertension, des maladies cardiovasculaires, ou encore une insuffisance rénale, et toutes les complications associées à ces pathologies (Tesfay *et al.*, 2018).

2) Mécanismes de développement

a) **La stéatose**

Les NAFLD débutent par une simple stéatose (NAFL), correspondant à l'accumulation des triglycérides dans le foie. Celle-ci peut être observée suite à une alimentation trop riche en graisses (correspond à 15% des acides gras observés dans le foie des patients NAFLD) (Donnelly *et al.*, 2005), le développement de la NAFL est donc corrélé à l'obésité. Mais elle peut aussi être observée suite à une lipogenèse *de novo* trop importante (25% des acides gras du foie), et/ou suite à une libération excessive d'acides gras libres par le tissu adipeux (60% des acides gras du foie). Or, l'insulino-résistance favorise la lipolyse du tissu adipeux, ce qui entraîne l'augmentation des taux sériques d'acides gras libres, qui seront captés et stockés excessivement dans le foie. La NAFL est donc corrélée au diabète de type 2. De plus, l'insulino-résistance diminue le transport des acides gras du foie vers les autres organes, ces derniers sont donc d'autant plus accumulés, et participent au développement de la stéatose hépatique (Bugianesi *et al.*, 2005).

Cependant, l'accumulation des triglycérides en elle-même n'est pas pathologique, et peut même être protectrice. En effet, il a été montré que l'inactivation d'une enzyme catalysant la synthèse des triglycérides, la DGAT2 (diacylglycérol acyltransférase 2), entraînait une augmentation de l'inflammation du foie et du ballonnement des hépatocytes (Yamaguchi *et al.*, 2007). Le passage du caractère bénin au caractère pathologique implique donc d'autres acteurs et voies métaboliques. La progression de la pathologie dépendrait notamment du type d'acides gras accumulés, et serait en l'occurrence favorisée par les acides gras saturés. Les mécanismes de la progression de la NAFL vers la NASH sont multiples, et sont encore à démontrer et/ou à préciser (**Schéma 4**) (Haas *et al.*, 2016 ; Caligiuri *et al.*, 2016).

b) La lipotoxicité

Tout d'abord, la progression de la NAFL vers la NASH pourrait être la conséquence d'une augmentation de la taille des gouttelettes lipidiques, où l'on passe d'une micro-stéatose à une macro-stéatose. Ce changement serait provoqué par la diminution du contenu en phosphatidylcholine des gouttelettes lipidiques, associée à une diminution des capacités d'absorption de la choline par les hépatocytes, ainsi que par une modification des protéines de surface des gouttelettes lipidiques. Ces événements participeraient au dysfonctionnement du métabolisme des acides gras, à l'apparition d'une lipotoxicité, amenant au développement de la NASH (Haas *et al.*, 2016).

Plusieurs enzymes du métabolisme seraient impliquées dans la lipotoxicité. Par exemple, la SCD1 (*stearoyl CoA desaturase 1*), qui intervient dans la synthèse des acides gras insaturés afin notamment de synthétiser les triglycérides et les phospholipides. Cette enzyme est augmentée au cours de la NASH, et favorise alors la lipogénèse et inhibe la voie de la β -oxydation des acides gras. Notamment, il a été montré que des souris déficientes en SCD1 et sous régime NASH étaient protégées contre la stéatose hépatique (Miyazaki *et al.*, 2007). Egalement, il a été montré qu'une alimentation riche en graisse favorisait l'expression hépatique du récepteur aux cannabinoïdes CB1. Cette stimulation induit l'expression du facteur de transcription SREBP1c (*sterol regulatory element-binding protein 1c*), qui cible les enzymes ACC1 (acétyl-CoA carboxylase) et FAS (*fatty acid synthase*). Ainsi, l'activation de CB1 favorise la lipogénèse hépatique et la production d'insuline, ce qui participe à la stéatose et à l'insulino-résistance (Helmy, 2006).

c) Altération des fonctions mitochondriales, stress oxydatif et stress du réticulum endoplasmique

Chez les patients NASH, l'accumulation excessive des triglycérides et la lipotoxicité altèrent les fonctions et la perméabilité des mitochondries, notamment *via* les kinases JNK (*c-Jun N-terminal kinases*). La déficience de la respiration mitochondriale entraîne une perturbation de la β -oxydation des acides gras, qui accentue la stéatose et la lipotoxicité, mais également une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), associée de plus à une diminution des capacités anti-oxydantes du foie (Koliaki *et al.*, 2015). Ceci favorise l'apparition d'un stress oxydatif, également alimenté par l'accumulation des triglycérides. Le stress oxydatif favorise la peroxydation lipidique, le relargage de molécules pro-inflammatoires et l'altération des

mitochondries, contribuant ainsi à l'apparition des dommages hépatocellulaires, de l'inflammation et de la fibrose (Al-Busafi *et al.*, 2012).

Le stress oxydatif s'associe également au stress du réticulum endoplasmique (RE) dans la progression de la NASH (Fu *et al.*, 2011). Le stress du RE favorise la perméabilisation mitochondriale et lysosomale, ainsi que la production de palmitate, un acide gras saturé participant à la lipotoxicité. Il induit également l'apoptose, et provoque une hyperferritinémie utilisée comme marqueur de gravité de la fibrose chez les patients NASH (Nelson *et al.*, 2011).

d) Le microbiote intestinal

Le microbiote intestinal est composé de bactéries, de levures et de virions retrouvés dans le tractus gastro-intestinal. Ces organismes participent à la digestion, la production des vitamines et interviennent dans la modulation de l'immunité. Il existe de nombreuses interactions entre l'intestin et le foie, ainsi qu'un lien entre microbiote, surpoids, inflammation et insulino-résistance, ce qui participe au développement et à la progression des NAFLD/NASH (Nawrot & Peschard *et al.*, 2021). Notamment, du fait de l'augmentation de la perméabilité intestinale au cours de l'obésité et des NAFLD, les endotoxines produites par les bactéries de l'intestin tels que les LPS se retrouvent dans le sang, et vont favoriser la résistance à l'insuline, la synthèse *de novo* d'acides gras et de triglycérides par le foie, et vont activer l'inflammation (Duarte *et al.*, 2019). Cette dysbiose intestinale serait également responsable de la progression de la maladie vers le HCC (Koukias *et al.*, 2017).

e) L'activation du système immunitaire

Les cellules de Kupffer sont activées par l'excès de ROS, l'augmentation de l'absorption du cholestérol dans les LDL (*low density lipoprotein*), les acides gras insaturés, les lipides peroxydés et les endotoxines du microbiote intestinal. Elles entraînent alors la production de molécules pro-inflammatoires, ainsi que le recrutement de cellules NKT et de monocytes. L'infiltration de ces cellules immunitaires dans le foie entraîne la progression de la NASH, *via* une sécrétion importante de cytokines pro-inflammatoires, qui activent notamment les récepteurs aux chimiokines C-C (CCR), et dont fait partie la chimiokine CCL24 (*chemokine (C-C motif) ligand 24*) impliquée dans l'inflammation et la fibrose. Le microenvironnement

inflammatoire ainsi créé, de même que le stress oxydatif, favorisent les dommages à l'ADN (acide désoxyribonucléique) et l'apparition de mutations, conduisant au développement de cellules cancéreuses et potentiellement à la progression de la maladie vers le HCC.

Les cellules immunitaires expriment également la Galectin-3, une lectine liant les β -galactosides, qui est impliquée dans la réponse inflammatoire. Cette protéine est surexprimée chez les patients NASH et participerait à son développement, d'après une étude *in vivo* menée sur le rat, qui a montré qu'une inhibition de la Galectin-3 permettait une diminution de la fibrose et une résolution de la cirrhose (Traber *et al.*, 2013).

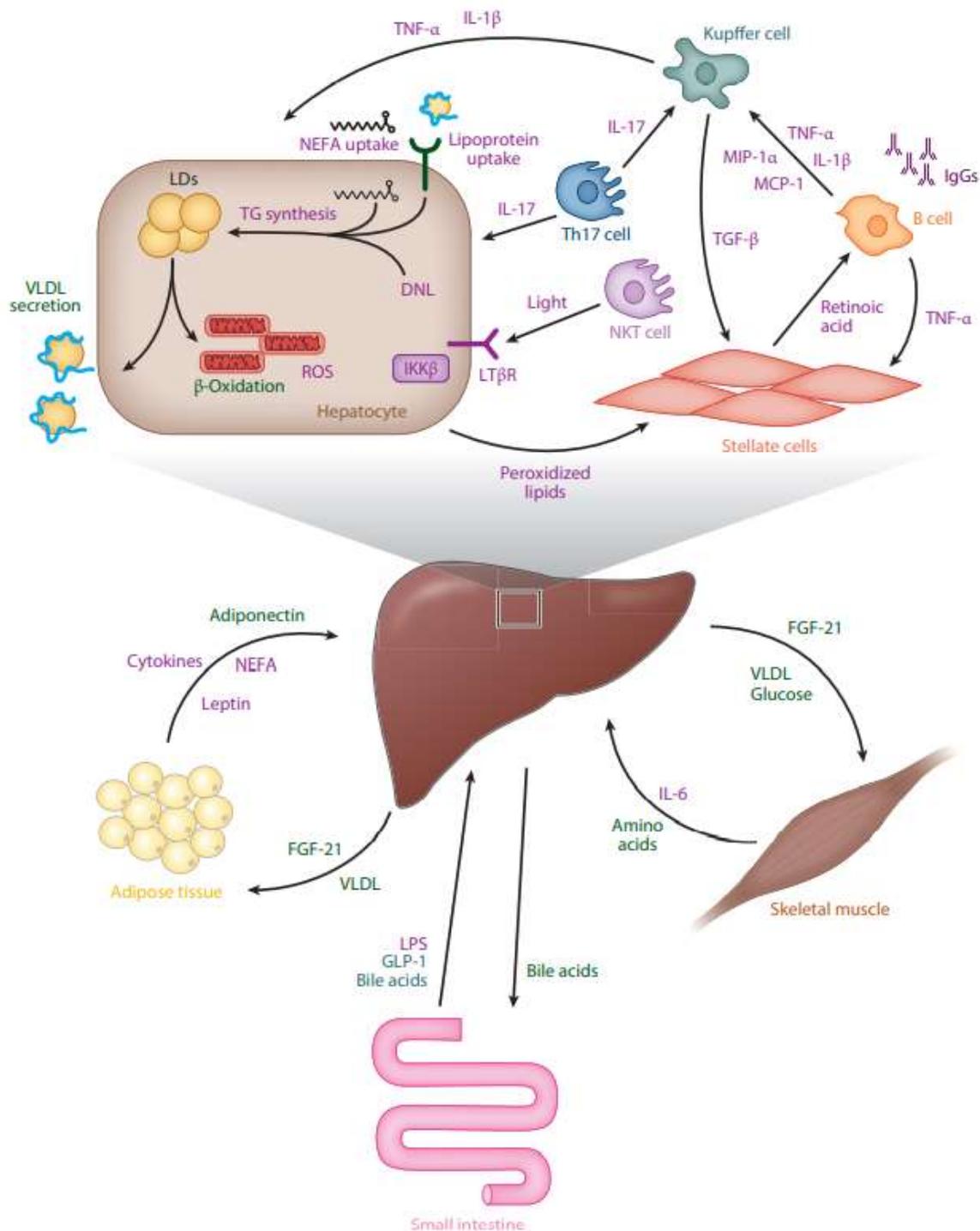
f) L'activation des cellules stellaires hépatiques

La sécrétion des cytokines pro-inflammatoires est également responsable de l'activation des cellules stellaires hépatiques. Ainsi, la sécrétion de collagène et de protéines de la matrice extracellulaire est favorisée. Ceci provoque un remodelage du parenchyme, une élévation de la pression portale, une diminution de l'élasticité du foie et entraîne le développement d'une fibrose hépatique (Friedman, 2008). Par ailleurs, de nombreuses études montrent que le stade fibrotique d'un patient NASH est un facteur majeur de prédiction du développement d'un HCC (Anstee *et al.*, 2019).

Schéma 4 : Les signaux impactant le développement des NAFLD au niveau de la cellule et de l'organe.

Les signaux verts sont protecteurs contre la NAFLD (*non-alcoholic fatty liver disease*), les signaux violets favorisent son développement. DNL : lipogenèse *de novo* ; FGF-21 : *fibroblast growth factor 21* ; GLP-1 : *glucagon-like peptide 1* ; IgG : immunoglobuline G ; IL : interleukine ; LD : *lipid droplets* ; LPS : lipopolysaccharide ; MCP-1 : *monocyte chemoattractant protein 1* ; MIP-1 α : *macrophage inflammatory protein 1 alpha* ; NEFA : *nonesterified fatty acid* ; NKT cell : *natural killer T cell* ; ROS : espèces réactives de l'oxygène ; TG : triglycérides ; TGF- β : *transforming growth factor beta* ; TNF- α : *tumor necrosis factor alpha* ; VLDL : *very low density lipoprotein* ; IKK β : *inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit beta*.

Schéma issu de : Haas JT, Francque S, Staels B. Pathophysiology and Mechanisms of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Annu Rev Physiol.* 2016;78:181-205. doi: 10.1146/annurev-physiol-021115-105331. Epub 2015 Nov 30. PMID: 26667070.



g) L'altération des récepteurs nucléaires impliqués dans le métabolisme

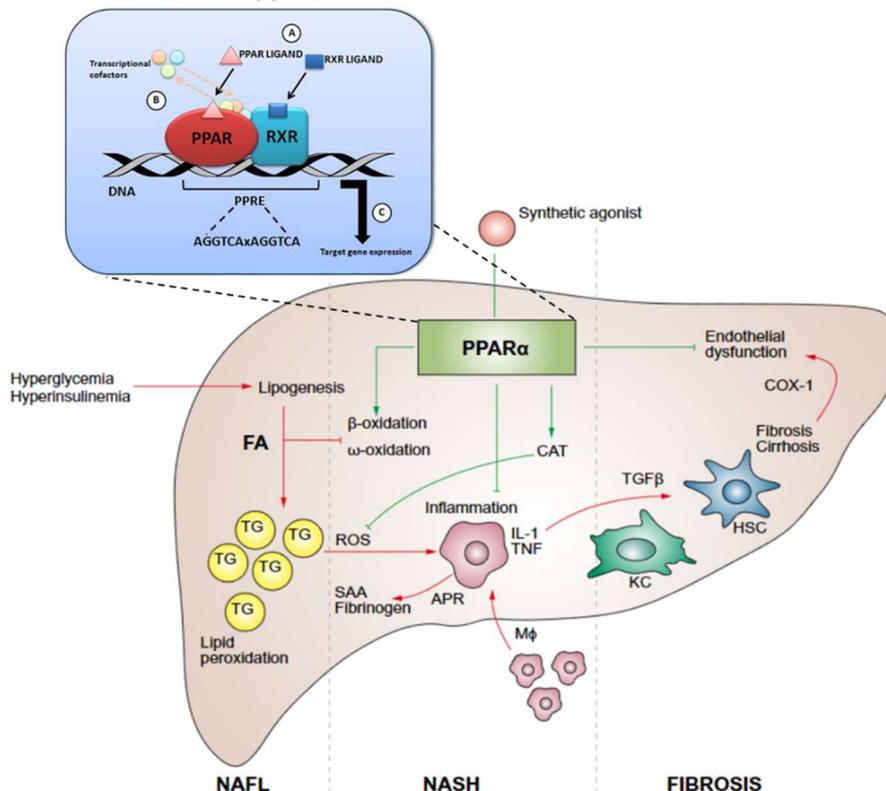
Le récepteur nucléaire FXR (*farnesoid X receptor*) est activé dans le foie par les acides biliaires, dont 90% de la production intestinale est acheminée vers le foie *via* la veine porte. L'activation de ce récepteur provoque son homodimérisation ou son hétérodimérisation avec le récepteur RXR (*retinoid X receptor*). FXR peut alors recruter des complexes co-activateurs ou corépresseurs, lui permettant de réguler l'expression de ses gènes cibles. Ces derniers sont notamment impliqués dans la synthèse et le transport des acides biliaires et dans le métabolisme du glucose et des lipides (cholestérol, triglycérides) (Lefebvre *et al.*, 2009 ; Caron *et al.*, 2013). Ainsi, FXR diminue la synthèse des acides biliaires et leur accumulation, diminue l'insulino-résistance, la néoglucogenèse hépatique et la lipogenèse *de novo*. Or, la synthèse des acides biliaires est altérée au cours de la NASH, en raison d'une diminution de la diversité du microbiote et de l'augmentation de la production de LPS. Ceci entraîne une diminution de l'activité du récepteur FXR, qui aurait pour conséquence une altération du métabolisme des lipides et de la sensibilité à l'insuline (Porez *et al.*, 2012).

Les 3 isoformes du récepteur nucléaire PPAR (*peroxisome proliferator activated receptor*), alpha, beta/delta et gamma, sont des facteurs de transcription. Ils sont activés par la fixation de leur ligand, et forment un hétérodimère avec le récepteur RXR, pour se fixer sur l'ADN au niveau de l'élément de réponse PPRE (*peroxisome proliferator response element*). Ainsi, à l'aide d'autres co-activateurs et corépresseurs, les PPAR régulent la transcription de leurs gènes cibles, et agissent sur le métabolisme, l'inflammation, la différenciation cellulaire et le développement (**Schéma 5**). Le récepteur PPAR α est notamment impliqué dans la régulation du transport, du stockage et de la dégradation des acides gras *via* la β -oxydation. PPAR α permet de diminuer les taux de cholestérol, de triglycérides et d'acides gras libres dans le foie, d'augmenter le taux de cholestérol HDL (*high density lipoprotein*), et d'atténuer l'inflammation. Or, PPAR α est diminué chez les patients NASH, et cette perte d'expression corrèle avec la sévérité de la maladie (Francque *et al.*, 2015). De même, dans un modèle de souris soumises à un régime riche en graisses, il est montré que la délétion de PPAR α spécifiquement dans les hépatocytes favorise le développement des NAFLD et de l'inflammation (Régnier *et al.*, 2020). De plus, et à l'inverse, il a été montré dans un modèle murin qu'une activation de PPAR α par un agoniste favorisait son action anti-inflammatoire dans le foie, et empêchait la progression de la NASH vers la fibrose hépatique (Pawlak *et al.*, 2014). Egalement, un agoniste double dirigé

contre PPAR α et PPAR δ , le GFT505 (ou Elafibranor), a permis d'empêcher le développement de la stéatose, de l'inflammation et de la fibrose dans différents modèles de souris NASH et/ou fibrotiques (Staels *et al.*, 2013). Toutes ces observations confèrent à PPAR α un rôle protecteur global contre la NASH (Pawlak *et al.*, 2015) (**Schéma 5**).

Schéma 5 : Effets protecteurs de l'activation du récepteur PPAR α sur les paramètres de la NASH dans un modèle murin. La fixation sur le récepteur PPAR α (*peroxisome proliferator activated receptor alpha*) d'un de ses agonistes (A), tel qu'un fibrates, provoque l'hétérodimérisation de PPAR α avec le récepteur RXR (*retinoid X receptor*), puis sa liaison à son élément de réponse (PPRE), ce qui induit le recrutement de cofacteurs transcriptionnels (B) et enfin l'activation de l'expression des gènes cibles du récepteur (C). Dans plusieurs modèles murins de NAFLD (*non-alcoholic fatty liver disease*), l'activation de PPAR α par les fibrates contrecarre différents stades de NAFLD en favorisant la β -oxydation des acides gras (FA) et en entravant la réponse pro-inflammatoire. De plus, l'activation du récepteur par les fibrates induit l'expression de la catalase (CAT) diminuant ainsi les niveaux de H₂O₂ dans le foie. La cirrhose hépatique est associée à un dysfonctionnement endothélial et à une altération de l'hémodynamique intrahépatique pouvant conduire à une insuffisance hépatique. Les fibrates améliorent la résistance vasculaire hépatique en réduisant l'expression de la protéine cyclo-oxygénase 1 (COX-1). ROS : espèces réactives de l'oxygène ; IL1 : interleukine 1 ; TNF : *tumor necrosis factor* ; APR : réponse en phase aiguë ; SAA : *serum amyloid A* ; M ϕ : macrophages circulants ; KC : macrophages résiduels ; TGF β : *transforming growth factor β* ; NAFL : *non-alcoholic fatty liver* ; NASH : *non-alcoholic steatohepatitis*.

Schémas issus de : Rigano D, Sirignano C, Tagliatalata-Scafati O. The potential of natural products for targeting PPAR α . *Acta Pharm Sin B*. 2017 Jul;7(4):427-438. doi: 10.1016/j.apsb.2017.05.005. Epub 2017 Jun 16. PMID: 28752027; PMCID: PMC5518659 ; Pawlak M, Lefebvre P, Staels B. Molecular mechanism of PPAR α action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2015 Mar;62(3):720-33. doi: 10.1016/j.jhep.2014.10.039. Epub 2014 Nov 1. PMID: 25450203.



En parallèle de tous ces mécanismes, d'autres facteurs de risque physiologiques, environnementaux, génétiques et épigénétiques peuvent prédisposer à l'apparition des NAFLD, et favoriser leur progression vers la NASH puis le HCC.

3) Facteurs de risque physiologiques et environnementaux

La prévalence des NAFLD entre les sexes diffère selon les études, mais semble plus importante chez les hommes que chez les femmes (Pan & Fallon, 2014). Les causes pourraient être liées à des modes de vie différents, mais aussi à des hormones sexuelles impliquées dans la puberté (Denzer *et al.*, 2009). Également, une étude transcriptomique effectuée par le laboratoire sur une cohorte lilloise de patients obèses atteints ou non de NASH (cohorte ABOS) a montré une signature génique différente entre hommes et femmes. Les données révèlent notamment un effet significatif du sexe sur le développement de la fibrose, justifiant l'importance de prendre en compte ce critère dans les études cliniques (Vandel *et al.*, 2021).

L'âge est également un facteur de risque de développement des NAFLD/NASH. L'âge moyen des patients atteints de NASH se situe autour de 50-60 ans. A Taiwan, une étude a montré une plus grande proportion de NAFLD chez les personnes plus âgées, avec notamment la présence d'une NAFLD chez les personnes d'environ 70 ans dans 51% des cas (Hung *et al.*, 2013). Néanmoins, du fait de l'augmentation de la prévalence de l'obésité, notamment chez les enfants, les NAFLD concernent aujourd'hui davantage de populations jeunes.

Le développement des NAFLD s'accompagne aussi de plusieurs facteurs de risques environnementaux (Younossi *et al.*, 2018).

La présence des NAFLD est observée sur tous les continents, mais on note une prévalence plus importante en Amérique du Sud (31% de la population), au Moyen-Orient (32%), en Asie (27%), aux Etats-Unis (32%) et en Europe (23%), et moins importante en Afrique (14%). Aux Etats-Unis, les NAFLD sont le plus souvent observées chez les personnes hispaniques, notamment d'origine mexicaine, tandis que les afro-américains sont globalement protégés. Ces observations peuvent en partie être expliquées par des habitudes alimentaires, une sédentarité et des facteurs socio-économiques différents entre les régions du monde.

Également, la prévalence des NAFLD/NASH est accentuée par la présence des comorbidités (Younossi *et al.*, 2018). Aux Etats-Unis, les patients NASH présentent une obésité dans 82% des cas, un diabète de type 2 dans 48%, une hyperlipidémie

dans 82%, un syndrome métabolique dans 76% et une hypertension dans 70% (Younossi *et al.*, 2016). En Amérique du Sud, 61% des patients atteints de NAFLD et obèses morbides présentent en réalité une NASH. En Europe, une étude italienne a montré que 60 à 70% des patients diabétiques de type 2 étaient atteints de NAFLD, de même au Royaume-Uni pour 42,6% des patients diabétiques. Egalement, il a été montré en Italie que 91% des patients obèses et 67% des personnes en surpoids présentaient une NAFLD, de même à Hong-Kong pour 60,5% des patients obèses. En Suède, une étude menée pendant 38 ans chez des hommes âgés au départ de 18-20 ans a montré que les sujets en surpoids à la fin de leur adolescence présentaient 64% de risque de développer une NAFLD une fois adultes (Hagström *et al.*, 2016).

Il est cependant possible de développer une NAFLD sans obésité, sans facteurs de comorbidités métaboliques et cardiovasculaires, et à un âge beaucoup plus précoce voire chez les enfants et adolescents : il s'agit de la « *Lean NAFLD* », retrouvée chez 10 à 20% des américains et européens (Younossi *et al.*, 2012), mais dont l'origine est plutôt génétique.

4) Facteurs de risque génétiques et épigénétiques

a) **Génétique et développement des NAFLD**

Le risque de développer une NASH peut également comporter une part génétique, pouvant influencer parfois les facteurs de risques environnementaux. Des études familiales montrent un risque plus élevé de développement de la stéatose hépatique chez les parents dont les enfants sont atteints de NAFLD que dans la population générale (Schwimmer *et al.*, 2009). Egalement, les différentes données de la littérature montrent qu'environ la moitié de la variabilité de la teneur en graisses hépatiques s'explique par des facteurs génétiques, qui déterminent également le risque de maladie métabolique et de fibrose hépatique (Eslam *et al.*, 2017). De plus, le fait que les personnes d'origine hispanique soient plus à risque de développer une NAFLD que les individus européens, et que les personnes d'origine africaine soient globalement protégées, serait en partie de cause génétique (Guerrero *et al.*, 2009). En effet, ces variabilités inter-ethniques peuvent parfois être expliquées par des polymorphismes génétiques (**Schéma 6**) (Eslam *et al.*, 2017).

Par exemple, une étude a montré qu'un polymorphisme du gène PNPLA3 (*patatin-like phospholipase domain-containing protein 3*) serait fortement associé à une

augmentation du contenu en graisses du foie et à une augmentation de l'inflammation (Romeo *et al.*, 2008). La substitution d'une isoleucine par une méthionine en position 148 (148M) serait la mutation la plus associée au développement de la NAFLD (rs738409 C>G). PNPLA3 code pour une enzyme de la famille des lipases, qui est impliquée dans l'hydrolyse des triacylglycérols. L'ubiquitinylation et la dégradation protéasomale de PNPLA3 sont inhibées par la mutation, entraînant l'accumulation de l'enzyme qui va inhiber l'activité d'autres lipases hépatiques, favorisant ainsi l'accumulation des graisses, comme démontré dans un modèle de souris sur-exprimant l'enzyme mutée (BasuRay *et al.*, 2017).

Également, il est décrit pour la protéine TM6SF2 (*Transmembrane 6 superfamily member 2*) qu'une substitution en position 167 d'un acide glutamique par une lysine (rs58542926 C>T) entraîne une perte de fonction liée au développement de la NASH (Kozlitina *et al.*, 2014). TM6SF2 permet d'enrichir l'apolipoprotéine B100 en triglycérides, au sein de la voie des VLDL (*very low density lipoprotein*). La mutation diminue son action, et entraîne donc une augmentation du contenu en triglycérides dans le foie et une diminution du taux de lipoprotéines circulantes, favorisant le développement de la maladie.

Ensuite, il a été montré qu'un polymorphisme du gène MBOAT7 (*membrane bound O-acyltransferase domain-containing 7*) (rs641738 C>T) était associé au risque de développement des NAFLD, de l'inflammation et de la fibrose chez les individus européens (Mancina *et al.*, 2016) et était également associé au risque de progression de la NAFLD vers le HCC (Donati *et al.*, 2017). Cette mutation entraîne une diminution de l'expression génique et protéique de MBOAT7, ce qui entraîne une réduction des taux de phosphatidylinositol contenant de l'acide arachidonique, au niveau des hépatocytes et de la circulation.

Une mutation faux-sens du gène GCKR (*glucokinase regulator*) (rs1260326 C>T) semble également favoriser l'accumulation des graisses dans le foie et le développement des NAFLD (Santoro *et al.*, 2011). La mutation empêche la protéine GCKR de diminuer l'activité de la glucokinase en réponse au fructose-6-phosphate, activant la recapture du glucose dans le foie. Les taux circulants de glucose et d'insuline sont diminués, mais la production de malonyl-CoA est augmentée, servant de substrat à la lipogenèse et bloquant l'oxydation des acides gras.

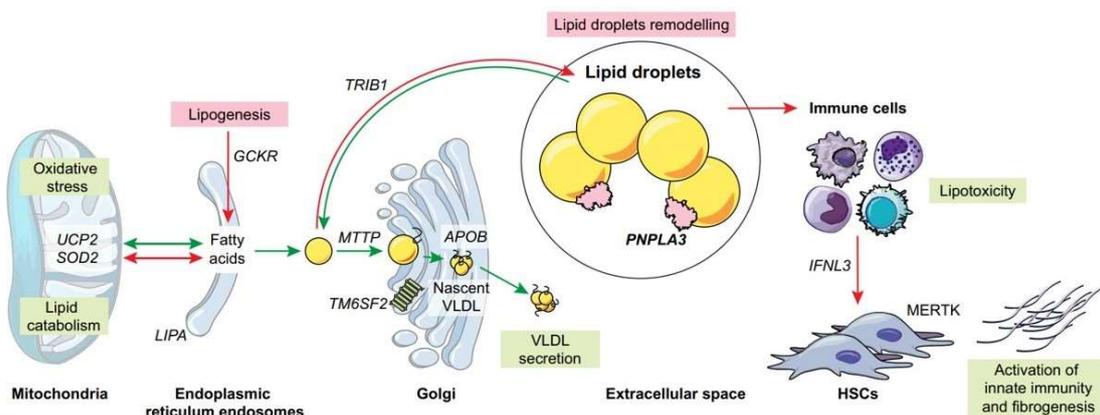
L'insulino-résistance joue un rôle important dans le développement des NAFLD, ainsi un polymorphisme du gène ENPP1 (*ectonucleotide pyrophosphatase /phosphodiesterase 1*) (rs1044498 A>C) ainsi qu'un variant du gène IRS1 (*insulin receptor substrate 1*) (rs1801278 A>C), tous deux des substrats du récepteur à l'insuline, entraînent l'inhibition de la voie de la réponse à l'insuline, favorisant une forme sévère de fibrose chez les patients NAFLD.

A l'inverse, d'autres mutations peuvent être associées à une protection contre la NAFLD. En effet, une mutation du gène LPIN1 (*lipin 1*) (rs13412852 C>T), impliqué dans la régulation du métabolisme des acides gras, permet une augmentation de son expression et lui confère un rôle protecteur de la NAFLD et de la fibrose chez les patients pédiatriques (Valenti *et al.*, 2012). Egalement, des variants des gènes UCP2 (*uncoupling protein 2*) (rs695366 G>A) et SOD2 (*superoxyde dismutase 2*) (rs4880 C>T), impliqués dans la régulation du statut oxydatif de la mitochondrie, sont associés à une diminution du risque de développer une NASH et à une diminution de la fibrose chez les patients atteints de NAFLD (Sutton *et al.*, 2003 ; Al-Serri *et al.*, 2012). L'activation des voies de l'inflammation est également impliquée dans la pathologie, ainsi un variant du gène MERTK (*myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase*) (rs4374383 G>A), impliqué dans l'immunité et l'activation des cellules stellaires, entraîne une diminution de son expression et permettrait de protéger contre la fibrose les patients NAFLD (Petta *et al.*, 2016).

Schéma 6 : Les voies et gènes majoritairement associés au développement et à la progression de la NAFLD.

APOB : *apolipoprotein B* ; IFNL3 : *interferon lambda 3* ; GCKR : *glucokinase regulator* ; HSC : cellules stellaires hépatiques ; LIPA : *lysosomal acid lipase* ; MTTP : *microsomal triglyceride transfer protein* ; PNPLA3 : *patatin-like phospholipase domain-containing protein 3* ; SOD2 : *superoxide dismutase 2* ; TM6SF2 : *transmembrane 6 superfamily member 2* ; TRIB1 : *tribble 1* ; UCP2 : *uncoupling protein 2* ; VLDL : *very low density lipoprotein*. ; MERTK : *myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase*.

Schéma issu de : Eslam M, Valenti L, Romeo S. Genetics and epigenetics of NAFLD and NASH: Clinical impact. J Hepatol. 2018 Feb;68(2):268-279. doi: 10.1016/j.jhep.2017.09.003. Epub 2017 Nov 6. PMID: 29122391.



b) Epigénétique et développement des NAFLD

De nombreuses modifications épigénétiques peuvent également participer au développement des NAFLD. Quelques exemples sont cités ci-dessous (Ashraf & Altaf, 2018).

Les enzymes DNMT (ADN méthyl-transférase) sont responsables de la méthylation de l'ADN, c'est-à-dire de l'ajout de groupements méthyles sur les sites CpG (cytosine puis guanine) de l'ADN, contribuant à inhiber l'expression des gènes. Dans un modèle murin ayant développé une NAFLD suite à un régime lipogénique déficient en méthyles, il a été montré une altération des enzymes DNMT du foie, associée à une susceptibilité plus importante d'accumuler des lipides et de développer une stéatose hépatique (da Silva *et al.*, 2014). Une autre étude montre une hypométhylation globale de l'ADN dans les foies des souris ayant développé une NASH suite à un régime déficient en méthyles. Ces souris présentent notamment une altération de la méthylation pour 164 gènes du foie qui sont impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN, le métabolisme des lipides et du glucose, la fibrose hépatique et le remodelage tissulaire du foie (Tryndyak *et al.*, 2011). Chez les patients NAFLD, il a été montré que l'expression de la DNMT1 était significativement diminuée chez les patients NASH, et associée à une altération des fonctions mitochondriales et de la prolifération des péroxisomes. Cependant, il a été montré également une hyperméthylation du promoteur de la NADH (nicotinamide adénine dinucléotide déshydrogénase) 6, une enzyme de la chaîne respiratoire mitochondriale, qui entraîne la diminution de son expression associée à la sévérité de la maladie (Pirola *et al.*, 2013). Globalement, les patients NAFLD présentent une déméthylation globale de l'ADN hépatique, avec cependant des loci spécifiques d'hyperméthylation associés au développement de la pathologie (Murphy *et al.*, 2013).

L'acétylation des histones est une autre modification épigénétique associée au développement de la NASH. Il a été montré chez la souris que l'enzyme HDAC3 (histone désacétylase 3) joue un rôle crucial dans la régulation de certains gènes impliqués dans le contrôle de la synthèse des lipides hépatiques. Une hyperacétylation de ces gènes, suite à l'altération de l'HDAC3, favorise le développement de la stéatose hépatique (Feng *et al.*, 2011). Egalement, une perte de l'expression d'HDAC3 (*Knock Out* (KO)) spécifiquement dans le foie de souris entraîne le développement d'une stéatose, et altère les mécanismes de réparation de l'ADN, amenant au développement d'un HCC (Sun *et al.*, 2012). Les patients NAFLD présentent également une diminution de l'expression des enzymes désacétylases

Sirtuine, et il a notamment été montré que la délétion de la Sirtuine 1 dans le foie de souris altère la voie de signalisation induite par PPAR α (Purushotham *et al.*, 2009).

c) Les ARN non codants dans le développement de la NASH

De nombreux ARN (acides ribonucléiques) non codants sont également associés au développement des NASH (**Tableau 1**). Les ARN non codants sont transcrits à partir de l'ADN mais non traduits en protéines, et ont pour fonction de réguler l'expression des gènes au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel : formation de l'hétérochromatine, modification des histones, méthylation de l'ADN, inhibition de l'expression de gènes, etc. Ils peuvent être classés en 2 groupes principaux : les petits (< 30 nucléotides, *short* : sncARN), parmi lesquels se trouvent les microARN (miARN), et les longs (> 200 nucléotides, *long* : lncARN) (Ashraf *et al.*, 2018).

Les miR-103 et miR-107 (miR-103/107), qui ne diffèrent entre eux que d'un seul nucléotide, sont augmentés dans le sérum des patients NAFLD (Xu *et al.*, 2015). *In vivo* chez la souris, cette augmentation est retrouvée dans les modèles NAFLD et NASH. Le miR-103 serait impliqué dans la stimulation de la lipogenèse dans les hépatocytes, favorisant l'accumulation des lipides, et dans l'induction de l'insulino-résistance (Trajkovski *et al.*, 2011).

Plusieurs études ont également montré la capacité des miARN à réguler les modifications post-transcriptionnelles : ils sont capables de réguler l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du glucose et des lipides, et nombre d'entre eux sont connus pour être dérégulés au cours de la NASH (Su *et al.*, 2018). Il a par exemple été montré chez les patients atteints de NASH et de HCC une surexpression du miR-23a, retrouvée également dans un modèle de souris ayant développé une NASH puis un HCC suite à un régime CDAA (*choline deficient, low methionine, L-amino acid-defined*). Dans ce modèle murin, l'activation de la voie pro-inflammatoire IL6-STAT3 (interleukine 6, *signal transducer and activator of transcription 3*) entraîne l'expression du miR-23a, induisant une diminution de l'expression de PGC1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha*) et G6Pc (*glucose-6-phosphatase catalytic subunit*), des gènes impliqués dans le métabolisme du glucose, conduisant au développement du HCC (Wang *et al.*, 2012).

Le miARN 33a est surexprimé chez les patients NASH. Il est induit par le SREBP2, et agit comme un inhibiteur du CYP7A1 (*cholesterol 7 α 1-hydroxylase*), ce qui

empêche l'action bénéfique de cette enzyme dans l'homéostasie métabolique. Ainsi, la synthèse des acides biliaires est diminuée et le contenu en cholestérol dans le foie est augmenté (Li *et al.*, 2013).

Egalement, il a été montré une diminution de l'expression de miR-122 chez les patients NAFLD (Cheung *et al.*, 2008), favorisant la lipogenèse et altérant la sécrétion des lipides par le foie. Le miR-122 est très fortement exprimé dans les hépatocytes et représente 80% du nombre total de miARN. Chez la souris, une délétion de miR-122 spécifiquement dans le foie est associée au développement spontané d'une NASH, et à sa progression vers le HCC (Hsu *et al.*, 2012). Le rétablissement de miR-122 chez ces souris permet une régression de la maladie et une forte inhibition de la tumorigenèse.

Le miR-34a est connu pour jouer sur le métabolisme des lipides, notamment *via* PPAR α , et pour contrôler le cycle cellulaire et l'activation de la sénescence, *via* l'inhibition d'enzymes désacétylases qui modulent la stéatose hépatique. Or, il est connu qu'une accumulation d'hépatocytes sénescents au cours de la NASH favorise le développement de la maladie vers des stades plus avancés (Papatheodoridi *et al.*, 2020). Ainsi, il a été montré que les patients NASH présentent une surexpression de miR-34a dans leur foie, qui corrèle avec la sévérité de la maladie (Cermelli *et al.*, 2011).

Enfin, le miR-21 est l'un des micro-ARN les plus augmentés dans le foie des patients atteints de NASH. *In vivo*, l'utilisation d'un régime NASHogène en association à un traitement par un inhibiteur du miR-21 (Antagomir 21) ou chez des souris KO miR-21 montre une diminution des dommages hépatiques, de l'inflammation et de la fibrose. L'effet du miR-21 dans la NASH serait notamment dû à son action sur PPAR α , puisque les modèles d'inhibition et de suppression du miR-21 permettent de restaurer l'expression du récepteur dans le foie (Loyer *et al.*, 2016).

Tableau 1 : Exemples d'ARN non codants associés au développement de la NASH chez l'Homme.

PPAR α : *peroxisome proliferator activated receptor alpha* ; PGC1 α : *peroxisome-proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha* ; G6PC : *glucose-6-phosphatase catalytic subunit* ; CYP7A1 : *cholesterol 7 α -hydroxylase* ; FASN : *fatty acid syntase* ; HMGCR : *hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase* ; SREBP1/2 : *sterol regulatory element-binding protein 1/2* ; HNF4a : *hepatocyte nuclear factor 4* ; Sirt1 : *sirtuine 1*. \uparrow : augmentation, \downarrow : diminution.

Nom	Cible	Effet dans la NASH
miR-103/107	Cavéoline 1	\uparrow dans la NASH (sérum) \uparrow : adipogénèse, accumulation des lipides, insulino-résistance
miR-23a	PGC1 α /G6PC	\uparrow dans la NASH et le HCC (foie) Perturbation du métabolisme du glucose, développement du HCC favorisé
miR-33a	CYP7A1	\uparrow dans la NASH (foie) \downarrow : synthèse des acides biliaires \uparrow : cholestérol dans le foie
miR-122	FASN HMGCR SREBP1/2	\downarrow dans le foie et \uparrow dans le sérum des patients NASH \uparrow : lipogénèse, sécrétion des lipides par le foie, développement spontané d'une NASH et progression vers le HCC
miR-34a	PPAR α , HNF4a, Sirt1, p53, enzymes déacétylases	\uparrow dans la NASH (foie) Favorise la sévérité de la maladie
miR-21	PPAR α	\uparrow dans la NASH (foie) Favorise les dommages tissulaires, l'inflammation, la fibrose

5) Diagnostic des NAFLD

a) La méthode de diagnostic actuelle

Les NAFLD sont au départ asymptomatiques. Les symptômes n'apparaissent souvent qu'au stade déjà irréversible de la cirrhose décompensée. L'examen de référence pour établir le diagnostic est la biopsie hépatique, suivie d'une analyse histologique par un anatomopathologiste (Chalasan *et al.*, 2017 ; Bedossa, 2018). Il s'agit d'un geste invasif, qui n'est donc pas un examen de routine. Celui-ci n'est réalisé que lorsque différents paramètres font suspecter un stade avancé de la maladie (NASH recommandations EASL (*European Association for the Study of the Liver*), 2017) :

- la présence de facteurs de risque : âge, contexte dysmétabolique, insulino-résistance, diabète de type 2, suspicion/diagnostic de cirrhose, maladie cardiovasculaire,
- des examens non invasifs alertants : des paramètres sanguins élevés (ASAT/ALAT (aspartate aminotransférase/alanine aminotransférase),

ferritinémie), une échographie et une mesure de l'élastométrie du foie anormales,

- l'exclusion des autres causes de maladie du foie chronique : alcool, hépatite virale, hépatite auto-immune, ...

A partir des biopsies, le calcul de deux scores permet de diagnostiquer la maladie et d'évaluer sa gravité (**Schéma 7**). Le score NAS (*NAFLD activity score*) évalue les paramètres de stéatose, d'inflammation et de ballonnement des hépatocytes, en définissant pour chacun une notation allant de 0 à 2 ou 3. On estime qu'un score NAS global strictement inférieur à 3 exclut la présence d'une NASH, et qu'un score NAS global strictement supérieur à 5 définit la présence d'une NASH. Un score NAS global entre 3 et 5 peut également traduire la présence d'une NASH, à partir du moment où une notation d'au moins 1 est établie pour chacun des paramètres. Le score SAF (stéatose, activité, fibrose) évalue également les paramètres de stéatose, d'inflammation et de ballonnement, mais s'intéresse aussi à la fibrose hépatique allant jusqu'à la cirrhose. Ces paramètres sont également notés, de 0 à 3 ou 4, et une notation d'au moins 1 pour chacun des paramètres définit la présence d'une NASH. Pour les deux scores, plus les notations des paramètres sont élevées, plus le stade de la maladie est avancé.

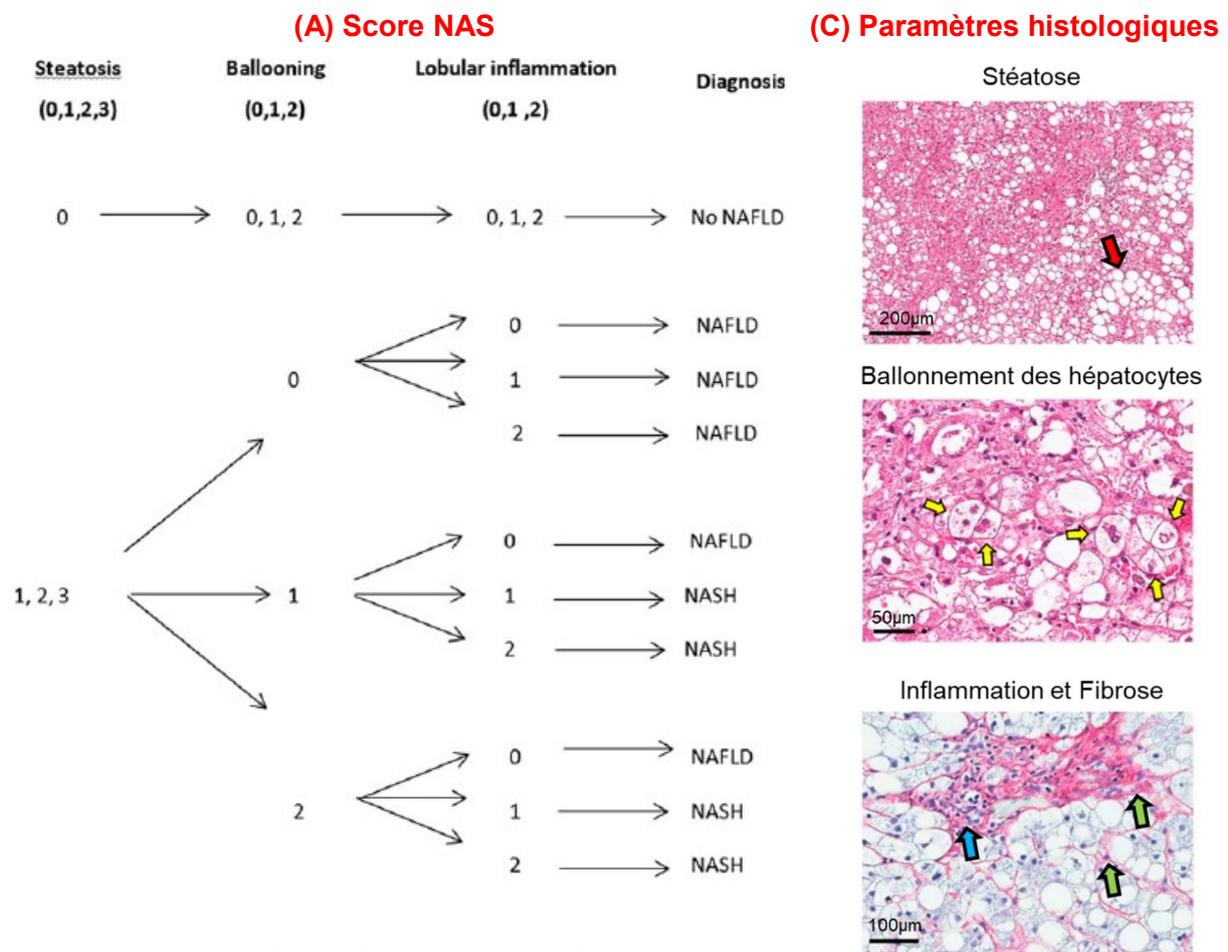
Schéma 7 : Calcul des scores NAS et SAF permettant de diagnostiquer la NASH et d'évaluer sa gravité.

La stéatose est évaluée par la mesure de la surface des gouttelettes lipidiques rapportée à la surface totale du foie, ensuite exprimée en pourcentage. NAS : *NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease) activity score* ; SAF : stéatose, activité, fibrose ; NASH : *non-alcoholic steatohepatitis*.

Schémas (A) et (B) issus de : Bedossa P, Poitou C, Veyrie N, Bouillot JL, Basdevant A, Paradis V, Tordjman J, Clement K. Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology*. 2012 Nov;56(5):1751-9. doi: 10.1002/hep.25889. PMID: 22707395 ; Collège Evaluation Formation Accréditation en Hépatogastro-Entérologie (CEFA-HGE).

Biopsies de foies de patients NASH, marquées à l'H&E (hématoxyline et éosine) ou au Rouge Sirius (marqueur de fibres de collagène/fibrose). Flèche rouge : stéatose. Flèches jaunes : hépatocytes ballonnés. Flèche bleue : foyer inflammatoire. Flèches vertes : fibres de collagène (fibrose).

Images (C) issues de : Overi D, Carpino G, Franchitto A, Onori P, Gaudio E. Hepatocyte Injury and Hepatic Stem Cell Niche in the Progression of Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Cells*. 2020 Mar 2;9(3):590. doi: 10.3390/cells9030590. PMID: 32131439; PMCID: PMC7140508.



(B) Score SAF : score NAS + fibrose

Stéatose %	Activité NAS (NASH-CRN)	Fibrose Kleiner et al.
0-3	0-8	0-4
0: < 5 %	Stéatose: 0-3	0: normal
1: 5-33 %	+ Ballonisation: 0-2	1: central (1a,b), portal (1c)
2: 34-66 %	+ Inflammation : 0-3	2: central + portal
3: 67-100 %		3: septa fibreux
		4: cirrhose

b) Les autres scores de diagnostic mis au point

D'autres nouveaux scores sont également utilisés pour dépister la fibrose dans la NAFLD. Tout d'abord, le score FIB-4 (*fibrosis-4 index*), qui est basé sur un algorithme calculé à partir de l'âge du patient (uniquement interprétable chez les moins de 70 ans), du nombre de plaquettes et des taux des transaminases ASAT et ALAT. Celui-ci permet d'évaluer la présence ou non d'une fibrose sévère. Un score inférieur à 1,3 exclut la présence d'une fibrose sévère, tandis qu'un score supérieur à 2,67 prédit une fibrose de stade 3 à 4. Entre 1,3 et 2,67, il est nécessaire de surveiller l'évolution tous les ans. Le score NFS (*NAFLD fibrosis score*) permet également de détecter la présence d'une fibrose hépatique chez les patients non alcooliques. Celui-ci se base sur l'âge, l'IMC (indice de masse corporelle), la glycémie, le nombre de plaquettes, le taux d'albumine et le ratio des taux de transaminases. Un score inférieur à -1,455 traduit une absence de fibrose significative, tandis qu'un score supérieur à 0,675 prédit une fibrose de stade 3 à 4. Entre les deux valeurs, le diagnostic est indéterminé, l'évolution est à surveiller. En cas de score FIB-4 supérieur à 2,67 ou de score NFS supérieur à 0,675, un deuxième test de confirmation doit être réalisé. Il s'agit soit d'une mesure de l'élastométrie du foie, à l'aide d'un appareil type FibroScan (Echosens), VTQ (Siemens), SSI (Supersonic Imaging Aixplorer) ou d'un appareil permettant la MRE (*magnetic resonance elastography*), soit d'un test sanguin spécialisé (tels que le FibroTest, le FibroMètre, l'ELF (*enhanced liver fibrosis*) ou l'Hepascore). Ces tests spécialisés se basent sur les taux de gamma-glutamyltransférase (GGT), de bilirubine, d' α 2-macroglobuline, d'apolipoprotéine AI, d'haptoglobine, des transaminases, de la ferritine, du PIIINP (*procollagen III amino-terminal peptide*), de l'acide hyaluronique, de TIMP1 (*tissue inhibitor of metalloproteinases 1*), ou encore sur la mesure de l'index de prothrombine et de la glycémie à jeun. Si le second test revient positif, le patient sera adressé à un hépatologue, qui après exclusion de toute autre cause, demandera la réalisation d'une biopsie hépatique diagnostiquant la NAFLD (NASH Recommandations EASL, 2017) (Recommandations du Syndicat des Biologistes, novembre 2020).

Des scores sont aussi utilisés pour évaluer la présence d'une stéatose hépatique, avec cependant peu d'efficacité (Wong *et al.*, 2018). Le FLI (*fatty liver index*) est un score basé sur l'IMC, le tour de taille et les taux de triglycérides et de GGT sanguins, corrélant avec l'insulino-résistance et la mortalité toute cause confondue. L'index HSI (*hepatic steatosis index*) utilise le ratio des taux de transaminases, l'IMC, le sexe et la

présence ou non d'un diabète. Un algorithme plus efficace pour mesurer le contenu en graisses du foie est permis grâce à l'association entre la présence d'un syndrome métabolique, la présence d'un diabète de type 2, la mesure de l'insuline sérique et le calcul du ratio entre les taux de transaminases, définissant le score *NAFLD liver fat*. Egalement, il est possible de réaliser un SteatoTest, comprenant les mesures des taux de bilirubine, de GGT, d' α 2-macroglobuline, d'haptoglobuline, des ALAT et d'apolipoprotéine A1, qui sont associées à l'IMC, aux taux de cholestérol, de triglycérides et de glucose, ajustés suivant l'âge et le sexe. Il existe également un score *NAFLD ridge*, incluant les taux d'ALAT, de HDL cholestérol, de triglycérides, d'hémoglobine A_{1c} et le nombre de leucocytes, associés aux données de comorbidités et à la présence d'une hypertension. Mais concernant la détection de la stéatose, les techniques d'imagerie sont préférées aux calculs des scores. Ainsi, l'ultrasonographie constitue la méthode standard de détection. Mais il est également possible d'utiliser l'imagerie par résonance magnétique (IRM) ou la spectrométrie par résonance magnétique (SRM), plus précisément la MRI-PDFF (*magnetic resonance imaging-estimated proton density fat fraction*) ou la MRS-PDFF. L'élastométrie mesurée par le FibroScan permet également d'estimer la stéatose, grâce au calcul du CAP (*controlled attenuation parameter*), qui évalue le degré d'ultrasons atténués suivant le contenu en graisses du foie (Wong *et al.*, 2018).

c) La recherche de biomarqueurs spécifiques

Pour parer au manque de précision des scores de stéatose ou de fibrose actuellement utilisés, et dans le but à terme de supprimer le geste invasif qu'est la biopsie hépatique, des biomarqueurs sanguins spécifiques de la NAFLD sont actuellement recherchés, grâce notamment aux techniques omics (Wong *et al.*, 2018).

Grâce à la lipidomique, des signatures lipidiques prédictives de la NAFLD ont pu être mises en évidence, ainsi que des acides gras oxydés et des produits du métabolisme de l'acide arachidonique pouvant prédire la NASH (Oresic *et al.*, 2013). Cependant, ces découvertes doivent être répétées et validées dans d'autres grandes cohortes de patients. La métabolomique a permis de montrer qu'il pouvait exister des sous-types de NAFLD répondant à une supplémentation par du S- adénosylméthionine, ce qui pourrait constituer une stratégie thérapeutique (Alonso *et al.*, 2017). Plusieurs études ont également montré des modifications caractéristiques de la composition du microbiote chez les patients NAFLD fibrosés (Loomba *et al.*,

2017). Enfin, la volatolomique, qui consiste à analyser les composés organiques volatils présents dans les fluides, les tissus ou l'air expiré, montre des différences de profil entre un patient NAFLD et un patient NASH (Verdam *et al.*, 2013), et permettrait potentiellement de distinguer les différents stades de la NAFLD.

Comme décrit précédemment, une analyse du génome peut également permettre de rechercher les mutations et autres modifications épigénétiques liées au développement et à la progression des NAFLD, sans toutefois constituer une preuve du diagnostic. Egalement, le dosage des miARN sanguins peut constituer un biomarqueur des NAFLD et de leur progression (Su *et al.*, 2018). Finalement, grâce à ces deux paramètres, des diagnostics plus précis pourraient être réalisés, et des stratégies thérapeutiques personnalisées pourraient être développées.

III. Objectifs de la thèse

Du fait de l'augmentation de la prévalence de l'obésité et du vieillissement de la population générale, la NASH représente un enjeu de santé publique mondial. Cette thèse aura pour but dans un premier temps de regrouper l'ensemble des stratégies thérapeutiques actuellement utilisées contre la NASH, qui sont encore peu efficaces, invasives et/ou non accessibles à tous, et de faire l'état des lieux des molécules en cours d'essai clinique. Puis dans un second temps, une nouvelle piste thérapeutique représentée par la protéine FAT10 (*HLA-F adjacent transcript 10*) sera proposée : de premiers résultats obtenus chez des patients NASH et dans des modèles *in vitro* et *in vivo* suggèrent que FAT10 pourrait constituer une cible thérapeutique dans le traitement de la NASH.

B. Prise en charge thérapeutique de la NASH

I. Les règles hygiéno-diététiques

L'obésité étant l'une des principales causes du développement des NAFLD et l'apparition d'une stéatose étant le point de départ de la pathologie, le premier objectif afin de ralentir la progression de la maladie voire de guérir les patients NAFLD est une perte de poids (Polyzos *et al.*, 2018). Ainsi, l'adoption de mesures hygiéno-diététiques est le premier traitement recommandé, en plus d'être le premier axe de prévention de la pathologie. Il s'agit pour le patient de modifier ses habitudes alimentaires, afin notamment de privilégier un régime moins gras, moins sucré, sans alcool et plus équilibré, mais qui doit aussi être associé à une activité physique régulière (Farzanegi *et al.*, 2019). Ces règles sont identiques à celles prônées dans les cas du diabète de type 2 ou de l'hypertension artérielle, qui sont par ailleurs des comorbidités des NAFLD. Différents régimes adaptés ont été proposés dans la littérature, tel que le régime méditerranéen, le régime DASH (*Dietary Approach to Stop Hypertension*) ou le régime faible en carbohydrates (*Low-CHO*) (Perdomo *et al.*, 2019).

Des études se sont intéressées à l'action combinée d'un régime et de la pratique d'une activité sportive chez les patients atteints de NAFLD (Hannah *et al.*, 2016). Une méta-analyse de 18 études a montré que l'association d'un régime et d'une activité physique permettait une perte de poids sur le long terme supérieure à l'application d'un régime seul (Wu *et al.*, 2009). Egalement, les résultats de 5 études combinant régime et exercice démontrent une diminution du contenu en graisses du foie, une réduction des taux d'enzymes hépatiques, et une perte de poids allant de 4,2% à 10,6% (Thoma *et al.*, 2012). Enfin, une étude menée chez les patients NAFLD soumis à un régime et à une activité sportive a montré une diminution de l'inflammation, du ballonnement et de la fibrose (Vilar Gomez *et al.*, 2009).

Ainsi, de nombreuses études ont montré l'intérêt de ces règles hygiéno-diététiques. De manière globale, il est estimé qu'une perte de poids supérieure ou égale à 3% permettrait une amélioration de la stéatose, qu'une perte supérieure ou égale à 5% permettrait une amélioration de l'inflammation, et qu'une perte supérieure ou égale à 10% permettrait une amélioration de la fibrose (Hannah *et al.*, 2016). Ainsi, les sociétés savantes telles que l'EASL, l'EASD (*European Association for the Study of Diabetes*) ou l'EASO (*European Association for the Study of Obesity*) recommandent de suivre

un régime particulier et de pratiquer une activité physique régulière afin d'atteindre une perte de poids entre 7 et 10% du poids initial (EASL-EASD-EASO, 2016). Cependant, ces mesures hygiéno-diététiques ne sont efficaces que pour un faible pourcentage de patients obèses atteints de NAFLD, d'une part car elles demandent une adhésion complète et durable du patient à ce nouveau style de vie, et d'autre part car certaines pathologies sont trop avancées et nécessitent l'ajout d'une pharmacothérapie et/ou d'une chirurgie bariatrique.

II. La chirurgie bariatrique

1) Principe de la chirurgie bariatrique

Lorsque l'obésité est trop importante, c'est-à-dire que l'IMC d'un individu est supérieur à 40kg/m² ou supérieur à 35kg/m² et associé à des comorbidités métaboliques et/ou cardiovasculaires, les règles hygiéno-diététiques ne sont plus adaptées car inefficaces. La perte de poids considérable qui est exigée en vue de soigner la maladie ne sera possible que par la réalisation d'un acte chirurgical : il s'agit de la chirurgie bariatrique. Plusieurs techniques ont été développées : l'anneau gastrique ajustable (AGA), la gastrectomie « sleeve » (SG), le by-pass (court-circuit) gastrique « roux-en-y » (BPG) (**Schéma 8**), la dérivation biliopancréatique ou encore la dérivation biliopancréatique avec switch duodénal. La France occupe la 3^{ème} place dans le monde concernant la réalisation des chirurgies bariatriques, après les Etats-Unis et le Brésil, avec plus de 60 000 interventions réalisées sur l'année 2018 (Halimi, Médecine des maladies Métaboliques - Décembre 2019 - Vol. 13 - N°8). Les interventions correspondent pour 5% à la pose d'un AGA, pour 30% au BPG et pour 60% à la SG. Le principe général est de réduire la taille de l'estomac, dans le but de limiter l'ingestion des aliments et de favoriser la perte de poids.

Schéma 8 : Les 3 principales chirurgies bariatriques en France. Haute autorité de santé, 2009.



2) Effets bénéfiques et délétères de l'intervention

Les études cliniques menées sur les patients ayant subi ce type d'interventions ont prouvé l'efficacité du geste : on note une diminution significative de la mortalité chez les patients opérés comparés aux patients témoins, avec un bénéfice plus important pour la SG comparée aux autres chirurgies (Thereaux *et al.*, 2018). L'efficacité de la chirurgie est également montrée sur la prise des traitements contre le diabète, l'hypertension artérielle et les lipides. Une cohorte de 1633 patients traités par antidiabétiques et opérés en 2009 révèle à 6 ans un pourcentage d'arrêt des traitements antidiabétiques de 49,9%, en comparaison au taux d'arrêt de 9% chez les témoins obèses non opérés. Ce taux était d'autant plus important avec le BPG qu'avec le SG puis l'AGA. Une diminution des traitements antidépresseurs a également été observée. De plus, une réduction marquée de la prise de traitements antihypertenseurs et hypolipémiants a été montrée chez les patients opérés (-40,7% et -53,6%), notamment suite à un BPG, par rapport aux patients témoins (-11,7% et -20,2%). En revanche, l'utilisation des inhibiteurs de la pompe à protons a été multipliée par 2 suite au BPG voire par 3 suite à la SG, 4 ans après l'intervention (Thereaux *et al.*, 2017). En effet, les principaux effets secondaires de la chirurgie sont les troubles digestifs, telles que des douleurs abdominales sévères, des lithiases biliaires, des obstructions intestinales, des hémorragies, ou encore des sténoses gastriques, pouvant donc mener à une intervention chirurgicale. Des troubles nutritionnels sont également observés, avec principalement la présence de carences et de problèmes de dénutrition. La chirurgie bariatrique est avant tout un acte invasif, source de nombreuses complications.

3) La transplantation hépatique

Lorsque le foie est trop atteint, avec la présence d'une cirrhose ou d'un cancer, la transplantation hépatique est recommandée. Toutefois, sa réalisation dépend de l'âge, des comorbidités et des éventuelles autres pathologies du patient.

Au cours des 20 dernières années, l'indication de transplantation hépatique ayant la croissance la plus rapide correspond aux NAFLD/NASH. En 2002 en Europe, 1,2% des transplantations étaient réalisées pour cause de cirrhose due aux NAFLD/NASH, contre 8,4% en 2016. Elles sont devenues l'une des causes principales de

développement du HCC, et on estime qu'en France le nombre de cas de HCC dus aux NAFLD/NASH augmentera de 117% dans les prochaines années (Burra *et al.*, 2020).

La transplantation n'est pas un acte anodin. Les patients NAFLD sont davantage sujets à développer des complications par rapport aux autres étiologies amenant à la transplantation hépatique. Les complications sont notamment post-chirurgicales, telles que des infections, mais se développent aussi sur le long terme, avec des événements cardiovasculaires ou des récurrences. Le risque de récidiver d'une NASH après une transplantation hépatique est élevé : 53%, 57,4% et 38% à 1, 3 et 5 ans respectivement après chirurgie, de même que le risque de développer une NASH *de novo* : 13%, 16% et 17% à 1, 3 et 5 ans respectivement après chirurgie (Saeed *et al.*, 2019). Afin d'éviter le rejet de la greffe, la prise consciencieuse des immunosuppresseurs est essentielle. De même, pour éviter les complications métaboliques et cardiovasculaires, l'adhésion totale aux règles hygiéno-diététiques préconisées est primordiale (Burra *et al.*, 2020).

III. Les molécules en essais cliniques pour traiter la NASH

Les molécules actuellement en cours d'essais cliniques dans le traitement de la NASH sont résumées dans le **Tableau 2** (pages 70-71).

1) Les molécules utilisées dans le traitement des maladies métaboliques

A ce jour, il n'existe aucun médicament sur le marché permettant de soigner spécifiquement les NAFLD/NASH. Cependant, les mécanismes impliqués dans l'apparition et la progression de la pathologie sont communs à de nombreuses autres maladies métaboliques et cardiovasculaires. Ainsi, l'utilisation de certains médicaments destinés au traitement de l'obésité, du syndrome métabolique, des dyslipidémies, de l'hypertension artérielle et/ou du diabète de type 2 est en étude dans le contexte des NAFLD/NASH (Chalasani *et al.*, 2017 ; Polyzos *et al.*, 2020 ; Fraile *et al.*, 2021).

a) L'Orlistat

L'Orlistat, également appelé tétrahydrolipstatine, permet l'inhibition des lipases gastro-intestinales et pancréatiques. Ainsi, les graisses ne peuvent être digérées et

restent dans le tube digestif, afin d'être éliminées dans les selles. L'absorption des triglycérides est alors diminuée du tiers, favorisant la perte de poids. Ce traitement est utilisé en parallèle d'un régime faible en calories chez les personnes obèses ou présentant un surpoids associé à des facteurs de risques métaboliques et cardiovasculaires (diabète, hypertension artérielle).

Cependant, l'absorption des vitamines peut également être diminuée, ainsi un régime riche en fruits et légumes est recommandé et des compléments vitaminiques peuvent être prescrits. Une mauvaise absorption de certains médicaments liposolubles peut également être observée suite au traitement et doit être contrôlée (Filippatos et al., 2008). Les effets indésirables fréquents impliquent des troubles gastro-intestinaux directement liés au mécanisme d'action du médicament (selles grasses, incontinence), des céphalées, une fatigue, des infections respiratoires et urinaires, ou encore des hypoglycémies chez les personnes diabétiques. De rares cas de cholélithiase (formation de dépôts durcis de bile dans la vésicule biliaire), d'hépatite cholestatique (élévation des taux de phosphatases alcalines et de la GGT) et d'insuffisance hépatiques ainsi que des cas d'insuffisances rénales aiguës ont été décrits, mais les mécanismes ne sont pas encore élucidés (Filippatos et al., 2008).

Concernant son efficacité dans le traitement des NAFLD, une étude clinique publiée en 2006 a montré qu'un traitement par l'Orlistat durant 6 mois diminuait le taux d'ALAT, une enzyme traduisant la souffrance hépatocytaire, ainsi que la stéatose hépatique (Zelber-Sagi *et al.*, 2006). Egalement, une étude réalisée sur des patients NASH obèses a montré une perte de poids, une diminution des ALAT ainsi qu'une diminution, pour la majorité des patients, de la stéatose, de l'inflammation et de la fibrose après 6 mois de traitement par l'Orlistat (Assy *et al.*, 2007).

b) La Pioglitazone

Les thiazolidinediones (TZDs) sont des agonistes du récepteur PPAR γ , dont fait partie la Pioglitazone, traitement utilisé dans le diabète de type 2 (Soccio *et al.*, 2014). Les ligands du récepteur PPAR γ stimulent son action afin d'améliorer la sensibilité à l'insuline et la capture des acides gras par le foie, et de diminuer l'inflammation. En stimulant PPAR γ , les TZDs favorisent cependant la rétention des fluides, la perte osseuse, et accentuent la prise de poids. En effet, les TZDs permettent la redistribution des graisses abdominales, dont les graisses hépatiques, vers les graisses sous-

cutanées. Ainsi, dans un contexte de NAFLD, les paramètres de sévérité de la maladie sont diminués, mais en favorisant la prise de poids du patient.

Chez les patients NASH et diabétiques, un traitement par la Pioglitazone a permis une amélioration de la sensibilité à l'insuline, une diminution des taux d'ALAT et d'ASAT, ainsi qu'une diminution de la stéatose hépatique, de l'inflammation, du ballonnement des hépatocytes et du score NAS de gravité de la maladie, avec une tendance à l'amélioration de la fibrose (phase 4 : NCT00227110) (Belfort *et al.*, 2006). Egalement, une étude portant sur des patients NASH et diabétiques sous régime hypocalorique montre qu'un traitement par la Pioglitazone a diminué le score NAS sans aggraver la fibrose, et a permis la résolution de la NASH chez 51% des patients de l'étude (phase 4 : NCT00994682) (Cusi *et al.*, 2016). Comme attendu, une prise de poids significativement plus importante a été observée chez les patients sous Pioglitazone. Egalement, une étude portant sur des patients NASH non diabétiques a montré un effet bénéfique de la Pioglitazone sur la souffrance hépatocellulaire et sur la fibrose (Aithal *et al.*, 2008).

Afin de pallier aux effets indésirables de l'activation de PPAR γ , des modulateurs sélectifs du récepteur (SPPARMs) ont été développés, dont l'INT131, qui serait un candidat potentiel dans le traitement des NAFLD (Sahebkar *et al.*, 2014). De plus, des TZDs de seconde génération ont été mises au point, dont fait partie le MSDC-0602K. Il permet d'inhiber le transporteur mitochondrial du pyruvate (MPC), en activant le moins possible le récepteur PPAR γ . Le MPC est un complexe protéique qui régule l'entrée du pyruvate dans la mitochondrie, et dont l'inhibition favorise la sensibilité à l'insuline. Les résultats de l'étude EMMINENCE de phase 2 (NCT02784444) réalisée chez des patients NASH diabétiques montrent que le MSDC-0602K diminue les marqueurs de lésions hépatiques et améliore le métabolisme du glucose (Harrison *et al.*, 2020a). L'étude de phase 3 MMONARCH-1 (NCT03970031) est en cours chez les patients NAFLD/NASH et diabétiques. Egalement, un autre inhibiteur du MPC est actuellement en cours d'étude clinique de phase 2 (NCT04321343) : le PXL065, un stéréoisomère R de la Pioglitazone stabilisé par substitution au deutérium.

c) La vitamine E

La vitamine E est un antioxydant retrouvé principalement dans les fruits et légumes. Sa structure moléculaire lui permet de neutraliser les radicaux libres et les ROS en

donnant à ces composés un hydrogène de son groupement hydroxyle. La vitamine E régule également la réponse à l'inflammation, l'agrégation plaquettaire, la signalisation et la prolifération cellulaire. De nombreuses études *in vivo* suggèrent que la vitamine E pourrait améliorer les NAFLD/NASH en diminuant l'accumulation des lipides, la peroxydation lipidique, l'insulino-résistance, l'inflammation et la stéatose. Cependant, de hautes doses de vitamine E prédisposeraient davantage au risque de survenu d'un AVC (accident vasculaire cérébral) hémorragique, sa prescription doit donc être contrôlée (Nagashimada & Ota, 2019).

Une étude effectuée sur des patients NASH atteints de diabète de type 2 (NCT01002547) a montré une amélioration des paramètres histologiques du foie grâce à un traitement par la Pioglitazone combiné à la vitamine E (Bril *et al.*, 2019). Ainsi, une étude de phase 3 (PIVENS) a testé l'efficacité de la vitamine E contre la Pioglitazone et contre le placebo chez des patients non diabétiques atteints de NASH (NCT00063622). Cette étude a montré une amélioration des paramètres histologiques du foie grâce à la vitamine E (43% des patients contre 19% des patients sous placebo), et une tendance à l'amélioration pour la Pioglitazone (34% des patients). Les deux traitements montrent en revanche une amélioration significative de la sévérité de la stéatose hépatique, de l'inflammation lobulaire et du ballonnement cellulaire, mais pas de la fibrose (Sanyal *et al.*, 2010).

Une autre étude (TONIC) de phase 3 (NCT00063635) s'intéressant aux enfants et aux adolescents atteints de NASH montre également une amélioration du score NAS et du ballonnement cellulaire suite au traitement par la vitamine E ou au traitement par la Metformine (un biguanide utilisé en première intention dans le traitement du diabète de type 2) en comparaison du placebo. Cependant, les traitements n'ont pas permis l'un comme l'autre de diminuer le taux d'ALAT et d'améliorer la stéatose, l'inflammation et la fibrose (Lavine *et al.*, 2011).

Egalement, une étude clinique réalisée sur des patients NAFLD a permis de comparer en étude de phase 4 (NCT00160407) l'effet de la vitamine E en monothérapie ou associée à l'Orlistat (Harrison *et al.*, 2009). Cependant, aucune différence n'a été observée entre les deux groupes : la stéatose hépatique, l'inflammation et le score NAS ont été améliorés de la même manière pour les deux types de thérapie, ne montrant pas d'effet bénéfique de la combinaison des deux molécules.

d) La voie du GLP1

Le GLP1 (*glucagon-like peptide 1*) est une hormone appelée incrétine, sécrétée par les cellules entéro-endocrines de l'intestin suite à un repas. En activant son récepteur, le GLP1 permet d'augmenter la sécrétion glucose-dépendante de l'insuline et d'inhiber la sécrétion de glucagon, et de ralentir la vidange gastrique ce qui diminue l'appétit et accentue le sentiment de satiété. Cette voie est ciblée dans le traitement du diabète grâce à 2 classes de médicaments : les inhibiteurs de la DPP4 (dipeptidyl peptidase 4) et les incrétino-mimétiques. Les premiers permettent d'inhiber l'enzyme à l'origine de la dégradation des incrétones, prolongeant ainsi leurs effets. Les seconds correspondent aux analogues du GLP1, non hydrolysables, qui miment l'action des incrétones, avec parmi eux le Liraglutide, le Sémaglutide et l'Exénatide. Les effets indésirables de ces analogues sont principalement des troubles digestifs (nausées, vomissements, diarrhée, constipation).

En plus de son action antidiabétique, le Liraglutide est également reconnu comme traitement anti-obésité en Europe et aux Etats-Unis. Son efficacité a alors été testée dans le traitement des NAFLD. Une étude pilote menée chez des patients NAFLD obèses présentant un pré-diabète (LEAN-J) a permis de montrer qu'un traitement à faible dose durant 5 mois favorisait la perte de poids et la réduction du contenu en graisses hépatiques et viscérales (Eguchi *et al.*, 2015). De plus, la poursuite du traitement pendant 2 ans pour un sous-groupe de patients a majoritairement amélioré leur score NAS et leur fibrose. Par la suite, un essai clinique de phase 2 (NCT01237119) effectué durant 1 an chez des patients NASH obèses (LEAN) a permis une résolution de la NASH pour 39% des patients traités au Liraglutide, contre 9% pour les patients sous placebo (Armstrong *et al.*, 2016). Le risque de progression de la fibrose était également moins élevé chez les patients traités (9% contre 36%).

Une étude de phase 2 a été menée chez des patients NASH présentant un stade 2 ou 3 de fibrose (NCT02970942), et a montré, grâce au traitement par le Sémaglutide, une résolution significativement plus importante de la NASH chez les patients traités comparés aux patients sous placebo, sans aggravation de la fibrose (Newsome *et al.*, 2020). Une étude de phase 3 sera effectuée sur des patients NASH non cirrhotiques. Egalement, le Sémaglutide est en cours d'essai clinique de phase 3 par Novo Nordisk dans le traitement des NAFLD/NASH (NCT04822181). Concernant les combinaisons de traitement, une étude de phase 2a a été conduite sur des patients NASH avec un stade de fibrose de 2 ou 3 (NCT03987074) afin d'évaluer l'efficacité du Sémaglutide

en association au Cilofexor (un agoniste du récepteur aux acides biliaires FXR) et/ou au Firsocostat (un inhibiteur de l'acétyl-coA carboxylase), et a montré une plus grande efficacité des combinaisons de traitements en comparaison du Sémaglutide seul sur la stéatose et la souffrance hépatique. Ainsi, une étude de phase 2b impliquant les mêmes stratégies thérapeutiques est en cours de planification pour des patients NASH atteints de cirrhose compensée. Enfin, la co-administration du Sémaglutide et du NNC0194 0499, un nouvel agoniste du facteur de croissance FGF21 (*fibroblast growth factor 21*) ayant un effet sur l'obésité, et la co-administration du Sémaglutide et du Cagrilintide (ou NNC0174 0833), un analogue de l'amyline à action prolongée visant à faire perdre du poids, sont en étude de phase 2 (NCT05016882) dans le traitement des patients NASH.

Egalement, il a été montré chez les patients obèses atteints de NAFLD qu'un traitement par l'Exénatide permettait de diminuer l'insulino-résistance dans le foie et dans le tissu adipeux. Plusieurs études effectuées après plusieurs mois de traitement par l'Exénatide montrent une efficacité contre la perte de poids et la graisse hépatique (Polyzos *et al.*, 2019). La combinaison de L'Exénatide et de la Pioglitazone montre également une diminution du taux d'ALAT et du contenu en graisse hépatique, qui est supérieure à celle de la Pioglitazone seule, chez des patients obèses traités par Metformine (Sathyanarayana *et al.*, 2011). Egalement, un traitement pendant 4 mois par l'Exénatide associé à l'insuline glargine montre une résolution de la stéatose hépatique plus efficace que pour le traitement par l'insuline seule (glargine ou aspart) chez des patients obèses diabétiques atteints de NAFLD (phase 4 : NCT02303730) (Shao *et al.*, 2014).

D'autres nouvelles molécules sont actuellement en cours d'essais cliniques et correspondent à des agonistes doubles (Fraile *et al.*, 2021). Une première famille comprend des agonistes du récepteur GLP1 et du récepteur au glucagon (GLP1-R/GCGR) : l'ALT-801 de chez Altimmune en phase 1, et le BI 456906 de chez Boehringer Ingelheim/Zealand Pharma et le Cotadutide de chez AstraZeneca en phase 2. Egalement, un agoniste double ciblant le récepteur GLP1 et mimant l'action de l'incrétine GIP (*glucose-dependent insulin releasing polypeptide*) est en essai clinique de phase 2 : le Tirzepatide de chez Lilly. Une molécule visant ces 3 cibles (GLP1-R/GCGR/GIP) est également en phase 2 : le HM15211 de chez Hanmi. Une autre combinaison actuellement en étude de phase 1 chez Pfizer consiste en

l'association d'un analogue GLP1 (le Danuglipron) et d'un inhibiteur de la DGAT2, une enzyme impliquée dans la synthèse des triglycérides (PF-06865571).

e) Les inhibiteurs du co-transporteur SGLT1/2

Les inhibiteurs du SGLT1/2 (*sodium-dependent glucose cotransporter-1/2*), aussi appelés Gliflozines, sont des hypoglycémisants utilisés dans le traitement du diabète de type 2 (Upadhyay *et al.*, 2018). L'inhibition de ce co-transporteur empêche la réabsorption rénale du glucose et du sodium dans le tube contourné proximal rénal. L'excrétion urinaire du glucose est ainsi favorisée, ce qui améliore le contrôle de la glycémie et facilite la perte de poids. Ces molécules ne doivent pas être utilisées en cas d'insuffisance rénale, et peuvent favoriser le développement d'infections urogénitales et entraîner une réduction du volume intravasculaire (vertiges, hypotension) ainsi que des troubles de la diurèse osmotique (polyurie, bouche sèche).

L'effet du Dapagliflozin a été étudié chez les patients diabétiques atteints de NAFLD. Après 6 mois de traitement, les patients présentaient une diminution de la graisse viscérale, de la stéatose et présentaient une meilleure élasticité du foie (Shimizu *et al.*, 2018). Une autre étude effectuée sur des patients diabétiques et NASH montre également un effet bénéfique du traitement par le Dapagliflozin sur la perte de poids et la graisse viscérale (Tobita *et al.*, 2017). Cette molécule est actuellement en cours d'essai clinique de phase 3 : l'étude DEAN (NCT03723252) recrute des patients atteints de NASH afin de tester l'efficacité et la sécurité du Dapagliflozin sur les paramètres histologiques de la maladie.

Egalement, une étude rétrospective s'intéressant à un traitement de 6 mois par le Canagliflozin ou l'Ipragliflozin chez des patients diabétiques atteints de NAFLD montre un effet sur la perte de poids et la diminution des taux d'ASAT et ALAT (Seko *et al.*, 2017). Le Canagliflozin a également montré son efficacité chez les patients diabétiques atteints de NAFLD concernant la perte de poids et la diminution du taux de triglycérides hépatiques (Cusi *et al.*, 2018). Le traitement de patients diabétiques atteints de NAFLD par l'Ipragliflozin permet aussi une diminution de la stéatose hépatique et de la graisse viscérale et sous-cutanée (phase 4 : NCT02875821) (Ito *et al.*, 2017). Egalement, l'ajout pendant 11 mois de l'Ipragliflozin à un traitement par un analogue du GLP1 ou un inhibiteur de la DPP4 chez les patients diabétiques NAFLD a permis de favoriser la perte de poids, la réduction du taux d'ALAT et d'améliorer le

score FIB-4 (Ohki *et al.*, 2016). De la même manière, un traitement pendant 5 mois par l'Empagliflozin favorise la perte de poids et de graisses hépatiques ainsi que la diminution du taux d'ALAT chez les patients diabétiques NAFLD (Kuchay *et al.*, 2018). Sa co-administration avec la Pioglitazone chez les patients diabétiques et NAFLD fait l'objet d'une étude de phase 4 (NCT03646292). Egalement, un traitement pendant 6 mois par le Luseogliflozin a permis une perte de poids et une diminution de la graisse hépatique, de manière plus efficace que la Metformine, chez les patients diabétiques NAFLD (Shibuya *et al.*, 2018). Le Licoglifocin est également en cours d'essai clinique de phase 2 (NCT04065841).

f) Les Statines

Les Statines sont des inhibiteurs compétitifs de l'enzyme HMG-CoA-réductase, impliquée dans la biosynthèse du cholestérol. Elles augmentent en parallèle le nombre de récepteur LDL du foie, favorisant ainsi la captation du cholestérol LDL et son catabolisme. Ainsi, les Statines sont des molécules hypolipémiantes, utilisées dans le traitement des dyslipidémies. Elles sont également administrées pour la prévention des événements cardiovasculaires, notamment car elles freinent l'accumulation de plaques dans les vaisseaux sanguins. Les effets indésirables les plus fréquents sont des troubles digestifs, des céphalées, des vertiges et des crampes. En cas de traitement à forte dose, une augmentation des transaminases du foie peut apparaître, ainsi que des lésions musculaires (rhabdomyolyse).

Les événements cardiovasculaires étant la première cause de mortalité chez les patients NASH (Athyros *et al.*, 2017), la prescription de Statines dans ce contexte est souvent observée. L'efficacité des Statines sur le risque de mortalité cardiovasculaire des patients NASH a été montrée dans les études GREACE et IDEAL (Athyros *et al.*, 2010 ; Tikkanen *et al.*, 2013). Mais également, des études ont montré un effet des Statines sur la NAFLD en elle-même, avec une réduction de la stéatose hépatique et une amélioration de l'inflammation, sans effet sur la fibrose (Tziomalos *et al.*, 2015). Même si plusieurs études montrent un effet bénéfique des Statines sur les paramètres histologiques du foie, d'autres concluent à une absence d'effet. Des études plus longues et des cohortes plus nombreuses seront donc nécessaires pour déterminer l'effet des Statines sur la NASH.

g) Les antagonistes du récepteur aux minéralocorticoïdes

La Spironolactone est un diurétique épargneur de potassium, antagoniste compétitif de l'aldostérone. Son action permet de bloquer la réabsorption des ions sodium et l'excrétion des ions potassium dans le tube rénal. Elle est utilisée dans le traitement de l'hypertension artérielle, des œdèmes, et en association avec un diurétique de l'anse, un inhibiteur de l'enzyme de conversion et un digitalique dans le traitement de l'insuffisance cardiaque. Ce médicament est déconseillé en cas d'insuffisance rénale, d'hyperkaliémie, d'insuffisance hépatique ou de prise de médicaments hyperkaliémisants. Il peut être responsable de troubles digestifs, de crampes, de problèmes dermatologiques (éruption cutanée, pemphigoïde), et favoriser l'inflammation du foie.

Malgré ses effets indésirables potentiels sur le foie, dans un contexte de NAFLD, un traitement de 2 mois par la Spironolactone en combinaison avec la Vitamine E a montré une diminution plus importante de l'insulino-résistance en comparaison à la Vitamine E seule (phase 2 : NCT01147523) (Polyzos *et al.*, 2011), et après un an de traitement, cette combinaison a permis de diminuer davantage la stéatose hépatique. Du fait de son action d'inhibiteur d'androgène, et de l'implication potentielle de la testostérone dans le développement du foie gras chez la femme (Sarkar *et al.*, 2021), une étude clinique est actuellement en cours afin de tester l'efficacité de la Spironolactone chez les femmes atteintes de NASH (NCT03576755).

Egalement, l'Apararenone, un antagoniste sélectif du récepteur aux minéralocorticoïdes, a fait l'objet d'une étude de phase 2 chez les patients NASH, et a permis de montrer son efficacité, par des effets anti-inflammatoires et anti-fibrotiques (Okanoue *et al.*, 2021).

Une autre molécule ciblant le récepteur aux minéralocorticoïdes, le Miricorilant (Corcept Therapeutics), est en essai clinique de phase 1b (NCT05117489) dans le traitement des patients atteints de NASH.

Enfin, le LPCN 1144 (Lipocine), un pro-médicament de la testostérone endogène, est en étude de phase 2 (NCT04134091) chez les patients NASH pré-cirrhotiques.

2) Les agonistes de FXR

L'acide obéticholique (OCA) est un dérivé d'acide biliaire, agoniste de FXR, utilisé en deuxième intention dans le traitement de la cholangite biliaire primitive en association avec l'acide ursodésoxycholique (un acide biliaire naturel hydrophile). L'OCA diminue le glucose hépatique et le métabolisme des lipides, *via* la diminution de SREBP1c, un facteur de transcription impliqué dans la synthèse *de novo* des acides gras. Il permet également la réduction de la production de la bile, en augmentant FGF19, qui inhibe la CYP7A1, l'enzyme de la conversion du cholestérol en acide biliaire. L'OCA peut cependant être responsable de prurit, fatigue, étourdissements et douleurs abdominales. Concernant son utilisation dans le traitement de la NASH, des études ont montré son efficacité. En effet, l'étude FLINT de phase 2b portant sur des patients atteints de NASH non cirrhotiques a montré qu'un traitement durant 72 semaines par l'OCA améliorerait la stéatose hépatique, l'inflammation lobulaire, le ballonnement des hépatocytes et la fibrose (Neuschwander-Tetri *et al.*, 2015). Son efficacité sur la fibrose a également été montrée dans les premiers résultats de l'étude REGENERATE de phase 3 (NCT02548351), réalisée chez des patients NASH fibrosés non cirrhotiques (Younossi *et al.*, 2019b). Cependant, l'OCA a également favorisé l'apparition de prurits et de désordres lipidiques chez les patients, avec une augmentation du cholestérol LDL, VLDL, et une diminution du cholestérol HDL. Ainsi, une autre étude appelée CONTROL s'est intéressée à la co-administration de l'OCA et d'une Statine, et a pu montrer chez les patients NASH sous OCA que l'Atorvastatine permettait de contrer l'augmentation du cholestérol LDL (Pockros *et al.*, 2019). Enfin, l'étude de phase 3 REVERSE (NCT03439254) vise à évaluer l'efficacité et la sécurité de l'OCA chez les patients atteints de cirrhose compensée suite à une NASH.

D'autres agonistes de FXR sont en cours d'essais cliniques dans le traitement de la NASH, notamment dans l'objectif de diminuer les effets secondaires du traitement. Le Cilofexor, associé au Firsocostat (un inhibiteur de l'acétyl-coA carboxylase), permet d'améliorer la fonction hépatique et les paramètres de la fibrose en comparaison d'un traitement placebo (Loomba *et al.*, 2021). Parmi les autres molécules testées, sont en phase 1 : AGN-242266 (Abbvie), ASC42 (Ascleris), EDP-297 (Enanta), HPG1860 (Hepagene) et MET409 (Metacrine); en phase 2 : EYP001 (ENYO), MET642 (Metacrine), TERN-101 (Terns); et en phase 2b : Tropifexor (Novartis), EDP-305 (Enanta) (Fraile *et al.*, 2021). Egalement, des co-administrations d'un agoniste FXR et

d'un inhibiteur du SGLT1/2 sont en étude de phase 2 : le Tropicifexor associé au Licogliflocin (Novartis) et le MET409 associé à l'Empagliflozin (Metacrine).

3) Les nouveaux agonistes PPAR

Les nouveaux agonistes PPAR et leurs cibles dans le traitement de la NASH sont représentés dans le **Schéma 9**.

PPAR α est exprimé de manière ubiquitaire dans l'organisme (cœur, muscle, tissu adipeux, ...), et notamment dans le foie, où il exerce son rôle de régulateur du transport des acides gras et d'acteur majeur de la β -oxydation. De nombreuses études précliniques ont montré l'efficacité des agonistes de PPAR α sur la NASH : l'activation du récepteur empêche notamment le développement de la stéatose, l'inflammation et la progression vers la fibrose (Pawlak *et al.*, 2015). Ainsi, le Pémafibrate (ou K-877) a été testé dans l'étude SPPARM α de phase 2 (NCT03350165) chez les patients NAFLD. Cette molécule appartient à la classe des fibrates, qui sont des agonistes de PPAR α initialement utilisés dans le traitement des dyslipidémies. Les résultats ont montré un effet du Pémafibrate sur la diminution des taux d'aminotransférases et de cholestérol LDL, ainsi que sur l'amélioration de l'élasticité du foie (Nakajima *et al.*, 2021).

PPAR δ (aussi appelé PPAR β) est exprimé dans tout l'organisme, notamment dans le foie, mais principalement dans le tissu adipeux et le cerveau. Il est impliqué dans la régulation de l'homéostasie énergétique en augmentant la sensibilité à l'insuline, l'oxydation des acides gras, le taux de cholestérol HDL, et en diminuant l'adiposité, les taux de triglycérides et l'inflammation.

PPAR γ est exprimé dans tous les tissus, dont le foie, où il diminue la recapture des acides gras, augmente la synthèse du glycogène et diminue l'inflammation. Mais il est principalement exprimé dans le tissu adipeux, afin de contrôler la différenciation des adipocytes, d'augmenter la sensibilité à l'insuline et de favoriser la recapture des acides gras. Il est ciblé par ses agonistes les TZDs, qui sont étudiés dans le traitement de la NASH, comme décrit précédemment.

Le T3D-959 est un agoniste double de PPAR δ/γ , au départ testé dans le traitement du diabète, et en cours d'étude pour le traitement de la maladie d'Alzheimer. En effet,

cette molécule agit au niveau du cerveau, dans la régulation du métabolisme du glucose et des lipides, ce qui améliorerait les capacités cognitives des patients. Une étude de phase 1 est également en cours en vue d'utiliser le T3D-959 dans le traitement de la NASH, qui *via* une augmentation de l'adiponectine, pourrait diminuer la résistance à l'insuline et atténuer la stéatose et la fibrose.

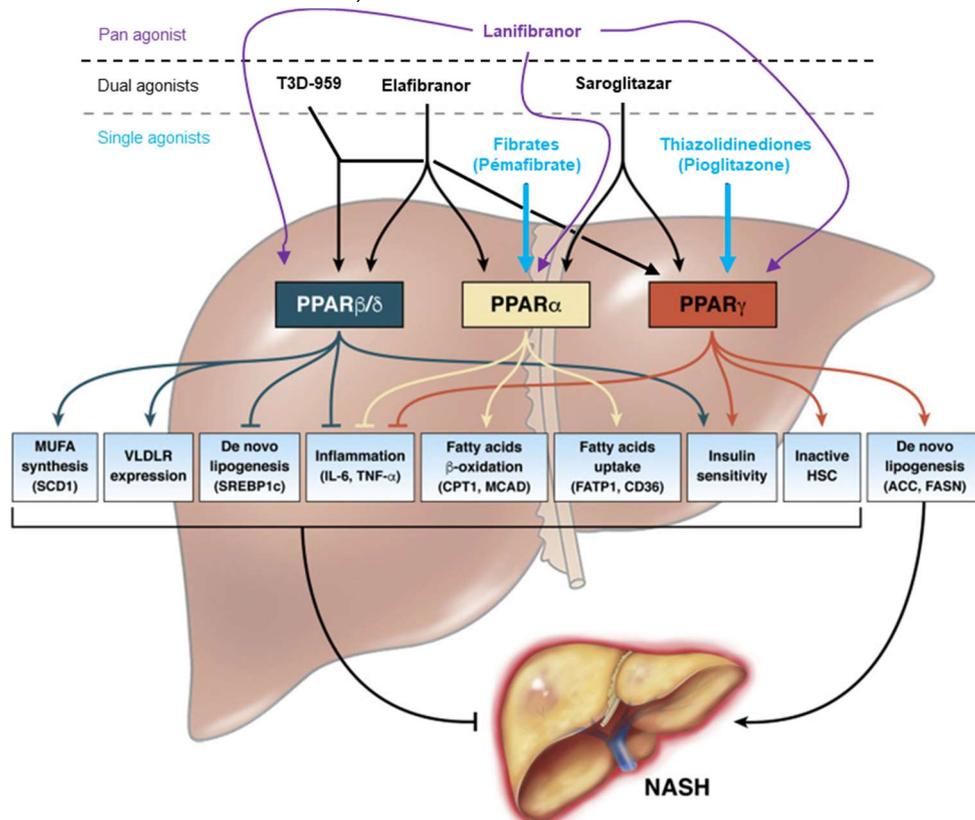
L'Elafibranor (ou GFT505) est un agoniste double des récepteurs PPAR α/δ développé par Genfit. Une étude pilote de phase 2 (NCT01271777) menée sur des patients obèses a permis de montrer un effet bénéfique de l'Elafibranor sur les taux de triglycérides, de cholestérol LDL et d'adiponectine, et sur l'insulino-résistance, de manière *a priori* hépato-spécifique (Cariou *et al.*, 2013). L'étude GOLDEN-505 de phase 2 a donc été menée sur des patients NASH, et a montré une amélioration de la stéatose, de l'inflammation et de la fibrose chez les patients les plus atteints, sans effets secondaires importants (Ratziu *et al.*, 2016). Ainsi, l'étude RESOLVE-IT de phase 3 (NCT02704403) menée sur des patients NASH a été lancée. Cependant, les patients traités par l'Elafibranor n'ont pas montré de résolution significative de la NASH par rapport aux patients sous placebo. L'Elafibranor est cependant toujours en cours d'étude dans le traitement de la cholangite biliaire primitive.

Le Saroglitazar est également un agoniste double, mais des récepteurs PPAR α/γ . Il est approuvé en Inde dans le traitement du diabète de type 2 et de la dyslipidémie, car il permet une diminution des taux de triglycérides et de glucose dans le sang. L'étude indienne EVIDENCES I de phase 2 a pu montrer que le Saroglitazar diminuait les taux d'enzymes hépatiques et de lipides chez les patients NAFLD. Ensuite, l'étude EVIDENCES II de phase 3 s'est intéressée à l'effet du Saroglitazar sur les patients NASH, et a montré une amélioration des paramètres histologiques, menant à la mise sur le marché du médicament pour le traitement de la NASH en Inde. En parallèle, l'étude EVIDENCES IV de phase 2 (NCT03061721) aux Etats-Unis a montré l'efficacité du Saroglitazar chez les patients NAFLD et NASH (Gawrieh *et al.*, 2021). D'autres études de phase 2 s'intéressant également au Saroglitazar sont en cours : une étude menée chez les patients NASH et fibrosés (NCT05011305), et l'étude EVIDENCES VI (NCT03863574) menée chez les patients NASH. Enfin, une étude de phase 3 (NCT04193982) est en cours, afin d'étudier l'effet de la combinaison du Saroglitazar et de la Vitamine E chez les patients NAFLD et NASH, en comparaison de l'application de règles hygiéno-diététiques seules.

Le Lanifibranor (ou IVA337) est un pan-agoniste PPAR, qui cible donc les 3 isoformes du récepteur. Il possède des propriétés anti-fibrotiques, anti-inflammatoires et permet de diminuer le taux de triglycérides, d'augmenter le taux de cholestérol HDL et d'améliorer la sensibilité à l'insuline. L'étude NATIVE de phase 2b (NCT03008070) menée chez les patients NASH a montré une diminution du score SAF de gravité de la NASH d'au moins 2 points, sans aggravation de la fibrose (Francque *et al.*, 2021). Face à ces résultats très prometteurs, l'étude NATIVE3 de phase 3 (NCT04849728) menée chez les patients NASH et fibrosés a été lancée.

Schéma 9 : Les agonistes PPAR dans la NASH. L'effet bénéfique de l'activation des PPAR dans le foie est le résultat d'une interaction complexe entre différentes voies cellulaires et moléculaires, qui régulent globalement à la baisse l'accumulation de lipides et contrastent l'inflammation, contribuant ainsi à l'amélioration de la santé du foie. PPAR : *peroxisome proliferator activated receptor* ; MUFA : *monounsaturated fatty acid* ; VLDLR : récepteur au *very low density lipoprotein* ; SREBP1c : *sterol regulatory element-binding protein 1c* ; ACC : acétyl-CoA carboxylase ; CD36 : *fatty acid translocase CD36* ; CPT1 : carnitine palmitoyltransférase 1 ; FASN : *fatty acid synthase* ; FATP1 : *fatty acid transport protein 1* ; IL6 : interleukine 6 ; MCAD : *medium-chain acyl-coA dehydrogenase* ; HSC : cellules stellaires hépatiques ; NASH : *non alcoholic steatohepatitis*.

Schéma adapté de : Cariello M, Piccinin E, Moschetta A. Transcriptional Regulation of Metabolic Pathways via Lipid-Sensing Nuclear Receptors PPARs, FXR, and LXR in NASH. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2021;11(5):1519-1539. doi: 10.1016/j.jcmgh.2021.01.012. Epub 2021 Feb 2. PMID: 33545430; PMCID: PMC8042405.



4) Les analogues FGF

Le FGF21 est produit dans le foie, suite à l'activation du récepteur PPAR α lors d'un jeûne ou de la présence d'acides gras libres. Sa sécrétion permet d'inhiber la lipolyse, d'augmenter l'adipogenèse, de favoriser la recapture du glucose et des lipides, et d'accentuer la dépense énergétique (Henriksson & Andersen, 2020). Il permet de favoriser la recapture du glucose notamment par le muscle squelettique et le tissu adipeux brun, ce qui accentue la sensibilité à l'insuline et améliore le métabolisme du glucose (Kharitonov *et al.*, 2005). Aussi, le FGF21 permet de diminuer la lipogenèse hépatique, de favoriser l'oxydation des acides gras, et de réduire la fibrose hépatique.

Ainsi, le Pegbelfermin (ou BMS-986036), analogue recombinant humain PEGylé de FGF21, a été étudié dans le traitement des patients NASH lors d'un essai clinique de phase 2a (NCT02413372). Les résultats ont montré suite au traitement une diminution du contenu en graisses hépatiques, une amélioration des paramètres métaboliques (adiponectine, lipides) et des marqueurs de fibrose, ainsi qu'une meilleure élasticité du foie (Sanyal *et al.*, 2019). Deux études de phase 2b nommées FALCON 1 (NCT03486899) et FALCON 2 (NCT03486912), sont en cours afin de tester l'efficacité de la molécule chez les patients NASH, respectivement atteints de fibrose avancée ou atteints de cirrhose (Abdelmalek *et al.*, 2021).

L'Efruxifermin (ou AKR-001), autre analogue de FGF21, a été testé chez les patients NASH dans l'étude BALANCED de phase 2a (NCT03976401). Les résultats ont montré une diminution du contenu en graisses hépatiques et une amélioration de la fibrose (Harrison *et al.*, 2021). L'étude HARMONY (NCT04767529) de phase 2b, qui sera suivie par une étude de phase 3, est en cours afin de tester l'efficacité de la molécule chez les patients NASH. De même, l'étude SYMMETRY (NCT05039450) de phase 2b s'intéressera aux effets du traitement par l'Efruxifermin des patients NASH atteints de cirrhose compensée.

Egalement, le BIO89-100, analogue du FGF21, est en cours d'essais cliniques par l'étude ENLIVEN (NCT04929483) de phase 2 chez les patients NASH, par une étude de phase 1/2 (NCT04048135) chez les patients NASH ou NAFLD à haut risque de développer une NASH, et par une étude de phase 1 (NCT05022693) chez les patients NASH atteints de cirrhose compensée.

Le FGF19 est sécrété en réponse à l'activation du récepteur FXR. Il diminue l'expression de la CYP7A1, afin de réguler la synthèse des acides biliaires. Il favorise également la glycogénogenèse hépatique et inhibe la néoglucogenèse (Henriksson & Andersen, 2020). Cependant, une surexpression de FGF19 a été montrée chez les patients atteints de HCC, et des effets pro-oncogènes de la protéine ont été mis en évidence, et sont donc à prendre en compte comme effets secondaires des traitements éventuels. L'Aldafermin, analogue de la protéine FGF19, a ainsi fait l'objet d'une étude de phase 2 (NCT02443116) chez les patients NASH, et a montré une diminution du contenu en graisses hépatiques, une amélioration de la fibrose sans aggravation de la NASH et une résolution de la NASH sans aggravation de la fibrose (Harrison *et al.*, 2021). Egalement, les effets du traitement sur les patients NASH atteints d'une fibrose sévère ou compensée seront étudiés dans l'essai clinique ALPINE 4 de phase 2b (NCT04210245).

5) Le Cenicriviroc

Le Cenicriviroc est un agent anti-viral, inhibiteur du CCR2 et du CCR5, développé au départ dans le traitement des patients VIH-1 (virus immunodéficient humain 1). En effet, son action permet d'empêcher le virus du VIH d'utiliser le CCR5 pour entrer dans les cellules, et de diminuer les propriétés pro-inflammatoires du CCR2. Mais en parallèle, dans des modèles d'induction de la stéatose et de la fibrose *in vivo*, cette molécule a montré également un effet sur l'amélioration des paramètres histologiques du foie (Lefebvre *et al.*, 2016). Ces observations ont permis de développer l'étude clinique CENTAUR (NCT02217475) de phase 2b, qui a permis d'évaluer l'efficacité et la sécurité du traitement chez des patients atteints de NASH, et qui a montré un effet sur l'amélioration de la fibrose sans aggravation de la NASH (Ratziu *et al.*, 2020). Ainsi, une étude de phase 3 nommée AURORA (NCT03028740) a été lancée pour le traitement des patients NASH atteints de fibrose, mais sans effet significatifs sur l'amélioration de la fibrose. Cependant, l'étude TANDEM (NCT03517540) de phase 2b est en cours afin de tester l'efficacité du Cenicriviroc combiné au Tropifexor, un agoniste de FXR, chez les patients NASH atteints de fibrose (Pedrosa *et al.*, 2020).

6) Les agonistes du THR β

Le récepteur β -sélectif aux hormones thyroïdiennes (THR β) est principalement exprimé dans le foie, et joue un rôle essentiel dans le métabolisme lipidique et la diminution de la lipotoxicité. Le Resmetirom, un agoniste sélectif du récepteur, a été développé au départ afin de cibler la dyslipidémie. Dans une étude de phase 2 (NCT02912260) menée sur des patients NASH, un traitement par le Resmetirom pendant 3 mois a permis une diminution du contenu en graisses hépatiques, de l'inflammation et du score de NAS (Harrison *et al.*, 2019). Suite à ces résultats l'étude MAESTRO-NASH (NCT03900429) de phase 3 est actuellement menée sur des patients NASH et fibrosés. Les données les plus récentes de cette étude obtenues après 3 mois de traitement montrent une diminution du contenu en graisses et prédisent une résolution de la NASH et une réduction de la fibrose.

D'autres agonistes du THR β sont également en étude : de phase 2b pour le VK2809 (Viking), et de phase 1 pour l'ASC41 (Ascleris) et le TERN-501 (Terns).

7) L'Aramchol

L'Aramchol est un inhibiteur partiel de la SCD1. L'étude ARREST de phase 2b (NCT02279524) s'est intéressée au traitement des patients en surpoids et diabétiques atteints de NASH par l'Aramchol, et a montré une diminution du contenu en graisses hépatiques, une résolution de la NASH sans aggravation de la fibrose et une amélioration de la fibrose sans aggravation de la NASH (Ratziu *et al.*, 2021). L'étude ARMOR de phase 3 (NCT04104321) ciblant les patients NASH atteints de fibrose est actuellement en cours.

8) Les inhibiteurs de la Galectin-3

Le Belapectin (GR-MD-02) est un complexe carbohydrate ciblant la Galectine-3. L'étude NASH-CX (NCT02462967) de phase 2b s'est intéressée au traitement des patients NASH atteints de cirrhose compensée par le Belapectin, et a mis en évidence une diminution de l'hypertension portale hépatique, sans apparition de varices œsophagiennes (Chalasani *et al.*, 2020). Un autre inhibiteur de la Galectin-3, le GB1211, est en étude de phase 1 chez les patients NASH et atteints de fibrose hépatique (NCT03809052).

9) Les inhibiteurs DGAT2

L'IONIS-DGAT2_{Rx} est un oligonucléotide anti-sens inhibiteur de la DGAT2 étudié dans le contexte du traitement des NAFLD/NASH. Une étude de phase 2 (NCT03334214) consistant en un traitement durant 13 semaines administré à des patients NAFLD montre une diminution du contenu en graisses hépatiques, sans hyperlipidémie ou élévation des aminotransférases (Loomba *et al.*, 2020). D'autres molécules de même classe sont également en étude de phase 1, l'ION224 (Ionis Pharmaceuticals) chez les patients NASH (NCT04932512), et de phase 2, le PF-06865571 (Pfizer), pour le traitement des patients NASH fibrosés (NCT04321031).

Le PF-06865571 est également testé en phase 1 en co-administration avec le Danuglipron, un analogue du GLP1, comme décrit précédemment. Egalement, une étude de phase 2 (NCT04399538) étudie l'effet de la co-administration chez les patients NASH de cette même molécule avec le PF-05221304, un inhibiteur de l'enzyme ACC qui permet la lipogenèse de novo par la conversion de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA, dont le but serait d'atténuer la stéatose hépatique.

10) Les anticorps

Les anticorps monoclonaux sont très utilisés dans les pathologies inflammatoires, tels que la polyarthrite rhumatoïde ou le psoriasis, et les cancers, tel que le cancer du sein HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*) positif. Ces anticorps reconnaissent spécifiquement une protéine cible, et l'empêche de tenir son rôle, afin par exemple de perturber le système inflammatoire ou la prolifération tumorale. Du fait du statut inflammatoire et de la prédisposition au développement du HCC, la NASH pourrait être traitées par des anticorps (Fraile *et al.*, 2021). Egalement, une application des anticorps monoclonaux aux maladies métaboliques en général est une piste thérapeutique potentielle.

Le BFKB8488A est un anticorps agoniste dirigé contre le complexe FGFR1/KLB (co-récepteur FGF beta-klotho). Le KLB est un co-récepteur transmembranaire nécessaire à la fixation des FGF19 et FGF21 au récepteur FGFR1. Ainsi, l'anticorps active de manière sélective le récepteur FGFR1 afin de mimer l'action du FGF21. Une étude de phase 1b (NCT03060538) a montré son efficacité chez les patients diabétiques et NAFLD, en améliorant les marqueurs cardio-métaboliques et les paramètres hépatiques, avec une diminution du contenu en graisses hépatiques dose-

dépendante et temps-dépendante (Baruch *et al.*, 2020). Suite à ces résultats, l'essai clinique BANFF de phase 2b a été lancé (NCT04171765), afin d'étudier les effets de la molécule chez les patients NASH fibrosés. Egalement, le MGM313 (ou MK-3655) est un anticorps monoclonal qui active de manière sélective le complexe FGFR1c/KLB, en se liant à un épitope unique du KLB qui améliore la sensibilité à l'insuline. L'étude de phase 1 portant sur des patients obèses atteints de NAFLD et insulino-résistants a montré une diminution du contenu en graisses hépatiques et une amélioration des paramètres métaboliques suite au traitement par cet anticorps. Une étude de phase 2b (NCT04583423) est en cours, afin de tester l'effet de l'anticorps durant 52 semaines sur la résolution de la NASH sans aggravation de la fibrose.

Le CM-101 est un anticorps monoclonal dirigé contre le CCL24. L'effet de cet anticorps sur des patients NAFLD et NASH a montré dans une étude de phase 1b qu'un traitement de 12 semaines diminuait les taux sériques des biomarqueurs de la fibrose et de l'inflammation (Segal-Salto *et al.*, 2020). L'étude SPLASH de phase 2a aura pour but de montrer l'effet du CM-101 sur la fibrose des patients NASH.

Le Nimacimab (ou RYI-018, ou JNJ-2463) est un anticorps antagoniste, possédant un effet anti-fibrotique et anti-inflammatoire en ciblant le CB1. Une étude de phase 1b (NCT03261739) a montré sa bonne tolérance et sa sécurité chez les patients NAFLD, et une étude de phase 2b pour tester son efficacité chez les patients NAFLD/NASH est en projet.

11) Cibler le microbiote intestinal

Les probiotiques sont composés de bactéries et/ou de levures étrangères à l'organisme, administrées chez le patient afin de modifier la composition de son microbiote. Il a été montré que cette modification pouvait diminuer l'inflammation et améliorer les taux d'aminotransférases. Egalement, elle améliore les paramètres métaboliques, tels que le contenu en graisses viscérales, le cholestérol et l'insulino-résistance. Par exemple, la consommation de *Bifidobacterium pseudocatenulatum* améliore la tolérance au glucose, l'inflammation et la stéatose hépatique (Cano *et al.*, 2013).

Les prébiotiques sont composés de fibres alimentaires, d'oligosaccharides et de polysaccharides complexes, qui nourrissent le microbiote intestinal. Ils permettent donc d'augmenter le pool de bactéries bénéfiques (telles que Bifidobacteria et

Lactobacilli), et de diminuer le pool de bactéries délétères (Blaut, 2002). Il a été montré que l'utilisation des prébiotiques permettait de diminuer la lipogenèse hépatique et les taux de triglycérides circulants, et d'augmenter la concentration en acides gras libres à chaîne courte.

Concernant le traitement des patients NAFLD/NASH, une étude clinique a montré que l'utilisation du probiotique Symbiter, composé de bactéries *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, et *Propionibacterium*, pouvait diminuer la stéatose, l'activité aminotransférase et les taux de cytokines inflammatoires chez les patients NAFLD diabétiques (Kobyliak *et al.*, 2018a). Egalement, la co-administration du Symbiter et d'acides gras oméga 3 a montré un effet bénéfique sur la stéatose, le taux de lipides sériques, le profil métabolique et l'inflammation chronique (Kobyliak *et al.*, 2018b). L'administration d'un acide gras oméga 3 seul, l'Icosabutate, pour le traitement de la NASH est également en cours d'étude dans l'essai clinique ICONA de phase 2 (NCT04052516).

Chez les patients NASH, l'effet d'un symbiotique, comprenant à la fois un prébiotique et un probiotique (*Bifidobacterium longum* et fructo-oligosaccharides), associé à un régime et une activité physique, a été comparé à l'application de ces règles hygiéno-diététiques seules, et a permis une diminution des taux d'aminotransférases, de cholestérol LDL, d'endotoxines, et une réduction de l'insulino-résistance, de l'inflammation et de la stéatose hépatique (Malaguarnera *et al.*, 2012).

Afin de moduler le microbiote, il est également possible d'utiliser des antibiotiques. La Rifaximine est un antibiotique dirigé contre les bactéries anaérobies et aérobies gram-négatives et gram-positives de l'intestin. Ce médicament est utilisé dans le traitement du syndrome du côlon irritable, de l'encéphalopathie hépatique et de la diarrhée du voyageur. Chez les patients NASH, l'utilisation de la Rifaximine a montré une diminution des taux d'aminotransférases, d'endotoxines et de cytokines, une amélioration de l'insulino-résistance et une tendance à la perte de poids (Abdel-Razik *et al.*, 2018). La Solithromycine est un antibiotique macrolide de quatrième génération dirigé contre les gram-positives, les gram-négatives, et les souches résistantes aux macrolides classiques, *a priori* sans provoquer de toxicité hépatique. Il est utilisé pour le traitement des pneumonies, et en étude pour la gonorrhée. Une étude de phase 2 (NCT02510599) menée chez des patients NASH non cirrhotiques a montré que la Solithromycine permettait de réduire le score NAS de gravité de la NASH et les taux d'aminotransférases.

De nombreuses autres molécules sont actuellement en étude de phases 1 et 2 chez les patients NASH, dont les buts sont de cibler l'inflammation, la fibrose et/ou le métabolisme. Ces dernières ainsi que l'ensemble des molécules décrites précédemment sont résumées dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 : Molécules en études cliniques contre la NASH (1/2). ↓ : diminution ; ↑ : augmentation.
NR : phase de l'étude non renseignée. En rouge : étude de phase 3 significative ou en cours.

Nom	Cible	Classe thérapeutique/autre utilisation	Phase d'essai clinique	Effet(s) dans le traitement de la NASH
Orlistat	Inhibition des lipases gastro-intestinales et pancréatiques	Anti-obésité	- NR - NR - phase 4	- ↓ : stéatose, ALAT - ↓ : poids, stéatose, inflammation, ALAT, fibrose - ↓ : stéatose, inflammation, score NAS
Pioglitazone	Agonistes PPAR _γ	Thiazolidinediones / diabète de type 2	- phase 4 - phase 4 - NR	- ↑ : sensibilité à l'insuline ; ↓ : stéatose, inflammation, ASAT/ALAT, ballonnement, score NAS, fibrose (tendance) - ↓ : score NAS, poids ; ↑ résolution NASH - ↓ : souffrance hépatocytaire, fibrose
MSDC-0602K	Inhibiteur MPC		- EMMINENCE, phase 2 - MMONARCH-1, phase 3	- ↓ : marqueurs lésions hépatiques ; ↑ : métabolisme glucose - en cours
PXL065			- phase 2 (NCT04321343)	- en cours
Vitamine E	ROS	Anti-oxydant	- + Pioglitazone = phase 2 - PIVENS, phase 3 - TONIC, phase 3 - phase 4	- ↓ : paramètres histologiques - ↓ : paramètres histologiques, stéatose, inflammation, ballonnement - ↓ : score NAS, ballonnement - ↓ : stéatose, inflammation, score NAS
Liraglutide			- LEAN, phase 2	- ↑ : résolution NASH ; ↓ progression fibrose
Sémaglutide	Analogues GLP1, agonistes récepteur GLP1 (GLP1R)	Incrétinomimétiques (Glutides) / diabète de type 2	- phase 2 - phase 3 - + Cilofexor (agoniste FXR) + Firsocostat (inhibiteur acétyl-coA carboxylase) = phase 2 - + NNC0194 0499 (agoniste FGF21) - + Cagrilintide (analogue amyline) = phase 2	- ↑ : résolution NASH - en cours - ↓ : stéatose, souffrance hépatique - en cours
Exénatide			- NR - + Pioglitazone = NR - + Insuline Glargine = phase 4	- ↓ : insulino-résistance, poids, graisse hépatique - ↓ : ALAT, graisse hépatique - ↓ : stéatose
Danuglipron			- + PF-06865571 (inhibiteur DGAT2) = phase 1	- en cours
ALT-801	Agonistes doubles : (GLP1R)/récepteur au glucagon (GCGR)		- phase 1	- en cours
BI 456906			- phase 2	- en cours
Cotadutide			- phase 2	- en cours
Tirzépatide	Agoniste double : GLP1R/mimétique de l'incrétine GIP		- phase 2	- en cours
HM15211	Agoniste triple : GLP1R/GCGR/GIP		- phase 2	- en cours
Dapagliflozin			- phase 2 - phase 3	- ↓ : graisse viscérale, stéatose ; ↑ : élasticité du foie - en cours
Canagliflozin			- phase 2	- ↓ : poids, ASAT/ALAT, triglycérides
Ipragliflozin	Inhibiteur SGLT1/2	Diabète de type 2 (Gliflozines)	- phase 4 - + Analogue GLP1 ou Inhibiteur DPP4 = NR	- ↓ : poids, ASAT/ALAT, stéatose, graisse viscérale et sous-cutanée - ↓ : ALAT, score FIB-4
Empagliflozin			- phase 2 - + Pioglitazone = phase 4	- ↓ : poids, graisses hépatiques, ALAT - en cours
Luseogliflozin			- phase 2	- ↓ : poids, graisses hépatiques
Licoglifocin			- phase 2	- en cours
Atorvastatine, Simvastatine, Pravastatine, Pitavastatine	Inhibiteur de l'HMG-CoA-réductase	Statine / Dyslipidémies	- NR	- ↓ : stéatose, inflammation
Spironolactone	Antagonistes du récepteur aux minéralocorticoïdes	Hypertension artérielle	- + Vitamine E = phase 2	- ↓ : insulino-résistance, stéatose
Aparanone			- phase 2	- ↓ : inflammation, fibrose
Miricorilant			- phase 1	- en cours
LPCN 1144	Pro-médicament de la testostérone endogène		- phase 2	- en cours
Acide obéticholique		Cholangite biliaire primitive	- FLINT, phase 2 - REGENERATE, phase 3 - REVERSE, phase 3	- ↓ : stéatose, inflammation, ballonnement, fibrose - ↓ : fibrose - en cours
Cilofexor			- + Firsocostat	- ↓ : stéatose, fibrose ; ↑ : élasticité du foie, fonction hépatique
Tropifexor			- phase 2 - + Licoglifocin	- en cours - en cours
MET409			- + Empagliflozin = phase 2	- en cours
AGN-242266 ; ASC42 ; EDP-297 ; HPG1860 ; MET409	Agonistes FXR		- phase 1	- en cours
EYP001 ; MET642 ; TERN-101 ; EDP-305			- phase 2	- en cours
Pémafibrate	Agoniste PPAR _α	Fibrates / Dyslipidémies	- SPPARMa, phase 2	- ↓ : ASAT/ALAT, cholestérol LDL ; ↑ : élasticité du foie
T3D-959	Agoniste PPAR _{δ/γ}	Maladie d'Alzheimer	- phase 1	- ↓ : insulino-résistance, stéatose, fibrose
Elafibranor	Agoniste PPAR _{α/δ}		- GOLDEN-505, phase 2 - RESOLVE-IT, phase 3	- ↓ : stéatose, inflammation, fibrose - non significatif
Saroglitazar	Agoniste PPAR _{α/γ}	NASH (Inde)	- EVIDENCES I, phase 2 - EVIDENCES II, phase 3 - EVIDENCES VI, phase 2 - + Vitamine E = phase 3	- ↓ : ASAT/ALAT, lipides - ↓ : paramètres histologiques - en cours - en cours
Lanifibranor	Pan-agoniste PPAR		- NATIVE, phase 2 - NATIVE3, phase 3	- ↓ score SAF - en cours

Tableau 2 : Molécules en études cliniques contre la NASH (2/2). ↓ : diminution ; ↑ : augmentation.
NR : phase de l'étude non renseignée. En rouge : étude de phase 3 significative ou en cours.

Nom	Cible	Classe thérapeutique/autre utilisation	Phase d'essai clinique	Effet(s) dans le traitement de la NASH
Pegbelfermin	Analogues FGF21		- phase 2	- ↓ graisses hépatiques, fibrose, paramètres métaboliques (adiponectine, lipides) ; ↑ : élasticité du foie
Efruxifermin			- FALCON 1 et 2, phase 2	- en cours
BIO89-100			- BALANCED, phase 2 - HARMONY, phase 2 puis phase 3 - SYMMETRY, phase 2	- ↓ : graisses hépatiques, fibrose - en cours
Aldafermin	Analogue FGF19		- phase 2	- ↓ : graisses hépatiques, fibrose ; ↑ : résolution NASH - en cours
Cenicriviroc	inhibiteur CCR2 et CCR5	VIH-1	- ALPINE 4, phase 2 - CENTAJUR, phase 2 - AURORA, phase 3 - + Tropifexor = phase 2	↓ : fibrose - non significatif - en cours
Resmetirom	Agonistes du THRβ	Dyslipidémies	- phase 2	- ↓ : graisses hépatiques, inflammation, score NAS - MAESTRO-NASH, phase 3 - ↓ : graisses hépatiques, fibrose ; ↑ résolution NASH
VK2809			- phase 2	- en cours
ASC41 ; TERN-501			- phase 1	- en cours
Aramchol	Inhibiteur SCD1		- ARREST, phase 2 - ARMOR, phase 3	- ↓ : graisses hépatiques, fibrose ; ↑ : résolution NASH - en cours
Belapectin GB1211	Inhibiteurs Galectin-3		- NASH-CX, phase 2	- ↓ : hypertension portale
IONIS-DGAT2_{Rx}			- phase 1	- en cours
ION224	Inhibiteurs DGAT2		- phase 2	- ↓ : graisses hépatiques
PF-06865571			- phase 1	- en cours
			- phase 2 - + Danaglipton = phase 1	- en cours
BFBK8488A	Anticorps agonistes FGFR1/KLB		- phase 1	- ↓ : marqueurs cardiométaboliques, paramètres hépatiques, graisses hépatiques
MGM313			- BANFF, phase 2	- en cours
			- phase 1	- ↓ : graisses hépatiques ; ↑ : paramètres métaboliques
CM-101	Anticorps contre le CCL24		- phase 2	- en cours
Nimacimab	Anticorps antagoniste CB1		- phase 1	- ↓ : fibrose, inflammation - en cours
Symbiter	<i>Bifidobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , et <i>Propionibacterium</i>	Probiotique	- NR - + Acides gras oméga 3	- ↓ : stéatose, ASAT/ALAT, cytokines - ↓ : stéatose, inflammation
Bifidobacterium longum + fructo-oligosaccharides Icosabutate		Symbiotique	- NR	- ↓ : ASAT/ALAT, cholestérol LDL, endotoxines, insulino-résistance, inflammation, stéatose
Rifaximine	Bactéries anaérobies et aérobies gram-négatives et gram-positives de l'intestin	Acide gras oméga 3	Antibiotique / Syndrome du côlon irritable, encéphalopathie hépatique, diarrhée du voyageur	- ICONA, phase 2 - en cours
Solithromycine	Bactéries gram-positives, gram-négatives, souches résistantes aux macrolides	Antibiotique	Antibiotique macrolide / Pneumonies, gonorrhée	- NR - ↓ : ASAT/ALAT, endotoxines, cytokines, insulino-résistance, poids (tendance)
Selonertib	Inhibiteur ASK1		- phase 2	- ↓ : ASAT/ALAT, score NAS
Larsucosterol	Régulateur des DNMTs		- STELLAR-3 et STELLAR-4, phase 3 - phase 1	- non significatif - ↓ : ASAT/ALAT, triglycérides ; ↑ : élasticité du foie
Epeleuton	Dérivé d'acide gras n-3		- phase 2	- ↓ : triglycérides, glycémie, inflammation
Tesamorelin	Hormone GHRH		- phase 2	- ↓ : graisses hépatiques
NS-0200	Activateurs Sirt1/AMPK/NO		- phase 2	- ↓ : poids, triglycérides
HTD1801	Anti-oxydant + acide biliaire		- phase 2	- ↓ : graisses hépatiques, ASAT/ALAT, poids ; ↑ : contrôle glycémie
DFV890	NLRP3	Dirigés contre l'inflammation	- phase 1	- en cours
PBF-1650	A3AR		- phase 1	- en cours
Namodenoson	JNK		- phase 2 (NCT04697810)	- en cours
CC-90001	TLR4		- phase 2 (NCT04048876)	- en cours
JKB-122	Inhibiteurs LOXL2		- phase 2 (NCT04255069)	- en cours
PXS-5382A et PXS-5338K		Dirigés contre la fibrose	- phase 1	- en cours
PLN-1474	Inhibiteur intégrine αvβ1		- phase 1	- en cours
Hepastem	Thérapie cellulaire allogénique		- PANASH, phase 2 (NCT03963921)	- en cours
BMS-986263	Inhibiteur HSP47		- phase 2 (NCT04267393)	- en cours
Nitazoxanide	Anti-parasitaire		- phase 2 (NCT03656068)	- en cours
Tipelukast	Antagoniste du récepteur aux leucotriènes		- phase 2 (NCT02681055)	- en cours
TERN-201	Inhibiteur VAP-1	Dirigés contre l'inflammation et la fibrose	- AVIATION, phase 1 (NCT04897594)	- en cours
CRV-431	Inhibiteur de la cyclophiline		- AMBITION, phase 2 (NCT04480710)	- en cours
ORMD-0801	Insuline orale	Diabète de type 2	- phase 2 (NCT04618744)	- en cours
AZD2693	Inhibiteur PNPLA3		- phase 1 (NCT04483947)	- en cours
CB4211	Analogue MOTS-c	Dirigés contre le métabolisme, l'inflammation et/ou la fibrose	- phase 1 (NCT03998514)	- en cours
PF-06835919	Inhibiteur KHK		- phase 2 (NCT03256526)	- en cours
TVB-2640	Inhibiteur FASN		- phase 2 (NCT04906421)	- en cours
SNP-610	Inhibiteur CYP2E1		- phase 2 (NCT03468556)	- en cours

Ainsi, de nombreuses molécules sont en cours d'essais cliniques pour le traitement de la NASH, et sont dirigées contre de nombreuses cibles différentes. Au sein du laboratoire, une nouvelle cible protéique potentiellement impliquée dans le développement et la progression de la NASH a été identifiée : la protéine FAT10 ou UBD (*ubiquitin D*).

C.FAT10 : une nouvelle piste dans le traitement de la NASH ?

I. Introduction

1) FAT10

a) **Structure et localisation**

FAT10 est une petite protéine de 18 kDa, codée par le gène *Fat10* du chromosome 6 appartenant au complexe d'histocompatibilité majeur (MHC) I. Elle est constituée de deux domaines UBL (*ubiquitin-like*), dont les extrémités C-terminale et N-terminale partagent respectivement 29% et 36% de leur séquence avec l'ubiquitine, conférant à FAT10 des propriétés similaires à celles de l'ubiquitine, on parle de protéine *ubiquitin-like modifier*.

Cette protéine est surexprimée naturellement dans les organes du système immunitaire (e.g. thymus, ganglions lymphatiques, rate), et a d'abord été décrite pour son rôle dans la présentation à l'antigène dans l'immunité innée et adaptative, où FAT10 cible les antigènes afin de les amener à la dégradation (Basler *et al.*, 2015). FAT10 peut aussi être induite dans les autres organes, dont le foie, lors d'un stimulus pro-inflammatoire (e.g. cytokines $TNF\alpha/IFN\gamma$, $TNF\alpha/IL6$, voie $NF\kappa B/STAT3$) (Raasi *et al.*, 1999).

b) **Mécanisme d'action**

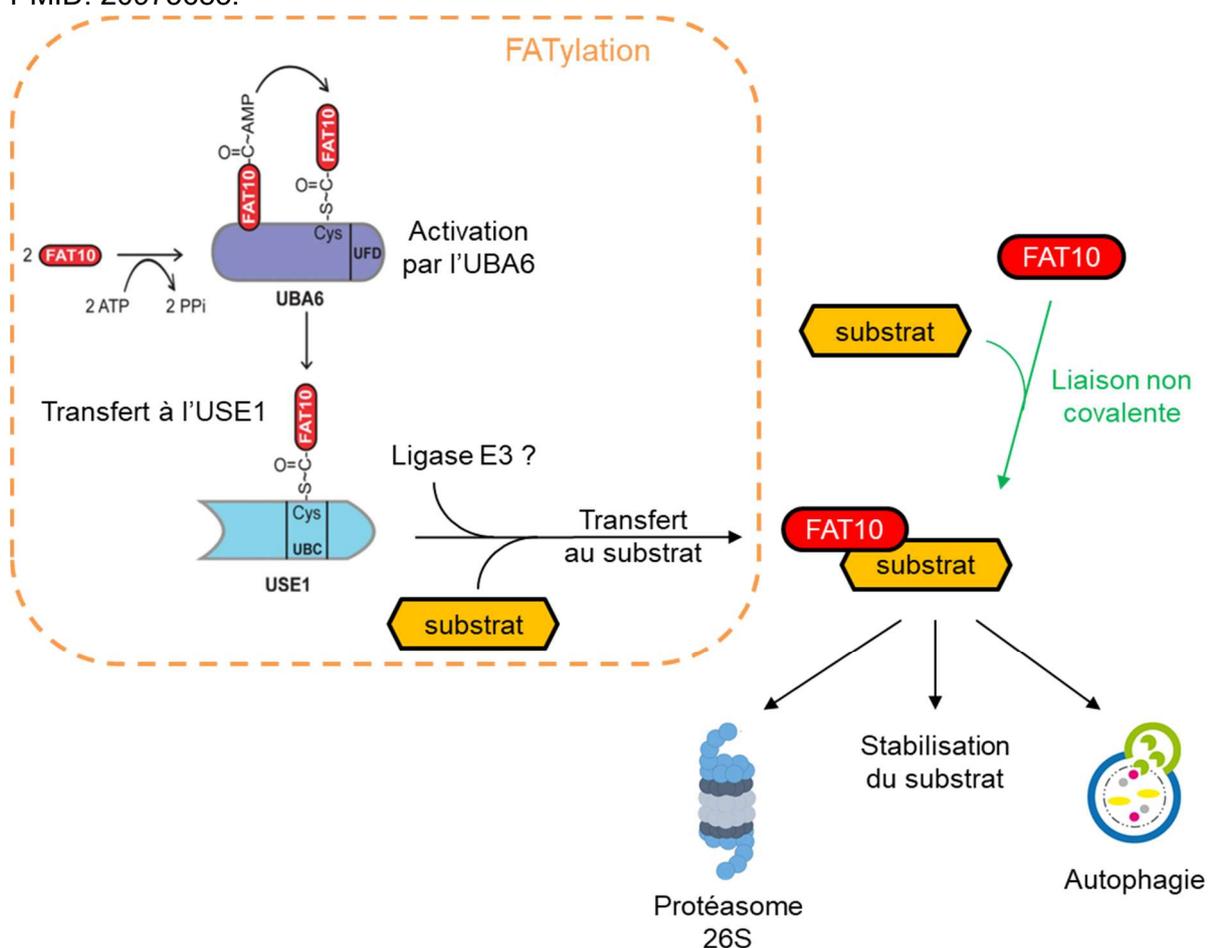
FAT10 peut se lier à ses cibles protéiques de manière covalente *via* les ligases UBA6 (*ubiquitin-like modifier-activating enzyme 6*) et USE1 (*UBA6-specific E2 enzyme 1*) (i.e. « FATylation »), ou de manière non covalente, afin d'amener le complexe ainsi formé à la dégradation par le protéasome 26S de manière dépendante ou non de l'ubiquitylation (Hipp *et al.*, 2005). Cette dégradation peut également être réalisée par la voie autophagique, en impliquant une liaison du complexe à l'histone désacétylase HDAC6, connue pour médier le transport des complexes polyubiquitylés vers les aggrésomes (Kalveram *et al.*, 2008). Mais à l'inverse, et à la différence des autres protéines *ubiquitin-like*, FAT10 peut également se lier à ses substrats en vue de les stabiliser (Bialas *et al.*, 2019 ; Liu *et al.*, 2016; Yuan *et al.*,

2014) (**Schéma 10**). On dénombre aujourd'hui plusieurs centaines de substrats pour la protéine FAT10 (Leng *et al.*, 2014), dégradés et/ou stabilisés par celle-ci. Les mécanismes dirigeant vers l'une ou l'autre des issues sont encore à déterminer, mais le but majoritairement mis en évidence dans la littérature est de mener au développement du cancer.

Schéma 10 : Mécanisme d'action de FAT10 sur ses substrats protéiques. FAT10 est activée par l'UBA6 grâce à l'ATP. L'UBA6 adényle le groupement carboxyle en C-terminale de FAT10, puis le complexe est transféré sur la cystéine active de l'UBA6. Par transthiolation, FAT10 est transférée à l'USE1 sur son site cystéine. A l'aide d'une ligase E3 encore non identifiée, FAT10 se lie à son substrat par une liaison isopeptide. En parallèle, FAT10 peut se lier de manière non covalente à son substrat. FAT10 peut ensuite diriger son substrat vers la dégradation, protéasomale ou autophagique, ou le stabiliser.

FAT10 : *HLA-F adjacent transcript 10* ; UBA6 : *ubiquitin-like modifier-activating enzyme 6* ; USE1 : *UBA6-specific E2 enzyme 1* ; ATP : adénosine triphosphate ; AMP : adénosine mono-phosphate ; UFD : *ubiquitin-fold domain* ; UBC : *ubiquitin conjugating enzyme E2 domain*.

Schéma adapté de : Aichem A, Pelzer C, Lukasiak S, Kalveram B, Sheppard PW, Rani N, Schmidtke G, Groettrup M. USE1 is a bispecific conjugating enzyme for ubiquitin and FAT10, which FAT10ylates itself in cis. *Nat Commun.* 2010 May 4;1:13. doi: 10.1038/ncomms1012. PMID: 20975683.



c) FAT10 dans le cancer

En effet, FAT10 est un oncogène, qui est impliqué dans le développement des cancers colorectaux, gastriques, gynécologiques, ou encore dans l'hépatocarcinome

(Aichem *et al.*, 2016) (**Schéma 11**). FAT10 est surexprimée dans les tumeurs possédant un microenvironnement inflammatoire, ce qui correspond à 90% des HCC (Lukasiak *et al.*, 2008), et y est induite notamment par la voie NFκB-STAT3 (Choi *et al.*, 2014). A l'inverse, FAT10 peut activer la voie NFκB, et ainsi jouer sur les nombreuses voies régulées par cette protéine (Gong *et al.*, 2010). En effet, NFκB est un facteur de transcription, qui à travers la régulation de ses gènes cibles module les modifications épigénétiques, l'angiogenèse, l'immunosuppression, ou encore la prolifération tumorale. L'ensemble de ces voies pourrait donc être activé par l'action de FAT10 sur NFκB et favoriser le cancer.

Egalement, il est connu qu'en contexte d'infection aiguë provoquant des dommages à l'ADN, le facteur de transcription NFκB diminue l'activité de p53, mais induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires qui permettent d'éliminer les cellules lésées et de favoriser la réparation des dommages. Cependant, en condition d'inflammation chronique, le système de réparation est dépassé, et l'activation chronique de NFκB maintient le blocage de l'activité de p53, favorisant ainsi le développement de mutations et de cancers (Gudkov *et al.*, 2011). Ici, FAT10 pourrait jouer indirectement sur l'activité de p53 *via* l'activation de NFκB, et favoriser le cancer.

Mais FAT10 peut aussi agir de manière directe sur p53 : en effet, la liaison de FAT10 à p53 provoque une inhibition de son activité transcriptionnelle, empêchant son rôle protecteur contre la progression tumorale (Choi *et al.*, 2014). Et à l'inverse, il a été montré que p53 pouvait réguler négativement FAT10, permettant de prévenir l'apparition de tumeurs (Zhang *et al.*, 2006).

L'implication de FAT10 dans le développement du cancer se fait aussi *via* de nombreux autres partenaires. Tout d'abord, la liaison de FAT10 au PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) entraîne sa dégradation protéasomale et empêche ainsi la réparation des dommages à l'ADN, favorisant la progression de la tumorigenèse (Chen *et al.*, 2018). De même, la liaison de FAT10 à la protéine MAD2 (*mitotic arrest deficient 2*) en vue de la stabiliser provoque une instabilité chromosomique et une dérégulation du cycle cellulaire, favorisant l'apparition du cancer (Liu *et al.*, 1999). Ensuite, FAT10 peut se lier à la β-caténine et empêcher sa dégradation et son ubiquitinylation, ce qui favorise le maintien de HOXB9 (homeobox 9) et le développement du HCC (Yuan *et al.*, 2014). Egalement, FAT10 peut entrer en compétition avec l'ubiquitinylation pour se lier à eEF1A1 (*eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1*) et empêcher sa dégradation, pour promouvoir l'HCC (Liu *et al.*, 2016). Enfin, il a été montré *in vivo* que

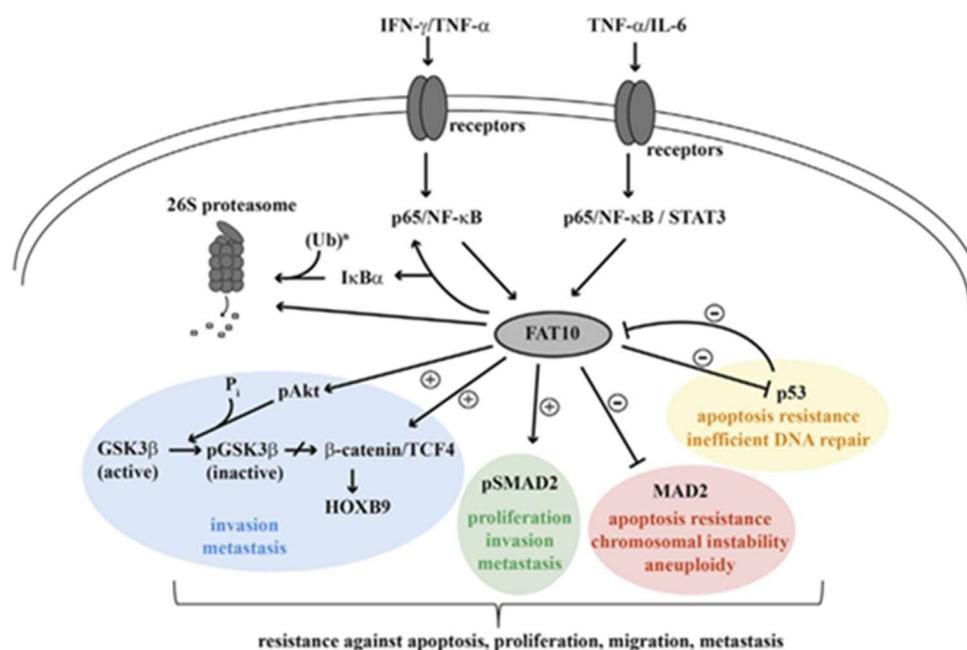
des souris n'exprimant pas FAT10 (KO FAT10) présentent une augmentation de 20% de leur espérance de vie moyenne, ainsi qu'une absence de développement de tumeurs, en comparaison des souris contrôles (Canaan *et al.*, 2014).

Schéma 11 : Les cibles protéiques de FAT10 impliquées dans le développement du cancer.

IFN γ : interféron gamma ; TNF α : *tumor necrosis factor alpha* ; IL6 : interleukine 6 ; NF κ B : *nuclear factor kappa B* ; STAT3 : *signal transducer and activator of transcription 3* ; MAD2 : *mitotic arrest deficient 2* ; pSMAD2 : *phosphorylated mothers against decapentaplegic homolog 2* ; pAkt : protéine kinase B phosphorylée ; GSK3 β : glycogène synthase kinase 3 bêta ; TCF4 : *transcription factor 4* ; HOXB9 : *homeobox 9* ; I κ B α : *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha* ; Ub : ubiquitine.

+ : activation ; - : inhibition.

Schéma issu de : Aichem A, Groettrup M. The ubiquitin-like modifier FAT10 in cancer development. *Int J Biochem Cell Biol.* oct 2016;79:451-61.



d) FAT10 dans le métabolisme

Au-delà de son action pro-tumorale, les cibles régulées par FAT10 suggèrent une possible implication dans la régulation du métabolisme. En effet, l'activité du facteur de transcription p53 est diminuée par FAT10 (Choi *et al.*, 2014). Or, les gènes cibles de p53 sont impliqués dans l'inhibition de la glycolyse, l'augmentation de la respiration mitochondriale et l'utilisation des lipides comme source de production d'énergie par la mitochondrie (β -oxydation des acides gras), l'inhibition de la biosynthèse des lipides et de la production d'équivalents réducteurs qui participent à cette biosynthèse (Lacroix *et al.*, 2013). De plus, des souris possédant une délétion totale de p53 (KO p53) présentent un défaut de la néoglucogenèse hépatique à jeun, une diminution du nombre de mitochondries et de l'activité respiratoire dans le muscle squelettique, et

ont une prise de poids plus importante lorsqu'elles sont soumises à un régime hypercalorique (Sen *et al.*, 2011; Saleem *et al.*, 2009; Molchadsy *et al.*, 2013). Egalement, les souris KO FAT10 présentent une diminution de leur obésité liée à l'âge, en comparaison des souris contrôles (Canaan *et al.*, 2014), suggérant un potentiel lien entre FAT10 et le métabolisme des lipides.

2) FAT10 et NASH

Dans la littérature, il a été montré récemment que l'expression en ARNm (ARN messenger) de FAT10 était augmentée chez les patients atteints de NASH, et corrélait avec l'augmentation de l'expression des gènes de l'inflammation IL32, CXCL9 et CXCL10 (chimiokines motif C-X-C) associés au développement de la maladie (Dali-Youcef *et al.*, 2019). Egalement, une augmentation de l'expression en ARNm de FAT10 est retrouvée dans le foie des patients NASH issus de la cohorte lilloise ABOS (Vandel *et al.*, 2021). Néanmoins, ces articles n'ont pas étudié la corrélation entre la surexpression de FAT10 et les paramètres de gravité de la maladie. Egalement, aucune association entre l'expression de FAT10 et la régression de la pathologie n'a été explorée.

Dans le but d'étudier les acteurs majeurs impliqués dans le développement de la NASH, et de s'intéresser particulièrement à FAT10, notre équipe de recherche a eu accès à des données de puces transcriptomiques humaines, réalisées à partir de biopsies de foies de patients obèses atteints de NAFLD ou non issus de la cohorte RESOLVE, grâce à une collaboration avec l'équipe du Professeur Van Gaal (UZA, Anvers) (Francque *et al.*, 2015). Ces premiers résultats constituent le point de départ de l'étude du rôle de la protéine FAT10 dans le développement de la NASH.

II. Premiers résultats

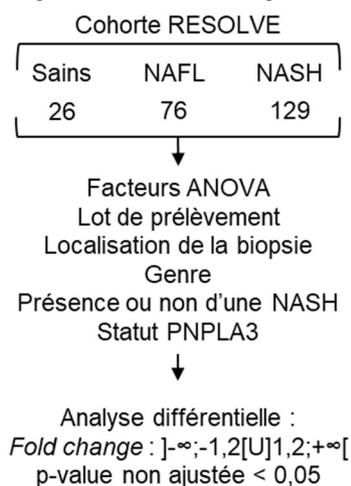
L'ensemble des résultats présentés ci-dessous ont été générés par l'équipe du Professeur Réjane Paumelle-Lestrelin : le Docteur Alexia Cotte, Ludivine Clavreul et moi-même.

1) Données chez l'Homme (cohorte RESOLVE)

a) **Matériels et méthodes**

La cohorte RESOLVE est constituée de patients obèses, soit non atteints de NAFLD, soit atteints de NAFLD au stade de simple NAFL (stéatose) ou de NASH avérée. Plusieurs examens ont été effectués afin d'inclure les patients dans l'étude : une mesure des paramètres sanguins (cholestérol, HDL, LDL, triglycérides, ASAT, ALAT, ...), un test de tolérance au glucose, une glycémie à jeun, une mesure de l'état du foie par ultrasons et doppler, un scanner du tissu adipeux, une scintigraphie du foie et de la rate, et un test respiratoire à l'Aminopyrine afin d'évaluer la fonction du foie. Suivant les résultats, sur décisions des hépatologues, les patients sans signe d'affection du foie ont entamé un simple régime. Les patients présentant des signes d'affection du foie ont été classés en deux catégories, les candidats à la chirurgie bariatrique et les non candidats. Une biopsie du foie a été réalisée pour les deux catégories, pendant la chirurgie bariatrique pour le premier groupe, et juste avant la mise en place d'un régime pour le second groupe. Les différents stades de la NAFLD ont été établis par calcul du score NAS suite à une analyse histologique des biopsies de foies, après réalisation de coupes paraffinées marquées à l'hématoxyline/éosine, permettant de classer les patients en 3 groupes : « Sains » pour les 26 patients ne présentant pas de NAFLD, « NAFL » pour les 76 patients présentant une simple stéatose (plus ou moins avancée), et « NASH » pour les 129 patients présentant une stéatose et une inflammation, et éventuellement un ballonnement des hépatocytes et une fibrose. Des puces transcriptomiques ont été réalisées à partir des biopsies, et des analyses bioinformatiques ont été faites selon les critères présentés dans le **Schéma 12** : normalisation et analyse des données selon la variance, le lot de prélèvement, la localisation et la technique de prélèvement, le sexe, le stade de la maladie (groupe sains, NAFL ou NASH) et le statut PNPLA3. Les groupes ont été comparés à l'aide du logiciel d'analyse GIANT Galaxy développé par une équipe de l'unité INSERM U1011 de Lille (Vandel *et al.*, 2020). Des biospies de foies ont également été récupérées une seconde fois pour 78 patients NASH, 12 mois après le début du régime (45 patients) ou 12 mois après la réalisation de la chirurgie bariatrique (33 patients), et ont été utilisées pour réaliser de nouveau des puces transcriptomiques. Une comparaison entre la première biopsie (M0) et la seconde biopsie (M12) a ainsi pu être réalisée.

Schéma 12 : Analyse bioinformatique des puces transcriptomiques réalisées à partir de biopsies de foie de patients obèses atteints ou non de NAFLD (cohorte RESOLVE).



Facteurs ANOVA : analyse de la variance ; Lot de prélèvement : année de réalisation de la biopsie ; Localisation de la biopsie : localisation du prélèvement et technique de prélèvement différentes suivant le contexte de la biopsie (chirurgie bariatrique, confirmation d'une suspicion de diagnostic). NAFL : *non-alcoholic fatty liver*, NASH : *non-alcoholic steatohepatitis*, PNPLA3 : *patatin-like phospholipase domain-containing protein 3*.

b) Résultats

Après analyse bio-informatique des données transcriptomiques, l'équipe de recherche a identifié *FAT10* comme l'un des vingt premiers gènes dont l'expression est augmentée chez les patients atteints de NASH (**Figure 1A**). La surexpression de *FAT10* chez les patients NASH est également montrée en protéine par immunofluorescence (**Figure 1B** – Matériels et Méthodes en **Annexe 1**). Une corrélation positive entre l'expression génique de *FAT10* et les différents paramètres de la NASH (stéatose, inflammation, ballonnement, fibrose) a également été établie (**Figure 1C**), se traduisant par une corrélation positive entre l'expression génique de *FAT10* et les scores NAS et SAF de gravité de la NASH (**Figure 1D**). Il a également été montré que l'expression génique de *FAT10* était négativement associée aux voies impliquées dans le métabolisme, tels que la biosynthèse des acides gras insaturés, le métabolisme des acides gras, ou encore la voie de signalisation PPAR (**Figure 1E**). En effet, l'expression en ARNm de *FAT10* corrèle négativement avec celle du récepteur nucléaire PPAR α , connu pour limiter la stéatose et l'inflammation et être ainsi un facteur protecteur contre la NASH (**Figure 1F**) (Pawlak *et al.*, 2015). Enfin, il a été montré une diminution de l'expression en ARNm de *FAT10* entre la première biopsie et la seconde, obtenue 12 mois plus tard après réalisation d'un régime ou d'une chirurgie bariatrique, ce qui traduit une corrélation négative entre l'expression en ARNm de *FAT10* et la régression de la pathologie (**Figure 1G**). L'ensemble de ces résultats montrent une association entre l'expression en ARNm de *FAT10* et la progression des NAFLD, suggérant que *FAT10* pourrait jouer un rôle dans le développement de la NASH.

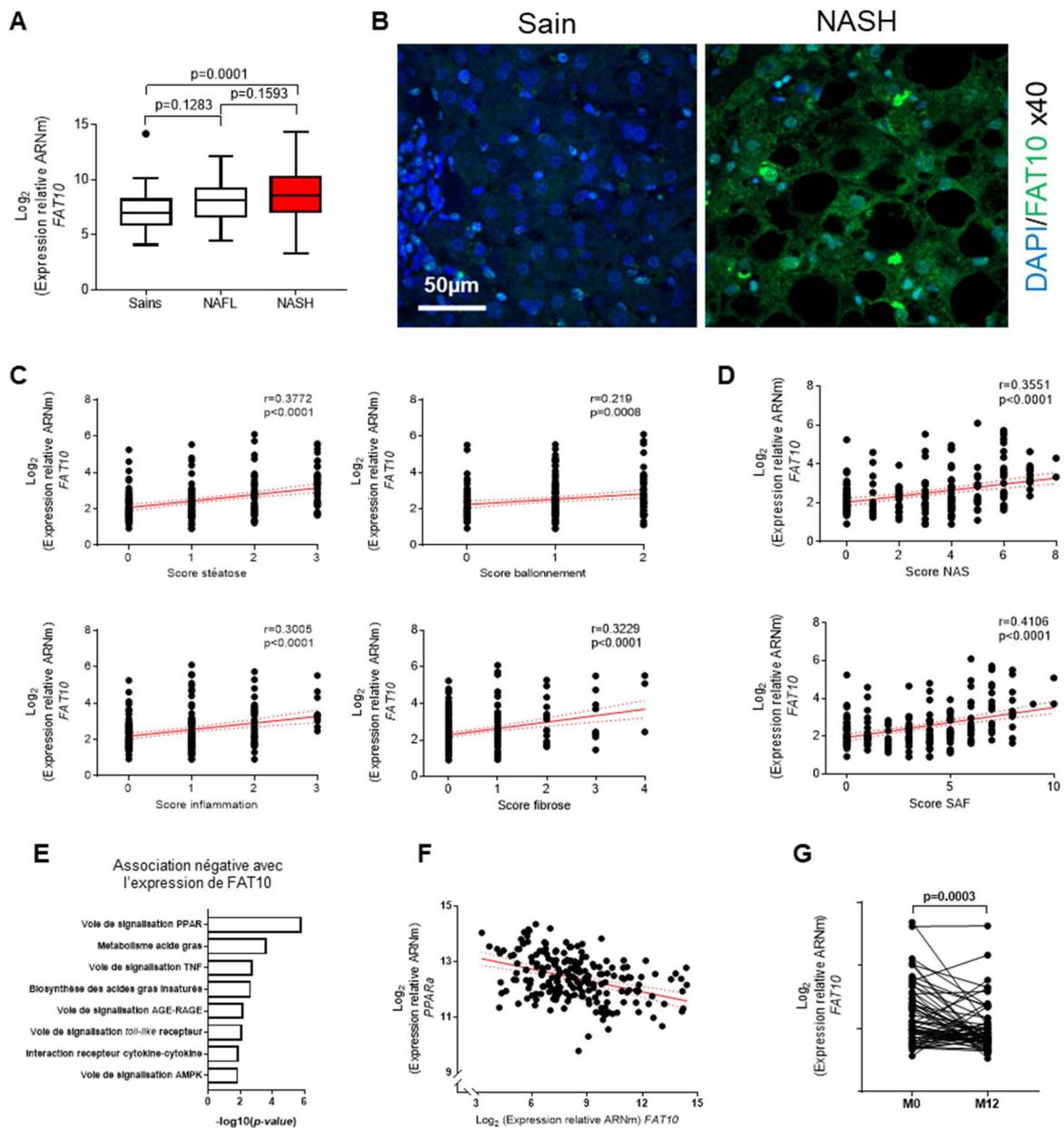


Figure 1 : L'expression de FAT10 est augmentée dans le foie des patients atteints de NASH, et corrèle positivement avec la gravité de la NASH, et négativement avec les voies du métabolisme et l'expression de PPAR α .

A partir de puces transcriptomiques issues des biopsies de foies prélevées chez 26 patients obèses sains, 76 patients obèses atteints de NAFL et 129 patients obèses atteints de NASH, une analyse bioinformatique a été effectuée. Expression en ARNm (A) et en protéine par immunofluorescence (B) de FAT10 ; corrélation entre l'expression de FAT10 et les scores de stéatose, d'inflammation, de ballonnement et de fibrose (C) ; corrélation entre l'expression de FAT10 et les scores de gravité NAS (*NAFLD activity score*) et SAF (stéatose, activité, fibrose) (D) ; voies métaboliques correspondant aux gènes dont l'expression est associée négativement à l'expression de FAT10 (E) ; corrélation entre l'expression de FAT10 et celle de PPAR α (F) ; corrélation entre l'expression de FAT10 à M0 et 12 mois après une chirurgie bariatrique ou un régime (M12) (G).

Photos prises en x40 au microscope confocal (*spinning disk*). Tests t de Student, tests de régression linéaire. GIANT/Galaxy, EnrichR. p-value<0,05, *Fold change* :]- ∞ ;-1,2[U]1,2;+ ∞ [.

2) Données *in vivo* chez la souris

Afin d'étudier le lien entre l'expression de FAT10 et le développement de la NASH, un modèle *in vivo* de souris développant une NASH a été utilisé, et l'expression de FAT10 ainsi que sa corrélation avec les voies métaboliques ont été étudiées.

a) **L'effet du régime CDAA supplémenté**

Afin d'étudier le lien entre l'expression de FAT10 et le développement de la NASH *in vivo*, des souris mâles C57Bl6/J ont été soumises à un régime NASHogène : le régime CDAA (ssniff® Spezialdiäten GmbH) déficient en choline et riche en graisses et en cholestérol, qui a été supplémenté en fructose et en sucrose dans l'eau de boisson. Des souris soumises au régime CSAA (*choline-sufficient L-amino acid-defined*, ssniff® Spezialdiäten GmbH) ont été utilisées comme groupe contrôle. Le régime CDAA permet le développement chez la souris des différents paramètres de la NASH : la stéatose (micro et macro), l'inflammation, de rares cellules ballonisées, la fibrose et même le HCC pour de très longs temps de régime. Le régime étant déficient en choline, celle-ci ne peut être utilisée pour l'élimination des lipides, ce qui favorisera l'accumulation des graisses dans le foie. De plus, les taux élevés de cholestérol favorisent l'absorption hépatique des lipides, l'inflammation et le développement de la fibrose. En parallèle, l'ajout du fructose et du sucrose dans l'eau de boisson augmente la lipogenèse et l'inflammation hépatique. Egalement, l'enrichissement en graisses du régime accentue ces mécanismes. L'ensemble de ces facteurs entraîne donc une accumulation importante de lipides dans le foie, qui est alors responsable du développement de la stéatose, de la lipotoxicité et des lésions hépatiques caractéristiques de la NASH. Pour nos expériences, afin de se placer dans un phénotype de NASH précoce, un temps court de régime CSAA/CDAA supplémenté de 2 semaines a été réalisé. Les souris ont été pesées avant administration du régime, puis 2 fois par semaine et avant le sacrifice, montrant que la perte de poids attendue avec le régime CDAA était équivalente entre les différentes cages (données non montrées ici). Grâce à un prélèvement sanguin intra-cardiaque effectué au moment du sacrifice, les enzymes ASAT/ALAT ont été dosées et sont augmentées de manière attendue à 400 UI/L chez les souris CDAA (données non montrées ici). Les foies des souris ont ensuite été récupérés, pesés et divisés en plusieurs échantillons pour les différentes analyses (**Annexe 2**).

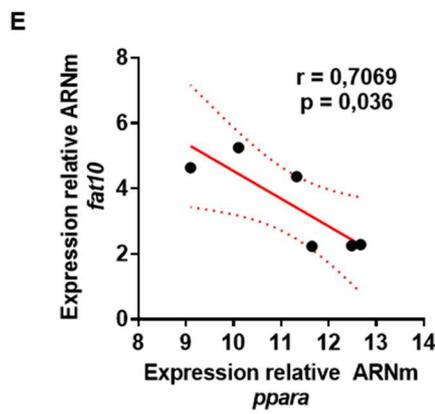
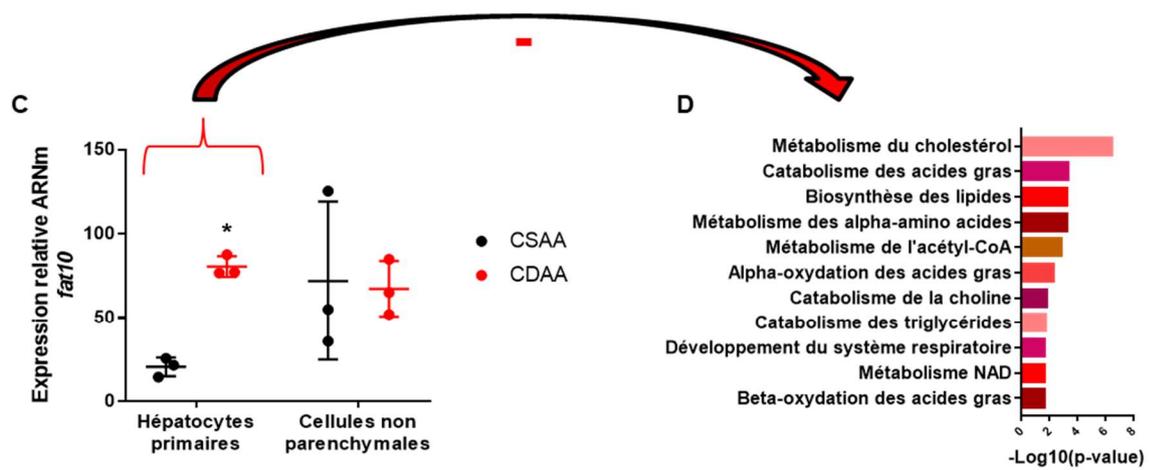
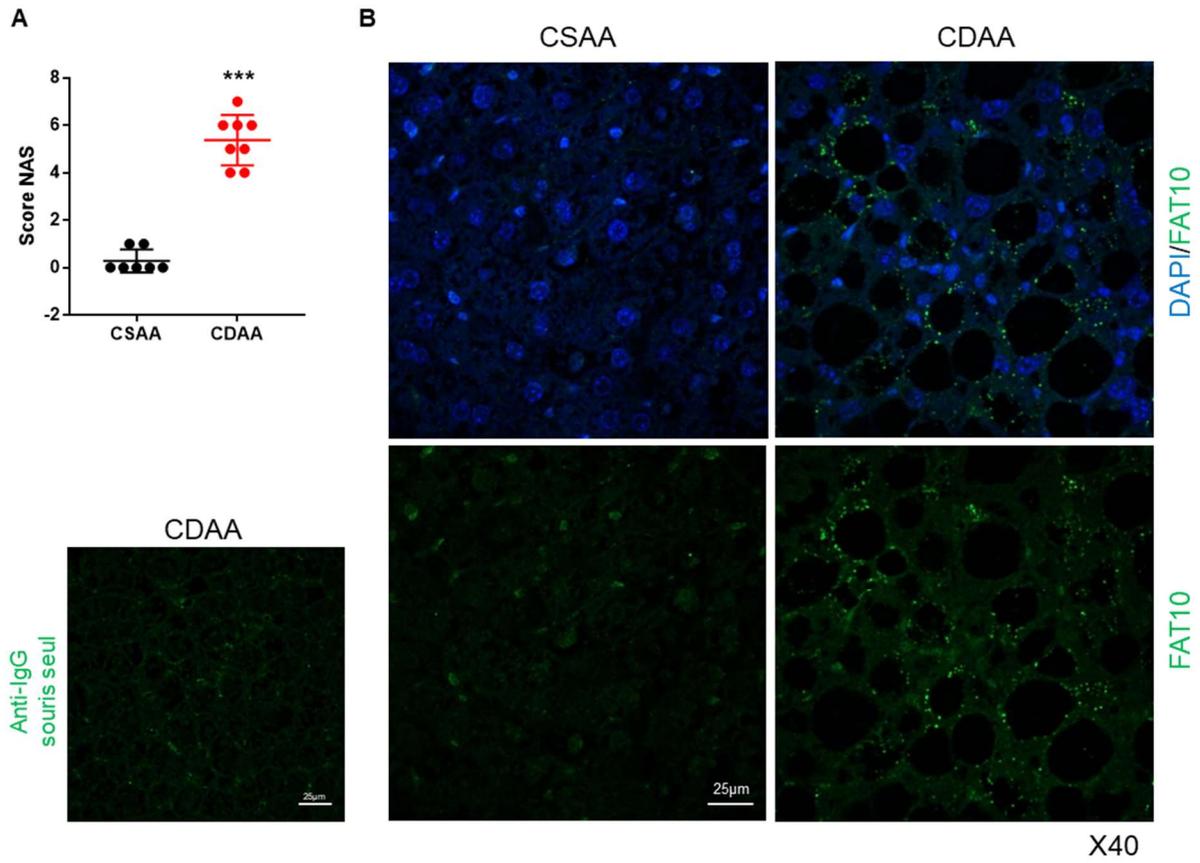
b) Résultats

Le calcul du score NAS à partir des coupes histologiques des foies des souris confirme le développement de la NASH chez les souris sous régime CDAA 2 semaines (**Figure 2A**). D'après le marquage immunofluorescent des foies, l'expression protéique de FAT10 est augmentée chez les souris NASH (**Figures 2B**). Afin d'étudier l'expression génique de FAT10 spécifiquement dans les hépatocytes et de s'affranchir des cellules non parenchymales, notamment des cellules inflammatoires fortement présentes dans les foies NASH, un isolement de ces deux types cellulaires a été réalisé. Une augmentation significative de l'expression en ARNm de FAT10 est observée dans les hépatocytes des souris CDAA, et n'est pas retrouvée dans les cellules non parenchymales (**Figure 2C**). A partir des puces transcriptomiques réalisées sur les échantillons d'hépatocytes primaires isolés, il est montré que l'expression génique de FAT10 corrèle négativement avec les voies du métabolisme des lipides au cours du développement de la NASH, notamment les voies du catabolisme des acides gras, du catabolisme des triglycérides ou encore de la β -oxydation des acides gras (**Figure 2D**). Egalement, l'expression en ARNm de FAT10 corrèle négativement avec celle de PPAR α dans les hépatocytes des souris (**Figure 2E**). Ces résultats rejoignent ceux obtenus chez les patients de la cohorte RESOLVE, où la surexpression de FAT10 au cours de la NASH est associée à l'altération du métabolisme des lipides et à la diminution de l'expression de PPAR α , suggérant donc que FAT10 pourrait participer au développement et à la progression de la pathologie.

Figure 2 : L'expression de FAT10 est augmentée dans les hépatocytes des souris atteintes de NASH après 2 semaines de régime CDAA supplémenté, et corrèle négativement avec le métabolisme des lipides et l'expression de PPAR α .

8 souris ont été soumises à un régime contrôle CSAA et 8 souris à un régime CDAA supplémenté afin de développer une NASH pendant 2 semaines. Calcul du score NAS suite à une analyse histologique des marquages hématoxyline/éosine des foies (A) ; Marquage de la protéine FAT10 par Immunofluorescence (B). Les hépatocytes primaires de 3 souris CSAA et 3 souris CDAA ont été isolés et utilisés afin de réaliser des puces transcriptomiques : Mesure de l'expression en ARNm de FAT10 dans les hépatocytes primaires isolés et dans les cellules non parenchymales par RT-QPCR TaqManTM (C), voies métaboliques correspondant aux gènes dont l'expression est corrélée négativement à l'expression de FAT10 d'après les puces transcriptomiques réalisées sur les hépatocytes primaires isolés (D), corrélation entre l'expression en ARNm de FAT10 et celle de PPAR α d'après les mêmes puces transcriptomiques (E).

Photos prises en x40 au microscope confocal (*spinning disk*). Test t de Student, test 2way ANOVA, * = p<0,05, *** = p<0,001. GIANI/Galaxy et EnrichR p-value<0,05.



3) Expériences *in vitro* : FAT10 et métabolisme des lipides dans les hépatocytes

La NASH est notamment caractérisée par une augmentation du taux de lipides dans les hépatocytes et une altération des fonctions mitochondriales. Afin d'étudier *in vitro* le rôle de FAT10 sur ces paramètres, des modèles de surexpression ou de diminution d'expression de FAT10 ont été mis au point dans une lignée cellulaire d'hépatocytes humains issus d'un HCC (HepG2), et leurs effets sur l'accumulation des gouttelettes lipidiques et sur la respiration mitochondriale ont été étudiés (Matériels et Méthodes en **Annexe 3**).

La surexpression stable de FAT10 dans le modèle cellulaire HepG2 infecté par un Lentivirus (LentiFAT10) a été vérifiée en ARNm par RT-QPCR (rétro-transcription – *quantitative polymerase chain reaction*) et en protéine par Western Blot, en comparaison à un Lentivirus contrôle (LentiNeg) (**Figure 3A**). Afin d'étudier l'effet de la surexpression de FAT10 sur l'accumulation des gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes, un marquage immunofluorescent BODIPY a été réalisé sur ces cellules. La quantification du marquage montre une augmentation significative du nombre de gouttelettes lipidiques accumulées dans les hépatocytes surexprimant FAT10 (**Figure 3B**) (le marquage des gouttelettes est à différencier de celui de la GFP (*green fluorescent protein*) exprimée à l'état basal par les cellules LentiNeg). Afin d'étudier l'effet de la surexpression de FAT10 sur la respiration mitochondriale, des expériences de seahorse ont été réalisées sur les cellules. Les 3 premiers points de mesure correspondent à la respiration mitochondriale basale. Les 3 suivants ont été mesurés après ajout d'oligomycine, un inhibiteur de l'ATP synthase, afin de s'intéresser uniquement à la respiration reliée à la fuite des protons. Les points 7, 8 et 9 sont mesurés après ajout de FCCP (Carbonyl cyanide-4 (trifluorométhoxy) phenylhydrazone), qui neutralise le gradient de protons et perturbe le potentiel membranaire mitochondrial, mettant en évidence la respiration maximale des cellules. Enfin, les 3 derniers points de mesure correspondent à l'effet de la roténone et de l'antimycine, qui inhibent totalement la respiration mitochondriale par inhibition des complexes I et III de la chaîne respiratoire, révélant le taux de respiration non-mitochondriale. D'après les résultats, la surexpression stable de FAT10 altère globalement la respiration basale des hépatocytes, et en particulier la capacité respiratoire maximale des cellules (**Figure 3C**).

Afin d'étudier l'effet de la diminution de l'expression de FAT10 sur l'accumulation des gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes, une transfection des cellules HepG2 par un siARN (*small interfering ARN*) contrôle (siNeg) ou dirigé contre FAT10 (siFAT10) suivie d'un marquage immunofluorescent BODIPY a été réalisé. La diminution de l'expression de FAT10 par le siARN a été vérifiée en ARNm par RT-QPCR et protéine par Western Blot (**Figure 3D**). La quantification du marquage BODIPY montre que la diminution de l'expression de FAT10 diminue significativement le nombre de gouttelettes lipidiques accumulées dans les hépatocytes (**Figure 3E**). Afin d'étudier les effets sur la respiration mitochondriale, des expériences de seahorse ont été réalisées dans les mêmes conditions. D'après les résultats, après ajout du FCCP (7^{ème}, 8^{ème} et 9^{ème} points de mesure), la diminution de l'expression de FAT10 améliore significativement la capacité respiratoire maximale des cellules (**Figure 3F**).

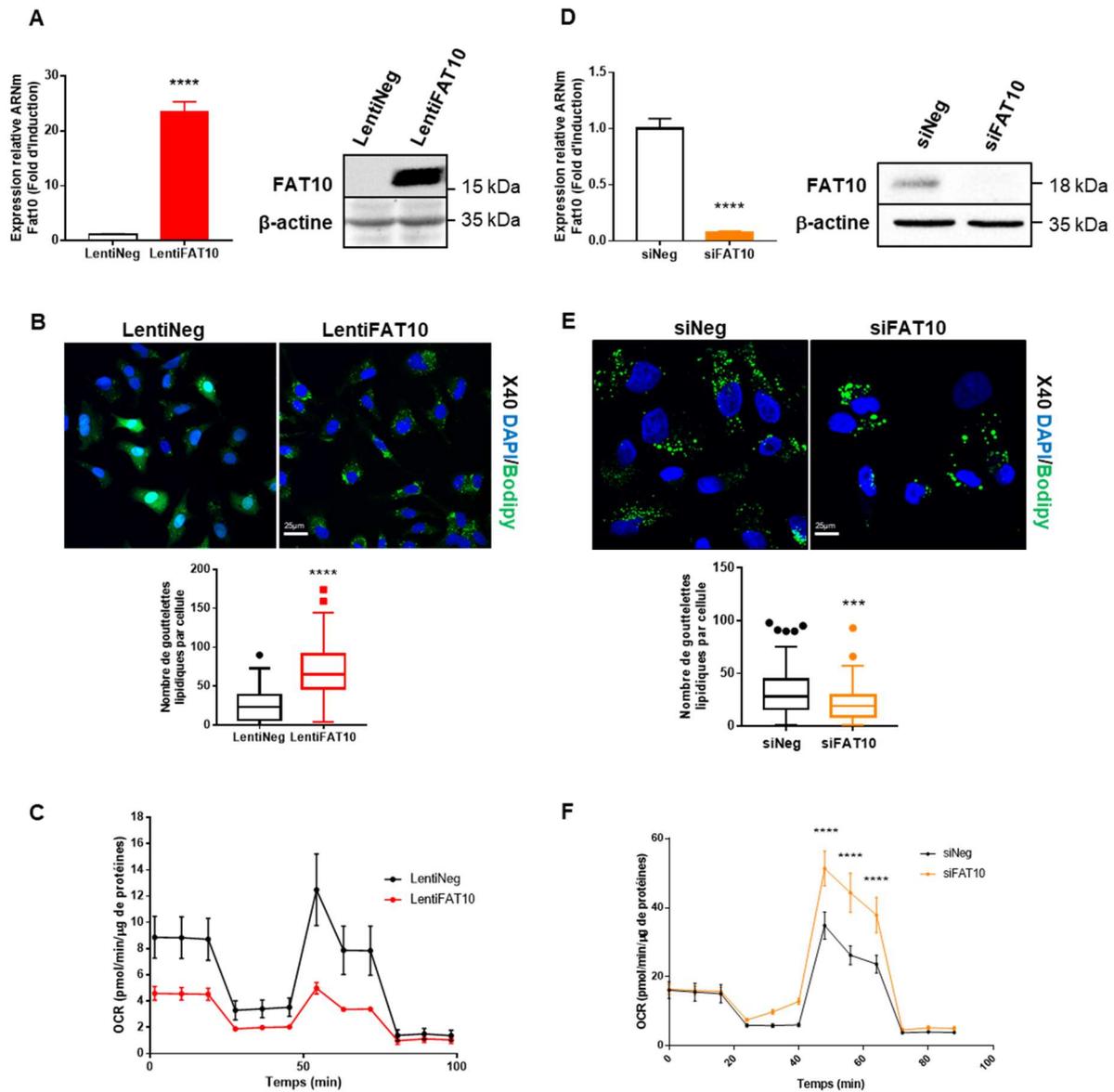


Figure 3 : La surexpression de FAT10 entraîne l'accumulation des gouttelettes lipidiques et altère la respiration mitochondriale des hépatocytes *in vitro*, tandis que la diminution de l'expression de FAT10 améliore ces paramètres. Les cellules HepG2 Lentivirus surexprimant stablement ou non FAT10, ainsi que les cellules HepG2 transfectées par un siARN ciblant ou non FAT10, ont été utilisées : expression en ARNm et protéine de FAT10 par RT-QPCR et Western Blot (A,D), marquage des gouttelettes lipidiques par le Bodipy en Immunofluorescence et quantification (B,E), mesure de la respiration mitochondriale par la technique du seahorse (C,F). Les 3 premières mesures de seahorse correspondent à la respiration basale, les 3 suivants à la fuite des protons suite à l'ajout de l'oligomycine, les 3 suivants à la respiration maximale suite à l'ajout du FCCP, et les 3 derniers à la respiration non mitochondriale suite à l'ajout du mix de roténone/antimycine. OCR : *oxygen consumption rate* ou taux de consommation d'oxygène. Photos prises en x40 au microscope confocal (*spinning disk*). Tests t de Student, tests 2way ANOVA : *** = $p < 0,001$, **** = $p < 0,0001$.

4) Discussion et perspectives

Nos résultats *in vitro* montrent que la surexpression de FAT10 dans les hépatocytes humains entraîne une accumulation excessive de gouttelettes lipidiques, une altération des capacités de respiration mitochondriale, et donc une altération du métabolisme des lipides. Ceci rejoint les observations effectuées *in vivo* chez la souris CDAA et chez les patients atteints de NASH, où la surexpression de FAT10 associée au développement de la pathologie corrèle négativement avec le métabolisme des lipides. Par ailleurs, la diminution de l'expression de FAT10 dans les hépatocytes humains *in vitro* améliore le métabolisme des lipides, rejoignant les résultats obtenus chez les patients atteints de NASH où la diminution de l'expression de FAT10 dans le foie corrèle avec la régression de la pathologie 12 mois après un régime ou une chirurgie bariatrique. FAT10 pourrait donc être responsable de l'aggravation et de la progression des NAFLD vers la NASH, voire vers le HCC d'après les propriétés oncogéniques connues de la protéine, et FAT10 pourrait constituer également une cible thérapeutique potentielle dans le traitement de la NASH.

Le mécanisme d'action de FAT10 sur le métabolisme est encore à élucider. Néanmoins, d'après les résultats obtenus sur la cohorte de patients NASH et sur les foies des souris CDAA, l'expression du récepteur PPAR α corrèle négativement avec celle de FAT10. De plus, de premiers résultats *in vitro* obtenus dans l'équipe ont montré que les protéines FAT10 et PPAR α interagissent entre elles, et que les effets de la diminution de l'expression de FAT10 sur le métabolisme des lipides sont PPAR α -dépendants (données non montrées ici, résultats de thèse de Ludivine Clavreul). L'hypothèse est donc qu'en contexte de NASH, FAT10 se lie à PPAR α dans le but de le dégrader ou d'empêcher son activité, altérant ainsi le métabolisme des lipides dépendant de PPAR α et empêchant son rôle protecteur contre la NASH.

L'étude du rôle de FAT10 dans le développement de la NASH est à poursuivre, notamment par la réalisation d'expérimentations *in vitro* visant à démontrer l'hypothèse du lien FAT10-PPAR α . Egalement, afin d'étudier *in vivo* les effets de la surexpression de FAT10 sur le développement de la NASH, des souris seront injectées à la veine caudale par un AAV (*adeno-associated virus*) ciblant la surexpression de FAT10 spécifiquement dans les hépatocytes, et soumises au régime CDAA supplémenté. De la même manière, afin d'étudier les effets de l'absence de FAT10 sur le développement de la NASH, des souris seront injectées à la veine caudale par un AAV-shARN (AAV-

small hairpin ARN) ciblant la diminution stable de l'expression de FAT10 spécifiquement dans les hépatocytes, et soumises au régime CDAA supplémenté. Les expressions en ARNm et en protéine de FAT10 seront mesurées dans les différents modèles afin de vérifier l'efficacité des AAV (en comparaison des souris injectées par les AAV contrôles) et différents organes seront prélevés pour valider la spécificité des AAV pour les hépatocytes. La toxicité de l'injection sera évaluée par le dosage sanguin des ASAT et ALAT. Les paramètres de la NASH seront évalués (stéatose, inflammation, ballonnement, fibrose), et les taux de triglycérides, de cholestérol et de corps cétoniques sanguins et/ou hépatiques seront mesurés.

D. Conclusion

I. La problématique du diagnostic

La prévalence des NAFLD est en pleine expansion à travers le monde, mais l'une des difficultés reste le diagnostic de la maladie chez les patients NASH. La recherche de biomarqueurs spécifiques est en cours, afin de pouvoir mieux appréhender la présence des NAFLD/NASH et leur sévérité. Les scores NAS et SAF de calcul de cette gravité sont aujourd'hui reconnus, mais sont subjectifs de l'anatomopathologiste et dépendent de la zone du foie prélevée pour la biopsie, ils peuvent alors être minimisés ou exacerbés. Les autres scores existants sont des indicateurs non officiels, dont l'utilisation dépend du médecin, qui sont plus ou moins précis et qui ne permettent pas de diagnostic certain.

Dans le but de mettre au point un test diagnostique non invasif, le projet PrécINASH a été développé par le Professeur François Pattou (UMR1190), dont l'UMR1011 est un partenaire. Grâce aux techniques omics, notamment appliquées à la cohorte lilloise de patients obèses atteints de NASH (cohorte ABOS), de nouveaux biomarqueurs de la NASH pourront être identifiés, et utilisés dans de nouveaux scores de diagnostic et de prédiction de l'évolution de la maladie. La mesure de ces biomarqueurs pourraient alors accompagner la réalisation de la biopsie hépatique afin de confirmer avec certitude le stade de la pathologie, voire à terme remplacer cet acte chirurgical. Le projet PrécINASH vise également à rechercher de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement de la NASH.

II. La NASH : comprendre les mécanismes pour trouver des cibles thérapeutiques

La NASH est une pathologie chronique complexe. Les mécanismes impliqués dans son développement et sa progression sont multiples, mais certaines voies et acteurs déjà connus sont aujourd'hui des cibles thérapeutiques potentielles, étudiées au cours de nombreux essais cliniques.

1) L'efficacité de certaines monothérapies

L'utilisation d'une molécule unique ciblant une voie particulière sera probablement insuffisante pour traiter l'ensemble de la maladie, cependant certains composés

administrés seuls montrent un réel effet dans le traitement de la NASH : en particulier l'agoniste de FXR (OCA), les agonistes des PPAR (Pioglitazone, Saroglitazar, Lanifibranor) ou l'inhibiteur des CCR2/CCR5 (Cenicriviroc), mais aussi l'inhibiteur du MPC (MSDC-0602K), l'analogue FGF21 (Aldafermin), l'inhibiteur du THR β (Resmetiron), l'inhibiteur du SGLT2 (Dapagliglozin), l'agoniste du GLP1R (Sémaglutide), l'inhibiteur de la Galectin-3 (Belapectin) et l'inhibiteur du SCD1 (Aramchol).

Mais certaines molécules pourtant prometteuses lors des premières étapes des études cliniques sont inefficaces contre la NASH lors des essais de phase 3. C'est le cas par exemple du Selonsertib. Il s'agit d'un inhibiteur de l'ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*), un membre de la famille des MAP (*mitogen activated protein*) kinases activé par le stress et l'inflammation, impliqué dans la différenciation cellulaire et l'apoptose, qui joue un rôle dans le diabète, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, la polyarthrite rhumatoïde et le cancer. Les études STELLAR-3 (NCT03053050) et STELLAR-4 (NCT03053063) se sont intéressées aux patients NASH, atteints respectivement de fibrose de stade 3, ou de fibrose compensée et de fibrose de stade 4. Pour ces études, l'objectif principal d'amélioration de la fibrose sans aggravation de la NASH grâce au traitement par le Selonsertib n'a pas été atteint (Harrison *et al.*, 2020b). Egalement, malgré des résultats encourageants de phase 2, l'Elafibranor (agoniste de PPAR α) n'a pas réussi à atteindre son objectif en phase 3 de résolution de la NASH sans aggravation de la fibrose. Cet échec pourrait cependant être dû à une dose insuffisante d'Elafibranor administrée aux patients, ce qui pourrait faire l'objet d'un nouvel essai clinique.

2) Les possibilités d'association de molécules

Les échecs des monothérapies justifient d'autant plus l'intérêt porté à la combinaison de plusieurs molécules dans le traitement de la NASH, dont les cibles et les propriétés pharmacologiques seraient différentes. Ainsi, les associations Tropifexor/Cenicriviroc (agoniste FXR/anti-viral) ou Sémaglutide/Cilofexor/Firsocostat (incrétino-mimétique/agoniste FXR/inhibiteur acétyl-coA carboxylase) par exemple ont montré des résultats encourageants dans le traitement de la NASH. A l'avenir, d'autres combinaisons de médicaments validés en monothérapie et ciblant différents paramètres de la maladie seront aussi à étudier chez les patients NASH.

Malgré tout, certaines combinaisons de molécules peuvent échouer : l'étude ATLAS de phase 2b (NCT03449446) s'est intéressée à l'administration simultanée du Selonsertib (inhibiteur ASK1), du Firsocostat (inhibiteur acétyl-CoA carboxylase) et du Cilofexor (agoniste FXR) chez les patients NASH atteints de fibrose avancée, mais l'objectif de résolution de la NASH sans aggravation de la fibrose n'a pas été atteint.

3) D'autres pistes thérapeutiques à suivre

Ainsi, d'autres pistes mécanistiques connues sont encore à cibler dans le but de traiter les différentes propriétés de la NASH.

Afin d'améliorer l'efficacité des règles hygiéno-diététiques, les médicaments actuellement utilisés contre l'obésité pourraient être testés chez les patients NAFLD/NASH, de la même manière que l'a été l'Orlistat. Ainsi, l'administration de Bupropion/Naltrexone, de Phentermine/Topiramate, de Phentermine seule ou de Lorcaserin, connus pour faciliter la perte de poids, pourrait être étudiée dans un contexte de NASH (Polyzos *et al.*, 2020).

Egalement, une piste pourrait être de cibler les modifications génétiques et épigénétiques, du fait de leur implication dans le développement de la maladie. Un premier médicament inhibiteur du PNPLA3, l'AZD2693, est d'ailleurs en cours d'étude chez les patients portant la mutation à risque 148M.

En parallèle, l'utilisation des miARN en thérapeutique est à envisager, car ils permettent de cibler plusieurs gènes et de moduler différentes voies métaboliques de manière simultanée. Des analogues miARN ou des anti-miARN sont par exemple en cours d'étude de phases 1 et 2 dans le traitement de l'hépatite C, des cancers ou des maladies cardiovasculaires et métaboliques (Su *et al.*, 2018). Concernant le traitement de la NASH, une étude portant sur le RG-125, un anti-miR-103/107 (AZD4076), a montré une amélioration de la sensibilité à l'insuline et de la tolérance au glucose, mais également une diminution du contenu en triglycérides et de la stéatose (Trajkovski *et al.*, 2011). Une étude de phase 1/2a est en cours pour tester l'effet de cette molécule sur des patients diabétiques atteints de NAFLD. Cependant, cette technologie comporte de nombreuses difficultés qui peuvent freiner son utilisation : il faut réussir à atteindre le tissu cible, éviter les *off-target* (fixation du miARN sur un site non voulu), assurer une stabilité du miARN et empêcher une réponse immunitaire innée (Hong & Nam, 2014).

4) La piste de la protéine FAT10

D'autres mécanismes de développement et de progression de la NASH restent à découvrir, et pourront amener de nouvelles pistes thérapeutiques. Dans ce but, notre équipe de recherche s'est intéressée à la protéine FAT10. Comme l'ont montré les premiers résultats, FAT10 est associée au développement de la NASH et à sa gravité, et agit de manière délétère sur l'expression de PPAR α et sur le métabolisme des lipides. D'autres résultats de l'équipe ont révélé une interaction physique entre les protéines FAT10 et PPAR α , et ont montré que les effets *in vitro* observés (sur l'accumulation des gouttelettes lipidiques et sur la respiration mitochondriale) étaient dépendant de PPAR α . Ainsi, en plus de diminuer l'expression de PPAR α , la surexpression de FAT10 au cours de la NASH pourrait être responsable d'une altération du récepteur et de son activité sur le métabolisme des lipides, et participer à la progression de la maladie. Potentiellement, cet effet pourrait expliquer l'échec de l'Elafibranor : l'activité du récepteur PPAR α étant altérée par FAT10, l'agoniste double ne peut réussir à l'activer, et l'activation seule de PPAR δ est insuffisante pour agir contre la NASH. Un projet de *screening* est en cours au sein de l'équipe, afin de trouver une molécule capable d'empêcher l'action de FAT10 sur l'activité de PPAR α . L'utilisation de cette molécule en co-administration avec un agoniste PPAR α pourrait éventuellement potentialiser l'effet bénéfique de l'agoniste, et correspondre à un nouveau médicament dans le traitement de la NASH.

E. Bibliographie

Abdelmalek MF, Charles ED, Sanyal AJ, Harrison SA, Neuschwander-Tetri BA, Goodman Z, et al. The FALCON program: Two phase 2b randomized, double-blind, placebo-controlled studies to assess the efficacy and safety of pegbelfermin in the treatment of patients with nonalcoholic steatohepatitis and bridging fibrosis or compensated cirrhosis. *Contemp Clin Trials*. mai 2021;104:106335.

Abdel-Razik A, Mousa N, Shabana W, Refaey M, Elzehery R, Elhelaly R, et al. Rifaximin in nonalcoholic fatty liver disease: hit multiple targets with a single shot. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. oct 2018;30(10):1237-46.

Aichem A, Groettrup M. The ubiquitin-like modifier FAT10 in cancer development. *Int J Biochem Cell Biol*. oct 2016;79:451-61.

Aichem A, Pelzer C, Lukasiak S, Kalveram B, Sheppard PW, Rani N, et al. USE1 is a bispecific conjugating enzyme for ubiquitin and FAT10, which FAT10ylates itself in cis. *Nat Commun*. 4 mai 2010;1:13.

Aithal GP, Thomas JA, Kaye PV, Lawson A, Ryder SD, Spendlove I, et al. Randomized, placebo-controlled trial of pioglitazone in nondiabetic subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*. oct 2008;135(4):1176-84.

Al-Busafi SA, Bhat M, Wong P, Ghali P, Deschenes M. Antioxidant therapy in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepat Res Treat*. 2012;2012:947575.

Alonso C, Fernández-Ramos D, Varela-Rey M, Martínez-Arranz I, Navasa N, Van Liempd SM, et al. Metabolomic Identification of Subtypes of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*. mai 2017;152(6):1449-1461.e7.

Al-Serri A, Anstee QM, Valenti L, Nobili V, Leathart JBS, Dongiovanni P, et al. The SOD2 C47T polymorphism influences NAFLD fibrosis severity: evidence from case-control and intra-familial allele association studies. *J Hepatol*. févr 2012;56(2):448-54.

Anderson EL, Howe LD, Jones HE, Higgins JPT, Lawlor DA, Fraser A. The Prevalence of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Children and Adolescents: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2015;10(10):e0140908.

Anstee QM, Reeves HL, Kotsiliti E, Govaere O, Heikenwalder M. From NASH to HCC: current concepts and future challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. juill 2019;16(7):411-28.

Armstrong MJ, Gaunt P, Aithal GP, Barton D, Hull D, Parker R, et al. Liraglutide safety and efficacy in patients with non-alcoholic steatohepatitis (LEAN): a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet Lond Engl*. 13 févr 2016;387(10019):679-90.

Ashraf NU, Altaf M. Epigenetics: An emerging field in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Mutat Res Rev Mutat Res*. déc 2018;778:1-12.

Assy N, Hussein O, Abassi Z. Weight loss induced by orlistat reverses fatty infiltration and improves hepatic fibrosis in obese patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Gut*. mars 2007;56(3):443-4.

Athyros VG, Alexandrides TK, Bilianou H, Cholongitas E, Doumas M, Ganotakis ES, et al. The use of statins alone, or in combination with pioglitazone and other drugs, for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis and related cardiovascular risk. An Expert Panel Statement. *Metabolism*. juin 2017;71:17-32.

Athyros VG, Tziomalos K, Gossios TD, Griva T, Anagnostis P, Kargiotis K, et al. Safety and efficacy of long-term statin treatment for cardiovascular events in patients with coronary heart disease and abnormal liver tests in the Greek Atorvastatin and Coronary Heart Disease Evaluation (GREACE) Study: a post-hoc analysis. *Lancet Lond Engl*. 4 déc 2010;376(9756):1916-22.

Baruch A, Wong C, Chinn LW, Vaze A, Sonoda J, Gelzleichter T, et al. Antibody-mediated activation of the FGFR1/Klotho β complex corrects metabolic dysfunction and alters food preference in obese humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 17 nov 2020;117(46):28992-9000.

Basler M, Buerger S, Groettrup M. The ubiquitin-like modifier FAT10 in antigen processing and antimicrobial defense. *Mol Immunol*. déc 2015;68(2 Pt A):129-32.

BasuRay S, Smagris E, Cohen JC, Hobbs HH. The PNPLA3 variant associated with fatty liver disease (I148M) accumulates on lipid droplets by evading ubiquitylation. *Hepatology* Baltim Md. oct 2017;66(4):1111-24.

Bedossa P. Diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: Why liver biopsy is essential. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver*. févr 2018;38 Suppl 1:64-6.

Belfort R, Harrison SA, Brown K, Darland C, Finch J, Hardies J, et al. A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med*. 30 nov 2006;355(22):2297-307.

Bialas J, Boehm AN, Catone N, Aichele A, Groettrup M. The ubiquitin-like modifier FAT10 stimulates the activity of deubiquitylating enzyme OTUB1. *J Biol Chem*. mars 2019;294(12):4315-30.

Blaut M. Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. *Eur J Nutr*. nov 2002;41 Suppl 1:111-16.

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.

Bugianesi E, Gastaldelli A, Vanni E, Gambino R, Cassader M, Baldi S, et al. Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. *Diabetologia*. avr 2005;48(4):634-42.

Burra P, Becchetti C, Germani G. NAFLD and liver transplantation: Disease burden, current management and future challenges. *JHEP Rep Innov Hepatol*. déc 2020;2(6):100192.

Caligiuri A, Gentilini A, Marra F. Molecular Pathogenesis of NASH. *Int J Mol Sci*. 20 sept 2016;17(9):E1575.

Canaan A, DeFuria J, Perelman E, Schultz V, Seay M, Tuck D, et al. Extended lifespan and reduced adiposity in mice lacking the FAT10 gene. *Proc Natl Acad Sci*. 8 avr 2014;111(14):5313-8.

Cano PG, Santacruz A, Trejo FM, Sanz Y. Bifidobacterium CECT 7765 improves metabolic and immunological alterations associated with obesity in high-fat diet-fed mice. *Obes Silver Spring Md*. nov 2013;21(11):2310-21.

Cariello M, Piccinin E, Moschetta A. Transcriptional Regulation of Metabolic Pathways via Lipid-Sensing Nuclear Receptors PPARs, FXR, and LXR in NASH. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2021;11(5):1519-39.

Cariou B, Hanf R, Lambert-Porcheron S, Zaïr Y, Sauvinet V, Noël B, et al. Dual peroxisome proliferator-activated receptor α/δ agonist GFT505 improves hepatic and peripheral insulin sensitivity in abdominally obese subjects. *Diabetes Care*. oct 2013;36(10):2923-30.

Caron S, Huaman Samanez C, Dehondt H, Ploton M, Briand O, Lien F, et al. Farnesoid X receptor inhibits the transcriptional activity of carbohydrate response element binding protein in human hepatocytes. *Mol Cell Biol*. juin 2013;33(11):2202-11.

Cermelli S, Ruggieri A, Marrero JA, Ioannou GN, Beretta L. Circulating microRNAs in patients with chronic hepatitis C and non-alcoholic fatty liver disease. *PloS One*. 2011;6(8):e23937.

Chalasanani N, Abdelmalek MF, Garcia-Tsao G, Vuppalanchi R, Alkhoury N, Rinella M, et al. Effects of Belapectin, an Inhibitor of Galectin-3, in Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis With Cirrhosis and Portal Hypertension. *Gastroenterology*. avr 2020;158(5):1334-1345.e5.

Chalasanani 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* Baltim Md. janv 2018;67(1):328-57.

Chen Z, Zhang W, Yun Z, Zhang X, Gong F, Wang Y, et al. Ubiquitin-like protein FAT10 regulates DNA damage repair via modification of proliferating cell nuclear antigen. *Mol Med Rep [Internet]*. 5 avr 2018 [cité 29 déc 2021]; Disponible sur: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2018.8843>

Cheung O, Puri P, Eicken C, Contos MJ, Mirshahi F, Maher JW, et al. Nonalcoholic steatohepatitis is associated with altered hepatic MicroRNA expression. *Hepatology* Baltim Md. déc 2008;48(6):1810-20.

Choi Y, Kim JK, Yoo J-Y. NF κ B and STAT3 synergistically activate the expression of FAT10, a gene counteracting the tumor suppressor p53. *Mol Oncol*. mai 2014;8(3):642-55.

Cusi K, Bril F, Barb D, Polidori D, Sha S, Ghosh A, et al. Effect of canagliflozin treatment on hepatic triglyceride content and glucose metabolism in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* avr 2019;21(4):812-21.

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.

da Silva RP, Kelly KB, Al Rajabi A, Jacobs RL. Novel insights on interactions between folate and lipid metabolism. *BioFactors Oxf Engl.* juin 2014;40(3):277-83.

Dali-Youcef N, Vix M, Costantino F, El-Saghire H, Lhermitte B, Callari C, et al. Interleukin-32 Contributes to Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Insulin Resistance. *Hepatol Commun.* sept 2019;3(9):1205-20.

Denzer C, Thiere D, Muche R, Koenig W, Mayer H, Kratzer W, et al. Gender-specific prevalences of fatty liver in obese children and adolescents: roles of body fat distribution, sex steroids, and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* oct 2009;94(10):3872-81.

Donati B, Dongiovanni P, Romeo S, Meroni M, McCain M, Miele L, et al. MBOAT7 rs641738 variant and hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic individuals. *Sci Rep.* 3 juill 2017;7(1):4492.

Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest.* mai 2005;115(5):1343-51.

Duarte SMB, Stefano JT, Oliveira CP. Microbiota and nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis (NAFLD/NASH). *Ann Hepatol.* juin 2019;18(3):416-21.

Eguchi Y, Kitajima Y, Hyogo H, Takahashi H, Kojima M, Ono M, et al. Pilot study of liraglutide effects in non-alcoholic steatohepatitis and non-alcoholic fatty liver disease with glucose intolerance in Japanese patients (LEAN-J). *Hepatol Res Off J Jpn Soc Hepatol.* mars 2015;45(3):269-78.

Eslam M, Valenti L, Romeo S. Genetics and epigenetics of NAFLD and NASH: Clinical impact. *J Hepatol.* févr 2018;68(2):268-79.

Farzanegi P, Dana A, Ebrahimpour Z, Asadi M, Azarbayjani MA. Mechanisms of beneficial effects of exercise training on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): Roles of oxidative stress and inflammation. *Eur J Sport Sci.* août 2019;19(7):994-1003.

Feng D, Liu T, Sun Z, Bugge A, Mullican SE, Alenghat T, et al. A circadian rhythm orchestrated by histone deacetylase 3 controls hepatic lipid metabolism. *Science.* 11 mars 2011;331(6022):1315-9.

Filippatos TD, Derdemezis CS, Gazi IF, Nakou ES, Mikhailidis DP, Elisaf MS. Orlistat-associated adverse effects and drug interactions: a critical review. *Drug Saf.* 2008;31(1):53-65.

Fraile JM, Palliyil S, Barelle C, Porter AJ, Kovaleva M. Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH) - A Review of a Crowded Clinical Landscape, Driven by a Complex Disease. *Drug Des Devel Ther.* 2021;15:3997-4009.

Francque S, Verrijken A, Caron S, Prawitt J, Paumelle R, Derudas B, et al. PPAR α gene expression correlates with severity and histological treatment response in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol.* juill 2015;63(1):164-73.

Francque SM, Bedossa P, Ratziu V, Anstee QM, Bugianesi E, Sanyal AJ, et al. A Randomized, Controlled Trial of the Pan-PPAR Agonist Lanifibranor in NASH. *N Engl J Med.* 21 oct 2021;385(17):1547-58.

Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology.* mai 2008;134(6):1655-69.

Fu S, Yang L, Li P, Hofmann O, Dicker L, Hide W, et al. Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity. *Nature.* 26 mai 2011;473(7348):528-31.

Gawrieh S, Nouredin M, Loo N, Mohseni R, Awasty V, Cusi K, et al. Saroglitazar, a PPAR- α/γ Agonist, for Treatment of NAFLD: A Randomized Controlled Double-Blind Phase 2 Trial. *Hepatol Baltim Md.* oct 2021;74(4):1809-24.

Gong P, Cnaan A, Wang B, Leventhal J, Snyder A, Nair V, et al. The Ubiquitin-Like Protein FAT10 Mediates NF- κ B Activation. *J Am Soc Nephrol.* févr 2010;21(2):316-26.

Gudkov AV, Gurova KV, Komarova EA. Inflammation and p53: A Tale of Two Stresses. *Genes Cancer.* avr 2011;2(4):503-16.

Guerrero R, Vega GL, Grundy SM, Browning JD. Ethnic differences in hepatic steatosis: an insulin resistance paradox? *Hepatology* Baltimore Md. mars 2009;49(3):791-801.

Haas JT, Francque S, Staels B. Pathophysiology and Mechanisms of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Annu Rev Physiol*. 2016;78:181-205.

Hagström H, Stål P, Hultcrantz R, Hemmingsson T, Andreasson A. Overweight in late adolescence predicts development of severe liver disease later in life: A 39years follow-up study. *J Hepatol*. août 2016;65(2):363-8.

Halimi, Médecine des maladies Métaboliques - Décembre 2019 - Vol. 13 - N°8

Hannah WN, Harrison SA. Effect of Weight Loss, Diet, Exercise, and Bariatric Surgery on Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Liver Dis*. mai 2016;20(2):339-50.

Harrison SA, Alkhoury 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 2020a;72(4):613-26.

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.

Harrison SA, Fecht W, Brunt EM, Neuschwander-Tetri BA. Orlistat for overweight subjects with nonalcoholic steatohepatitis: A randomized, prospective trial. *Hepatology* Baltimore Md. janv 2009;49(1):80-6.

Harrison SA, Ruane PJ, Freilich BL, Neff G, Patil R, Behling CA, et al. Efruxifermin in non-alcoholic steatohepatitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 2a trial. *Nat Med*. juill 2021;27(7):1262-71.

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 2020b;73(1):26-39.

Helmy A. Endocannabinoids and non-alcoholic steatohepatitis. *Saudi J Gastroenterol Off J Saudi Gastroenterol Assoc*. mars 2006;12(1):36-7.

Henriksson E, Andersen B. FGF19 and FGF21 for the Treatment of NASH-Two Sides of the Same Coin? Differential and Overlapping Effects of FGF19 and FGF21 From Mice to Human. *Front Endocrinol*. 2020;11:601349.

Hipp MS, Kalveram B, Raasi S, Groettrup M, Schmidtke G. FAT10, a Ubiquitin-Independent Signal for Proteasomal Degradation. *Mol Cell Biol*. mai 2005;25(9):3483-91.

Hong CA, Nam YS. Functional nanostructures for effective delivery of small interfering RNA therapeutics. *Theranostics*. 2014;4(12):1211-32.

Hsu S-H, Wang B, Kota J, Yu J, Costinean S, Kutay H, et al. Essential metabolic, anti-inflammatory, and anti-tumorigenic functions of miR-122 in liver. *J Clin Invest*. août 2012;122(8):2871-83.

Hung, S.-C., Lai, S.-W., Chen, M.-C., Li, P.-C. & Lin, K.-C. Prevalence and related factors of non-alcoholic fatty liver disease among the elderly in Taiwan. *Eur. Geriatr. Med*. 4, 78–81 (2013).

Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest*. mars 2007;117(3):539-48.

Ito D, Shimizu S, Inoue K, Saito D, Yanagisawa M, Inukai K, et al. Comparison of Ipragliflozin and Pioglitazone Effects on Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Patients With Type 2 Diabetes: A Randomized, 24-Week, Open-Label, Active-Controlled Trial. *Diabetes Care*. oct 2017;40(10):1364-72.

Kalveram B, Schmidtke G, Groettrup M. The ubiquitin-like modifier FAT10 interacts with HDAC6 and localizes to aggresomes under proteasome inhibition. *J Cell Sci*. 15 déc 2008;121(24):4079-88.

Kharitonov A, Shiyanova TL, Koester A, Ford AM, Micanovic R, Galbreath EJ, et al. FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest*. juin 2005;115(6):1627-35.

Kobyliak N, Abenavoli L, Falalyeyeva T, Mykhalchyshyn G, Boccuto L, Kononenko L, et al. Beneficial effects of probiotic combination with omega-3 fatty acids in NAFLD: a randomized clinical study. *Minerva Med*. déc 2018b;109(6):418-28.

Kobyliak N, Abenavoli L, Mykhalchyshyn G, Kononenko L, Boccuto L, Kyriienko D, et al. A Multi-strain Probiotic Reduces the Fatty Liver Index, Cytokines and Aminotransferase levels in NAFLD Patients: Evidence from a Randomized Clinical Trial. *J Gastrointest Liver Dis JGLD*. mars 2018a;27(1):41-9.

Koliaki C, Szendroedi J, Kaul K, Jelenik T, Nowotny P, Jankowiak F, et al. Adaptation of hepatic mitochondrial function in humans with non-alcoholic fatty liver is lost in steatohepatitis. *Cell Metab.* 5 mai 2015;21(5):739-46.

Koukias N, Buzzetti E, Tsochatzis EA. Intestinal hormones, gut microbiota and non-alcoholic fatty liver disease. *Minerva Endocrinol.* juin 2017;42(2):184-94.

Kuchay MS, Krishan S, Mishra SK, Farooqui KJ, Singh MK, Wasir JS, et al. Effect of Empagliflozin on Liver Fat in Patients With Type 2 Diabetes and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Randomized Controlled Trial (E-LIFT Trial). *Diabetes Care.* août 2018;41(8):1801-8.

Lacroix M, Linares LK, Le Cam L. [Role of the p53 tumor suppressor in metabolism]. *Med Sci MS.* déc 2013;29(12):1125-30.

Lavine JE, Schwimmer JB, Van Natta ML, Molleston JP, Murray KF, Rosenthal P, et al. Effect of vitamin E or metformin for treatment of nonalcoholic fatty liver disease in children and adolescents: the TONIC randomized controlled trial. *JAMA.* 27 avr 2011;305(16):1659-68.

Lefebvre E, Moyle G, Reshef R, Richman LP, Thompson M, Hong F, et al. Antifibrotic Effects of the Dual CCR2/CCR5 Antagonist Ceniciviroc in Animal Models of Liver and Kidney Fibrosis. *PloS One.* 2016;11(6):e0158156.

Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev.* janv 2009;89(1):147-91.

Leng L, Xu C, Wei C, Zhang J, Liu B, Ma J, et al. A proteomics strategy for the identification of FAT10-modified sites by mass spectrometry. *J Proteome Res.* 3 janv 2014;13(1):268-76.

Li T, Francl JM, Boehme S, Chiang JYL. Regulation of cholesterol and bile acid homeostasis by the cholesterol 7 α -hydroxylase/steroid response element-binding protein 2/microRNA-33a axis in mice. *Hepatology.* sept 2013;58(3):1111-21.

Liu X, Chen L, Ge J, Yan C, Huang Z, Hu J, et al. The Ubiquitin-like Protein FAT10 Stabilizes eEF1A1 Expression to Promote Tumor Proliferation in a Complex Manner. *Cancer Res.* 15 août 2016;76(16):4897-907.

Liu Y-C, Pan J, Zhang C, Fan W, Collinge M, Bender JR, et al. A MHC-encoded ubiquitin-like protein (FAT10) binds noncovalently to the spindle assembly checkpoint protein MAD2. *Proc Natl Acad Sci.* 13 avr 1999;96(8):4313-8.

Loomba R, Morgan E, Watts L, Xia S, Hannan LA, Geary RS, et al. Novel antisense inhibition of diacylglycerol O-acyltransferase 2 for treatment of non-alcoholic fatty liver disease: a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* sept 2020;5(9):829-38.

Loomba R, Nouredin M, Kowdley KV, Kohli A, Sheikh A, Neff G, et al. Combination Therapies Including Cilofexor and Firsocostat for Bridging Fibrosis and Cirrhosis Attributable to NASH. *Hepatology.* févr 2021;73(2):625-43.

Loomba R, Seguritan V, Li W, Long T, Klitgord N, Bhatt A, et al. Gut Microbiome-Based Metagenomic Signature for Non-invasive Detection of Advanced Fibrosis in Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Cell Metab.* 2 mai 2017;25(5):1054-1062.e5.

Loyer X, Paradis V, Hénique C, Vion A-C, Colnot N, Guerin CL, et al. Liver microRNA-21 is overexpressed in non-alcoholic steatohepatitis and contributes to the disease in experimental models by inhibiting PPAR α expression. *Gut.* nov 2016;65(11):1882-94.

Lukasiak S, Schiller C, Oehlschlaeger P, Schmidtke G, Krause P, Legler DF, et al. Proinflammatory cytokines cause FAT10 upregulation in cancers of liver and colon. *Oncogene.* 9 oct 2008;27(46):6068-74.

Malaguarnera M, Vacante M, Antic T, Giordano M, Chisari G, Acquaviva R, et al. Bifidobacterium longum with fructo-oligosaccharides in patients with non alcoholic steatohepatitis. *Dig Dis Sci.* févr 2012;57(2):545-53.

Mancina RM, Dongiovanni P, Petta S, Pingitore P, Meroni M, Rametta R, et al. The MBOAT7-TMC4 Variant rs641738 Increases Risk of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Individuals of European Descent. *Gastroenterology.* mai 2016;150(5):1219-1230.e6.

Miyazaki M, Flowers MT, Sampath H, Chu K, Otselberger C, Liu X, et al. Hepatic stearyl-CoA desaturase-1 deficiency protects mice from carbohydrate-induced adiposity and hepatic steatosis. *Cell Metab.* déc 2007;6(6):484-96.

Molchadsky A, Ezra O, Amendola PG, Krantz D, Kogan-Sakin I, Buganim Y, et al. p53 is required for brown adipogenic differentiation and has a protective role against diet-induced obesity. *Cell Death Differ.* mai 2013;20(5):774-83.

Murphy SK, Yang H, Moylan CA, Pang H, Dellinger A, Abdelmalek MF, et al. Relationship between methylome and transcriptome in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* nov 2013;145(5):1076-87.

Nagashimada M, Ota T. Role of vitamin E in nonalcoholic fatty liver disease. *IUBMB Life.* avr 2019;71(4):516-22.

Nakajima A, Eguchi Y, Yoneda M, Imajo K, Tamaki N, Suganami H, et al. Randomised clinical trial: Pemafibrate, a novel selective peroxisome proliferator-activated receptor α modulator (SPPARM α), versus placebo in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther.* nov 2021;54(10):1263-77.

Nawrot M, Peschard S, Lestavel S, Staels B. Intestine-liver crosstalk in Type 2 Diabetes and non-alcoholic fatty liver disease. *Metabolism.* oct 2021;123:154844.

Nelson JE, Wilson L, Brunt EM, Yeh MM, Kleiner DE, Unalp-Arida A, et al. Relationship between the pattern of hepatic iron deposition and histological severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology Baltim Md.* févr 2011;53(2):448-57.

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.

Newsome PN, Buchholtz K, Cusi K, Linder M, Okanoue T, Ratziu V, et al. A Placebo-Controlled Trial of Subcutaneous Semaglutide in Nonalcoholic Steatohepatitis. *N Engl J Med.* 25 mars 2021;384(12):1113-24.

Ohki T, Isogawa A, Toda N, Tagawa K. Effectiveness of Ipragliflozin, a Sodium-Glucose Co-transporter 2 Inhibitor, as a Second-line Treatment for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Patients with Type 2 Diabetes Mellitus Who Do Not Respond to Incretin-Based Therapies Including Glucagon-like Peptide-1 Analogs and Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitors. *Clin Drug Investig.* avr 2016;36(4):313-9.

Okanoue T, Sakamoto M, Harada K, Inagaki M, Totsuka N, Hashimoto G, et al. Efficacy and safety of aparesone (MT-3995) in patients with nonalcoholic steatohepatitis: A randomized controlled study. *Hepatology Res Off J Jpn Soc Hepatol.* sept 2021;51(9):943-56.

Orešič M, Hyötyläinen T, Kotronen A, Gopalacharyulu P, Nygren H, Arola J, et al. Prediction of non-alcoholic fatty-liver disease and liver fat content by serum molecular lipids. *Diabetologia.* oct 2013;56(10):2266-74.

Overi D, Carpino G, Franchitto A, Onori P, Gaudio E. Hepatocyte Injury and Hepatic Stem Cell Niche in the Progression of Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Cells.* 2 mars 2020;9(3):E590.

Pan J-J, Fallon MB. Gender and racial differences in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol.* 27 mai 2014;6(5):274-83.

Papatheodoridi A-M, Chrysavgis L, Koutsilieris M, Chatzigeorgiou A. The Role of Senescence in the Development of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Progression to Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology Baltim Md.* janv 2020;71(1):363-74.

Pawlak M, Baugé E, Bourguet W, De Bosscher K, Lalloyer F, Tailleux A, et al. The transrepressive activity of peroxisome proliferator-activated receptor alpha is necessary and sufficient to prevent liver fibrosis in mice. *Hepatology Baltim Md.* nov 2014;60(5):1593-606.

Pawlak M, Lefebvre P, Staels B. Molecular mechanism of PPAR α action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* mars 2015;62(3):720-33.

Pedrosa M, Seyedkazemi S, Francque S, Sanyal A, Rinella M, Charlton M, et al. A randomized, double-blind, multicenter, phase 2b study to evaluate the safety and efficacy of a combination of

tropifexor and cenicriviroc in patients with nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis: Study design of the TANDEM trial. *Contemp Clin Trials*. janv 2020;88:105889.

Perdomo CM, Frühbeck G, Escalada J. Impact of Nutritional Changes on Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrients*. 21 mars 2019;11(3):E677.

Petta S, Valenti L, Marra F, Grimaudo S, Tripodo C, Bugianesi E, et al. MERTK rs4374383 polymorphism affects the severity of fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. mars 2016;64(3):682-90.

Pirola CJ, Gianotti TF, Burgueño AL, Rey-Funes M, Loidl CF, Mallardi P, et al. Epigenetic modification of liver mitochondrial DNA is associated with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Gut*. sept 2013;62(9):1356-63.

Pockros PJ, Fuchs M, Freilich B, Schiff E, Kohli A, Lawitz EJ, et al. CONTROL: A randomized phase 2 study of obeticholic acid and atorvastatin on lipoproteins in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver*. nov 2019;39(11):2082-93.

Polyzos SA, Kountouras J, Mantzoros CS. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. *Metabolism*. mars 2019;92:82-97.

Polyzos SA, Kountouras J, Zafeiriadou E, Patsiaoura K, Katsiki E, Deretzi G, et al. Effect of spironolactone and vitamin E on serum metabolic parameters and insulin resistance in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst JRAAS*. déc 2011;12(4):498-503.

Porez G, Prawitt J, Gross B, Staels B. Bile acid receptors as targets for the treatment of dyslipidemia and cardiovascular disease. *J Lipid Res*. sept 2012;53(9):1723-37.

Purushotham A, Schug TT, Xu Q, Surapureddi S, Guo X, Li X. Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation. *Cell Metab*. avr 2009;9(4):327-38.

Raasi S, Schmidtke G, de Giuli R, Groettrup M. A ubiquitin-like protein which is synergistically inducible by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Immunol*. déc 1999;29(12):4030-6.

Ratziu V, de Guevara L, Safadi R, Poordad F, Fuster F, Flores-Figueroa J, et al. Aramchol in patients with nonalcoholic steatohepatitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2b trial. *Nat Med*. oct 2021;27(10):1825-35.

Ratziu V, Harrison SA, Francque S, Bedossa P, Leheret 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.

Ratziu V, Sanyal A, Harrison SA, Wong VW-S, Francque S, Goodman Z, et al. Cenicriviroc Treatment for Adults With Nonalcoholic Steatohepatitis and Fibrosis: Final Analysis of the Phase 2b CENTAUR Study. *Hepatol Baltim Md*. sept 2020;72(3):892-905.

Régnier M, Polizzi A, Smati S, Lukowicz C, Fougerat A, Lippi Y, et al. Hepatocyte-specific deletion of Ppar α promotes NAFLD in the context of obesity. *Sci Rep*. 16 avr 2020;10(1):6489.

Rigano D, Sirignano C, Tagliatela-Scafati O. The potential of natural products for targeting PPAR α . *Acta Pharm Sin B*. juill 2017;7(4):427-38.

Saeed N, Glass L, Sharma P, Shannon C, Sonnenday CJ, Tincopa MA. Incidence and Risks for Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Steatohepatitis Post-liver Transplant: Systematic Review and Meta-analysis. *Transplantation*. nov 2019;103(11):e345-54.

Sahebkar A, Chew GT, Watts GF. New peroxisome proliferator-activated receptor agonists: potential treatments for atherogenic dyslipidemia and non-alcoholic fatty liver disease. *Expert Opin Pharmacother*. mars 2014;15(4):493-503.

Saleem A, Adhietty PJ, Hood DA. Role of p53 in mitochondrial biogenesis and apoptosis in skeletal muscle. *Physiol Genomics*. 3 mars 2009;37(1):58-66.

Santoro N, Zhang CK, Zhao H, Pakstis AJ, Kim G, Kursawe R, et al. Variant in the glucokinase regulatory protein (GCKR) gene is associated with fatty liver in obese children and adolescents. *Hepatol Baltim Md*. mars 2012;55(3):781-9.

Sanyal A, Charles ED, Neuschwander-Tetri BA, Loomba R, Harrison SA, Abdelmalek MF, et al. Pegbelfermin (BMS-986036), a PEGylated fibroblast growth factor 21 analogue, in patients with non-alcoholic steatohepatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2a trial. *Lancet Lond Engl*. 22 déc 2019;392(10165):2705-17.

Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, McCullough A, Diehl AM, Bass NM, et al. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med.* 6 mai 2010;362(18):1675-85.

Sarkar MA, Suzuki A, Abdelmalek MF, Yates KP, Wilson LA, Bass NM, et al. Testosterone is Associated With Nonalcoholic Steatohepatitis and Fibrosis in Premenopausal Women With NAFLD. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc.* juin 2021;19(6):1267-1274.e1.

Sathanarayanan P, Jogi M, Muthupillai R, Krishnamurthy R, Samson SL, Bajaj M. Effects of combined exenatide and pioglitazone therapy on hepatic fat content in type 2 diabetes. *Obes Silver Spring Md.* déc 2011;19(12):2310-5.

Schwimmer JB, Celedon MA, Lavine JE, Salem R, Campbell N, Schork NJ, et al. Heritability of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* mai 2009;136(5):1585-92.

Segal-Salto M, Barashi N, Katav A, Edelshtein V, Aharon A, Hashmueli S, et al. A blocking monoclonal antibody to CCL24 alleviates liver fibrosis and inflammation in experimental models of liver damage. *JHEP Rep Innov Hepatol.* févr 2020;2(1):100064.

Seko Y, Sumida Y, Sasaki K, Itoh Y, Iijima H, Hashimoto T, et al. Effects of canagliflozin, an SGLT2 inhibitor, on hepatic function in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus: pooled and subgroup analyses of clinical trials. *J Gastroenterol.* janv 2018;53(1):140-51.

Sen N, Satija YK, Das S. PGC-1 α , a key modulator of p53, promotes cell survival upon metabolic stress. *Mol Cell.* 18 nov 2011;44(4):621-34.

Shao N, Kuang HY, Hao M, Gao XY, Lin WJ, Zou W. Benefits of exenatide on obesity and non-alcoholic fatty liver disease with elevated liver enzymes in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* sept 2014;30(6):521-9.

Shibuya T, Fushimi N, Kawai M, Yoshida Y, Hachiya H, Ito S, et al. Luseogliflozin improves liver fat deposition compared to metformin in type 2 diabetes patients with non-alcoholic fatty liver disease: A prospective randomized controlled pilot study. *Diabetes Obes Metab.* févr 2018;20(2):438-42.

Shimizu M, Suzuki K, Kato K, Jojima T, Iijima T, Murohisa T, et al. Evaluation of the effects of dapagliflozin, a sodium-glucose co-transporter-2 inhibitor, on hepatic steatosis and fibrosis using transient elastography in patients with type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Obes Metab.* févr 2019;21(2):285-92.

Soccio RE, Chen ER, Lazar MA. Thiazolidinediones and the promise of insulin sensitization in type 2 diabetes. *Cell Metab.* 7 oct 2014;20(4):573-91.

Staels B, Rubenstrunk A, Noel B, Rigou G, Delataille P, Millatt LJ, et al. Hepatoprotective effects of the dual peroxisome proliferator-activated receptor α/δ agonist, GFT505, in rodent models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol Baltim Md.* déc 2013;58(6):1941-52.

Su Q, Kumar V, Sud N, Mahato RI. MicroRNAs in the pathogenesis and treatment of progressive liver injury in NAFLD and liver fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev.* avr 2018;129:54-63.

Sun Z, Miller RA, Patel RT, Chen J, Dhir R, Wang H, et al. Hepatic Hdac3 promotes gluconeogenesis by repressing lipid synthesis and sequestration. *Nat Med.* juin 2012;18(6):934-42.

Sutton A, Khoury H, Prip-Buus C, Capanec C, Pessayre D, Degoul F. The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. *Pharmacogenetics.* mars 2003;13(3):145-57.

Tesfay M, Goldkamp WJ, Neuschwander-Tetri BA. NASH: The Emerging Most Common Form of Chronic Liver Disease. *Mo Med.* juin 2018;115(3):225-9.

Thereaux J, Lesuffleur T, Czernichow S, Basdevant A, Msika S, Nocca D, et al. Association Between Bariatric Surgery and Rates of Continuation, Discontinuation, or Initiation of Antidiabetes Treatment 6 Years Later. *JAMA Surg.* 1 juin 2018;153(6):526-33.

Thereaux J, Lesuffleur T, Czernichow S, Basdevant A, Msika S, Nocca D, et al. Do sleeve gastrectomy and gastric bypass influence treatment with proton pump inhibitors 4 years after surgery? A nationwide cohort. *Surg Obes Relat Dis Off J Am Soc Bariatr Surg.* juin 2017;13(6):951-9.

Thoma C, Day CP, Trenell MI. Lifestyle interventions for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease in adults: a systematic review. *J Hepatol.* janv 2012;56(1):255-66.

Tikkanen MJ, Fayyad R, Faergeman O, Olsson AG, Wun C-C, Laskey R, et al. Effect of intensive lipid lowering with atorvastatin on cardiovascular outcomes in coronary heart disease patients with

mild-to-moderate baseline elevations in alanine aminotransferase levels. *Int J Cardiol.* 9 oct 2013;168(4):3846-52.

Tobita H, Sato S, Miyake T, Ishihara S, Kinoshita Y. Effects of Dapagliflozin on Body Composition and Liver Tests in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis Associated with Type 2 Diabetes Mellitus: A Prospective, Open-label, Uncontrolled Study. *Curr Ther Res Clin Exp.* 2017;87:13-9.

Traber PG, Zomer E. Therapy of experimental NASH and fibrosis with galectin inhibitors. *PLoS One.* 2013;8(12):e83481.

Trajkovski M, Hausser J, Soutschek J, Bhat B, Akin A, Zavolan M, et al. MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity. *Nature.* 8 juin 2011;474(7353):649-53.

Tryndyak VP, Han T, Muskhelishvili L, Fuscoe JC, Ross SA, Beland FA, et al. Coupling global methylation and gene expression profiles reveal key pathophysiological events in liver injury induced by a methyl-deficient diet. *Mol Nutr Food Res.* mars 2011;55(3):411-8.

Tziomalos K, Athyros VG, Paschos P, Karagiannis A. Nonalcoholic fatty liver disease and statins. *Metabolism.* oct 2015;64(10):1215-23.

Upadhyay J, Polyzos SA, Perakakis N, Thakkar B, Paschou SA, Katsiki N, et al. Pharmacotherapy of type 2 diabetes: An update. *Metabolism.* janv 2018;78:13-42.

Valenti L, Motta BM, Alisi A, Sartorelli R, Buonaiuto G, Dongiovanni P, et al. LPIN1 rs13412852 polymorphism in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* mai 2012;54(5):588-93.

Vandel J, Dubois-Chevalier J, Gheeraert C, Derudas B, Raverdy V, Thuillier D, et al. Hepatic Molecular Signatures Highlight the Sexual Dimorphism of Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH). *Hepatology.* mars 2021;73(3):920-36.

Vandel J, Gheeraert C, Staels B, Eeckhoutte J, Lefebvre P, Dubois-Chevalier J. GIANT: galaxy-based tool for interactive analysis of transcriptomic data. *Sci Rep.* 16 nov 2020;10(1):19835.

Verdam FJ, Dallinga JW, Driessen A, de Jonge C, Moonen EJC, van Berkel JBN, et al. Non-alcoholic steatohepatitis: a non-invasive diagnosis by analysis of exhaled breath. *J Hepatol.* mars 2013;58(3):543-8.

Vilar Gomez E, Rodriguez De Miranda A, Gra Oramas B, Arus Soler E, Llanio Navarro R, Calzadilla Bertot L, et al. Clinical trial: a nutritional supplement Viusid, in combination with diet and exercise, in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 15 nov 2009;30(10):999-1009.

Wang B, Hsu S-H, Frankel W, Ghoshal K, Jacob ST. Stat3-mediated activation of microRNA-23a suppresses gluconeogenesis in hepatocellular carcinoma by down-regulating glucose-6-phosphatase and peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha. *Hepatology.* juill 2012;56(1):186-97.

Wong VW-S, Adams LA, de Lédinghen V, Wong GL-H, Sookoian S. Noninvasive biomarkers in NAFLD and NASH - current progress and future promise. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* août 2018;15(8):461-78.

Wu T, Gao X, Chen M, van Dam RM. Long-term effectiveness of diet-plus-exercise interventions vs. diet-only interventions for weight loss: a meta-analysis. *Obes Rev Off J Int Assoc Study Obes.* mai 2009;10(3):313-23.

Yamaguchi K, Yang L, McCall S, Huang J, Yu XX, Pandey SK, et al. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* juin 2007;45(6):1366-74.

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.

Younossi ZM, Golabi P, de Avila L, Paik JM, Srisord M, Fukui N, et al. The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol.* oct 2019;71(4):793-801.

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*, Vol. XX, No. X 2016. *Hepatology.* juill 2016;64(1):73-84.

Younossi ZM, Otgonsuren M, Henry L, Venkatesan C, Mishra A, Erario M, et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) with hepatocellular carcinoma (HCC) in the United States from 2004 to 2009: Hepatology, Vol. XX, No. X, 2015 Younossi et al. Hepatology. déc 2015;62(6):1723-30.

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.

Younossi ZM, Stepanova M, Negro F, Hallaji S, Younossi Y, Lam B, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in lean individuals in the United States. Medicine (Baltimore). nov 2012;91(6):319-27.

Yuan R, Wang K, Hu J, Yan C, Li M, Yu X, et al. Ubiquitin-like Protein FAT10 Promotes the Invasion and Metastasis of Hepatocellular Carcinoma by Modifying β -Catenin Degradation. Cancer Res. 15 sept 2014;74(18):5287-300.

Zelber-Sagi S, Kessler A, Brazowsky E, Webb M, Lurie Y, Santo M, et al. A double-blind randomized placebo-controlled trial of orlistat for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc. mai 2006;4(5):639-44.

Zhang DW, Jeang K-T, Lee CGL. p53 negatively regulates the expression of FAT10, a gene upregulated in various cancers. Oncogene. avr 2006;25(16):2318-27.

Annexes

• **Annexe 1 : Immunofluorescence sur l'Humain**

Des biopsies de foie ont été récupérées et fixées dans le paraformaldéhyde (PAF) 4%, puis incluses en blocs de paraffine. Des coupes de 3µm ont été réalisées au microtome (Leica RM2255). Le jour du marquage, les coupes ont été déparaffinées, puis les antigènes ont été démasqués dans un tampon citrate 1X (*Diva Decloaker 20X*, Biocare Medical). Les coupes ont été perméabilisées par une solution de Triton 100X (Euromedex) à 0,1% dans du TBS (*tris buffered saline*) 1X, puis les sites ont été saturés par une solution de Tween 20 (BioBasic Canada Inc.) à 0,05%, de BSA (*bovine serum albumin standard*, Euromedex) à 1% et Sérum normal de chèvre (Vector) à 5% dans du TBS 1X. Le marquage immunofluorescent a été réalisé à l'aide du kit Tyramide SuperBoost™ Kits with Alexa Fluor™ Tyramides (Invitrogen), selon les instructions du fabricant. Un anticorps primaire anti-FAT10 (ENZO® FAT10 (human) BML-PW0765, 4F1) dilué au 1/50^{ème} a été utilisé. Un marquage des noyaux en bleu (DAPI) grâce au NucBlue™ Live ReadyProbes™ Reagent (Invitrogen) a été associé. Les lames ont été observées au microscope confocal (*spinning disk*).

• **Annexe 2 : Expériences *in vivo* – Matériels et Méthodes**

- Marquage hématoxyline/éosine et calcul du score NAS

Les lobes médians droits des foies des souris ont été récupérés et fixés dans le PAF 4%, puis inclus en blocs de paraffine. Des coupes de 3µm ont été réalisées au microtome (Leica RM2255). Le jour du marquage, les coupes ont été déparaffinées puis incubées avec l'hématoxyline (Vector) et l'éosine (Sigma aldrich). Une analyse histologique des coupes a été réalisée afin de calculer les scores NAS de gravité de la NASH.

- Immunofluorescence

A partir des blocs de paraffine, des coupes de 3µm ont été réalisées. Les coupes ont été déparaffinées, puis les antigènes ont été démasqués dans un tampon citrate 1X (*Diva Decloaker 20X*, Biocare Medical). Les coupes ont été perméabilisées par une solution de Triton 100X (Euromedex) à 0,1% dans du TBS 1X, puis les sites ont été

saturés par une solution de Tween 20 (BioBasic Canada Inc.) à 0,05%, de BSA (Euromedex) à 1% et Sérum normal de chèvre (Vector) à 5% dans du TBS 1X. Un anticorps primaire anti-FAT10 (ENZO® FAT10 (human) BML-PW0765, 4F1) a été dilué au 1/50^{ème} dans la solution de saturation et déposé sur les coupes pour incubation sur la nuit à 4°C. Le lendemain, un anticorps secondaire anti-IgG souris couplé à l'Alexa 488 a été dilué au 1/500^{ème} dans la solution de saturation afin de marquer la protéine FAT10 en vert, et a été associé à du NucBlue™ Live ReadyProbes™ Reagent (Invitrogen™) pour marquer les noyaux en bleu (DAPI). Les lames ont été observées au microscope confocal (*spinning disk*).

- Hépatocytes primaires : isolement, extraction de l'ARN, RT-QPCR, analyse transcriptomique

Après 2 semaines de régime, 3 souris CSAA et 3 souris CDAA ont été anesthésiées par une injection intra-abdominale de pentobarbital. Après perfusion du foie par un tampon de lavage (25mL Hepes 1M (Sigma aldrich), 1,5mL EGTA (*ethylene glycol-bis (β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid*) 167mM (Sigma aldrich) ajustée au pH 7,4, 500mL HBSS (*Hank's balanced salt solution*) (Gibco)), puis un tampon collagénase (5mL Hepes 1M, 10mL CaCl₂·2H₂O 50mM (Sigma aldrich) ajusté au pH 7,4, 0,025% collagénase type IV (Sigma aldrich), 100mL HBSS), les foies ont été récupérés et dissociés mécaniquement. Après filtration et centrifugation à 400rpm (rotations par minute) pendant 2 minutes, le surnageant contenant les cellules non parenchymales a été prélevé et conservé dans un autre tube, puis du tampon de lavage a été ajouté aux cellules restantes afin de réaliser deux nouvelles centrifugations pour ne garder que les hépatocytes primaires. Une extraction de l'ARN sur colonnes a été réalisée à l'aide du kit RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen). La qualité de l'ARN extrait a été vérifiée à l'aide d'un bioanalyzer (Agilent 2100). A partir de la concentration en ARN mesurée pour chaque échantillon et du kit High Capacity cDNA (ADN complémentaire) Reverse Transcription (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), des mix de RT (rétro-transcription) ont été préparés et les ADNc ont été obtenus à l'aide d'un Mastercycler gradient (Eppendorf). Pour détecter FAT10, du fait de sa faible expression en condition basale, une sonde TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) a été utilisée (oligo FAT10-FAM, mM01972246_s1 UBD 4331182). Le gène de la β -actine a été utilisé comme gène de référence (oligo β -actine-VIC, 4352341E). Les Ct de FAT10 ont été soustraits aux Ct de la β -actine, permettant d'obtenir un Δ Ct. L'expression relative a ensuite été

calculée comme suit : $2^{-\Delta Ct} * 1000$. Egalement, à partir des échantillons ARN d'hépatocytes primaires, des puces transcriptomiques ont été réalisées.

• **Annexe 3 : Expériences *in vitro* – Matériels et Méthodes**

- Lignées cellulaires et entretien

Les expériences ont été réalisées *in vitro* sur les HepG2 (ATCC® HB-8065TM) issues d'un HCC d'un adolescent de 15 ans. Des lignées de cellules HepG2 surexprimant stablement FAT10, suite à une infection par un Lentivirus ciblant FAT10 (LentiFAT10), ou un Lentivirus contrôle (LentiNeg) couplé à la GFP, suivie d'une sélection par un traitement à la puromycine, ont également été utilisées. Les lignées ont été maintenues à 37°C sous 5% de CO₂, et ont été cultivées dans un milieu essentiel minimum d'Eagle (MEM) (Gibco par life technologies) complété avec 10% de sérum de veau fœtal (Gibco), 1% d'acides aminés non-essentiels 100X (Gibco) et 1% de sodium pyruvate 100mM (Gibco). Les cellules ont étéensemencées en plaques 12 puits ou en boîte de pétri 10cm² (Thermo Fisher Scientific) pour les différentes expériences.

- Transfection siARN

Pour chaque siARN, la transfection dans les puits de plaque 12 puits a nécessité la préparation dans l'OptiMEM™ I Reduced Serum Medium (Gibco) d'un mix contenant du DharmaFECT™ T-20XX-XX (Dharmacon™) au 1:100 et le siARN à la concentration finale de 10 nM. La transfection dans les boîtes de pétri a nécessité la préparation pour chaque siARN dans l'OptiMEM™ d'un mix contenant du DharmaFECT™ au 1:200 et le siARN à la concentration finale de 6,25nM. Le milieu de transfection a été laissé durant 24 heures. Les siARN utilisés étaient les suivants : siARN contrôle négatif (siNeg) (sens 5'->3' : AGGUAGUGUAAUCGCCUUGTT ; antisens 5'->3' : CAAGGCGAUUACACUACCUTT ; Eurofins Genomics), et siARN FAT10 (siFAT10) (Smart pool siGENOME UBD ; Séquence 1 : GAGACUAAGACGGGUAUAA ; Séquence 2 : GAUCUUAAAGCCACGGAGA ; Séquence 3 : CAAAGAACAUGUCCGGUCU ; Séquence 4 : GUGCGAAGGUCCAGCUCAG ; Dharmacon).

- Extraction de l'ARN et RT-QPCR

Les plaquesensemencées ont été récupérées et les cellules lavées au PBS (*phosphate buffer solution*) 1X, avant d'ajouter 500µL de TRIzol® par puits. Du chloroforme a été ajouté au 1:5, et les tubes ont été vortexés et centrifugés à 12000g pendant 15 minutes à 4°C. La phase supérieure aqueuse contenant l'ARN a été récupérée, dans laquelle a été ajouté de l'Isopropanol (Propane-2-ol, Carlo Erba Reagents) en quantité égale au surnageant. Après 15 minutes d'attente et 2 centrifugations à 12000g pendant 15 minutes à 4°C, les culots obtenus ont été lavés à l'éthanol 70%, puis laissés séchés sous sorbonne, avant d'être repris dans un volume d'eau RNase/DNase free. L'ARN a été dosé à l'aide d'un NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific). A partir de la concentration en ARN, des mix de RT ont été préparés comme décrit précédemment. Pour détecter FAT10, du fait de sa faible expression en condition basale, une sonde TaqMan™ Fast Advanced Master Mix a été utilisée (oligo FAT10-FAM « assay HS001973-74 »). Le gène de la β-actine a été utilisé comme gène de référence (oligo β-actine-VIC, 4326315E). Les Ct de FAT10 ont été soustraits aux Ct de la β-actine, permettant d'obtenir un ΔCt. L'expression relative a ensuite été calculée comme suit : $2^{-\Delta Ct} * 1000$. La moyenne des valeurs ΔCt des échantillons contrôles d'une expérience (siNeg ou LentiNeg) a été soustraite aux valeurs ΔCT de tous les échantillons de l'expérience, permettant d'obtenir un ΔΔCt pour chacun. Les *Fold* d'induction ont ensuite été calculés comme suit : $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

- Immunoblotting (Western Blot)

Les cellules ont été lysées à l'aide d'un tampon RIPA (*radioimmunoprecipitation assay*) (Tris 50mM, NaCl 150mM, SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) 0,1%, Nadeoxycholate 0,5%, NP40 1%, EDTA (Ethylène-Diamine-Tétra-Acétique) 2mM, NaF 50mM, 100µM PMSF, pH 8), complété par un cocktail d'anti-protéases (Roche diagnostics GmbH). Après sonication, les protéines ont été dosées en utilisant le kit Pierce de dosage BCA™ (*bicinchoninic acid assay*). Des gels de polyacrylamide de 12 ou 15% ont été réalisés afin d'y déposer les échantillons protéiques, puis la migration a été réalisée à l'aide d'un tampon de migration (pH 8,3-8,8 : 3,03g Tris base, 14,4g Glycine, 5mL SDS 20%, qsp 1L H₂O). Un marqueur de poids moléculaire (PageRuler™ Plus ; Thermo scientific) a également été déposé. Après migration, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose 0,45µM (Thermo scientific) à l'aide d'un tampon de transfert éthanol à 25% (6,25g Tris base, 29,75g glycine, 625mL d'éthanol 100%, qsp 2,5L H₂O). Les membranes ont été saturées dans

une solution de lait (Chem Cruz™, Santa Cruz Biotechnology) à 5 %, préparée dans du TBST 0,1%, et mises à incuber sur agitation et sur la nuit à 4°C avec les anticorps primaires. Pour la détection de FAT10, l'anticorps primaire anti-FAT10 souris a été utilisé, dilué au 1:500 dans le lait 5%. Pour la détection de la protéine de charge, un anticorps primaire anti-β-actine souris a été utilisé (Santa Cruz Biotechnology, Inc. β-Actin (N-21), sc-130656), dilué au 1:1000 dans le lait 5%. Les membranes ont été lavées puis incubées pendant 1 heure avec un anticorps secondaire anti-IgG souris couplé à une peroxydase (Sigma Aldrich) dilué au 1:5000 dans le lait 5%. Les protéines ont été révélées à l'aide du substrat de la peroxydase ECL Dura (SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate ; Thermo Scientific), ou du kit ECL Femto (SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate ; Thermo Scientific). La luminescence a été détectée à l'aide de l'appareil iBright 1500 (Invitrogen™).

- Marquage immunofluorescent BODIPY™ 493/503 (Invitrogen™)

Les cellules ont étéensemencées en plaques 12 puits, sur des lamelles préalablement incubées dans de la poly-L-lysine 0,01% (Sigma-Aldrich). Les cellules Lentivirus ont été récupérées après 24 heures d'ensemencement, et les cellules HepG2 ont été transfectées par un siARN (siNeg ou siFAT10) pendant 24 heures puis récupérées. Les puits ont été lavés puis fixés à l'aide d'une solution de PAF 2% et de Glutaraldéhyde (Sigma Aldrich) 0,2% dans de l'eau milliQ. Après lavages, les puits ont été incubés pendant 20 minutes avec une solution de BODIPY™ 493/503 (Invitrogen™) à la concentration de 1µg/µL préparée dans du PBS 1X et associée à du NucBlue® (DAPI). Les lames ont été observées au microscope confocal (*spinning disk*).

- Respiration mitochondriale : Seahorse

Les cellules ont étéensemencées dans une plaque 24 puits, fournie dans le kit « Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit » (Agilent). L'ensemble des équipements et composants utilisés sont également issus de ce kit ou de chez Agilent. La veille du jour de récupération, une plaque « cartouche » a été incubée avec 1mL de solution de calibration par puits à 37°C sans CO₂ sur la nuit. Le lendemain, la plaque de cellules a été récupérée et le milieu des puits a été remplacé par 500µL de milieu Seahorse (milieu Seahorse fourni + glucose 1:2500 + glutamine au 1:1000, pH 7,4), avant de replacer la plaque dans l'incubateur 37°C sans CO₂ pendant 1 heure. Pendant ce temps, les pores A, B et C de chaque puits d'une plaque de calibration ont

été remplis respectivement avec de l'oligomycine à 2 μ M, du FCCP à 1 μ M et du mix Roténone/Antimycine à 0,5 μ M. La plaque de calibration a ensuite été placée au-dessus de la plaque « cartouche » préalablement récupérée, afin de calibrer la machine de lecture des plaques (Seahorse XFe24, Seahorse Bioscience) *via* le logiciel Wave. La plaque « cartouche » a ensuite été remplacée par la plaque de cellules, afin d'effectuer les mesures. Successivement, les composés contenus dans les pores A, B et C ont été injectés par la machine dans les puits de cellules, et le taux de consommation d'oxygène (OCR) a été mesuré durant tout le processus. La mesure initiale correspond à la respiration mitochondriale basale. Après ajout de l'oligomycine, l'ATP synthase est inhibée, permettant de soustraire la respiration liée à l'ATP et de mesurer uniquement celle reliée à la fuite des protons. L'ajout de la FCCP neutralise le gradient de protons et perturbe le potentiel membranaire mitochondrial, contrant les effets de l'oligomycine et forçant la respiration, ce qui permet de mesurer la respiration maximale et d'obtenir par soustraction la capacité respiratoire de réserve. L'ajout de la roténone et de l'antimycine, inhibant respectivement les complexes I et III de la chaîne respiratoire mitochondriale, permet l'inhibition totale de la respiration, révélant le taux de respiration non-mitochondriale. Après l'expérience, les cellules ont été récupérées dans un tampon RIPA et dosées comme décrit précédemment pour l'Immunoblotting, afin de normaliser l'OCR à la quantité de protéines. Les analyses statistiques ont été effectuées sur le logiciel GraphPad Prism 7.00. Des tests 2way ANOVA ont été réalisés avec une significativité placée à $p < 0,05$.

Université de Lille
FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Année Universitaire 2021/2022

Nom : BERNARD

Prénom : Lucie

Titre de la thèse : La stéato-hépatite non alcoolique (NASH) : stratégies thérapeutiques actuelles et piste de la protéine FAT10

Mots-clés : NAFLD, NASH, traitements, FAT10

Résumé :

Les maladies du foie gras non alcooliques (NAFLD) correspondent à un spectre évolutif de pathologies hépatiques, allant de la simple stéatose jusqu'à la cirrhose voire le carcinome hépatocellulaire. Elles se développent avec l'âge et l'obésité, et sont associées à de nombreuses comorbidités métaboliques et cardio-vasculaires. La stéato-hépatite non alcoolique (NASH) correspond à une forme sévère des NAFLD, caractérisée par une stéatose, une inflammation, un ballonnement des hépatocytes et éventuellement une fibrose. Actuellement, près de 25% de la population générale est atteinte de NAFLD, or il n'existe aucun traitement pharmacologique, faisant des NAFLD/NASH un enjeu de santé publique. Néanmoins, de nombreuses molécules différentes ciblant les multiples acteurs impliqués dans le développement de la NASH sont en cours d'étude.

Cette thèse vise à faire l'état des lieux des essais cliniques montrant des effets prometteurs dans le traitement de la NASH, par l'administration de composés en monothérapie ou en association.

De plus, de premiers résultats obtenus au sein du laboratoire INSERM UMR1011 y sont présentés. Grâce à des données obtenues chez l'Homme dans une cohorte de patients obèses atteints de NASH, *in vivo* dans un modèle de souris NASH et *in vitro* dans une lignée d'hépatocytes humains, il est montré que FAT10 (*HLA-F adjacent transcript 10*), une protéine *ubiquitin-like* induite par l'inflammation, est surexprimée au cours de la NASH, et qu'elle est impliquée dans l'altération du métabolisme des lipides dans les hépatocytes. Ainsi, FAT10 constituerait une nouvelle cible thérapeutique potentielle dans le traitement de la NASH.

Membres du jury :

Présidente :

Pr. MUHR-TAILLEUX Anne, Professeur des Universités, Université de Lille

Directrice de Thèse :

Pr. PAUMELLE-LESTRELIN Réjane, Professeur des Universités, Université de Lille

Assesseurs :

Dr. MARY Aurélien, Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier, Université de Picardie Jules Verne, CHU Amiens-Picardie

Dr. DUCASTEL Sarah, Pharmacien Chercheur, INSERM UMR1011 Lille

Dr. CAPPE Arnaud, Assistant Pharmacien Hospitalier, Centre Hospitalier Intercommunale Montdidier-Roye