

UNIVERSITÉ TOULOUSE III – PAUL SABATIER
FACULTÉS DE MÉDECINE

ANNÉE 2017

2017 TOU3 1636

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE
MÉDECINE SPÉCIALISÉE CLINIQUE

Présentée et soutenue publiquement

par

Cyrielle DELABAUDIERE

le 13 Octobre 2017

**Etude prospective du microbiote intestinal et sanguin chez
des patients atteints de stéatopathie métabolique**

Directeur de thèse : Docteur Maeva GUILLAUME

JURY

Monsieur le Professeur Jean-Marie PERON	Président
Monsieur le Professeur Louis BUSCAIL	Assesseur
Monsieur le Professeur Jacques AMAR	Assesseur
Monsieur le Professeur Eric OSWALD	Assesseur
Monsieur le Professeur Christophe BUREAU	Suppléant
Madame le Docteur Maeva GUILLAUME	Invité



TABLEAU du PERSONNEL HU
des Facultés de Médecine de l'Université Paul Sabatier
au 1^{er} septembre 2016

Professeurs Honoraires

Doyen Honoraire	M. ROUGE Daniel	Professeur Honoraire	M. BAZEX Jacques
Doyen Honoraire	M. LAZORTHE Yves	Professeur Honoraire	M. VIRENQUE Christian
Doyen Honoraire	M. CHAP Hugues	Professeur Honoraire	M. CARLES Pierre
Doyen Honoraire	M. GUIRAUD-CHAUMEIL Bernard	Professeur Honoraire	M. BONAFÉ Jean-Louis
Doyen Honoraire	M. PUEL Pierre	Professeur Honoraire	M. VAYSSE Philippe
Professeur Honoraire	M. ESCHAPASSE Henri	Professeur Honoraire	M. ESQUERRE J.P.
Professeur Honoraire	M. GEDEON André	Professeur Honoraire	M. GUITARD Jacques
Professeur Honoraire	M. PASQUIE M.	Professeur Honoraire	M. LAZORTHE Franck
Professeur Honoraire	M. RIBAUT Louis	Professeur Honoraire	M. ROQUE-LATRILLE Christian
Professeur Honoraire	M. ARLET Jacques	Professeur Honoraire	M. CERENE Alain
Professeur Honoraire	M. RIBET André	Professeur Honoraire	M. FOURNIAL Gérard
Professeur Honoraire	M. MONROZIES M.	Professeur Honoraire	M. HOFF Jean
Professeur Honoraire	M. DALOUS Antoine	Professeur Honoraire	M. REME Jean-Michel
Professeur Honoraire	M. DUPRE M.	Professeur Honoraire	M. FAUVEL Jean-Marie
Professeur Honoraire	M. FABRE Jean	Professeur Honoraire	M. FREXINOS Jacques
Professeur Honoraire	M. DUCOS Jean	Professeur Honoraire	M. CARRIERE Jean-Paul
Professeur Honoraire	M. LACOMME Yves	Professeur Honoraire	M. MANSAT Michel
Professeur Honoraire	M. COTONAT Jean	Professeur Honoraire	M. BARRET André
Professeur Honoraire	M. DAVID Jean-Frédéric	Professeur Honoraire	M. ROLLAND
Professeur Honoraire	Mme DIDIER Jacqueline	Professeur Honoraire	M. THOUVENOT Jean-Paul
Professeur Honoraire	Mme LARENG Marie-Blanche	Professeur Honoraire	M. CAHUZAC Jean-Philippe
Professeur Honoraire	M. BERNADET	Professeur Honoraire	M. DELSOL Georges
Professeur Honoraire	M. REGNIER Claude	Professeur Honoraire	M. ABBAL Michel
Professeur Honoraire	M. COMBELLES	Professeur Honoraire	M. DURAND Dominique
Professeur Honoraire	M. REGIS Henri	Professeur Honoraire	M. DALY-SCHVEITZER Nicolas
Professeur Honoraire	M. ARBUS Louis	Professeur Honoraire	M. RAILHAC
Professeur Honoraire	M. PUJOL Michel	Professeur Honoraire	M. POURRAT Jacques
Professeur Honoraire	M. ROCHICCIOLI Pierre	Professeur Honoraire	M. QUERLEU Denis
Professeur Honoraire	M. RUMEAU Jean-Louis	Professeur Honoraire	M. ARNE Jean-Louis
Professeur Honoraire	M. BESOMBES Jean-Paul	Professeur Honoraire	M. ESCOURROU Jean
Professeur Honoraire	M. SUC Jean-Michel	Professeur Honoraire	M. FOURTANIER Gilles
Professeur Honoraire	M. VALDIGUIE Pierre	Professeur Honoraire	M. LAGARRIGUE Jacques
Professeur Honoraire	M. BOUNHOURE Jean-Paul	Professeur Honoraire	M. PESSEY Jean-Jacques
Professeur Honoraire	M. CARTON Michel	Professeur Honoraire	M. CHAVOIN Jean-Pierre
Professeur Honoraire	Mme PUEL Jacqueline	Professeur Honoraire	M. GERAUD Gilles
Professeur Honoraire	M. GOUZI Jean-Louis	Professeur Honoraire	M. PLANTE Pierre
Professeur Honoraire associé	M. DUTAU Guy	Professeur Honoraire	M. MAGNAVAL Jean-François
Professeur Honoraire	M. PASCAL J.P.	Professeur Honoraire	M. MONROZIES Xavier
Professeur Honoraire	M. SALVADOR Michel	Professeur Honoraire	M. MOSCOVICI Jacques
Professeur Honoraire	M. BAYARD Francis	Professeur Honoraire	Mme GENESTAL Michèle
Professeur Honoraire	M. LEOPHONTE Paul	Professeur Honoraire	M. CHAMONTIN Bernard
Professeur Honoraire	M. FABIÉ Michel	Professeur Honoraire	M. SALVAYRE Robert
Professeur Honoraire	M. BARTHE Philippe	Professeur Honoraire	M. FRAYSSE Bernard
Professeur Honoraire	M. CABARROT Étienne	Professeur Honoraire	M. BUGAT Roland
Professeur Honoraire	M. DUFFAUT Michel	Professeur Honoraire	M. PRADERE Bernard
Professeur Honoraire	M. ESCAT Jean		
Professeur Honoraire	M. ESCANDE Michel		
Professeur Honoraire	M. PRIS Jacques		
Professeur Honoraire	M. CATHALA Bernard		

Professeurs Émérites

Professeur ALBAREDE Jean-Louis	Professeur CHAMONTIN Bernard
Professeur CONTÉ Jean	Professeur SALVAYRE Bernard
Professeur MURAT	Professeur MAGNAVAL Jean-François
Professeur MANELFE Claude	Professeur ROQUES-LATRILLE Christian
Professeur LOUVET P.	Professeur MOSCOVICI Jacques
Professeur SARRAMON Jean-Pierre	Professeur Jacques LAGARRIGUE
Professeur CARATERO Claude	
Professeur GUIRAUD-CHAUMEIL Bernard	
Professeur COSTAGLIOLA Michel	
Professeur ADER Jean-Louis	
Professeur LAZORTHE Yves	
Professeur LARENG Louis	
Professeur JOFFRE Francis	
Professeur BONEU Bernard	
Professeur DABERNAT Henri	
Professeur BOCCALON Henri	
Professeur MAZIERES Bernard	
Professeur ARLET-SUAU Elisabeth	
Professeur SIMON Jacques	
Professeur FRAYSSE Bernard	
Professeur ARBUS Louis	

FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-PURPAN

37 allées Jules Guesde - 31062 TOULOUSE Cedex

Doyen : D. CARRIE

P.U. - P.H. Classe Exceptionnelle et 1ère classe		P.U. - P.H. 2ème classe	
M. ADOUE Daniel (C.E)	Médecine Interne, Gériatrie	Mme BEYNE-RAUZY Odile	Médecine Interne
M. AMAR Jacques	Thérapeutique	M. BROUCHET Laurent	Chirurgie thoracique et cardio-vascul
M. ATTAL Michel (C.E)	Hématologie	M. BUREAU Christophe	Hépat-Gastro-Entéro
M. AVET-LOISEAU Hervé	Hématologie, transfusion	M. CALVAS Patrick	Génétique
M. BIRMES Philippe	Psychiatrie	M. CARRERE Nicolas	Chirurgie Générale
M. BLANCHER Antoine	Immunologie (option Biologique)	Mme CASPER Charlotte	Pédiatrie
M. BONNEVIALLE Paul	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie.	M. CHAIX Yves	Pédiatrie
M. BOSSAVY Jean-Pierre	Chirurgie Vasculaire	Mme CHARPENTIER Sandrine	Thérapeutique, méd. d'urgence, addict
M. BRASSAT David	Neurologie	M. COGNARD Christophe	Neuroradiologie
M. BROUSSET Pierre (C.E)	Anatomie pathologique	M. DE BOISSEZON Xavier	Médecine Physique et Réadapt Fonct.
M. CARRIE Didier (C.E)	Cardiologie	M. FOURNIE Bernard	Rhumatologie
M. CHAP Hugues (C.E)	Biochimie	M. FOURNIÉ Pierre	Ophthalmologie
M. CHAUVEAU Dominique	Néphrologie	M. GAME Xavier	Urologie
M. CHOLLET François (C.E)	Neurologie	M. GEERAERTS Thomas	Anesthésiologie et réanimation
M. CLANET Michel (C.E)	Neurologie	M. LAROCHE Michel	Rhumatologie
M. DAHAN Marcel (C.E)	Chirurgie Thoracique et Cardiaque	M. LAUWERS Frédéric	Anatomie
M. DEGUINE Olivier	Oto-rhino-laryngologie	M. LEOBON Bertrand	Chirurgie Thoracique et Cardiaque
M. DUCOMMUN Bernard	Cancérologie	M. LOPEZ Raphael	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
M. FERRIERES Jean	Epidémiologie, Santé Publique	M. MARX Mathieu	Oto-rhino-laryngologie
M. FOURCADE Olivier	Anesthésiologie	M. MAS Emmanuel	Pédiatrie
M. IZOPET Jacques (C.E)	Bactériologie-Virologie	M. OLIVOT Jean-Marc	Neurologie
Mme LAMANT Laurence	Anatomie Pathologique	M. PARANT Olivier	Gynécologie Obstétrique
M. LANG Thierry (C.E)	Biostatistiques et Informatique Médicale	M. PATHAK Atul	Pharmacologie
M. LANGIN Dominique	Nutrition	M. PAYRASTRE Bernard	Hématologie
M. LAUQUE Dominique (C.E)	Médecine Interne	M. PERON Jean-Marie	Hépat-Gastro-Entérologie
M. LIBLAU Roland (C.E)	Immunologie	M. PORTIER Guillaume	Chirurgie Digestive
M. MALAVAUD Bernard	Urologie	M. RONCALLI Jérôme	Cardiologie
M. MANSAT Pierre	Chirurgie Orthopédique	Mme SAVAGNER Frédéric	Biochimie et biologie moléculaire
M. MARCHOU Bruno	Maladies Infectieuses	Mme SELVES Janick	Anatomie et cytologie pathologiques
M. MAZIERES Julien	Pneumologie	M. SOL Jean-Christophe	Neurochirurgie
M. MOLINIER Laurent	Epidémiologie, Santé Publique		
M. MONTASTRUC Jean-Louis (C.E)	Pharmacologie		
Mme MOYAL Elisabeth	Cancérologie		
Mme NOURHASHEMI Fatemeh (C.E)	Gériatrie		
M. OLIVES Jean-Pierre (C.E)	Pédiatrie		
M. OSWALD Eric	Bactériologie-Virologie		
M. PARIENTE Jérémie	Neurologie		
M. PARINAUD Jean	Biol. Du Dévelop. et de la Reprod.		
M. PAUL Carle	Dermatologie		
M. PAYOUX Pierre	Biophysique		
M. PERRET Bertrand (C.E)	Biochimie		
M. RASCOL Olivier	Pharmacologie		
M. RECHER Christian	Hématologie		
M. RISCHMANN Pascal (C.E)	Urologie		
M. RIVIERE Daniel (C.E)	Physiologie		
M. SALES DE GAUZY Jérôme	Chirurgie Infantile		
M. SALLES Jean-Pierre	Pédiatrie		
M. SANS Nicolas	Radiologie		
M. SERRE Guy (C.E)	Biologie Cellulaire		
M. TELMON Norbert	Médecine Légale		
M. VINEL Jean-Pierre (C.E)	Hépat-Gastro-Entérologie		
P.U. Médecine générale		P.U. Médecine générale	
M. OUSTRIC Stéphane	Médecine Générale	M. MESTHÉ Pierre	Médecine Générale
		P.A Médecine générale	
		POUTRAIN Jean-Christophe	Médecine Générale

P.U. - P.H.

Classe Exceptionnelle et 1ère classe

M. ACAR Philippe	Pédiatrie
M. ALRIC Laurent	Médecine Interne
Mme ANDRIEU Sandrine	Epidémiologie
M. ARLET Philippe (C.E)	Médecine Interne
M. ARNAL Jean-François	Physiologie
Mme BERRY Isabelle (C.E)	Biophysique
M. BOUTAULT Franck (C.E)	Chirurgie Maxillo-Faciale et Stomatologie
M. BUJAN Louis (C. E)	Urologie-Andrologie
Mme BURA-RIVIERE Alessandra	Médecine Vasculaire
M. BUSCAIL Louis	Hépto-Gastro-Entérologie
M. CANTAGREL Alain (C.E)	Rhumatologie
M. CARON Philippe (C.E)	Endocrinologie
M. CHIRON Philippe (C.E)	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
M. CONSTANTIN Arnaud	Rhumatologie
M. COURBON Frédéric	Biophysique
Mme COURTADE SAIDI Monique	Histologie Embryologie
M. DAMBRIN Camille	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire
M. DELABESSE Eric	Hématologie
Mme DELISLE Marie-Bernadette (C.E)	Anatomie Pathologie
M. DELORD Jean-Pierre	Cancérologie
M. DIDIER Alain (C.E)	Pneumologie
M. ELBAZ Meyer	Cardiologie
M. GALINIER Michel	Cardiologie
M. GLOCK Yves (C.E)	Chirurgie Cardio-Vasculaire
M. GOURDY Pierre	Endocrinologie
M. GRAND Alain (C.E)	Epidémiologie. Eco. de la Santé et Prévention
M. GROLLEAU RAOUX Jean-Louis	Chirurgie plastique
Mme GUIMBAUD Rosine	Cancérologie
Mme HANAIRE Hélène (C.E)	Endocrinologie
M. KAMAR Nassim	Néphrologie
M. LARRUE Vincent	Neurologie
M. LAURENT Guy (C.E)	Hématologie
M. LEVADE Thierry (C.E)	Biochimie
M. MALECAZE François (C.E)	Ophtalmologie
M. MARQUE Philippe	Médecine Physique et Réadaptation
Mme MARTY Nicole	Bactériologie Virologie Hygiène
M. MASSIP Patrice (C.E)	Maladies Infectieuses
M. MINVILLE Vincent	Anesthésiologie Réanimation
M. RAYNAUD Jean-Philippe (C.E)	Psychiatrie Infantile
M. RITZ Patrick	Nutrition
M. ROCHE Henri (C.E)	Cancérologie
M. ROLLAND Yves	Gériatrie
M. ROUGE Daniel (C.E)	Médecine Légale
M. ROUSSEAU Hervé (C.E)	Radiologie
M. SAILLER Laurent	Médecine Interne
M. SCHMITT Laurent (C.E)	Psychiatrie
M. SENARD Jean-Michel	Pharmacologie
M. SERRANO Elie (C.E)	Oto-rhino-laryngologie
M. SOULAT Jean-Marc	Médecine du Travail
M. SOULIE Michel (C.E)	Urologie
M. SUC Bertrand	Chirurgie Digestive
Mme TAUBER Marie-Thérèse (C.E)	Pédiatrie
Mme URO-COSTE Emmanuelle	Anatomie Pathologique
M. VAYSSIERE Christophe	Gynécologie Obstétrique
M. VELLAS Bruno (C.E)	Gériatrie

P.U. - P.H.

2ème classe

M. ACCADBLED Franck	Chirurgie Infantile
M. ARBUS Christophe	Psychiatrie
M. BERRY Antoine	Parasitologie
M. BONNEVILLE Fabrice	Radiologie
M. BOUNES Vincent	Médecine d'urgence
Mme BOURNET Barbara	Gastro-entérologie
M. CHAUFOUR Xavier	Chirurgie Vasculaire
M. CHAYNES Patrick	Anatomie
M. DECRAMER Stéphane	Pédiatrie
M. DELOBEL Pierre	Maladies Infectieuses
Mme DULY-BOUHANICK Béatrice	Thérapeutique
M. FRANCHITTO Nicolas	Addictologie
M. GALINIER Philippe	Chirurgie Infantile
M. GARRIDO-STÖWHAS Ignacio	Chirurgie Plastique
Mme GOMEZ-BROUCHET Anne-Muriel	Anatomie Pathologique
M. HUYGHE Eric	Urologie
M. LAFFOSSE Jean-Michel	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
Mme LAPRIE Anne	Radiothérapie
M. LEGUEVAQUE Pierre	Chirurgie Générale et Gynécologique
M. MARCHEIX Bertrand	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
M. MAURY Jean-Philippe	Cardiologie
Mme MAZEREEUW Juliette	Dermatologie
M. MEYER Nicolas	Dermatologie
M. MUSCARI Fabrice	Chirurgie Digestive
M. OTAL Philippe	Radiologie
M. ROUX Franck-Emmanuel	Neurochirurgie
Mme SOTO-MARTIN Maria-Eugénia	Gériatrie et biologie du vieillissement
M. TACK Ivan	Physiologie
M. VERGEZ Sébastien	Oto-rhino-laryngologie
M. YSEBAERT Loic	Hématologie

M.C.U. - P.H.

M. APOIL Pol Andre	Immunologie
Mme ARNAUD Catherine	Epidémiologie
M. BIETH Eric	Génétique
Mme BONGARD Vanina	Epidémiologie
Mme CASPAR BAUGUIL Sylvie	Nutrition
Mme CASSAING Sophie	Parasitologie
M. CAVAIGNAC Etienne	Chirurgie orthopédique et traumatologie
Mme CONCINA Dominique	Anesthésie-Réanimation
M. CONGY Nicolas	Immunologie
Mme COURBON Christine	Pharmacologie
Mme DAMASE Christine	Pharmacologie
Mme de GLISEZENSKY Isabelle	Physiologie
Mme DE MAS Véronique	Hématologie
Mme DELMAS Catherine	Bactériologie Virologie Hygiène
M. DUBOIS Damien	Bactériologie Virologie Hygiène
M. DUPUI Philippe	Physiologie
M. FAGUER Stanislas	Néphrologie
Mme FILLAUX Judith	Parasitologie
M. GANTET Pierre	Biophysique
Mme GENNERO Isabelle	Biochimie
Mme GENOUX Annelise	Biochimie et biologie moléculaire
M. HAMDJ Safouane	Biochimie
Mme HITZEL Anne	Biophysique
M. IRIART Xavier	Parasitologie et mycologie
Mme JONCA Nathalie	Biologie cellulaire
M. KIRZIN Sylvain	Chirurgie générale
Mme LAPEYRE-MESTRE Maryse	Pharmacologie
M. LAURENT Camille	Anatomie Pathologique
M. LHERMUSIER Thibault	Cardiologie
Mme MONTASTIER Emilie	Nutrition
M. MONTOYA Richard	Physiologie
Mme MOREAU Marion	Physiologie
Mme NOGUEIRA M.L.	Biologie Cellulaire
M. PILLARD Fabien	Physiologie
Mme PUISSANT Bénédicte	Immunologie
Mme RAYMOND Stéphanie	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme SABOURDY Frédérique	Biochimie
Mme SAUNE Karine	Bactériologie Virologie
M. SILVA SIFONTES Stein	Réanimation
M. SOLER Vincent	Ophthalmologie
M. TAFANI Jean-André	Biophysique
M. TREINER Emmanuel	Immunologie
Mme TREMOLLIERES Florence	Biologie du développement
Mme VAYSSE Charlotte	Cancérologie

M.C.U. - P.H.

Mme ABRAVANEL Florence	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme BASSET Céline	Cytologie et histologie
M. CAMBUS Jean-Pierre	Hématologie
Mme CANTERO Anne-Valérie	Biochimie
Mme CARFAGNA Luana	Pédiatrie
Mme CASSOL Emmanuelle	Biophysique
Mme CAUSSE Elizabeth	Biochimie
M. CHAPUT Benoit	Chirurgie plastique et des brûlés
M. CHASSAING Nicolas	Génétique
Mme CLAVE Danielle	Bactériologie Virologie
M. CLAVEL Cyril	Biologie Cellulaire
Mme COLLIN Laetitia	Cytologie
Mme COLOMBAT Magali	Anatomie et cytologie pathologiques
M. CORRE Jill	Hématologie
M. DE BONNECAZE Guillaume	Anatomie
M. DEDOUIT Fabrice	Médecine Légale
M. DELPLA Pierre-André	Médecine Légale
M. DESPAS Fabien	Pharmacologie
M. EDOUARD Thomas	Pédiatrie
Mme ESQUIROL Yolande	Médecine du travail
Mme EVRARD Solène	Histologie, embryologie et cytologie
Mme GALINIER Anne	Nutrition
Mme GARDETTE Virginie	Epidémiologie
M. GASQ David	Physiologie
Mme GRARE Marion	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme GUILBEAU-FRUGIER Céline	Anatomie Pathologique
Mme GUYONNET Sophie	Nutrition
M. HERIN Fabrice	Médecine et santé au travail
Mme INGUENEAU Cécile	Biochimie
M. LAIREZ Olivier	Biophysique et médecine nucléaire
M. LEANDRI Roger	Biologie du dével. et de la reproduction
M. LEPAGE Benoit	Biostatistiques et Informatique médicale
Mme MAUPAS Françoise	Biochimie
M. MIEUSSET Roger	Biologie du dével. et de la reproduction
Mme NASR Nathalie	Neurologie
Mme PERIQUET Brigitte	Nutrition
Mme PRADDAUDE Françoise	Physiologie
M. RIMAILHO Jacques	Anatomie et Chirurgie Générale
M. RONGIERES Michel	Anatomie - Chirurgie orthopédique
Mme SOMMET Agnès	Pharmacologie
Mme VALLET Marion	Physiologie
M. VERGEZ François	Hématologie
Mme VEZZOSI Delphine	Endocrinologie

M.C.U. Médecine générale

M. BRILLAC Thierry

M.C.U. Médecine générale

M. BISMUTH Michel	Médecine Générale
M. BISMUTH Serge	Médecine Générale
Mme ROUGE-BUGAT Marie-Eve	Médecine Générale
Mme ESCOURROU Brigitte	Médecine Générale

Maîtres de Conférences Associés de Médecine Générale

Dr ABITTEBOUL Yves
 Dr CHICOLAA Bruno
 Dr IRI-DELAHAYE Motoko
 Dr FREYENS Anne

Dr BOYER Pierre
 Dr ANE Serge
 Dr BIREBENT Jordan

A notre président de Jury,

Monsieur le Professeur Jean-Marie PERON

Professeur des Universités

Praticien Hospitalier

Hépatogastro-entérologue

Tu nous fais l'honneur de présider ce jury de thèse et de juger notre travail. Je te remercie pour la transmission de ton savoir toujours avec enthousiasme, ton dynamisme dans tout ce que tu fais et tes encouragements. Sois assuré de ma gratitude et de mon profond respect.

Aux membres du Jury,

Monsieur le Professeur Louis BUSCAIL

Professeur des Universités

Praticien Hospitalier

Hépatogastro-entérologue

Merci d'avoir accepté de siéger à notre jury et de juger ce travail. Je vous suis reconnaissante de tout ce que vous m'avez appris tant sur le plan médical que sur le plan humain, avec bonne humeur et anecdotes. Soyez assuré de mon profond respect.

Monsieur le Professeur Jacques AMAR

Professeur des Universités

Praticien Hospitalier

Cardiologue, Hypertension artérielle et thérapeutique

Vous nous faites l'honneur de siéger à notre jury de thèse et de juger notre travail. Je vous remercie d'avoir contribué à la conception et à l'analyse des données de ce projet et de nous avoir apporté votre expertise sur le sujet. Veuillez recevoir l'expression de ma sincère gratitude.

Monsieur le Professeur Eric OSWALD

Professeur des Universités

Praticien Hospitalier

Laboratoire de Bactériologie-Hygiène

Institut de Recherche en Santé Digestive

Vous nous faites l'honneur de siéger à notre jury de thèse et de juger notre travail. Je vous remercie de votre investissement dans ce projet, et de vos connaissances aguerries sur le sujet que vous nous avez apporté. J'ai appris beaucoup de choses qui m'ont permis d'élargir mon horizon au-delà de l'hépatogastroentérologie. Veuillez recevoir l'expression de ma sincère gratitude.

Monsieur le Professeur Christophe BUREAU

Professeur des Universités

Praticien Hospitalier

Hépatogastro-entérologue

Je te remercie de m'avoir proposé ce travail et ton aide apportée. J'espère en être digne. Je te suis reconnaissante pour ton enseignement complet et rigoureux de l'hépatologie et ton dévouement à la médecine. Sois assuré de mon admiration et de mon profond respect.

A ma directrice de thèse,

Madame le Docteur Maeva GUILLAUME

Assistante hospitalo-universitaire en physiologie

Hépatogastro-entérologue

J'ai été honoré que tu diriges ce travail. Je te remercie sincèrement pour ta disponibilité, ton écoute, ton soutien et tes conseils. J'admire ta force de travail, ton intelligence, et ta détermination qui font de toi un grand médecin en clinique et en recherche. Je suis très heureuse de pouvoir travailler avec toi prochainement.

REMERCIEMENTS

Au Professeur Jannick Selves

Professeur des Universités- Praticien Hospitalier, Anatomo-pathologiste

Veillez recevoir l'expression de ma sincère gratitude pour votre participation à ce travail, qui n'aurait pas pu aboutir sans votre expertise.

A l'ensemble de l'équipe « Pathogénie et commensalisme des Entérobactéries » du Laboratoire de Bactériologie-Hygiène, CHU de Toulouse-Purpan et au Docteur Patricia Martin, qui ont travaillé avec intérêt et dynamisme sur ce travail.

A l'ensemble de l'équipe du Laboratoire Vaiomer, Docteur Benjamin Lelouvier et Jérôme Lluch, pour leur investissement majeur dans ce travail. Je vous remercie particulièrement pour toutes vos explications et votre disponibilité tout au long de ma thèse.

A toute ma famille qui a toujours été là pour moi durant ces longues années d'étude. Vous avez su me soutenir dans les moments de doute, m'encourager dans les moments les plus difficiles, et me féliciter à chaque étape franchie. Heureusement que vous étiez là. Je vous aime. Et énorme bisous câlin tchin à ma nièce préférée Louann.

A Grég, mon chéri rencontré au cours d'une de ces folles soirées de l'internat, qui sait me supporter, me faire rire, me soutenir, m'écouter, être là pour moi. Et qui a beaucoup d'autres qualités. Bientôt la vie à deux, j'ai hâte. Merci de m'avoir fait découvrir ton Aveyron (et son fameux aligot/ratafia sur l'Aubrac).



A tes parents, tes frères, Delphine, Bertille et Jules qui m'ont accueilli chaleureusement dans leur maison.

A ton coloc Etienne, le guitariste, qui a dû me supporter pendant quelques années dans votre appart.

Aux ami(e)s :

de Bagnols : Claire et Marion, je pense à vous malgré la distance ; Elodie, la blonde bientôt Docteur ; Balkis, la plus belle ; Anastasia, une super Nana et David, profitez bien de votre voyage, j'espère que l'on ne se perdra plus de vue. Et bien sûr « pace e salute ! ».

de Montpellier : Perrine, Philippe, leurs filles et Gus, une famille formidable ; Elsa, merci pour ton accueil et tes soirées Parisiennes ; Léa.

de l'internat de Ranguel : Morgane, ma bordelaise préférée sur qui je peux compter, vivement une nouvelle randonnée viticole chaque année dans l'entre deux mers ! ; Marie (et Florian), merci pour ta douce amitié qui j'espère durera ; Anne Charlotte et Jimmy, le couple le plus mignon de l'internat, je vous souhaite plein de bonheur pour la suite sur Mulhouse ; et les autres.

Amandine (et son Machu, un peu grâce à moi) : la plus géniale des néphro ! Reste comme tu es. Et encore merci pour ces superbes vacances Tahitiennes. Spéciale dédicace à tes parents qui m'ont adopté (et supporté) avec tant de gentillesse pendant quelques jours là-bas ;).

aux Cadurciens, que notre amitié dure : Elodie, merci pour ton amitié sincère et d'être là pour moi quand j'en ai besoin, je suis très heureuse de t'avoir rencontré ! ; et Fabien, allez l'ASM

de Clermont !! ; Déborah, merci pour ta sagesse et ton amitié ; Thibault, et son incroyable hyperactivité ; Mimi, la sportive adorable ; Anaïs, et sa bonne humeur ; Guillaume, le ronchon ; Thomas ; Pierre. Petite pensée aux 2 pharmaciens qui se sont délocalisés... dans l'Aveyron !

aux Tarbais : Gwendoline, Alexandra, Valérie, Zoé, Thibault... . Même si je n'étais pas souvent là, je garde un bon souvenir de ce semestre passé avec vous.

A mes co-internes et aux bons moments passés ensemble : Marie, Mumu, Thibault, Chloé, Manon, Cécile, Claire, Martin, Fédé, Pauline, Lucile, Marion et les plus jeunes.

Aux médecins :

Les jeunes mamans : Pauline et sa famille, tu es pour moi une superwoman et toujours avec enthousiasme ! ; Hélène, malgré tes « Salut, bande de nazes ! » tu caches un cœur gros comme ça et tu as su prendre soins de tes internes, merci d'être énorme ; Julie M., ma future cochef avec plaisir.

Les Purpanais : Dr Marie-Angèle Robic, merci pour ton immense savoir que tu nous transmets ; Dr Karl Barange, le roi de l'endoscopie (et de la plongée), merci d'être là pour nous perfectionner en endoscopie ; Dr Sophie Metivier, merci pour ta gentillesse ; Alice Rondoudou, Dr Delphine Bonnet.

Les Ranguellois, je vous remercie de ce que vous m'avez appris: Pr Barbara Bournet, Dr Jacques Moreau, Marion, Adrian ; Nadim, merci pour ton soutien dans mes débuts d'interne ! (et ne m'appelle plus Delabobo s'il te plaît ;))

Les ancien(ne)s chefs du début d'internat: Adeline, Audrey, Camille, Pierre, Nicolas, Matthieu G., Julie C. Et de la fin d'internat : Sophie, Cécile, merci pour ses semestres passés avec vous, je vous souhaite que du bonheur pour la suite.

Les Cadurciens : Merci à Gaëlle et Nassima, les plus belles, pour tous ce que vous m'avez appris et votre motivation ; au Dr Hadjadj, pour l'accueil chaleureux dans ton service ; au Dr Vignoboul, pour les premiers pas au bloc procto inoubliables; Laura et Virginie.

Les Tarbais, une super équipe qui m'a beaucoup appris et m'a permis d'évoluer : Jérémy, mon premier co-interne devenu un grand médecin malgré ses doutes ; Dr Andrau ; Dr Kanafi ; Dr Glibert ; Dr Imani ; Dr Desjardins.

A l'équipe de Néphrologie de Ranguéil (Pr Kamar, Dr Ribes, Dr Cointault, Gaëlle, ...), et son dynamisme sans faille, qui a su me passionner de la greffe durant ces quelques mois.

Aux infirmières et toute l'équipe de Purpan (ceux que j'ai connu qui sont partis, ceux qui sont restés), c'est un réel plaisir de pouvoir travailler avec vous ! Vous êtes au top ! ; de Ranguéil, merci pour votre gentillesse à mes débuts; de Cahors, des infirmières un peu dingo mais trop cool ; de Tarbes, une équipe d'endoscopie adorable.

Aux secrétaires de Purpan, merci pour votre gentillesse et votre aide tout au long de l'internat ; de Ranguéil ; de Cahors, les 2 secrétaires les plus cool de la gastro ; et de Tarbes.

A l'équipe de recherche de Purpan (Maika, Carine, Léa, Guillemette, Béatrice), merci pour votre sympathie, votre aide et votre soutien durant tous ces mois où je suis venue vous embêter. Par contre, à partir de Novembre je vous préviens, je ne lis plus les ECG des protocoles...

Aux patients qui nous font aimer notre travail.

A une autre équipe de gastro formidable, celle de la *clinique Claude Bernard d'Albi*, médicale (Manu, Philippe, Frédéric, Fabrice, Hélène, Antoine, Matthieu), infirmières et secrétaires (merci de m'avoir sauvé la vie plusieurs fois !) qui ont bien voulu de moi pour mes débuts de remplaçante. J'espère avoir été à la hauteur. Je vous remercie d'avoir toujours été là quand j'en avais besoin, de votre gentillesse, et de votre humilité.

Spéciale dédicace au Dr Daude, ou plutôt « maître Yodaude » et ses jeunes padawans. Merci pour ta motivation sans faille, ta soif de nouveautés et tout ce que tu nous as appris et ce que tu continues de m'apprendre (avec l'accent du Sud-ouest bien sûr).

A l'équipe accueillante de la *clinique du Pont de Chaume de Montauban* (Dr Sanchez, Dr Pienkowski, Dr Madonia, Dr Dubuc, Dr Pierre-Nicolas), merci pour tous vos conseils.

Aux proctologues de la *clinique Saint Jean* (Dr Gorez, Dr Staumont) et l'équipe du bloc opératoire qui m'ont agréablement accueilli cette année.

A tous ceux que j'ai pu oublier.

« On devrait pouvoir aimer tout d'une personne, l'oesophage, et le foie, et les intestins. Peut-être qu'on ne les aime pas par manque d'habitude, si on les voyait comme ils voient nos mains et nos bras peut-être qu'on les aimerait. » **Le Mur de Jean-Paul Sartre - Sartre**

**Etude prospective du microbiote intestinal et sanguin chez
des patients atteints de stéatopathie métabolique**

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS.....	5
INTRODUCTION GENERALE.....	6
I. Les stéatopathies métaboliques : aspects cliniques.....	7
A. Définition.....	7
B. Physiopathologie.....	8
C. Epidémiologie.....	9
D. Facteurs de risque.....	10
E. Histoire naturelle.....	11
F. Pronostic.....	12
1) Complications hépatiques.....	14
2) Complications extra-hépatiques.....	15
II. Outils diagnostiques dans les stéatopathies métaboliques.....	16
A. Diagnostic histologique.....	16
B. Diagnostic non invasif.....	19
1) Les marqueurs non invasifs de stéatose.....	20
2) Les marqueurs non invasifs de stéato-hépatite.....	22
3) Les marqueurs non invasifs de fibrose.....	22
C. Stratégie diagnostique.....	26
1) Stratégie de dépistage et d'adressage en centre spécialisé d'hépatologie.....	26
2) Stratégie de diagnostic de la fibrose en centre spécialisé d'hépatologie.....	28
D. Diagnostics différentiels.....	30
III. Stéatopathie métabolique et microbiote intestinal.....	30
A. Le microbiote intestinal : définition et fonctions physiologiques.....	30
B. Microbiote sanguin et microbiote hépatique.....	32
C. Notions de dysbiose : aspects physio-pathologiques.....	34
D. Lien entre le microbiote et les maladies métaboliques.....	34
1) L'obésité.....	34
2) Le diabète de type 2.....	34
E. Lien entre le microbiote et les stéatopathies métaboliques.....	35
1) Aspects physio-pathologiques.....	35
2) Caractérisation du microbiote intestinal dans la stéatopathie métabolique.....	37
3) Caractérisation du microbiote sanguin dans la stéatopathie métabolique.....	40
F. Rôle pathogène de l' <i>Escherichia coli</i> du groupe B2 produisant la génotoxine colibactine.....	40
G. Microbiote intestinal : une nouvelle cible thérapeutique.....	41
H. Méthodes d'étude du microbiote intestinal, sanguin et tissulaire.....	42
TRAVAIL DE THESE.....	44
ETUDE 1.....	45

I. INTRODUCTION	46
A. Contexte et hypothèses	46
B. Objectifs.....	47
II. PATIENTS ET METHODES.....	47
A. Schéma d'étude	47
B. Critères d'éligibilité.....	48
1) Critères d'inclusion	48
2) Critères de non inclusion ou d'exclusion	48
C. Modalités de recrutements.....	48
D. Indication de la biopsie hépatique.....	49
E. Critères de jugement.....	49
F. Recueil de données.....	50
1) Modalités de la biopsie hépatique et étude anatomopathologique.....	50
2) Collection d'échantillons biologiques	51
G. Etude du microbiote intestinal	51
H. Etude du microbiote hépatique	52
I. Calcul de la taille d'étude	52
J. Méthodes statistiques	53
III. RESULTATS	53
A. Population d'étude	53
B. Description de la population et comparaison des caractéristiques des patients selon la présence d'une fibrose sévère	56
C. Résultats histologiques	58
D. Prévalence de l' <i>E. coli</i> appartenant au groupe B2	60
1) Prévalence d' <i>E. coli</i> du groupe B2 en fonction de la sévérité de la fibrose	61
2) Prévalence d' <i>E. coli</i> du groupe B2 en fonction de la présence d'une stéato-hépatite	61
E. Prévalence du portage de l'îlot <i>pks</i> codant pour la génotoxine colibactine chez les patients porteurs d' <i>E. coli</i> du groupe B2.....	63
F. Présence d' <i>E. coli</i> du groupe B2 dans le tissu hépatique.....	66
IV. DISCUSSION.....	66
V. CONCLUSION	68
ETUDE 2	69
I. INTRODUCTION	70
A. Contexte et hypothèses	70
B. Objectif	71
II. PATIENTS ET METHODES.....	71
A. Schéma d'étude	71
B. Critères d'éligibilité.....	72
1) Critères d'inclusion	72
2) Critères de non inclusion ou d'exclusion	72

C.	Critères de jugement.....	72
D.	Etude du microbiote sanguin	72
1)	Détermination quantitative de l'ADN bactérien circulant par dosage qPCR du gène bactérien 16S dans le sang	73
2)	Analyse qualitative par séquençage métagénomique haut débit de l'ADNr 16S du microbiote sanguin.....	73
E.	Calcul de la taille de l'étude	73
F.	Méthodes statistiques	74
III.	RESULTATS	74
A.	Description de la population et comparaison des caractéristiques des patients selon la présence d'une fibrose sévère	74
B.	Résultats histologiques	77
C.	Quantification de l'ADN bactérien dans le sang	79
1)	Quantification de l'ADNr 16S en fonction de la sévérité de la fibrose	79
2)	Quantification de l'ADNr 16s en fonction de la sévérité de la stéatose	80
3)	Quantification de l'ADNr 16s en fonction de la présence d'une stéato-hépatite	80
D.	Séquençage du microbiote sanguin.....	82
1)	Composition taxonomique du microbiote sanguin selon la sévérité de la fibrose.....	83
2)	Composition taxonomique du microbiote sanguin selon la présence d'une stéato-hépatite	86
IV.	DISCUSSION.....	88
V.	CONCLUSION	91
	REFERENCES	92

ABREVIATIONS

ADNr 16S: ADN ribosomal 16S

ALAT: alanine aminotransférase

ASAT: aspartate aminotransférase

AUROC: area under receiver operator curve

CAP: controlled attenuation parameter

CHC: carcinome hépato-cellulaire

DAMPs: damage-associated molecular patterns

DT2: diabète de type 2

γ GT: gamma-glutamyltranspeptidase

HOMA-IR: Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance

IL: interleukine

IMC: indice de masse corporelle

IR: insulino-résistance

LPS: lipopolysaccharides

LBP: lipopolysaccharide-binding protein

MI: microbiote intestinal

MS: microbiote sanguin

NAFL: Non Alcoholic Fatty Liver

NAFLD: Non Alcoholic Fatty Liver Diseases

NAS score: NAFLD Activity Score

PAMPs: pathogen-associated molecular patterns

PNPLA3: Patatin-like phospholipase domain-containing 3

TLR: toll like receptor

TM6SF2: Transmembrane 6 superfamily member 2

TNF- α : tumor necrosis factor α

SSI: supersonic shear imaging

St. Met: stéatopathie métabolique

VLDL: Very Low Density Lipoprotein

INTRODUCTION GENERALE

I. Les stéatopathies métaboliques : aspects cliniques

Les stéatopathies métaboliques (St. Met) ou hépatopathies métaboliques, également appelées Non Alcoholic Fatty Liver Diseases (NAFLD), sont la manifestation au niveau hépatique du syndrome métabolique [1] et d'une insulino-résistance (IR) [2]. La première description de cette entité clinique a été effectuée par Ludwig *et al.* en 1980 [3].

A. Définition

Les St. Met regroupent un spectre histologique dont le dénominateur commun est la présence d'une stéatose, en l'absence de consommation excessive d'alcool (< 20 g/j pour la femme et < 30 g/j pour l'homme) et de toute autre cause de stéatose (virus de l'hépatite C, maladie de Wilson, malnutrition, médicaments, toxiques, abetalipoprotéinémie, etc...) [4, 5].

Le spectre histologique comporte (Figure 1) :

- la stéatose pure (Non Alcoholic Fatty Liver, NAFL) définie par une accumulation de lipides dans plus de 5% des hépatocytes,
- la stéato-hépatite (Non Alcoholic Steato-Hepatitis, NASH) qui associe à la stéatose, une inflammation lobulaire et des lésions hépatocytaires, avec des degrés variables de sévérité de la fibrose,
- la cirrhose.

Classiquement, on décrit que la stéato-hépatite expose au risque de fibrose hépatique, de cirrhose et de carcinome hépato-cellulaire (CHC) [6-8].

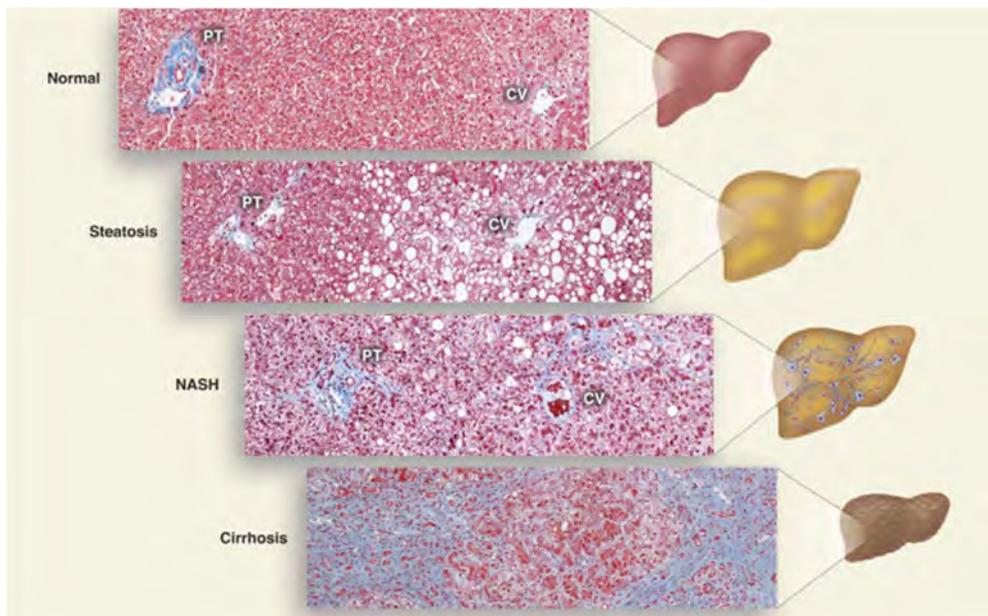


Figure 1 : Schéma du spectre histologique de la St. Met. D'après [9].

B. Physiopathologie

La physiopathologie est complexe, impliquant de multiples mécanismes, dont la chronologie est encore imparfaitement comprise [10]. L'accumulation intra-hépatique de triglycérides provient d'une part de l'estérification d'acides gras libres augmentés en condition d'hyperglycémie et d'hyperinsulinémie, et d'autre part d'une diminution de leur exportation par les lipoprotéines VLDL (« Very Low Density Lipoprotein ») (Figure 2). Les acides gras libres proviennent (Figure 2) :

- d'une augmentation de la lipogenèse *de novo* intra-hépatique
- d'une diminution de la β -oxydation mitochondriale
- d'une augmentation de la lipolyse du tissu adipeux périphérique (par diminution de l'effet anti-lipolytique de l'insuline)
- et enfin d'un excès de graisses notamment d'acides gras saturés apportés par l'alimentation et affluant depuis l'intestin dans les chylomicrons.

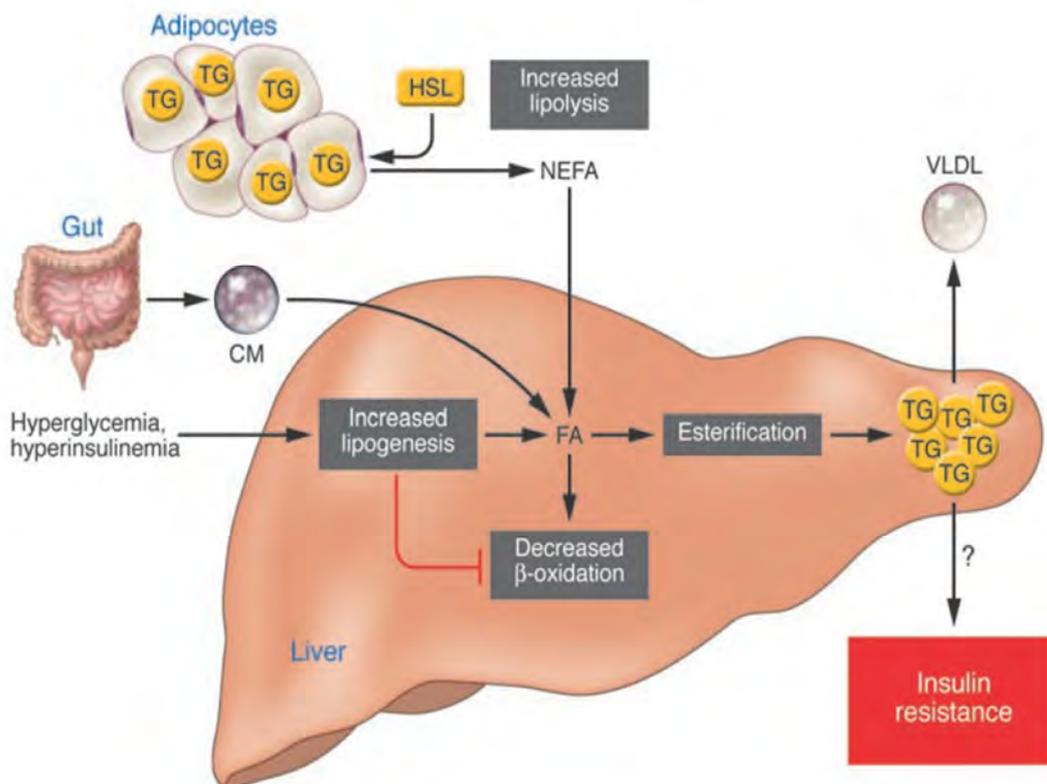


Figure 2 : Schéma illustrant les mécanismes conduisant au développement d'une stéatose. D'après [11]. Abréviations : CM : chylomicrons ; FA : acides gras ; NEFA : acides gras libres non estérifiés ; TG : triglycérides ; VLDL : « Very Low Density Lipoprotein ».

La souffrance hépatocyttaire (ballonisation) et les lésions fibro-inflammatoires hépatiques sont liées d'une part à l'IR qui stimule les mécanismes de stress oxydatif et de lipotoxicité (peroxydation lipidique) [11-16], et d'autre part à la libération de cytokines pro-inflammatoires par le tissu adipeux périphérique.

Enfin, il a été mis en évidence récemment le rôle du microbiote intestinal (MI) dans la pathogenèse de la St. Met [17, 18] que nous détaillerons plus loin.

C. Epidémiologie

La St. Met devient une des causes les plus fréquentes d'hépatopathie chronique dans les pays occidentaux [19]. L'augmentation de son incidence suit parallèlement celle du diabète, de l'obésité et du syndrome métabolique [20]. Dans la population générale adulte, la prévalence globale de la de la St. Met tous stades confondus est estimée à 25%, allant de 24% en Europe et en Amérique du Nord, 27% en Asie, 30% en Amérique du Sud et jusqu'à 32% au Moyen-Orient [19] (Figure 3).

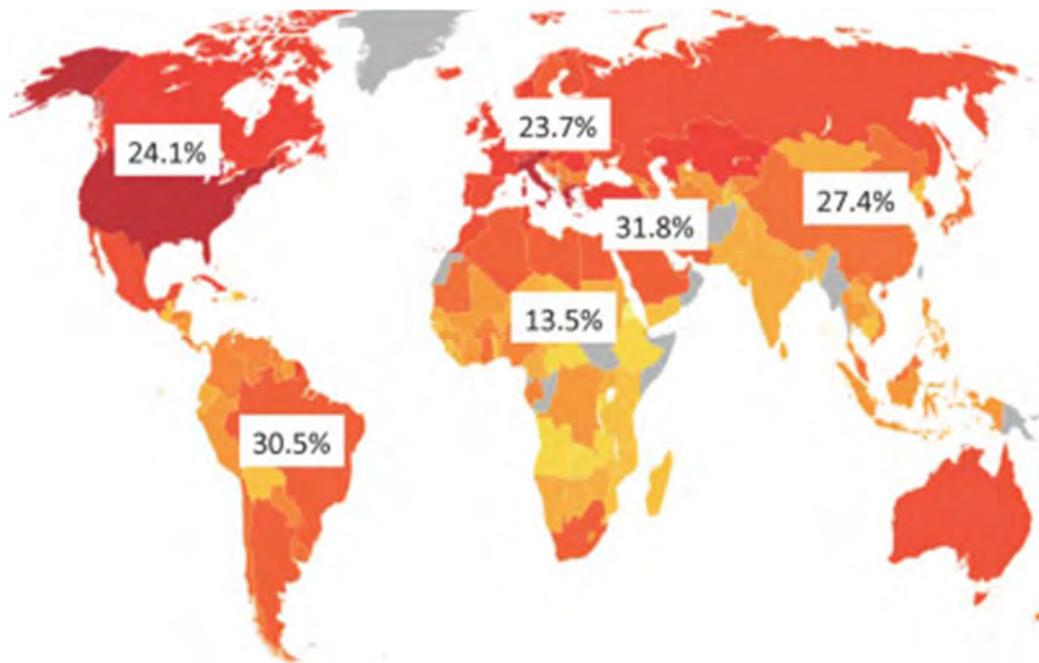


Figure 3 : Prévalence de la St. Met dans le monde. D'après [19].

La prévalence est plus forte dans certaines populations à risque, notamment en cas d'obésité morbide (90%) [21], de DT2 (70%) [22] ou de dyslipidémie (60%) [3]. Des disparités ethniques ont aussi été identifiées, avec une prévalence plus élevée et une maladie plus sévère

chez les populations hispaniques ou asiatiques [23] par rapport aux caucasiens ou aux afro-américains [24-26].

La prévalence de la stéato-hépatite est plus faible que celle de la stéatose, estimée entre 3 et 5% dans la population générale, mais s'élève entre 22 et 35% dans les populations présentant un syndrome métabolique, un diabète ou une obésité [27, 28]. Elle atteint 12% dans la population générale adulte aux Etats-Unis [25]. La stéato-hépatite serait la première cause de fibrose sévère en France [29], la troisième cause de cancer du foie [30] et la seconde indication de transplantation hépatique pour cirrhose ou pour cancer du foie aux Etats-Unis [31].

L'incidence de la St. Met a été peu étudiée et semble dépendre de la population observée : 29 cas pour 100 000 personnes-année en Angleterre [32], et jusqu'à 86 cas pour 1000 personnes-année au Japon [33]. L'incidence du CHC dans la St. Met était évaluée en 2015 à 0,44 pour 1000 personnes-années, mais augmente à 5,29 pour 1000 personnes-années en cas de stéato-hépatite [19] et à 2,6% par an en cas de cirrhose [34].

D. Facteurs de risque

La St. Met est associée à la présence d'au moins un facteur de risque métabolique parmi : l'obésité abdominale, l'IR ou le DT2, et la dyslipidémie [35-40]. Le syndrome métabolique est défini selon la Fédération Internationale du Diabète par une obésité abdominale (définie en Europe par un tour de taille ≥ 94 cm pour l'homme et ≥ 80 cm pour la femme) et au moins deux des critères suivants : triglycérides $\geq 1,50$ g/l ou dyslipidémie traitée, HDL-C $< 0,40$ g/l pour l'homme et $< 0,50$ g/l pour la femme ou dyslipidémie traitée, PAS ≥ 130 mmHg ou PAD ≥ 85 mmHg ou hypertension artérielle traitée, glycémie veineuse à jeun ≥ 1 g/l ou DT2 traité. La présence du syndrome métabolique n'est pas requise pour définir la St. Met.

Bien que la majorité des patients atteints de St. Met présentent un surpoids ou une obésité, la présence d'une St. Met a été décrite chez des patients avec un IMC normal. La prévalence de la « lean NAFLD » est estimée entre 10 et 30% dans le monde [41]. Les facteurs de risque associés sont l'adiposité viscérale, le régime alimentaire riche en fructose et cholestérol, l'IR et l'intolérance au glucose [41, 42].

En raison du rôle protecteur des œstrogènes dans la survenue des maladies métaboliques, la prévalence de la St. Met est plus élevée et le stade de fibrose plus sévère chez les hommes de plus de 50 ans et les femmes ménopausées que chez les femmes pré-ménopausées [24, 25, 43-50].

De plus, il existe un polymorphisme génétique qui pourrait expliquer les différences de susceptibilité à développer une St. Met, tel que le gène Palatin-like phospholipase domain-containing 3 (PNPLA3), fortement associé à l'accumulation de lipides et à l'inflammation hépatique en particulier dans la population hispanique et chez les « lean NAFLD » [41, 51, 52], ou encore le gène Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase impliqué dans la sécrétion des triglycérides hépatiques, en particulier dans la population asiatique [53], et enfin le gène de l'Adiponectine [54]. Certains gènes tel que le variant *TM6SF2* (Transmembrane 6 superfamily member 2) rs58542926 du chromosome 19 sont aussi associés à une fibrose plus avancée [55].

Enfin, un certain nombre de pathologies sont également fortement associées à la présence d'une St. Met telles que l'hypothyroïdie, l'hypopituitarisme, l'hypogonadisme, le syndrome d'apnées du sommeil, le psoriasis et le syndrome des ovaires polykystiques (indépendamment de l'obésité, en raison d'un rôle délétère des androgènes) [56, 57].

E. Histoire naturelle

Différentes étapes ont été décrites dans l'histoire naturelle de la St. Met, correspondant au spectre d'entités histologiques (Figure 4):

- la stéatose pure
- la stéato-hépatite avec ou sans fibrose
- la cirrhose.

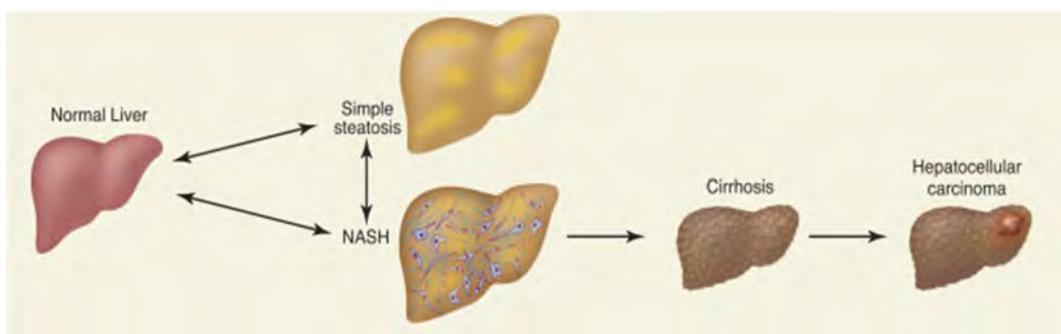


Figure 4 : Schéma de progression de la St. Met. D'après [9].

Classiquement considérée comme bénigne car potentiellement réversible [58], la stéatose pure peut pourtant évoluer dans 45% des cas vers une stéato-hépatite [59] et justifie donc une surveillance. En effet, le risque d'évolution vers la cirrhose et les complications hépatiques est

certes faible mais non négligeable, puisque près de 6% des patients avec une stéatose pure meurent de maladie hépatique après un suivi de 8 à 20 ans [60].

Les études qui ont réalisé des biopsies répétées au cours du temps ont montré qu'au stade de stéato-hépatite, environ 40% des patients connaissent une progression de leur fibrose [19, 61], 20% une régression, et 40% une stabilisation [62, 63].

Les temps de progression de la stéatose et de la stéato-hépatite vers la cirrhose sont estimés respectivement à 57 et 28 ans [62]. Cependant, deux études récentes ont suggéré que la stéatose pure pouvait progresser rapidement, ¼ des patients développant une fibrose sévère en 3 et 6 ans [59, 63].

La présence de lésions inflammatoires ou d'une fibrose, même légère sur la première biopsie est le meilleur facteur prédictif de progression vers la cirrhose [64, 65]. Les facteurs de risque cliniques de progression de la fibrose sont principalement l'aggravation des paramètres du syndrome métabolique [65], en particulier de l'obésité, de l'IR ou du DT2 [66], l'hypertension artérielle [62] et l'âge supérieur à 45-50 ans [64, 67, 68].

Chez les patients « lean NAFLD », la maladie hépatique semble moins sévère et le pronostic meilleur par rapport aux patients obèses [69].

Parmi les facteurs environnementaux, tandis que le tabagisme est un facteur de risque de fibrose dans la St. Met, [70, 71], une consommation d'alcool modérée serait à l'inverse associée à une atteinte histologique moins sévère par rapport à une absence totale de consommation d'alcool [72-75] mais ces données doivent être confirmées. En effet, une étude récente a montré qu'une faible consommation d'alcool dans la St. Met augmenterait le risque d'intolérance au glucose [76].

Par ailleurs, il a été suggéré un effet bénéfique du café en réduisant l'inflammation de la stéato-hépatite et en prévenant le risque de CHC [77].

Sur le plan biologique, une hyperferritinémie $> 1,5N$ [78] et l'hyperuricémie [79] seraient associées à un risque de fibrose plus avancée.

F. Pronostic

Contrairement aux autres hépatopathies, le pronostic des St. Met est principalement lié aux complications cardio-vasculaires et aux cancers (respectivement 40% et 30% des causes de mortalité), les complications de la cirrhose n'étant que la 3^{ème} cause de mortalité (10%) [61, 80].

Younossi *et al.* évalue l'incidence de mortalité par cause hépatique dans la stéatose et dans la stéato-hépatite à respectivement 0,77/1000 personne-année et 15,44/1000 personne-année, et l'incidence de mortalité globale à respectivement 11,77/1000 personne-année et 25,56/1000 personne-année [19].

Une méta-analyse parue en 2017 montre une augmentation de la mortalité globale dès le stade de fibrose légère (F1) [81], et de la mortalité d'origine hépatique dès le stade de fibrose modérée (F2), le risque augmentant avec le degré de fibrose [81]. Il est important de souligner que seule la présence d'une fibrose et non la stéato-hépatite, diminue la survie sans transplantation hépatique [82] (Figure 5 et 6).

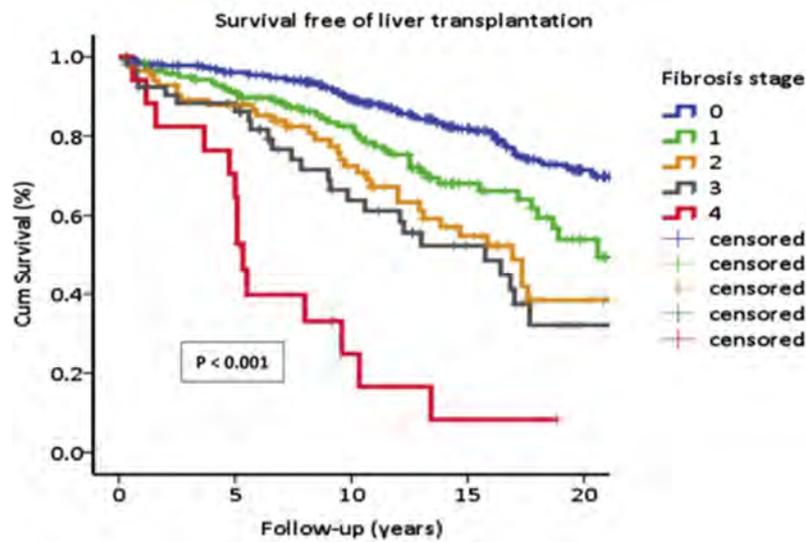


Figure 5 : Survie sans transplantation hépatique en fonction du stade de fibrose. D'après [82].

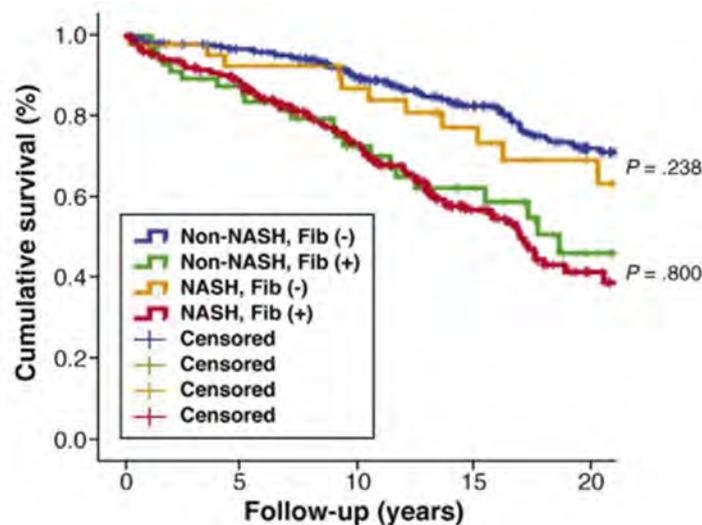


Figure 6 : Survie sans transplantation hépatique en fonction de la présence ou non d'une stéato-hépatite et / ou d'une fibrose. D'après [82].

1) Complications hépatiques

Les complications hépatiques sont celles liées aux décompensations de la cirrhose et au CHC. Près de 10 à 15% des patients sont au stade de cirrhose au moment du diagnostic, et un tiers sont décompensés [83]. L'insuffisance hépatique apparaît chez 38 à 45% des patients cirrhotiques après 7 à 10 ans [84].

Dans la St. Met, près de 13% des patients qui développent un CHC n'ont pas de cirrhose sous-jacente [85], probablement car le diabète et l'obésité sont des facteurs de risque indépendants de développement du CHC [86-89]. Les autres facteurs de risque de CHC sont résumés sur la Figure 7 (mutations génétiques, dysbiose, lipotoxicité...). Le CHC sur St. Met est associé à un moins bon pronostic que le CHC sur hépatite virale (survie plus courte de 5 mois, mortalité à 1 an de 61% vs 50%, décès dans la majorité des cas secondaires aux complications du CHC) [90]. Par rapport aux patients avec CHC survenant sur d'autres causes d'hépatopathies, les patients avec un CHC sur St. Met sont plus âgés au moment du diagnostic, présentent une prévalence de cirrhose sous-jacente plus faible (seulement 2/3 des patients) et ont plus de comorbidités extra-hépatiques [85, 91, 92]. Le CHC est également diagnostiqué à un stade plus avancé, probablement en raison d'une absence de dépistage avant le stade de cirrhose [93]. Ils reçoivent également moins de traitement curatif, probablement du fait de leurs comorbidités [93]. Ainsi, la St. Met devient la deuxième cause de transplantation hépatique pour CHC aux Etats-Unis en 2012 [31, 94, 95].

Par ailleurs, des études épidémiologiques ont montré que le syndrome métabolique pouvait être également un facteur de risque de cholangiocarcinome intrahépatique [96, 97].

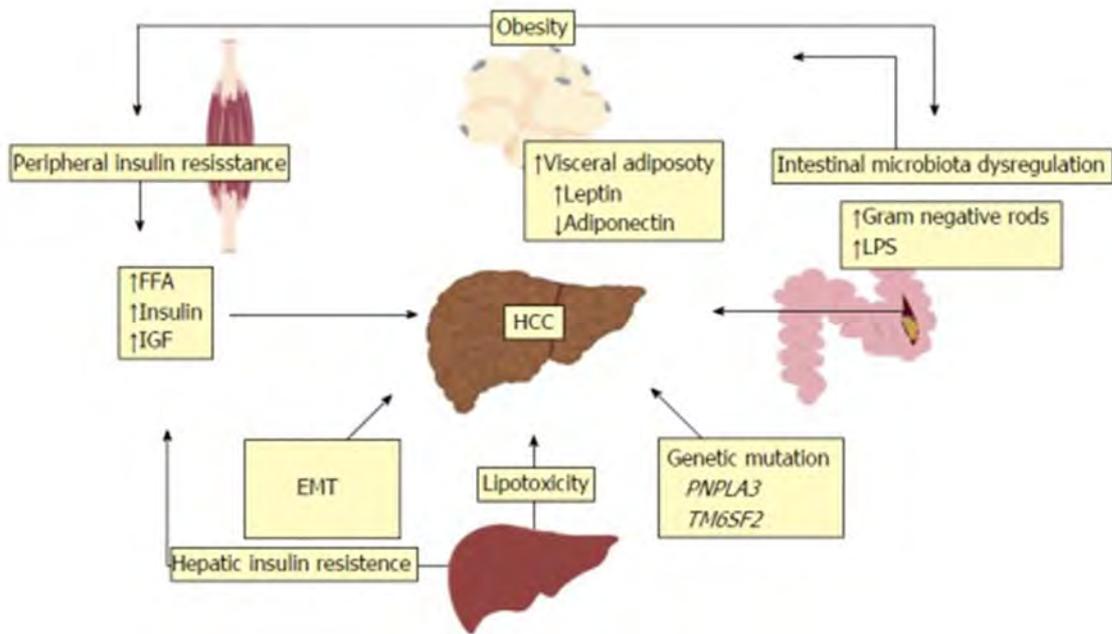


Figure 7 : Facteurs de risque de CHC dans la St. Met. D'après [98]. Abréviations : EMT : Transition épithéliale à mésenchymateuse ; FFA : acides gras libres ; HCC : Carcinome hépatocellulaire ; IGF : Insulin-like growth factor ; LPS : Lipopolysaccharide ; NAFLD : Non-alcoholic fatty liver disease ; NASH : Non-alcoholic steatohepatitis ; PNPLA3 : Palatin-like phospholipase domain-containing 3 ; TM6SF2 : Transmembrane 6 superfamily member 2.

2) Complications extra-hépatiques

Bien que l'IR puisse être une des causes de survenue de la stéatose, le développement d'une stéatose peut précéder et participer au développement d'une IR hépatique et systémique. En effet, la stéatose peut induire une dérégulation du métabolisme des acides gras et une diminution de la clairance de l'insuline [99, 100]. En outre, la présence d'une stéatose est toujours un facteur d'aggravation et de déséquilibre d'une IR ou d'un DT2 préexistant [11, 101, 102]. La St. Met est aussi un facteur prédictif de développement du syndrome métabolique [100, 103].

De plus, la St. Met augmente le risque cardio-vasculaire et favorise l'athérosclérose carotidienne précoce [104]. En effet, la stéato-hépatite favorise le relargage de cytokines pro-inflammatoires aggravant l'athérosclérose, entraîne un état d'hypercoagulabilité sanguine, une augmentation du LDL-cholestérol et une diminution du HDL-cholestérol. Les patients atteints d'une stéato-hépatite présentent également une dysfonction endothéliale [105], et une

altération de la fonction diastolique et de la morphologie cardiaque plus importante par rapport aux patients présentant une stéatose pure. L'altération de la fonction diastolique et de la morphologie cardiaque, de même que l'épaisseur de la graisse épicaudique sont associées à un stade de fibrose plus sévère [106].

Enfin, la St. Met est un facteur de risque de cancers extra-hépatiques notamment de cancer colorectal [107, 108]. La prévalence des adénomes et des néoplasies colorectales est augmentée dans la St. Met par rapport à la population générale (respectivement 35% et 19% versus 21% et 5%), principalement chez les patients au stade de stéato-hépatite, et prédominant dans le colon droit [108]. Le risque de cancers du pancréas, de l'estomac, du rein et de mélanome est également plus important dans la St. Met [109, 110]. D'autres cancers (œsophage, sein, prostate) ont été associés à l'obésité ou au syndrome métabolique, mais le lien avec la St. Met n'a pas encore été démontré [111].

Enfin, les patients avec une St. Met ont un sur-risque de développer une néphropathie chronique et une rétinopathie diabétique [112].

II. Outils diagnostiques dans les stéatopathies métaboliques

A. Diagnostic histologique

La biopsie hépatique est l'outil diagnostique de référence de la St. Met [113]. Elle apporte une évaluation qualitative et semi-quantitative du degré de stéatose, de l'activité inflammatoire et de la fibrose. Elle permet ainsi de distinguer une stéatose pure d'une stéato-hépatite et de quantifier le degré de sévérité de la fibrose.

La stéatose est définie par l'accumulation dans > 5% des hépatocytes de triglycérides formant de vacuoles intra-cytoplasmiques qui refoulent le noyau. La stéatose liée au syndrome métabolique est typiquement macro-vésiculaire et prédomine en centro-lobulaire. Une stéatose < 5% est physiologique. Les stéatoses d'origine secondaires sont à l'inverse préférentiellement micro-vésiculaires.

La stéato-hépatite est définie par la présence en plus d'une stéatose, d'une ballonnisation hépatocytaire avec ou sans corps de Mallory, et d'une inflammation lobulaire [114, 115]. Ces lésions sont identiques à celles liées à une intoxication chronique d'alcool ou à une toxicité du méthotrexate. D'autres lésions histologiques peuvent être présentes : mégamitochondries, noyaux glycogéniques, lipogranulomes, surcharge en fer périportale mais ne rentrent pas dans

les critères diagnostiques. En outre, la fibrose n'est pas non plus un critère diagnostique de stéato-hépatite.

La classification du NASH-Clinical Research Network (NASH-CRN) Scoring System est la référence pour définir le degré de fibrose [7] (Figure 8).

Stade de la fibrose de la NASH	Stade
Aucune	0
Légère, fibrose périsinusoidale zone 3	1a
Modérée, fibrose périsinusoidale zone 3	1b
Fibrose portale/périportale uniquement	1c
Fibrose périsinusoidale et portale/périportale Zone 3	2
Ponts fibreux (porto-portaux)	3
Cirrhose	4

Figure 8 : NASH-Clinical Research Network (NASH-CRN) Scoring System (Score de fibrose). D'après [7].

La définition histologique classique de la stéato-hépatite repose sur un score américain, proposé en 2005 par Kleiner *et al.* appelé le score NAS (« NAFLD Activity Score») [116] (Figure 9). Ce score additionne les degrés de sévérité des lésions de stéatose et d'hépatite (inflammation lobulaire et ballonnisation hépatocytaire). Le score NAS affirme la présence d'une stéato-hépatite s'il est ≥ 5 , ou l'exclut s'il est ≤ 2 , mais un score à 3 ou 4 conclut à une stéato-hépatite « borderline ».

Degré d'activité de la NASH	NAFLD Activity Score (NAS)			
	0	1	2	3
Stéatose	< 5%	5%-33%	>33%-66%	> 66%
Inflammation lobulaire (x200/champ)	sans infiltrat	< 2 infiltrats	2-4 infiltrats	> 4 infiltrats
Ballonnisation	Absence	Quelques	Nombreuses	

Figure 9 : Score NAS (« NAFLD Activity Score ») de Kleiner. D'après [116].

Actuellement ce score reste utilisé pour grader la sévérité de la stéato-hépatite mais vise à être remplacé par le score français proposé par Pierre Bedossa *et al.* en 2012 appelé score SAF

(Steatosis, Activity, Fibrosis) [117, 118] (Figure 10), plus précis car il distingue la stéatose de l'activité inflammatoire (hépatite):

- le degré de sévérité de la stéatose: S0 : < 5%, S1 : 5-33%, S2 : 34-66%, S3 : > 67%
- le degré d'activité : A0 : aucune, A1 : légère, A2 : modérée, A3 : sévère, A4 : très sévère à partir de la somme des degrés d'inflammation lobulaire (0 à 2) et de ballonisation (0 à 2)
- la fibrose est quantifiée selon la classification NASH-CRN [7].

Stéatose (0-3)	<5%	0 point
	5-33%	1 point
	34-66%	2 points
	>66%	3 points
Activité (0-4)	Ballonisation	0-2 points
	Inflammation lobulaire	0-2 points
Fibrose (0-4)	absence	0 point
	Périsinusoidale ou périportale	1 point
	Périsinusoidale et périportale	2 points
	Fibrose en pont	3 points
	Cirrhose	4 points

Figure 10 : Score SAF (Steatosis Activity Fibrosis). D'après [118].

A partir du score SAF, l'algorithme diagnostique FLIP a été proposé pour distinguer la stéatose pure de la stéato-hépatite (Figure 11). En résumé, le diagnostic de stéato-hépatite requiert la présence d'une stéatose (S1 minimum) associée à la présence à la fois d'inflammation (1 minimum) et de ballonisation (1 minimum) [117, 118].

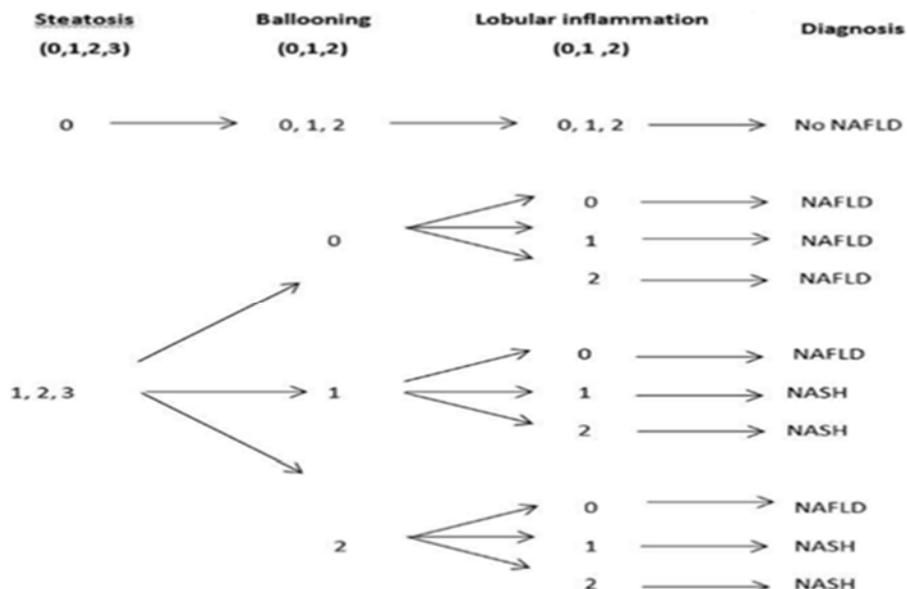


Figure 11 : Algorithme de FLIP (détermination de la stéato-hépatite selon le score SAF). D'après [117, 118].

Des coupes histologiques des différentes lésions de stéatose, stéato-hépatite et fibrose sont représentées sur la Figure 12.

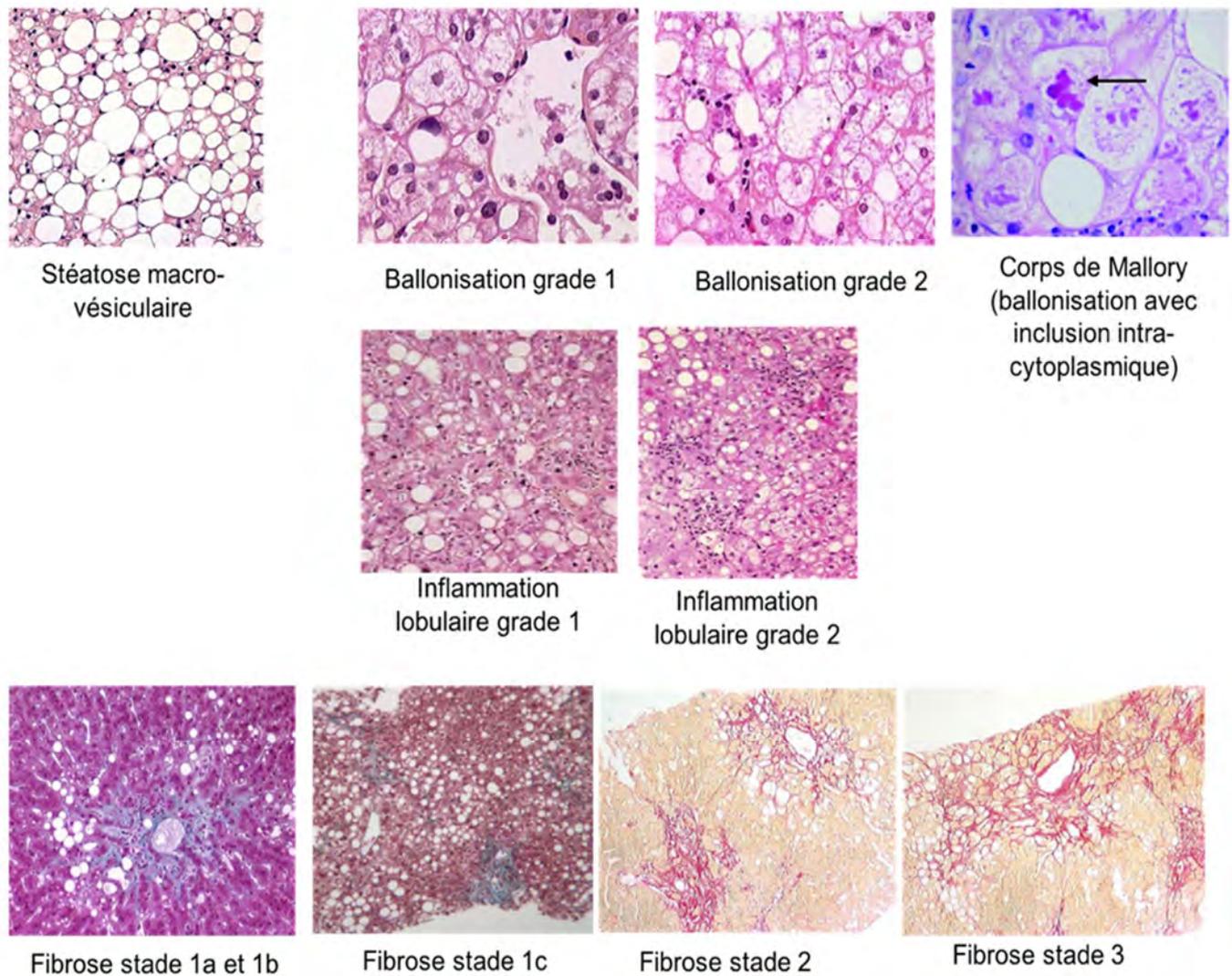


Figure 12 : Coupes histologiques représentatives des différentes lésions de stéatose, stéato-hépatite (ballonisation hépatocytaire et inflammation lobulaire) et fibrose (stade 1 à 3)

B. Diagnostic non invasif

Outre le caractère invasif, il existe plusieurs limites à la biopsie hépatique telles que le risque d'erreur d'échantillonnage lié à l'hétérogénéité de la répartition des lésions, qui empêchent son utilisation pour du dépistage ou du suivi régulier de l'évolution de la maladie. Pour ces raisons, des méthodes diagnostiques non invasives ont été développées. Nous détaillerons plus loin les indications de la biopsie hépatique et la place des tests non invasifs.

L'objectif des tests non invasifs est de sélectionner les patients candidats à la biopsie hépatique voire de se substituer à la biopsie, actuel examen diagnostique de référence.

1) *Les marqueurs non invasifs de stéatose*

a) Techniques d'imagerie évaluant la stéatose

L'IRM-PDFF (magnetic resonance imaging-proton density fat fraction) (Figure 13) et la spectroscopie par résonance magnétique (H-MRS) sont les deux techniques les plus précises pour diagnostiquer la présence de stéatose et la quantifier [119, 120]. Bien que leur utilisation en pratique clinique n'est pas encore envisageable en raison de leur coût et du manque de disponibilité, elles doivent néanmoins être utilisées comme référence pour les essais cliniques [119].

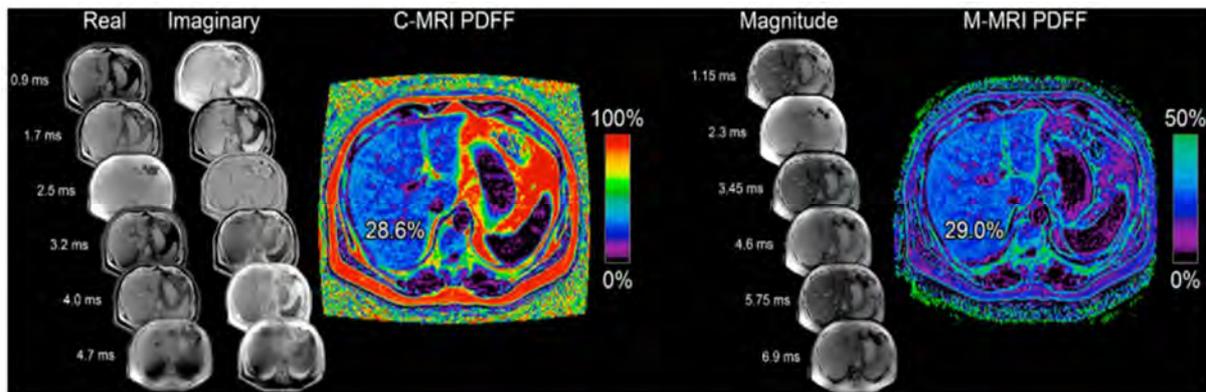


Figure 13 : Image d'évaluation et de quantification de la stéatose par IRM-PDFF (magnetic resonance imaging-proton density fat fraction)

L'échographie hépatique, qui a une sensibilité limitée (ne détecte la stéatose qu'à partir de 20%), et qui ne permet pas de la quantifier [121, 122], doit cependant être réalisée en première intention en pratique clinique pour le diagnostic de stéatose en raison de sa disponibilité et de son faible coût par rapport à l'IRM.

La tomодensitométrie abdominale permet aussi de faire le diagnostic et d'évaluer de façon semi-quantitative la stéatose [123] mais sa sensibilité est moindre que l'IRM et la variabilité inter et intra-observateur est importante. Elle ne doit donc pas être utilisée en pratique courante.

Le CAP (controlled attenuation parameter) est un logiciel implémenté sur les appareils de FibroScan® qui mesure l'atténuation du signal ultrasonore émis par l'élastométrie

impulsionnelle (Figure 14). Il permet non seulement de détecter mais aussi de quantifier la stéatose (absence de stéatose (S0) si < 215 dB/m, stéatose légère entre 10 et 33% (S1) si 215 à 252 db/m, stéatose modérée entre 33% et 66% (S2) si > 252 db/m, stéatose sévère (S3) $>66\%$ si >296 dB/m) [124]. Ces seuils ne sont pas encore parfaitement validés et semblent varier selon les études et les populations étudiées [125-130]. Comme pour le FibroScan®, sa performance est altérée par l'IMC [126, 129] et l'utilisation d'une sonde XL doit être privilégiée chez les patients obèses [131]. Bien que moins précis que l'IRM pour distinguer les différents grades de stéatose [132], sa disponibilité et son faible coût pourrait lui donner une place dans la pratique clinique quotidienne.

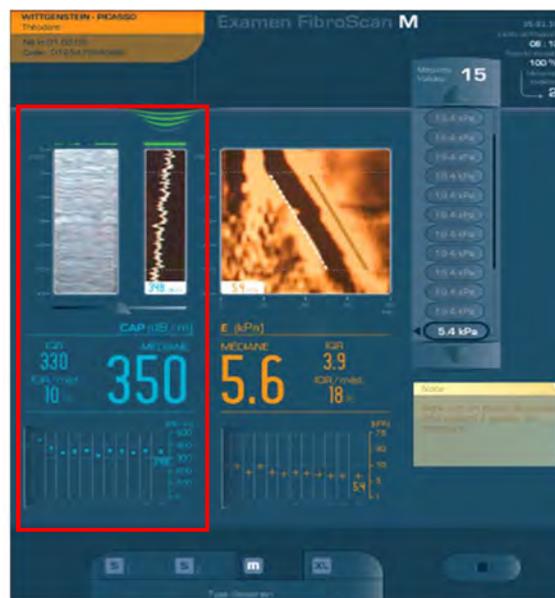


Figure 14 : Quantification de la stéatose par le CAP (controlled attenuation parameter) implémenté dans l'appareil de FibroScan®

b) Biomarqueurs de stéatose

Le fatty liver index (FLI), le SteatoTest® et le NAFLD liver fat score (NAFLD-LFS) sont les trois scores les plus utilisés dans les essais cliniques. D'autres ont été proposés : l'hépatostéatose index (HSI), le visceral adiposity index (VAI), le lipid accumulation product (LAP) et le triglycéride \times glucose (TyG) index. Tous correspondent à des formules qui combinent des paramètres cliniques et biologiques simples. Certains sont brevetés, d'autres gratuits. Ils permettent de diagnostiquer la présence d'une stéatose mais ne permettent pas de la quantifier [133]. Ils ne sont pas validés en pratique clinique [134] et leur intérêt serait principalement de dépister la présence d'une stéatose dans la population générale ou dans des essais à grande échelle en raison de leur faible coût et de leur disponibilité.

2) Les marqueurs non invasifs de stéato-hépatite

Aucune technique d'imagerie ne permet de distinguer stéatose et stéato-hépatite. Des biomarqueurs ont été développés mais ne sont pas encore validés:

- le NashTest® (sb 33%, sp 94%) [135],
- la Cytokératine 18 fragments (CK-18) : marqueur de l'apoptose des hépatocytes et de l'inflammation (sb 88%, sp 89%) [136],
- le rapport adiponectine/leptine sérique combiné au score HOMA [137].

La biopsie hépatique reste l'examen de référence pour le diagnostic de stéato-hépatite.

3) Les marqueurs non invasifs de fibrose

a) Biomarqueurs de fibrose

Il existe des biomarqueurs (Tableau 1) (scores combinant des données biologiques et cliniques) brevetés et payants et d'autres disponibles gratuitement sur internet. Ces scores ont une forte valeur prédictive négative, permettant d'exclure une fibrose avancée (F3-F4), mais ont une valeur prédictive positive modérée pour la fibrose significative (F2-F4) [138].

Parmi les biomarqueurs gratuits, certains sont spécifiques de la St. Met tels que :

- Le NAFLD Fibrosis Score, le plus utilisé dans le monde, est aussi le plus validé et le meilleur biomarqueur prédictif de survie [139] (Figure 15). Un score $< -1,455$ est prédictif de l'absence de fibrose significative (F0-F2) et un score $> 0,675$ d'une fibrose avancée (F3-F4) [140]. Cependant, 25% des patients se situent en zone indéterminée.

NAFLD fibrosis score
Online calculator

Angulo P, Hui JM, Marchesini G et al. **The NAFLD fibrosis score**
A noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD
Hepatology 2007;45(4):846-854 doi:10.1002/hep.21496

Age (years)
BMI (kg/m²)
IGF/diabetes
AST
ALT
Platelets (x10⁹/l)
Albumin (g/l)

BMI: body mass index
IGF: impaired fasting glucose

Figure 15 : Calcul sur internet du NAFLD Fibrosis Score. D'après <http://naflscore.com/>.

- l'Hepascore [141],
- le score BARD [142],
- l'Enhanced Liver Fibrosis Panel [143],
- d'autres, initialement développés pour les hépatopathies virales ont montré leur fiabilité dans la St. Met tels que le FIB-4 [144], l'APRI (aspartate aminotransférase/platelet ratio) [145] et le ratio ASAT/ALAT.

Parmi les biomarqueurs brevetés, on citera le FibroTest® [146] lui aussi développé pour les hépatites virales, le FibroMètre NAFLD® [147], et le FibroMètre-V2G® [148] plus précis que les non brevetés mais dont le coût (environ 50 euros) est à la charge du patient. Enfin, le FibroGENE est un nouveau marqueur génétique de fibrose constitué d'algorithmes, évalué dans la NAFLD. Ses résultats sont prometteurs [149].

Auteur	Nom de score	Nombre de patients	Formule	AUROC (fibrose avancée)	Résultats
Guha et al. (2008)	ELF simplifié	196 NAFLD patients	$ELF = -7.412 - [\text{Ln}(\text{acide hyaluronique}) * 0.681] - [\text{Ln}(\text{propeptide amino-terminal de collagène de type III}) * 0.755] - [\text{Ln}(\text{inhibiteur tissulaire de la métalloprotéinase 1}) * 0.494]$	0.87	cut-off -2.3824 Se 91%, Sp 59%, VPP 42%, VPN 95%
Ratziu et al. (2006)	FibroTest®	170 (contrôle) 97 (validation)	La formule non divulguée: l'apha-2-macroglobuline, l'haptoglobine, l'apolipoprotéine-A1, la bilirubine totale et le gamma glutamyl transférase (GGT) ajusté sur l'âge et le sexe	0.75- 0.86	2 cut-off: 0.3 et 0.7 Se 77%, Sp 98%, VPP 90%, VPN 73%
Angulo et al. (2007)	NAFLD Fibrosis Score	480 (contrôle) 253 (validation)	$NFS = -1.675 + 0.037 \times \text{âge (années)} + 0.094 \times \text{IMC (kg/m}^2) + 1.13 \times \text{l'hyperglycémie à jeun/diabète (oui=1, non=0)} + 0.99 \times \text{AST/ALT} - 0.013 \times \text{plaquettes} (\times 10^9/l) - 0.66 \times \text{albumine (g/dl)}$	0.84	2 cut-off: -1.455 et 0.676 Se 82%, Sp 98%, VPP 90%, VPN 93%
Harrison et al. (2008)	BARD	827 NAFLD patients	Combine 3 variables: 1. $IMC \geq 28 \text{ kg/m}^2$, 2. rapport $AST/ALT \geq 0.8$, 3. Diabète de type 2	0.81	Score >2 fibrose avancée VPP 43%, VPN 96%
Calès et al. (2009)	FibroMètre®	235 NAFLD patients	score basé sur les paramètres suivants : âge, poids, glycémie à jeun, AST, ALT, ferritine et le taux des plaquettes	0.943	2 cut-off: 0.611 et 0.715 Se 79%, Sp 96%, VPP 88%, VPN 92%
McPherson et al. (2010)	FIB-4	145 NAFLD patients	$\text{Age (années)} * \text{AST (IU/L)} / \text{Taux de plaquettes (10}^9/\text{L)} * \text{ALT } 1/2 \text{ (IU/L)}$	0.86	cut-off: 1.3 Se 85%, Sp 65%, VPN 95%

Tableau 1 : Biomarqueurs non invasifs de fibrose. Abréviations : AUROC : area under receiver operator curve ; ALT : Alanine aminotransférase ; AST : Aspartate aminotransférase ; IMC : indice de masse corporelle ; Se : sensibilité ; Sp : spécificité ; VPN : valeur prédictive négative ; VPP : valeur prédictive positive.

b) Techniques d'imagerie évaluant la fibrose

L'élastométrie impulsionnelle mécanique (FibroScan®) évalue la quantité de fibrose en mesurant l'élasticité du foie par ultrasons (Figure 16). Cette technique mesure la vitesse de propagation dans le foie d'une onde de choc. La vitesse augmente avec la dureté du foie. Le résultat est exprimé en kPa. Elle a été évaluée dans plusieurs études chez les patients présentant une St. Met [150]. Une méta-analyse de Musso *et al.* retrouve chez les patients avec une fibrose avancée, une courbe AUROC à 0,94, une sensibilité à 0,94 et une spécificité à 0,95 [151]. Le FibroScan® a également une forte valeur prédictive négative. Il est facile d'utilisation, reproductible et disponible. Il doit être réalisé dans de bonnes conditions, chez un patient à jeun depuis 2h, dont la cytolysse est $< 5N$, en dehors d'une hépatite alcoolique aiguë, de cholestase ou d'insuffisance cardiaque droite. En cas d'obésité, l'utilisation de la sonde XL est nécessaire pour diminuer le taux d'échec et optimiser la performance.

Dans la St. Met, des cut-off ont été proposés : une élasticité hépatique $\geq 7,9$ KPa, avec la sonde M, suggère une fibrose sévère [152] (7,2 KPa avec la sonde XL) [153].

L'évaluation de la sévérité de la fibrose hépatique par FibroScan® doit prendre en compte la quantité de stéatose évaluée par le CAP. En effet, une valeur de CAP élevée (> 300 dB/m), traduisant une stéatose sévère, diminue de manière significative la performance du FibroScan® pour le diagnostic de fibrose sévère F3-F4 par surestimation de la fibrose [154].

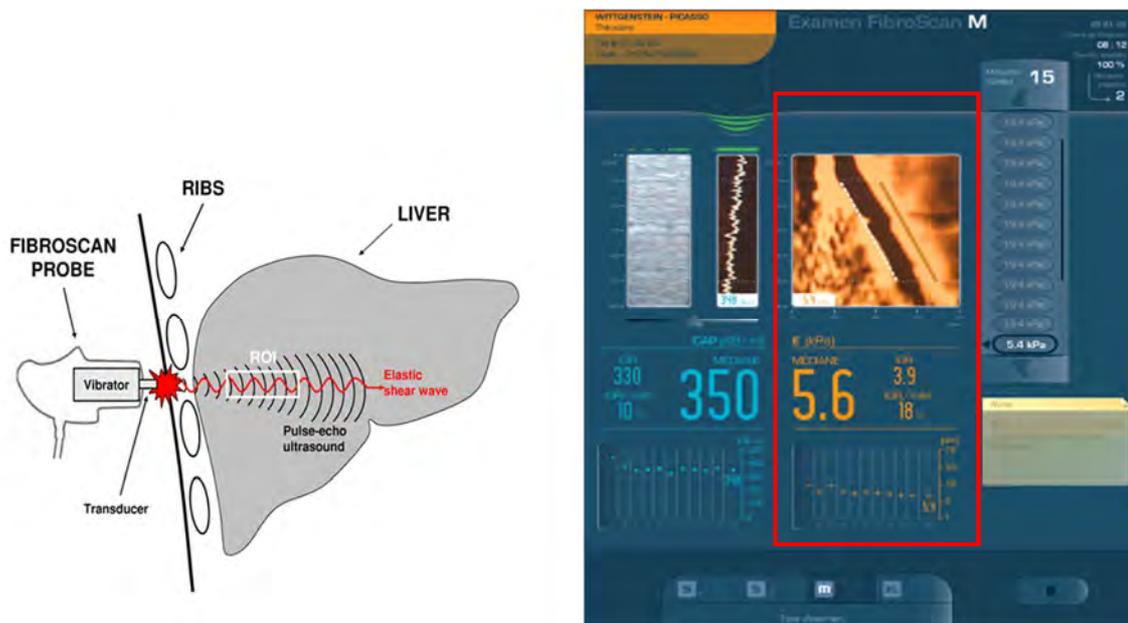


Figure 16 : Quantification de la fibrose par élastométrie impulsionnelle (FibroScan®)

D'autres techniques d'élastographie permettent de quantifier la fibrose (Figure 17):

- l'ARFI (acoustic radiation force impulse) [155, 156],
- le SSI (supersonic shear imaging) [157, 158],
- l'élastographie ShearWave en temps réel, qui a montré une meilleure applicabilité que le FibroScan® en diminuant l'impact de l'inflammation et de la stéatose chez les patients avec une fibrose non avancée [159],
- l'élastographie par résonance magnétique (MRE), dont les performances diagnostiques semblent meilleures que celles de l'ARFI et du FibroScan® [160].

La faible disponibilité, le coût et le manque de validation de ces techniques limitent encore leur utilisation en routine contrairement au FibroScan®.

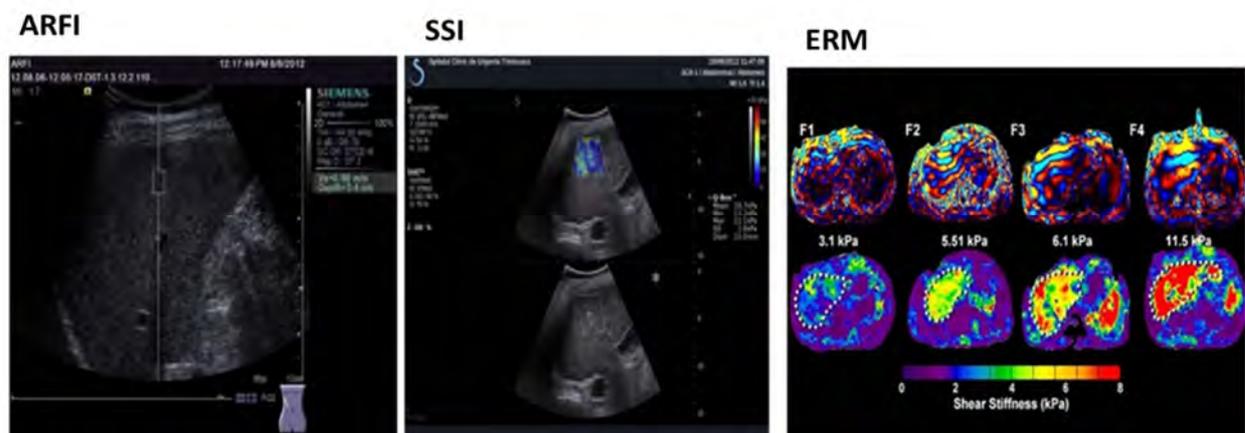


Figure 17 : Image de quantification de la fibrose par ARFI (acoustic radiation force impulse), SSI (supersonic shear imaging) et ERM (élastographie par résonance magnétique)

L'étude de Boursier *et al.* a montré que le FibroMètre-V2G® et le FibroScan® sont les méthodes les plus précises pour le diagnostic de fibrose hépatique parmi un panel de tests [161]. Ils sont aussi des facteurs pronostiques de survie globale [161] (Figure 18).

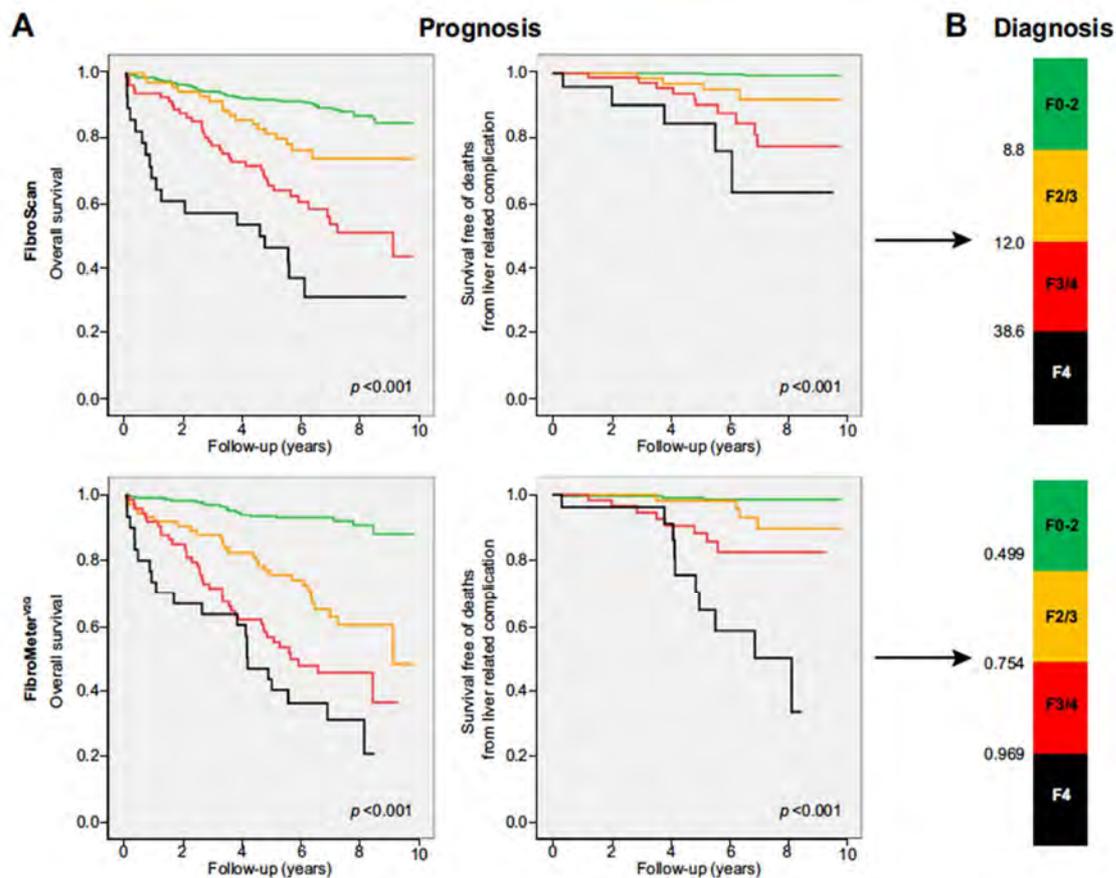


Figure 18 : Survie globale en fonction du stade de fibrose déterminé par le FibroScan® et le FibroMètre V2G®. D'après [161].

C. Stratégie diagnostique

1) Stratégie de dépistage et d'adressage en centre spécialisé d'hépatologie

Le dépistage de la St. Met est recommandé chez tout patient présentant au moins un facteur de risque métabolique, en particulier pour ceux dont l'âge est supérieur à 50 ans et qui présentent un DT2 ou un syndrome métabolique [93]. Les sociétés savantes européennes ont recommandé en 2016 de proposer à ces patients l'association d'un bilan hépatique et d'une échographie hépatique (Figure 19) :

- les deux examens sont normaux : le bilan hépatique et l'échographie hépatique sont contrôlés tous les 3 à 5 ans,
- le bilan hépatique est anormal (élévation des ALAT et/ou de la γ GT) : le patient doit être adressé en consultation spécialisée d'hépatologie pour la réalisation d'un bilan étiologique et d'examens complémentaires,

- le bilan hépatique est normal mais il existe une stéatose à l'échographie : il est recommandé de réaliser un biomarqueur de fibrose.
 - Si le risque de fibrose est faible, le bilan hépatique et le biomarqueur de fibrose sont recontrôlés à 2 ans.
 - Si le risque de fibrose est modéré à sévère, le patient doit être adressé en consultation spécialisée d'hépatologie pour la réalisation d'un FibroScan® et si nécessaire d'une biopsie.

Récemment, le CHU d'Angers a proposé la réalisation en première ligne du test eLIFT (easy liver fibrosis test) qui pourrait permettre une meilleure sélection des patients par le médecin traitant en consultation spécialisée d'hépatologie [162].

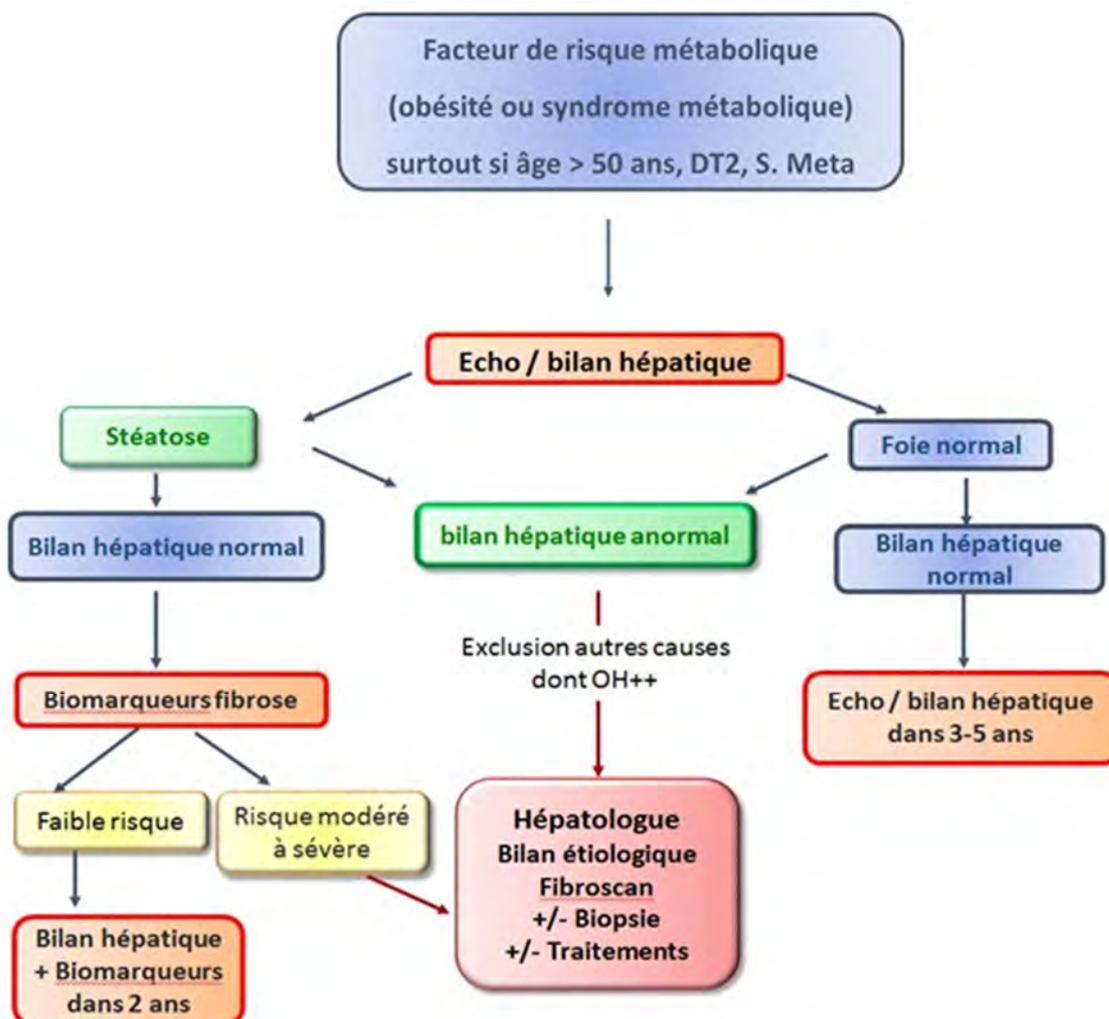


Figure 19 : Algorithme de dépistage de la St. Met et d'adressage en centre spécialisé d'hépatologie. Adapté de [93].

2) Stratégie de diagnostic de la fibrose en centre spécialisé d'hépatologie

Il est recommandé d'utiliser en première intention les tests non invasifs par l'association d'un biomarqueur de fibrose avec l'élastométrie impulsionnelle afin d'augmenter la précision diagnostique [93] (Figure 20). Cette stratégie doit cependant être validée par d'autres études [93, 113, 163].

Par exemple, l'algorithme eLIFT-FM^{VCTE} proposé par le CHU d'Angers pourrait améliorer le diagnostic de la fibrose avancée en proposant aux patients sélectionnés par l'eLIFT (easy liver fibrosis test), la réalisation de deux marqueurs non invasifs de fibrose combinés : le biomarqueur FibroMètre® et l'élastométrie par FibroScan®. Le score combiné de ces 2 tests, appelé FibroMètre^{VCTE}, aurait la meilleure performance diagnostique parmi un panel de tests non invasifs [162].

La ponction biopsie hépatique sera proposée :

- lorsqu'une cause associée de stéatose ou d'hépatopathie chronique ne peut être exclue autrement que par l'histologie,

- en cas de perturbations chroniques du bilan hépatique et/ou de stéatose, après exclusion de toute autre cause d'hépatopathie, dès lors qu'il existe une suspicion de stéato-hépatite avec fibrose avancée à partir d'un faisceau d'arguments :

- cliniques (présence de facteurs de risque [1, 164, 165] tels que l'obésité [67, 166, 167], l'âge supérieur à 45-50 ans [64, 67, 68, 167], la présence d'un DT2 [66, 70, 80, 167, 168])
- et para-cliniques lorsque les deux marqueurs non invasifs (FibroScan® et biomarqueur) sont concordants pour prédire la présence d'une fibrose significative, ou lorsqu'ils sont discordants, techniquement non réalisables ou ininterprétables (Tableau 2, Figure 20)

- en cas de persistance des perturbations du bilan hépatique malgré la correction des facteurs de risque chez un patient dont les tests non invasifs étaient initialement concordants pour prédire l'absence de fibrose sévère (Figure 20).

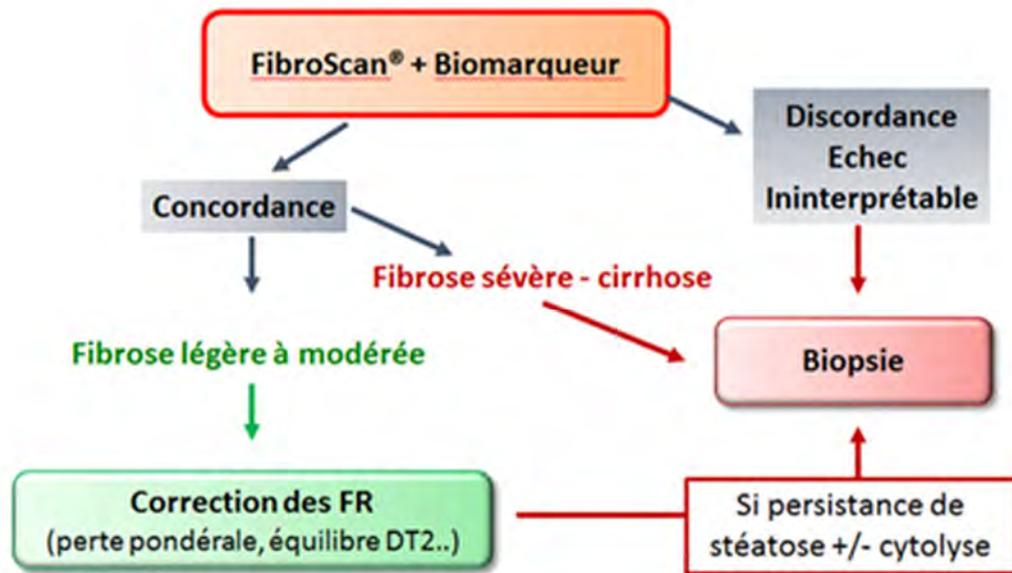


Figure 20 : Algorithme de diagnostic de la fibrose dans la St. Met. Adapté de [93].

		Valeurs du FibroScan®		
		< 7,9kPa (sonde M) < 7,2kPa (sonde XL)	≥ 7,9kPa (sonde M) ≥ 7,2kPa (sonde XL)	Non réalisable, non interprétable*
Valeurs du NFS	< -1,455	F0-F2	Discordance	F0-F2
	Zone grise indéterminée comprise entre -1,455 et 0,675	F0-F2 sur 1 examen	F3-F4 sur 1 examen	IND
	> 0,675	Discordance	F3-F4	F3-F4 sur 1 examen
	Données manquantes	F0-F2 sur 1 examen	F3-F4 sur 1 examen	IND

Tableau 2 : Détermination du stade de fibrose selon les valeurs du NAFLD Fibrosis Score et du FibroScan® et indications de la ponction biopsie hépatique (zones grisées).

Abréviations : IND : indéterminé ; NFS : NAFLD Fibrosis Score.

*Non interprétable : moins de 10 mesures valides ; IQR supérieur à 30% (écart-type) ; pourcentage de réussite inférieur à 60%.

D. Diagnostics différentiels

Devant une suspicion de St. Met, les autres causes d'hépatopathie chronique doivent être éliminées : alcool, virus B et C, auto-immun, hémochromatose, maladie cœliaque, maladie de Wilson... ainsi que les causes de stéatose secondaire. Le caractère macro- ou micro-vésiculaire à l'histologie peut orienter sur la cause de stéatose :

- macro-vésiculaire : alcool, virus C, pullulation intestinale microbienne, nutrition (dénutrition sévère, amaigrissement brutal, chirurgie bariatrique, résection étendue du grêle, nutrition parentérale exclusive), lipodystrophie, cytopathies mitochondriales mineures, maladie de Weber-Christian, médicaments (amiodarone, corticoïdes, tamoxifène, méthotrexate, isoniazide, cisplatine, nifédipine, diltiazem), maladies héréditaires innées (abéta-lipoprotéïnémie)
- micro-vésiculaire : maladie de Wilson, hépatite delta, fièvre jaune, stéatose aiguë gravidique, HELLP syndrome, syndrome de Reye, médicaments (aspirine, amiodarone, cyclines, dépakine, antirétroviraux, kétoprofène, tianeptine), maladies héréditaires innées (syndrome de Turner, galactosémie, déficit en lipase acide lysosomale), produits toxiques (plantes médicinales).

III. Stéatopathie métabolique et microbiote intestinal

A. Microbiote intestinal : définition et fonctions physiologiques

Le microbiote intestinal (MI) est constitué de l'ensemble des micro-organismes (bactéries, virus, protozoaires et levures) vivant dans le tube digestif de l'Homme. Chaque individu possède un MI unique [169]. La flore digestive s'acquiert à la naissance et dépend entre autres du mode d'accouchement (voie basse ou césarienne) et du mode d'alimentation (lait de substitution ou allaitement). Cette flore évolue pendant les deux premières années de vie puis se stabilise. Elle peut ensuite varier au cours de la vie sous l'influence de facteurs environnementaux (infection, antibiothérapie, régime alimentaire...), et possède une capacité de résilience (retour à l'état basal) en 1 à 2 mois.

Le MI comprend 10^{14} bactéries avec plus de 1000 espèces différentes, dont le nombre augmente de l'estomac vers le colon et dont la composition varie en fonction du site.

La taxonomie a permis une classification phylogénétique du monde vivant en trois domaines : les bactéries, les archées et les eucaryotes qui ont été classés en rangs taxonomiques (phylum ou embranchement, classe, ordre, famille, genre et espèce) (Figure 21). Les bactéries du MI

sont divisées en sept phyla : les trois principaux phyla sont représentés par les Firmicutes (60-80%), les Bacteroidetes (15-30%) et les Actinobacteria (2-25%), suivis par les Proteobacteria et Verrucomicrobia (1-2%) et enfin par les Fusobacteria et Spirochaetae (Figure 22).

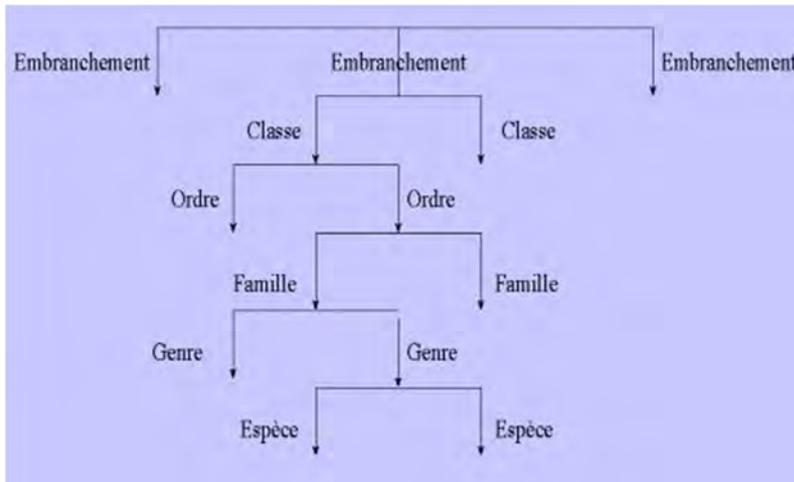


Figure 21 : Rangs taxonomiques de la classification phylogénétique

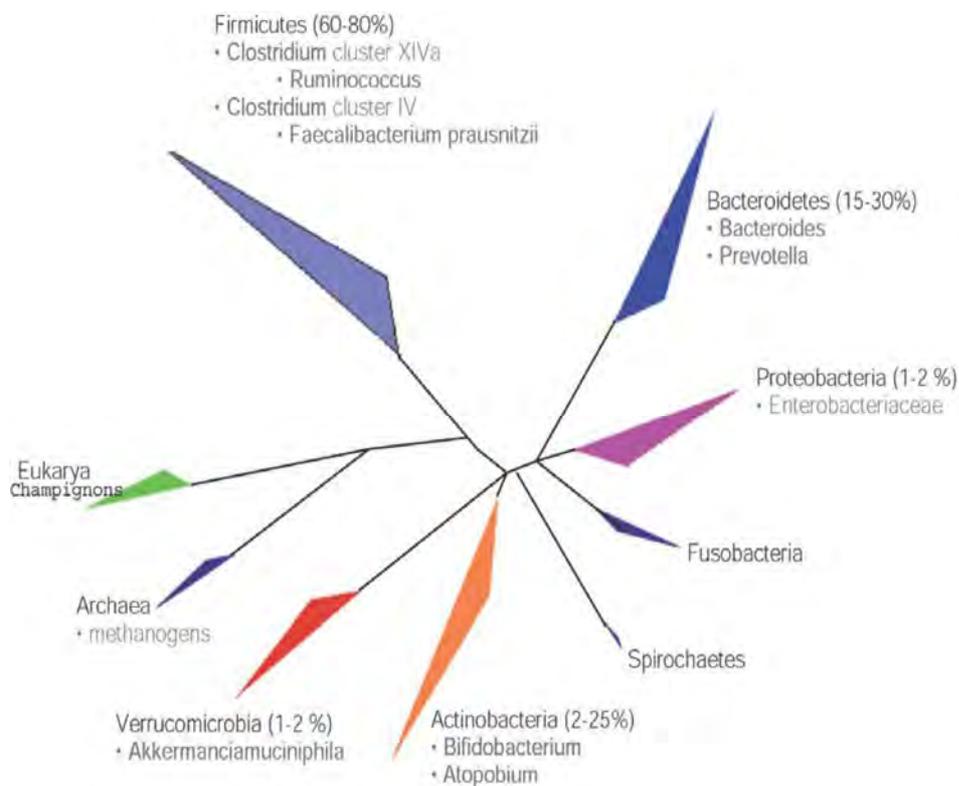


Figure 22 : Arbre phylogénétique du vivant divisé en 3 domaines : les bactéries (7 phyla et quelques exemples de genres et espèces), les archées et les eucaryotes. D'après [170].

Le microbiome intestinal est défini par l'ensemble des génomes des micro-organismes du MI. Combiné à notre génome, il constitue le métagénome qui compte jusqu'à 300 000 gènes [171]. On appelle protéome et métabolome respectivement l'ensemble des protéines et des métabolites du MI.

Les fonctions du MI sont multiples :

- fonctions métaboliques : production de vitamines pour l'hôte, métabolisme des protéines, des glucides et des lipides, stockage des graisses, absorption des ions, dégradation des acides biliaires, fermentation des résidus alimentaires non digestibles (tel que les fibres alimentaires également appelées pré-biotiques),
- fonctions protectrices : compétition avec les agents pathogènes, production de facteurs antibactériens (bactériocines...), action sur les jonctions serrées, fortification de la barrière intestinale,
- fonctions immunes : stimulation de la production d'IgA par le système immunitaire, développement et maturation du système immunitaire inné.

Chaque bactérie possède un ADN ribosomal 16S (ADNr 16S) qui code pour l'ARN ribosomal 16S (ARNr 16S), une des unités des ribosomes responsable de la traduction des ARN messagers en protéines. Cette fonction est indispensable à la vie et l'ADNr 16S est donc présent chez toutes les bactéries (et son équivalent l'ADNr 18S chez les eucaryotes). L'ADNr 16S possède des parties très conservées entre les bactéries et d'autres variables (9 régions hypervariables) dont la séquence permet de distinguer et de caractériser les différents taxa bactériens.

En utilisant les techniques moléculaires de qPCR et de séquençage ciblé sur l'ADNr 16S, il est possible d'établir chez un individu la quantité d'ADN bactérien et d'identifier les taxa bactériens qui composent le microbiome. Son analyse pourrait permettre de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques et des biomarqueurs de nombreuses maladies.

B. Microbiote sanguin et microbiote hépatique

Les bactéries et leurs produits comme les endotoxines (également appelés lipopolysaccharides, LPS) ou leur ADN, peuvent migrer de l'intestin vers le sang portal par translocation bactérienne. On peut ainsi retrouver dans le sang et dans tous les organes tissulaires de l'ADN bactérien, communément appelés « microbiote sanguin » (MS) et « microbiote tissulaire » tel que le « microbiote hépatique ».

Chez un individu sain (étude réalisée chez des donneurs de sang), il existe en moyenne dans le sang de l'ordre de 10^8 copies/ml d'ADNr 16S correspondant à 10^7 génomes bactériens/ml (chaque bactérie a en moyenne dans son génome 10 copies du gène codant pour l'ARNr 16S). L'ADN bactérien détecté dans le sang correspond à des bactéries vivantes ou « dormantes » sous forme libre, associées aux globules rouges ou aux globules blancs, ou à des bactéries en cours de dégradation ou encore à de l'ADN libre. L'essentiel (plus de 90 %) de l'ADN bactérien présent dans le sang se retrouve dans le buffy coat (globules blancs) après centrifugation du sang.

Le foie est le premier organe qui draine le sang en provenance de l'intestin via le système veineux porte. En l'absence de pathologie, seule une très faible fraction de bactéries intestinales parvient ainsi au niveau du foie, où le système immunitaire régule leur présence [172].

Le métagénome sanguin d'un individu sain, contrairement au métagénome intestinal, est constitué principalement de séquences appartenant à des bactéries des phyla Proteobacteria (> 80 %) et Actinobacteria (de l'ordre de 10%) et très peu aux phyla Firmicutes et Bacteroidetes (quelques %) [173] (Figure 23). Ces différences entre les profils bactériens du sang et de l'intestin pourraient être expliquées par le rôle de filtre de l'intestin et du système immunitaire.

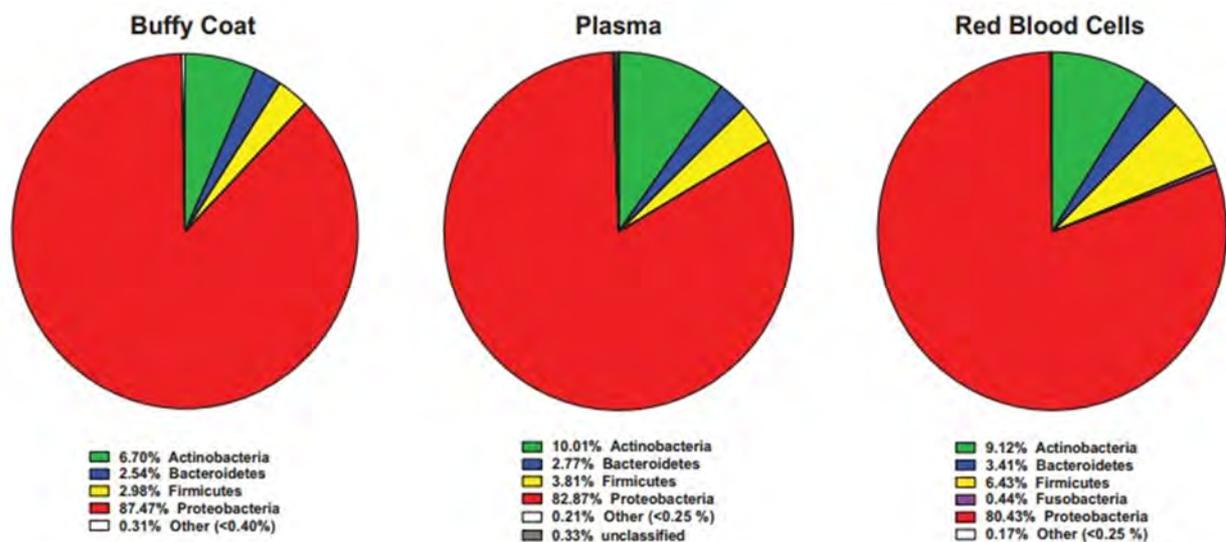


Figure 23 : Diagrammes circulaires représentant les proportions moyennes des phyla bactériens dans les 3 différentes fractions du sang. D'après [173].

C. Notion de dysbiose : aspects physiopathologiques

L'hôte et son microbiote vivent en symbiose. Toute modification anormale de structure (composition et/ou fonction) du microbiote est appelée dysbiose. La dysbiose peut être localisée dans un organe précis (dysbiose intestinale, sanguine...). En cas de réponse immunitaire inappropriée de l'hôte à cette dysbiose, il peut en résulter certaines pathologies telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, les allergies, les rhumatismes inflammatoires, la fièvre méditerranéenne, mais aussi les maladies métaboliques. La dysbiose semble jouer un rôle important dans l'auto-immunité et la carcinogenèse [171, 174].

Lorsque la translocation bactérienne est augmentée, des quantités trop importantes de bactéries ou d'endotoxines se retrouvent dans le sang, appelées respectivement bactériémie et endotoxémie.

D. Lien entre le microbiote et les maladies métaboliques

1) L'obésité

Le lien entre le MI et les maladies métaboliques a d'abord été étudié dans des modèles murins d'obésité. Des souris non-obèses « germ-free » (dépourvues de flore intestinale) transplantées avec un MI provenant de souris obèses développent une obésité par rapport à des souris transplantées avec un MI issu de souris non-obèses, démontrant un lien causal entre la composition de la flore et la survenue d'une obésité [174, 175].

Ces résultats ont été confirmés chez l'Homme [176, 177]. Les modifications de l'écologie bactérienne chez les patients obèses entraînent une modification du métagénome à l'origine d'une augmentation des capacités d'absorption de l'énergie provenant de l'alimentation.

Cependant, les études analysant le profil de MI de patients obèses n'ont pas retrouvé de résultats concordants (diminution ou augmentation des Bacteroidetes, absence de modification du MI...) [178, 179].

2) Le diabète de type 2

Un lien entre dysbiose intestinale et diabète de type 2 [180], syndrome métabolique [181] et maladies cardio-vasculaires [182] a ensuite été démontré.

Le MI des patients diabétiques est caractérisé par une augmentation du phylum des Bacteroidetes au détriment d'une diminution des Firmicutes [183] et une diminution du genre *Bifidobacteria* [184] en comparaison aux sujets sains.

Il a également été démontré que les taux plasmatiques d'ADNr 16S sont plus élevés chez les patients diabétiques que chez les individus sains [185]. De plus, l'endotoxémie serait associée à une augmentation du risque de développer un diabète chez la souris [180] comme chez l'Homme [186], et serait un facteur de risque indépendant de maladies cardio-vasculaires [182].

E. Lien entre le microbiote et les stéatopathies métaboliques

1) Aspects physiopathologiques

Il existe des preuves expérimentales de l'implication d'une augmentation de la translocation bactérienne dans de nombreuses maladies hépatiques.

L'hépatite alcoolique est caractérisée par une dysbiose associée à une augmentation de la perméabilité intestinale [187-189], responsable d'une translocation bactérienne accrue. Cette translocation est responsable d'une activation exagérée des systèmes de défense immunitaire hépatiques [190] associée à une dérégulation de la production de peptides anti-microbiens responsables d'une inflammation intra-hépatique et d'une fibrose [191].

Des données récentes suggèrent également un lien entre dysbiose et St. Met. Plusieurs mécanismes physiopathologiques seraient impliqués. Il existe une augmentation de la perméabilité intestinale par dysfonction des jonctions serrées intestinales et de la masse bactérienne intestinale à l'origine d'une pullulation microbienne, aggravée par l'hypomotilité intestinale [192]. Ces deux mécanismes sont associés à la sévérité de la stéatose [192]. Ils favorisent l'endotoxémie et la translocation de bactéries intestinales dans le sang jusqu'au foie. Ainsi, de l'ADN bactérien a été détecté dans le sang de souris présentant une stéatose hépatique induite par un régime hyperlipidique [193] et de nombreuses études ont retrouvé une augmentation des endotoxines dans le sang de patients présentant une St. Met [194, 195]. Plusieurs mécanismes expliquent le lien entre dysbiose intestinale, MS et développement d'une stéatose hépatique :

- Dans l'intestin, la présence excessive de bactéries capables de métaboliser les hydrates de carbone non digestibles pour produire des acides gras à chaînes courtes favorise la lipogénèse hépatique [196].
- Certaines espèces de bactéries telles que les *Escherichia coli*, produisent de l'éthanol endogène en grande quantité, ce qui favorise la perméabilité de la barrière intestinale et son métabolisme dans le foie entraîne l'accumulation de triglycérides et un stress oxydatif [197].

- Certaines bactéries du MI favorisent également le métabolisme de la choline en méthylamines, aboutissant à un déficit en phosphatidylcholine, ce qui altère l'exportation des lipides du foie et favorise l'accumulation hépatique des triglycérides [198, 199]. Ainsi, un régime pauvre en choline chez un individu sain modifie le MI et induit une stéatose [199].
- Au cours du cycle entéro-hépatique, la conversion des acides biliaires primaires en acides biliaires secondaires déconjugués est favorisée par certaines espèces de bactéries (*Bacteroides*, *Clostridium* et *Escherichia*). L'augmentation de la concentration d'acides biliaires secondaires qui en résulte est à l'origine d'une hépatotoxicité. De plus, la modulation du récepteur FXR (farnesoid X receptor) par les acides biliaires dans le foie ou l'intestin, modifie le métabolisme des lipides et du glucose [200-202].
- Dans le foie, les LPS (composants essentiels de la membrane externe des bactéries à Gram négatif) sont à l'origine d'une IR et d'une augmentation de la production de triglycérides [203].

Enfin, les LPS et les bactéries participent à la progression de la stéatose vers la stéato-hépatite et la fibrose. En effet, ils stimulent le système immunitaire inné via les toll-like receptors (TLR4 et TLR9) présents sur les cellules hépatiques (cellules de Küpffer, hépatocytes ...) entraînant la production de TNF- α et d'IL-10, responsables de lésions inflammatoires et pro-fibrosantes [204].

Associée à la dérégulation de l'expression des microARN (notamment le miR-29c impliqué dans l'expression du collagène), cette stimulation excessive du système immunitaire avec infiltration de polynucléaires neutrophiles est à l'origine de la production dans le foie de DAMPs (« damage-associated molecular patterns »). Ces DAMPs proviennent principalement des hépatocytes endommagés (ex : acide urique, ATP, cristaux de cholestérol, fragments d'ADN, et acides gras) [205].

Les autres produits bactériens (ADN non méthylé, ARN, lipopeptides, lipoprotéines, peptidoglycanes) sont appelés PAMPs pour « pathogen-associated molecular patterns ». Les PAMPs et les DAMPs activent les patterns recognition receptors (PRRs) (principalement les TLRs et les nod-like receptors (NLRs)) situés sur les cellules de Küpffer, les cellules stellaires ou les hépatocytes. L'activation des PRRs induit la synthèse de nouvelles protéines appelées inflammasomes (nod-like receptor proteins (NLRPs), procaspase-1, proIL-1 β , etc...). Ces inflammasomes entraînent la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF- α ...) qui vont stimuler les cellules stellaires à l'origine d'une fibrose hépatique et détruire les hépatocytes [206, 207] (Figure 24).

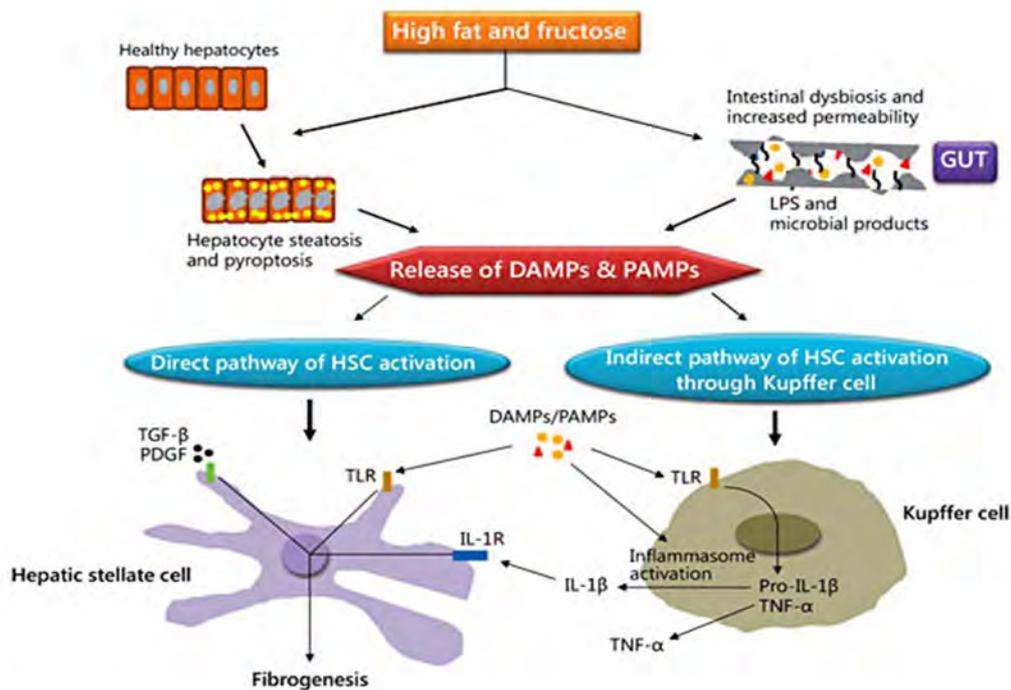


Figure 24 : Fibrogénèse induite par les DAMPs et les PAMPs. D’après [207].
 Abréviations : DAMPs : damage-associated molecular patterns ; LPS : lipopolysaccharides ;
 IL-1 β : interleukine 1 β ; TGF- β : transforming growth factor β ; TLR : toll like receptor ;
 TNF- α : tumor necrosis factor α ; PAMPs : pathogen-associated molecular patterns ;
 PDGF : Platelet-derived growth factor.

2) Caractérisation du microbiote intestinal dans la stéatopathie métabolique

La synthèse des résultats des études [208-212] qui ont étudié la composition du MI chez les patients atteints de St. Met est résumée dans le Tableau 3.

Certaines études ont comparé le microbiote intestinal de patients sans stéatose à celui de patients présentant une stéatose :

- l’espèce *Faecalibacterium prausnitzii* (productrice de butyrate qui diminue la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires) serait diminuée en cas de stéatose [208].
- dans une autre étude, la présence d’une stéatose chez des patients obèses était associée à une dysbiose intestinale à l’échelle des familles et du genre [209].

Les études qui ont comparé le microbiote intestinal de patients avec une stéato-hépatite à celui de sujets sains ou de patients présentant une stéatose pure ont montré :

- une proportion de Bacteroidetes [210], de *Faecalibacterium* et *Anaerosporobacter* [211] plus faible, et de *Parabacteroides* et *Allisonella* [211] plus importante en cas de stéato-hépatite.

- dans l'étude de Boursier *et al.*, la stéato-hépatite était uniquement associée à une augmentation des *Bacteroides* par rapport aux sujets avec stéatose pure [212].

- chez les enfants, *Escherichia* était augmenté chez ceux atteints de stéato-hépatite par rapport aux enfants obèses sans stéato-hépatite [213], suggérant que l'*Escherichia* pourrait être un facteur de risque de progression vers la stéato-hépatite.

Seules trois études ont étudié la composition du MI en fonction du degré de sévérité de la fibrose :

- dans l'étude de Boursier *et al.*, la fibrose significative ($F \geq 2$) était associée à une augmentation des *Ruminococcus* [212].

- dans l'étude de Lelouvier *et al.*, à l'échelle des phyla, il y avait une augmentation des Bacteroidetes et des Fusobacteria et une diminution des Firmicutes et des Actinobacteria en présence d'une fibrose. Au sein des phyla, il apparaissait plusieurs modifications des taxa bactériens décrites dans le Tableau 4 [214].

- dans celle de Loomba *et al.*, le groupe fibrose F3-F4 présentait une diminution du phylum des Firmicutes et des espèces *Ruminococcus obeum* et *Eubacterium rectale* et une augmentation du phylum des Proteobacteria par rapport au groupe F0-F2 [215]. A partir de 37 espèces bactériennes du MI de ces patients, de l'indice de Shannon, de l'IMC et de l'âge, ces auteurs ont construit un modèle diagnostique permettant de classer les patients en fibrose avancée (F3-F4) ou fibrose légère à modérée (F0-F2) avec une forte précision diagnostique (AUROC 0,936) [215].

	PHYLUM	CLASSE	ORDRE	FAMILLE	GENRE	ESPECE
Stéatose [208] (vs sujets sains)	<u>Firmicutes</u>	<u>Clostridia</u>	<u>Clostridiales</u>	<u>Ruminococcaceae</u>	<u>Faecalibacterium</u>	↓ <u>Faecalibacterium prausnitzii</u>
	<u>Firmicutes</u>	<u>Bacilli</u>	<u>Lactobacillales</u>	↑ <u>Lactobacillaceae</u>	↑ <u>Lactobacillus</u>	
		<u>Clostridia</u>	<u>Clostridiales</u>	↑ <u>Lachnospiraceae</u>	↑ <u>Dorea</u> , <u>Robinsoniella</u> , <u>Roseburia</u>	
				↑ <u>Veillonellaceae</u>		
	<u>Bacteroidetes</u>	<u>Bacteroidia</u>	<u>Bacteroidales</u>	↓ <u>Ruminococcaceae</u>	↓ <u>Oscillibacter</u>	
<u>Proteobacteria</u>	<u>Alphaproteobacteria</u>	<u>Kiloniellales</u>	↓ <u>Porphyromonadaceae</u>			
			↑ <u>Kiloniellaceae</u>			
		<u>Gammaproteobacteria</u>	<u>Pasteurellales</u>	↑ <u>Pasteurellaceae</u>		
Stéato-hépatite [210] (vs sujets sains et stéatose)	↓ <u>Bacteroidetes</u>					
	<u>Bacteroidetes</u>	<u>Bacteroidia</u>	<u>Bacteroidales</u>	<u>Porphyromonadaceae</u>	↑ <u>Parabacteroides</u>	
		<u>Firmicutes</u>	<u>Clostridia</u>	<u>Clostridiales</u>	<u>Veillonellaceae</u>	↑ <u>Allisonella</u>
				<u>Ruminococcaceae</u>	↓ <u>Faecalibacterium</u>	
			<u>Clostridiaceae</u>	↓ <u>Anaerospobacter</u>		
[212] (vs stéatose)	<u>Bacteroidetes</u>	<u>Bacteroidia</u>	<u>Bacteroidales</u>	<u>Bacteroidaceae</u>	↑ <u>Bacteroides</u>	
Fibrose [212] (F≥2 vs F0-F1)	<u>Firmicutes</u>	<u>Clostridia</u>	<u>Clostridiales</u>	<u>Ruminococcaceae</u>	↑ <u>Ruminococcus</u>	
	↑ <u>Bacteroidetes</u>	<u>Fusobacteria</u>	<u>Fusobacteriales</u>	↑ <u>Fusobacteriaceae</u>		
				↓ <u>Ruminococcaceae</u>		
	↓ <u>Firmicutes</u>	↓ <u>Clostridia</u>	↓ <u>Clostridiales</u>	↓ <u>Lachnospiraceae</u>	↓ <u>Dorea</u>	
		↓ <u>Erysipelotrichia</u>	↓ <u>Erysipelotrichales</u>			
↓ <u>Actinobacteria</u>		<u>Coriobacteriia</u>	↓ <u>Coriobacteriales</u>	↓ <u>Coriobacteriaceae</u>		
[215] (F3-F4 vs F0-F2)	↑ <u>Proteobacteria</u>					
	↓ <u>Firmicutes</u>	<u>Clostridia</u>	<u>Clostridiales</u>	<u>Ruminococcaceae</u>	<u>Ruminococcus</u>	↓ <u>Ruminococcus obeum</u>
				<u>Eubacteriaceae</u>	<u>Eubacterium</u>	↓ <u>Eubacterium rectale</u>

Tableau 3 : Composition du microbiote intestinal dans la stéatopathie métabolique

3) Caractérisation du microbiote sanguin dans la stéatopathie métabolique

Plusieurs études ont démontré un lien entre les taux circulants de marqueurs d'endotoxémie (LBP (lipopolysaccharide-binding protein), soluble CD14 (sCD14), soluble tumor necrosis factor- α receptor II (sTNFRII)...) et les St. Met [194, 195].

L'étude de Pang *et al.* a mis en évidence une association entre l'endotoxémie et le degré de sévérité de la St. Met. En effet, le taux sanguin de LBP augmentait en cas de stéato-hépatite et de fibrose F2-F4 [216].

Enfin, l'étude de Lelouvier *et al.* a montré une augmentation de la concentration d'ADNr 16S dans le sang chez des patients obèses morbides présentant une fibrose hépatique légère à modérée par rapport aux patients obèses sans fibrose [214].

F. Rôle pathogène de l'*Escherichia coli* du groupe B2 produisant la génotoxine colibactine

Escherichia coli est une bactérie commensale de la flore intestinale des mammifères. Elle colonise massivement les enfants quelques jours après la naissance et devient la principale bactérie anaérobie facultative dans le microbiote des adultes [217]. *E. coli* est divisé en sept groupes phylogénétiques majeurs (A, B1, B2, C, D, E et F) [218]. Depuis ces dernières décennies, un changement dans la composition de la population commensale d'*E. coli* est constaté dans les pays industrialisés, avec une augmentation du groupe phylogénétique B2 au détriment du groupe ancestral A [219, 220]. Dans une étude française, l'ensemble des patients (244 patients) étaient porteurs d'*E. coli* dans leurs selles et 34% des souches d'*E. coli* appartenait au groupe phylogénétique B2 [220]. La prévalence accrue des souches d'*E. coli* appartenant au groupe B2 dans les populations industrialisées et urbaines est associée à une augmentation de la prévalence de pathologies liées à des désordres immuns, tels que l'asthme, la sclérose en plaque ou la maladie de Crohn [221].

Le groupe phylogénétique B2 comprend de nombreuses souches pathogènes responsables d'infections aiguës (méningites néonatales, septicémies, diarrhées infectieuses, infections urinaires). Les souches pathogènes d'*E. coli* appartenant au groupe phylogénétique B2 ont développé, via l'acquisition d'éléments génétiques mobiles, un arsenal de fonctions qui leur permettent de coloniser de nouvelles niches écologiques en contournant les mécanismes de défense de l'hôte. L'analyse génétique de ces souches montre qu'elles ont développé une plus grande capacité à acquérir le fer, indispensable à la survie de la bactérie, notamment via l'acquisition de sidérophores, facteurs d'adaptabilité et de virulence. L'équipe « Pathogénie et

commensalisme des entérobactéries » du Pr E. Oswald a par ailleurs montré l'existence chez de nombreuses souches d'*E. coli* du groupe B2 (commensales ou pathogènes), d'un îlot de pathogénicité, l'îlot *pks*, codant une génotoxine de la famille des polykétides, appelée « colibactine » [222]. Cette équipe a récemment montré une connexion entre la synthèse des sidérophores et de la génotoxine colibactine chez *E. coli* [223]. Une évaluation de l'influence du taux de fer systémique dans la relation hôte-pathogène a révélé une corrélation directe entre la susceptibilité de l'hôte à une infection par *E. coli* et le taux de fer systémique (données non publiées).

Les souches d'*E. coli* appartenant au groupe phylogénétique B2 et produisant la colibactine sont également impliquées dans des infections aiguës ou chroniques, en affectant la réponse immunitaire de l'hôte et en entraînant la production de cytokines pro-inflammatoires et de protéases. De plus, la colibactine entraîne des cassures double brin de l'ADN des cellules de l'hôte, notamment de la muqueuse intestinale, à l'origine de la mort cellulaire ou d'une instabilité chromosomique, de mutations géniques et de transformation cellulaire [222]. Certaines souches du groupe B2 ont été associées aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin [224] et à une sénescence cellulaire qui pourrait accélérer le vieillissement [225]. Elles pourraient également être impliquées dans le cancer colorectal [226, 227]. En outre, l'équipe du Pr E. Oswald a montré que la synthèse de colibactine par une souche commensale d'*E. coli* colonisant le tube digestif du nouveau-né a des conséquences sur l'homéostasie intestinale à l'âge adulte, avec notamment une altération chronique de la perméabilité intestinale [228].

G. Microbiote intestinal : une nouvelle cible thérapeutique

Le rôle clé du MI dans la St. Met suggère que sa modulation quantitative ou qualitative pourrait être une cible thérapeutique potentielle dans la St. Met.

Certains **antibiotiques** (ampicilline et néomycine) améliorent l'IR et la stéatose induites par un régime gras chez la souris [229-231]. La rifaximine, efficace dans le traitement de l'encéphalopathie hépatique qui complique la cirrhose [232], est actuellement évaluée dans les St. Met.

L'utilisation de **pro-biotiques**, constitués de micro-organismes non pathogènes, tels que *Lactobacilli* et *Bifidobacteria*, permet de diminuer la sécrétion d'agents pro-inflammatoires et de restaurer la barrière épithéliale en modulant le MI [196, 233]. Le VSL#3 (mixture de 8 espèces différentes) chez l'Homme atteint de St. Met améliore la cytolyse et diminue les

marqueurs de peroxydation des lipides [234]. Des essais contrôlés randomisés sont désormais attendus.

Les **pré-biotiques**, constitués d'oligo- ou polysaccharides non digestibles, substrats pour l'hydrolyse et la fermentation des bactéries intestinales, peuvent ainsi moduler le MI en stimulant la croissance ou l'activité de certaines bactéries (*Bifidobacterium* et *Lactobacillus spp.*). Les études suggèrent que l'association d'un régime alimentaire et de pré-biotiques favoriserait la perte de poids, améliorerait la satiété et la glycorégulation [235]. Un essai contrôlé randomisé est actuellement en cours pour évaluer les modifications sur la stéatose et la stéato-hépatite [236].

La **transplantation de microbiote fécal** de sujets sains à des patients présentant un syndrome métabolique permet d'améliorer l'IR [237]. La transplantation fécale est également en cours d'évaluation dans le traitement de la St. Met [238].

H. Méthodes d'étude du microbiote intestinal, sanguin et tissulaire

Seulement une petite fraction des bactéries présentes dans différentes parties du corps humains sont détectées par la culture standard. Certaines bactéries, notamment les anaérobies, requièrent un environnement plus spécifique pour être détectées.

De nouvelles techniques biochimiques et moléculaires ont été développées afin de déterminer la composition des populations bactériennes de façon plus précise. L'étude métagénomique du MI est effectuée sur un échantillon de selles par :

- amplification de l'ADNr 16S (gène codant l'ARNr 16S) par la « quantitative real-time polymerase chain reaction » (qRT-PCR ou qPCR), méthode de référence [239] (Figure 25),
- méthodes d'empreintes (électrophorèse en milieu dénaturant),
- hybridation *in-situ* couplée à la cytométrie en flux (FISH : Fluorescent In-Situ Hybridization),
- séquençage haut débit ciblé de l'ADNr 16S ou séquençage du génome complet (Shotgun métagénomique sequencing) [239] (Figure 25).

La qPCR et le séquençage à haut débit de l'ADNr 16S sont applicables à l'étude du microbiote sanguin et tissulaire.

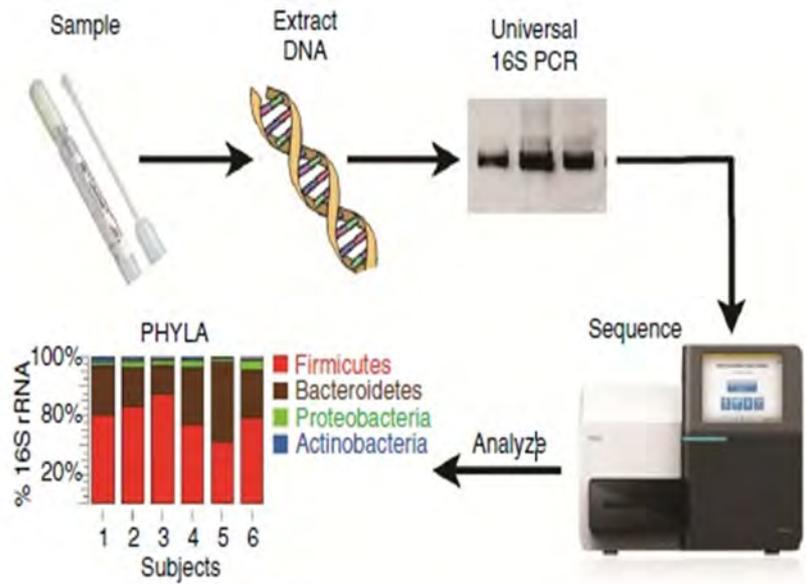


Figure 25 : Schéma de l'étude métagénomique par amplification ciblée de l'ADNr 16S par qPCR puis séquençage de l'ADNr 16S par technologie Illumina Miseq. D'après [239]. Abréviations : PCR : polymerase chain reaction.

TRAVAIL DE THESE

ETUDE 1

Etude prospective du microbiote intestinal chez des patients

atteints de stéatopathie métabolique :

implication de l'*Escherichia coli* du groupe B2

produisant la génotoxine colibactine

I. INTRODUCTION

A. Contexte et hypothèses

La stéatopathie métabolique (St. Met) devient une des premières causes d'hépatopathie chronique dans les pays occidentaux, avec une prévalence de 24% dans la population générale adulte [19]. La présence d'une stéato-hépatite expose à un risque d'évolution vers la cirrhose et le cancer du foie. Le pronostic est conditionné par la présence d'une fibrose [81, 82], avec une augmentation de la mortalité globale dès le stade de fibrose légère (F1) [81], et de la mortalité hépatique dès le stade de fibrose modérée (F2) [81].

Le microbiote intestinal (MI) est considéré comme un facteur environnemental associé à l'obésité, au syndrome métabolique et aux St. Met. Les études préalables qui ont analysé la composition du MI des patients atteints de St. Met sont peu nombreuses, leurs résultats sont parfois discordants et l'analyse par séquençage souvent insuffisamment précise dans la description taxonomique. Une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques impliquant le MI dans le développement et la progression des St. Met pourrait permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Récemment, un changement dans la composition de la population commensale d'*Escherichia coli* (*E. coli*) est observé dans les pays industrialisés, avec une augmentation du groupe phylogénétique B2 au détriment des autres groupes [219, 220]. Alors que 95% de la population porte dans son MI de l'*E. coli*, 34% des souches d'*E. coli* appartiennent au groupe phylogénétique B2 [220]. Une prévalence accrue de ces souches du groupe B2 est associée à une augmentation de la prévalence d'infections aiguës (méningites néonatales, septicémies, infections urinaires), mais aussi de pathologies dysimmunitaires, telles que l'asthme, la sclérose en plaque ou la maladie de Crohn ou encore des pathologies chroniques telles que le cancer colorectal [221, 224, 227]. Ceci peut être expliqué par la présence, dans le groupe phylogénétique B2, de souches commensales ou pathogènes qui sécrètent une génotoxine appelée « colibactine » codée par un îlot génomique de pathogénicité, l'îlot *pks* [222]. Cette colibactine affecterait la réponse immunitaire de l'hôte en entraînant la production de cytokines pro-inflammatoires et de protéases et serait à l'origine de cassures double brin de l'ADN des cellules de l'hôte. En outre, la synthèse de colibactine par une souche commensale d'*E. coli* colonisant le tube digestif du nouveau-né a des conséquences sur l'homéostasie intestinale à l'âge adulte, avec notamment une altération chronique de la perméabilité intestinale [228].

La St. Met est associée à une dysbiose intestinale et à une augmentation de la perméabilité intestinale, qui favorisent la translocation de bactéries intestinales et leurs fragments dans le sang jusqu'au foie (endotoxémie). Dans le foie, ces bactéries et leurs fragments participent à la progression de la stéatose vers la stéato-hépatite et la fibrose en stimulant la production de cytokines pro-inflammatoires (via l'activation des Toll-like Receptors et des Pattern Recognition Receptors présents sur les cellules hépatiques), qui vont activer les cellules stellaires, principales cellules productrices de fibrose [204, 206, 207].

A notre connaissance, aucune étude n'a étudié la prévalence et l'influence des souches d'*Escherichia coli* appartenant au groupe phylogénétique B2, en particulier de celles produisant la génotoxine colibactine dans la St. Met.

Nous avons fait l'hypothèse que la prévalence dans les selles des souches d'*E. coli* du groupe B2, et possiblement des souches présentant l'îlot *pks* qui code pour la colibactine, pouvait être augmentée chez les patients présentant une stéato-hépatite et/ou une fibrose sévère par rapport à celle observée chez les patients avec une stéatose sans hépatite avec fibrose légère à modérée.

B. Objectifs

L'objectif principal était de déterminer s'il existait une association entre la prévalence de l'*E. coli* du groupe B2 et en particulier des souches portant l'îlot *pks* codant pour la génotoxine colibactine et la sévérité de la stéatopathie métabolique définie par la présence d'une stéato-hépatite ou d'une fibrose sévère (F3-F4).

L'objectif secondaire était de rechercher la présence d'*E. coli* du groupe B2 dans le tissu hépatique.

II. PATIENTS ET METHODES

A. Schéma d'étude

Il s'agit d'une étude de recherche clinique, prospective, observationnelle, descriptive, translationnelle, monocentrique, conduite dans le service d'hépatogastro-entérologie de l'hôpital Purpan, au CHU de Toulouse, intitulée «*Etude de l'implication des souches d'Escherichia coli appartenant au groupe phylogénétique B2 et produisant la génotoxine colibactine dans la stéato-hépatite non alcoolique*» (acronyme «*Coli-NASH*»)

(*ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02390232*). Le coordonnateur de l'étude est le Dr Maeva Guillaume et le promoteur, le CHU de Toulouse.

Cette étude a obtenu le soutien financier de l'Appel d'Offre Local 2014 le 06/06/2014, l'autorisation de l'ANSM le 19/01/2015 et l'avis favorable du CPP le 14/01/2015. Tous les patients recevaient pour cette étude une information orale et écrite et donnaient leur consentement par écrit après un délai de réflexion qu'ils jugeaient nécessaire.

B. Critères d'éligibilité

1) Critères d'inclusion

Étaient inclus les patients majeurs atteints d'une St. Met avec une indication de biopsie hépatique. Le diagnostic de St. Met était retenu s'il existait au moins un des éléments du syndrome métabolique et une stéatose sans autre cause possible de stéatose ou d'hépatopathie.

2) Critères de non inclusion ou d'exclusion

Les patients qui présentaient au moins un des critères suivants étaient exclus:

- présence d'une autre cause associée d'hépatopathie chronique ou aiguë
- présence d'une autre cause de stéatose
- consommation d'alcool excédant 30 g/jour pour un homme ou 20 g/jour pour une femme
- prise de pré-biotiques, pro-biotiques ou antibiotiques dans le mois précédant l'inclusion
- maladie gastro-intestinale chronique ou aiguë
- antécédent de chirurgie gastro-intestinale modifiant l'anatomie
- grossesse ou allaitement en cours
- patient sous tutelle ou curatelle.

C. Modalités de recrutements

Tous les patients qui présentaient une St. Met vus consécutivement en consultation spécialisée entre mars 2015 et juin 2017 dans le service d'hépto-gastro-entérologie de l'Hôpital Purpan au CHU de Toulouse étaient considérés pour l'inclusion si une biopsie hépatique était indiquée pour le diagnostic de leur maladie.

D. Indication de la biopsie hépatique

L'indication de la biopsie hépatique, conforme aux recommandations nationales de l'HAS et internationales (européennes et américaines) [21, 93][240], était posée par :

- la suspicion d'une fibrose sévère sur au moins un test non invasif d'évaluation de la fibrose (FibroScan® et biomarqueurs) :
 - un « NAFLD Fibrosis Score » supérieur à 0.675 [140].
 - et / ou une élasticité hépatique évaluée par FibroScan® ≥ 7.9 kPa. Ce seuil arbitraire a été choisi à partir de la publication de Wong *et al.* [152].
- ou lorsque ces tests étaient non contributifs (« NAFLD Fibrosis Score » en zone grise), ininterprétables (FibroScan® avec un IQR élevé $> 30\%$ ou un taux de réussite insuffisant ($<60\%$)) ou encore techniquement non réalisables (échec du FibroScan® défini par un nombre de mesures valides < 10)
- ou lorsqu'une cause associée d'hépatopathie chronique ne pouvait être exclue autrement que par la réalisation d'une biopsie hépatique
- ou en per-opératoire lorsqu'une chirurgie bariatrique était prévue dans la prise en charge du patient et que la biopsie n'était pas justifiée dans le bilan pré-opératoire en raison d'une absence de suspicion de fibrose sévère par les tests non invasifs.

E. Critères de jugement

Le critère de jugement principal était de comparer la prévalence du portage dans les selles de l'espèce *E. coli* appartenant au groupe B2:

- entre les patients présentant une fibrose sévère (F3-F4) et ceux sans fibrose sévère (F0-F2),
- entre les patients présentant une stéatose pure et ceux présentant une stéato-hépatite.

Les critères de jugements secondaires étaient :

- de comparer entre ces groupes de patients la prévalence du portage de l'îlot génomique *pks* qui code la génotoxine colibactine parmi ceux porteurs de l'*E. coli* du groupe B2
- de rechercher la présence d'*E. coli* du groupe B2 dans le tissu hépatique.

F. Recueil de données

La visite d'inclusion était assurée par le médecin investigateur spécialisé en hépato-gastro-entérologie et avait lieu entre 1 jour et au plus tard 1 mois avant la biopsie.

Étaient recueillis pour chaque patient :

- les caractéristiques générales (la présence d'un syndrome métabolique, les constantes, l'examen clinique, les antécédents d'infections au cours de l'année précédente, ... etc.).
- les paramètres biologiques usuels et ceux nécessaires pour éliminer la présence d'une autre cause d'hépatopathie chronique ou de stéatose
- les résultats de l'évaluation non invasive de la fibrose (résultats du FibroScan® et du NAFLD Fibrosis Score) et les données de l'échographie-Doppler hépatique (présence d'une stéatose, d'une hépatomégalie, de signes évocateurs de cirrhose, de nodules, perméabilité de la veine porte et des veines hépatiques, taille de la rate).
- le consentement libre, éclairé et écrit du patient pour participer à l'étude.

Le jour de la biopsie hépatique étaient recueillis un échantillon de sang, de selles, de foie et d'urines.

1) Modalités de la biopsie hépatique et étude anatomopathologique

Les biopsies hépatiques étaient réalisées :

- par abord veineux jugulaire qui permettait dans le même temps de réaliser une étude de l'hémodynamique hépatique
- ou en percutané lorsque l'abord jugulaire présentait un risque (hémangiome hépatique)
- ou en per opératoire au cours d'une chirurgie bariatrique.

L'étude des biopsies hépatiques était réalisée en aveugle, par un médecin anatomopathologiste spécialiste des maladies hépatiques (Professeur Janick Selves, service d'anatomie et pathologie de l'Institut Universitaire du Cancer de Toulouse - Oncopole). Ce médecin réalisait sur des colorations usuelles (hémalum-éosine et trichrome de Masson), une évaluation de l'activité inflammatoire et de la fibrose hépatique standardisée sur la classification des St. Met selon le score NAS de Kleiner [116] et le score SAF [118]. La présence d'une stéato-hépatite était définie par la présence d'une stéatose \geq S1, d'une inflammation lobulaire \geq 1 et d'une ballonnisation hépatocytaire \geq 1 selon l'algorithme de FLIP à partir du score SAF.

2) Collection d'échantillons biologiques

Le matin de la biopsie étaient collectés par le patient lui-même, à domicile, des échantillons de selles et d'urines, sur pot stérile, et conservées à +4°C (réfrigérateur) jusqu'à l'acheminement à l'hôpital. Les prélèvements étaient ensuite confiés à l'infirmière de recherche à l'arrivée à l'hôpital.

Au cours de la biopsie hépatique était prélevés :

- un échantillon de sang veineux périphérique (sang total, plasma, sérum Buffy coat) congelés à -80°C,
- et pour les biopsies par voie jugulaire, un échantillon de sang prélevé dans la veine hépatique.

L'échantillon de foie était réparti entre :

- un échantillon fixé dans du formol pour analyse anatomopathologique
- un échantillon frais pour culture en milieu sélectif McConkey
- un échantillon immédiatement congelé dans l'azote liquide puis stocké à -80°C.

G. Etude du microbiote intestinal

L'étude du MI a été réalisée dans le Laboratoire de Bactériologie-Hygiène, CHU de Toulouse-Purpan - Centre de Physiopathologie de Toulouse-Purpan, Inserm UMR1043 - CNRS UMR5282 - Université Toulouse III- INRA USC1360, équipe « Pathogénie et commensalisme des Entérobactéries » sous la responsabilité du Pr Eric Oswald, par le Dr Patricia Martin, avec l'aide du Dr Damien Dubois.

Les échantillons de selles étaient acheminés en moins de 2 h au laboratoire.

Une partie des selles étaitensemencée pure ou diluée sur milieu sélectif McConkey pour entérobactéries pour détecter les *E. coli* et déterminer leur phylogroupe d'appartenance.

La présence de l'îlot génomique *pks* permettant la synthèse de la colibactine était déterminée par qPCR. En effet, en raison de la très grande instabilité de la génotoxine, il n'est pas encore possible de détecter, d'isoler ou de purifier la colibactine produite par la bactérie.

Les échantillons de selles restant ont été conservés à -80°C en vue d'étudier ultérieurement la composition du MI. L'ADN sera extrait à partir des selles à l'aide du kit QIAamp DNA Stool (Qiagen). Ces analyses comprendront :

- une PCR quantitative afin d'identifier les phyla bactériens majeurs : Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobactéries et Actinobactéries (protocole adapté de Gregoris et al.

[241]). Cette méthode de qPCR a été validée et est utilisée en routine dans le Laboratoire de Bactériologie de l'Hôpital de Toulouse-Purpan,

- le « Deep pyrosequencing » d'ADNr 16S sur une plateforme Roche 454 (en collaboration avec la Plate-forme GenoToul). Les données de pyroséquençage seront analysées avec l'aide de divers programmes de bio-informatique: MOTHUR (base de données, FORÊT), MEGAN, CLC.

H. Etude du microbiote hépatique

Le foie des patients a été analysé pour rechercher la présence d'*E. coli* dans le tissu hépatique :

- l'échantillon de foie frais a été utilisé pour étalement sur milieu de culture MacConkey spécifique des *E. coli*,
- l'échantillon de foie congelé a été conservé en vue de réaliser ultérieurement de l'extraction d'ADN, PCR de l'ADNr 16S et séquençage.

I. Calcul de la taille d'étude

Près de 600 patients par an sont vus actuellement en consultation pour des facteurs de risque de stéatopathie métabolique. Parmi eux 20 % soit 120 patients ont une indication de biopsie hépatique.

Nous avons fait l'hypothèse que les patients présentant une stéato-hépatite et/ou une fibrose sévère auraient une prévalence accrue des souches pathogènes d'*Escherichia coli* appartenant au groupe B2 et sécrétant la génotoxine colibactine, par rapport aux patients présentant une stéatose pure et/ou une fibrose non sévère. D'après la littérature, la prévalence de souches d'*Escherichia coli* B2 dans la population générale est de 34% [219]. Nous avons fait l'hypothèse que les patients avec une St. Met non sévère auraient une prévalence similaire à celle de la population générale et que les patients présentant une St. Met avancée, du fait des hypothèses physiopathologiques expliquées dans le rationnel de l'étude, auraient une prévalence similaire à cette retrouvée chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques intestinales, soit 60% [224].

En fonction de ces hypothèses, et avec un risque alpha de 5% et une puissance à 80%, il était nécessaire d'inclure 53 patients par groupe pour mettre en évidence de façon statistiquement significative cette différence [242]. Afin de pallier aux éventuelles données non exploitables (par manque d'un des échantillons biologiques requis), biopsies annulées / refusées par le

patient, ou non réalisées pour des raisons de difficultés techniques, nous avons fixé les inclusions à 100 patient par groupe soit 200 au total, afin d'avoir un nombre final de patient analysables de 120 soit 60 par groupe.

J. Méthodes statistiques

L'analyse des données cliniques et biologiques était effectuée sur un fichier de données anonymisées. Le seuil de significativité était fixé à 5%. Les variables catégorielles étaient résumées sous la forme d'effectifs et de pourcentages. La distribution des variables quantitatives était résumée par le calcul de la moyenne et de l'écart type. Les comparaisons des variables cliniques et biologiques relevées au moment de l'inclusion étaient effectuées par tests de Chi-2 (ou test de Fisher en cas d'effectifs < 20) pour les variables catégorielles et par tests de Student pour les variables quantitatives. Les logiciels utilisés pour l'analyse des données statistiques et pour la réalisation des graphiques étaient respectivement les logiciels SPSS (version 19.0) et GraphPad Prism (version 5.00) pour Windows.

III. RESULTATS

A. Population d'étude

Parmi les patients vus consécutivement en consultation spécialisée dans le service d'hépatologie et gastro-entérologie de l'hôpital Purpan au CHU de Toulouse entre mars 2015 et juin 2017 et présentant une St. Met avec une indication de biopsie hépatique, 163 patients ont signé un consentement pour participer à cette étude et ont été inclus (Figure 1). Après inclusion, 61 patients ont été exclus de l'analyse (Figure 1). Parmi eux, 17 patients présentaient des critères d'exclusion :

- 1 prenait un traitement par méthotrexate au long cours,
- 4 présentaient une consommation significative d'alcool active,
- 1 avait une cholangite biliaire primitive associée à sa St. Met sur la biopsie hépatique,
- 3 avaient eu dans leur histoire une chirurgie bariatrique,
- 1 avait un antécédent de rectocolite inflammatoire,
- 1 avait eu une colectomie droite,
- 1 prenait un antibiotique au long cours,
- 1 était sous antibiotique au moment du prélèvement des selles,
- et 4 étaient sous curatelle.

De plus, la ponction biopsie hépatique (PBH) n'a pas été réalisée chez 31 patients :

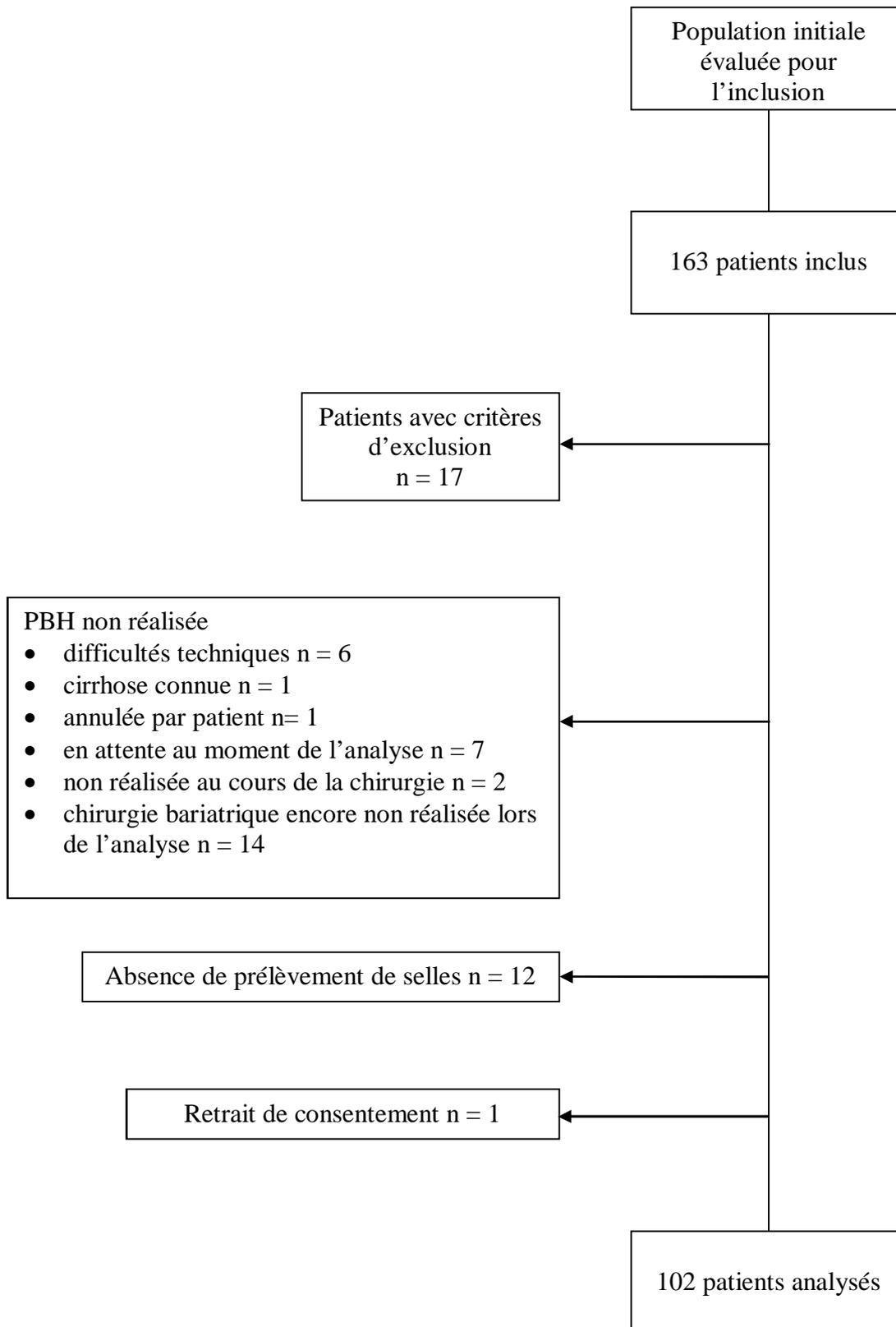
- 6 en raison de difficultés techniques (biopsie par abord jugulaire droit),
- 1 a finalement annulé la PBH après l'inclusion,
- 1 avait finalement une cirrhose connue et suivie par un autre médecin et la biopsie a été annulée,
- 7 étaient encore en attente de leur PBH au moment de l'analyse des données,
- chez les patients ayant eu une chirurgie bariatrique, 2 d'entre eux n'ont pu avoir la PBH au cours de l'intervention, et 14 patients n'avaient pas encore été opérés au moment de l'analyse des données.

De plus, le prélèvement de selles n'a pas été donné par 12 patients.

Enfin, un patient a retiré son consentement après inclusion.

Nous avons donc analysé 102 patients.

Figure 1 : Diagramme de flux



B. Description de la population et comparaison des caractéristiques des patients selon la présence d'une fibrose sévère

Les caractéristiques cliniques et biologiques des 102 patients sont détaillées dans le Tableau 1. Il y avait 59 hommes (57,8%) et 43 femmes (42,2%). En moyenne, notre population avait un âge de 59 ans, un poids de 99,8 kg, un IMC de 35,9 kg/m² et un tour de taille de 118 cm. La majorité des femmes (70%) étaient ménopausées, avec un âge moyen de survenue de la ménopause à 48 ans. Seules 6 d'entre elles ont été traitées par traitement hormonal substitutif. Près de 54% des patients étaient fumeurs ou anciens fumeurs. Concernant les facteurs de risques métaboliques, 70,6% avait un diabète de type 2, 64,7% une hypertension artérielle, 67,7% présentait une dyslipidémie, 1/3 un syndrome d'apnées du sommeil. Entre 12 et 18% des patients avec des comorbidités métaboliques n'étaient pas traités pour leurs facteurs de risque. Concernant les évènements cardio-vasculaires, 3,9% avait présenté un accident vasculaire cérébral (AVC), 12,8% avait fait un infarctus du myocarde (IDM) et 5,9% présentait une artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI).

Concernant les données biologiques, on notait une élévation modérée des transaminases, prédominant sur les ALAT, et de l'activité de la γ GT. Les taux moyens de triglycérides et d'HbA1c étaient élevés, respectivement $2,1 \pm 1,6$ g/l et $7,2 \pm 1,5\%$. Les taux d'albumine sérique, de plaquettes et le taux de prothrombine (TP) étaient dans les normes.

Concernant l'évaluation non invasive de la fibrose (Tableau 2), la médiane de l'élasticité hépatique retrouvée au FibroScan® était élevée ($14 \pm 7,6$ KPa) avec des critères d'interprétabilité fiables. Le taux d'échec ou d'ininterprétabilité du FibroScan® était de 29,4%. La moyenne du biomarqueur de fibrose NAFLD Fibrosis Score se situait en zone indéterminée ($-0,32 \pm 1,45$). Enfin, sur le plan radiologique, plus de 80% des patients présentaient une stéatose hépatique à l'échographie abdominale.

Dans cette population de patients atteints de St. Met prouvée par biopsie, 59 (57.9%) avaient une fibrose sévère (F3-F4). Ces patients étaient plus âgés et présentaient plus fréquemment un diabète de type 2 et de l'hypertension artérielle que les patients sans fibrose sévère (F0-F2) (Tableau 1). L'obésité (IMC) notamment viscérale (tour de taille), de même que la présence d'une dyslipidémie, n'étaient pas supérieures ou plus fréquentes chez les patients avec fibrose sévère. Leur taux d'ASAT était aussi significativement plus élevé. Nous avons observé une tendance à des taux de plaquettes ($p = 0,075$) et de TP ($p = 0,083$) plus bas chez les patients avec fibrose sévère bien que ces taux soient dans les normes (Tableau 1). Les valeurs du

FibroScan® et du NAFLD Fibrosis Score étaient bien corrélées avec la présence d'une fibrose sévère (Tableau 2).

Tableau 1 : Données cliniques et biologiques de la population totale

	Population totale (n = 102)	F0-F2 n = 43 (42,1%)	F3-F4 n = 59 (57,9%)	p valeur
Données cliniques				
Genre, homme	59 (57,8%)	22 (51,2%)	37 (62,7%)	0,243
Age à l'inclusion, ans	59 ± 11	56 ± 12	61 ± 10	0,022
Tabagisme actif ou sevré	55 (53,9%)	21 (48,9%)	34 (57,7%)	0,645
Poids, kg	99,8 ± 20,4	-	-	-
IMC, kg/m ²	35,9 ± 7,6	35,4 ± 8,1	36,2 ± 7,2	0,625
Tour de taille, cm	118 ± 14	115 ± 14	120 ± 14	0,100
Tour de hanche, cm	117 ± 13	115 ± 14	120 ± 14	0,100
Diabète de type 2	72 (70,6%)	25 (58,1%)	47 (79,7%)	0,018
Dyslipidémie	69 (67,7%)	26 (60,5%)	43 (72,9%)	0,186
HTA	66 (64,7%)	22 (51,2%)	44 (74,6%)	0,015
SAS	35 (34,3%)	14 (32,6%)	21 (35,6%)	0,750
AVC	4 (3,9%)	1 (2,3%)	3 (5,1%)	0,478
IDM	13 (12,8%)	3 (7%)	10 (16,9%)	0,136
AOMI	6 (5,9%)	3 (7%)	3 (5,1%)	0,688
Données biologiques				
HDL-cholestérol, g/l	0,42 ± 0,12	0,44 ± 0,11	0,41 ± 0,13	0,262
LDL-cholestérol, g/l	1,01 ± 0,38	1,04 ± 0,40	0,98 ± 0,37	0,519
Triglycérides, g/l	2,11 ± 1,60	2,04 ± 1,49	2,16 ± 1,68	0,730
HbA1c, %	7,2 ± 1,5	7 ± 1,5	7,3 ± 1,5	0,360
ASAT, UI/l	40 ± 31	30 ± 12	47 ± 38	0,006
ALAT, UI/l	54 ± 28	49 ± 27	58 ± 27	0,088
γGT, UI/l	105 ± 136	91 ± 174	115 ± 100	0,379
Albumine sérique, g/L	40,3 ± 3,3	39,9 ± 3,5	40,6 ± 3,1	0,299
TP, %	96 ± 7	98 ± 4	95 ± 9	0,083
Plaquettes, g/l	235 ± 66	248 ± 72	225 ± 60	0,075
Créatinine, µmol/l	77 ± 24	80 ± 29	75 ± 20	0,292

Les données sont présentées en effectif (%) ou en moyenne ± écart-type.

Abréviations : ALAT : alanine aminotransférase ; AOMI : artériopathie oblitérante des membres inférieurs ; ASAT : aspartate aminotransférase ; AVC : accident vasculaire cérébral ; γ GT : gamma glutamyl transpeptidase ; HbA1c : hémoglobine glyquée ; HDL : High Density Lipoproteins ; HTA : hypertension artérielle ; IDM : infarctus du myocarde ; IMC : indice de masse corporelle ; LDL : Low Density Lipoproteins ; TP : taux de prothrombine ; SAS : syndrome d'apnée du sommeil.

Tableau 2 : Résultats des méthodes non invasives d'évaluation de la fibrose

	Population totale (n = 102)	F0-F2 n = 43 (42,1%)	F3-F4 n = 59 (57,9%)	p valeur
FibroScan®, kPa	14 ± 7,6	10,8 ± 3,1	16,5 ± 9,2	0,001
- ≥ 7,9	67 (65,7%)			
- ≤ 7,9	5 (4,9%)			
- Echec	30 (29,4%)			
NAFLD Fibrosis Score	-0,32 ± 1,45	-0,85 ± 1,37	0,1 ± 1,38	0,001
- > 0,675	29 (28,4%)			
- < -1,455	28 (27,5%)			
- Zone grise	38 (37,2%)			
- NC	7 (6,9%)			

Les données sont présentées en effectif (%) ou en moyenne ± écart-type.

Abréviations : IQR : interquartile range ; NC : non connu.

C. Résultats histologiques

La majorité des biopsies hépatiques a été réalisée par abord jugulaire en endoscopie (87,3%), 11,7% par voie chirurgicale et 1% par voie percutanée en radiologie (en raison d'hémangiomes). Le gradient porto-systémique moyen était normal. A l'histologie (Tableau 3), 47 patients (46,1%) avaient une fibrose sévère (F3) et 12 (11,8%) une cirrhose. Selon l'algorithme de FLIP qui définit la présence d'une stéato-hépatite à partir du score SAF, 85 patients (83,3%) présentaient une stéato-hépatite.

Il y avait significativement plus de stéato-hépatite chez les patients avec une fibrose sévère (90% vs 74%) du fait d'une ballonnisation hépatocytaire plus marquée et non d'une inflammation plus sévère (Tableau 3).

Tableau 3 : Résultats histologiques de la ponction biopsie hépatique

Population totale (n = 102)					p
	F0-F2 n = 43 (42,1%)	F3-F4 n = 59 (57,9%)			valeur
Stéatose - NC/S0/S1 - S2/S3	1 (1%) / 4 (3,9%) / 40 (39,2%) 37 (36,3%) / 20 (19,6%)	3 (7%) / 20 (46,5%) 13 (30,2%) / 7 (16,3%)	1 (1,7%) / 1 (1,7%) / 20 (33,9%) 24 (40,7%) / 13 (22%)		0,322
Fibrose - F0/F1/F2 - F3/F4	3 (2,9%) / 10 (9,8%) / 30 (29,4%) 47 (46,1%) / 12 (11,8%)	3 (7%) / 10 (23,3%) / 30 (69,8%) -	- 47 (79,7%) / 12 (20,3%)		< 0,001
Score NAS Stéato-hépatite selon le score NAS : *oui (≥ 5) *borderline (3-4) *NC	4,1 ± 1,5 37 (36,3%) 52 (51%) 2 (1,9%)	3,5 ± 1,4 11 (25,6%) 11 (25,6%) 0	4,5 ± 1,5 26 (44,1%) 19 (32,2%) 2 (3,4%)		0,012
Stéato-hépatite selon FLIP/SAF: *NC SAF, inflammation - NC/0 - 1/2 SAF, ballonnisation - NC/0 - 1/2 Activité SAF - NC/A0/A1 - A2/A3/A4	85 (83,3%) *1 (1,7%) 2 (2%) / 8 (7,8%) 74 (72,6%) / 18 (17,6%) 2 (2%) / 11 (10,8%) 58 (56,8%) / 31 (30,4%) 1 (1%) / 5 (4,9%) / 14 (13,7%) 47 (46,1%) / 19 (18,6%) / 16 (15,7%)	32 (74,4%) 1 (2,3%) / 4 (9,3%) 33 (76,8%) / 5 (11,6%) 1 (2,3%) / 8 (18,6%) 31 (72,1%) / 3 (7%) 0 / 3 (7%) / 9 (20,9%) 25 (58,1%) / 4 (9,3%) / 2 (4,7%)	53 (89,8%) *1 (1,7%) 1 (1,7%) / 4 (6,8%) 41 (69,5%) / 13 (22%) 1 (1,7%) / 3 (5,1%) 27 (45,8%) / 28 (47,4%) 1 (1,7%) / 2 (3,4%) / 5 (8,5%) 22 (37,3%) / 15 (25,4%) / 14 (23,7%)		0,037 0,385 < 0,001 0,007

Les données sont présentées en effectif (%). Abréviations : NAS : *NAFLD Activity Score* ; NC : *non connu* ; SAF : *steatosis activity fibrosis*.

D. Prévalence de l'*E. coli* appartenant au groupe B2

Les résultats d'une analyse préliminaire portant sur les 79 premiers patients des 102 inclus sont présentés ci-dessous.

Parmi ces 79 patients, 50 (63,3%) avaient une fibrose sévère F3-F4 et 63 (79,7%) une stéato-hépatite définie par le score SAF.

La répartition des patients selon les stades de fibrose et la présence d'une stéato-hépatite en fonction du portage d'*E. coli* du groupe B2 est détaillée dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Répartition du portage d'*E. coli* du groupe B2 chez les 79 patients analysés

	Porteurs d'<i>E. coli</i> B2 n = 38 (48,1%)	Non porteurs d'<i>E. coli</i> B2 n = 41 (51,9%)
Fibrose - F0/F1/F2 - F3/F4	0 / 2 (5,3%) / 14 (36,8%) 19 (50%) / 3 (7,9%)	2 (4,9%) / 5 (12,2%) / 6 (14,6%) 20 (48,8%) / 8 (19,5%)
Stéato-hépatite selon le score NAS :		
*oui (≥ 5)	13 (34,2%)	17 (41,5%)
*borderline (3-4)	11 (28,9%)	12 (29,3%)
*NC	1 (2,6%)	1 (2,4%)
Stéato-hépatite selon FLIP/SAF:		
*NC	34 (89,5%)	29 (70,7%)
SAF, inflammation		*1 (2,4%)
- 0	3 (7,9%)	5 (12,2%)
- 1-2	35 (92,1%)	34 (82,9%)
- NC	0	2 (4,9%)
SAF, ballonnisation		
- 0	2 (5,3%)	8 (19,5%)
- 1/2	36 (94,7%)	31 (75,6%)
- NC	0	2 (4,9%)

Les données sont présentées en effectif (%).

Abréviations : NAS : NAFLD Activity Score ; NC : non connu ; SAF : steatosis activity fibrosis.

Nous avons étudié la prévalence de l'*E. coli* en fonction de la sévérité de la fibrose d'une part et de la présence d'une stéato-hépatite d'autre part (Figure 2).

1) *Prévalence d'E. coli du groupe B2 en fonction de la sévérité de la fibrose*

Sur ces 79 patients analysés, 38 (48,1%) patients étaient porteurs d'*E. coli* appartenant au groupe phylogénétique B2.

Nous avons observé une association entre le portage d'*E. coli* du groupe B2 et le stade de fibrose ($p = 0.043$) (Figure 2A). Cependant, il n'y avait pas de différence de prévalence en classant les patients selon la sévérité de la fibrose F1-F2 versus F3-F4 ($p = 0.338$) (Figure 2A).

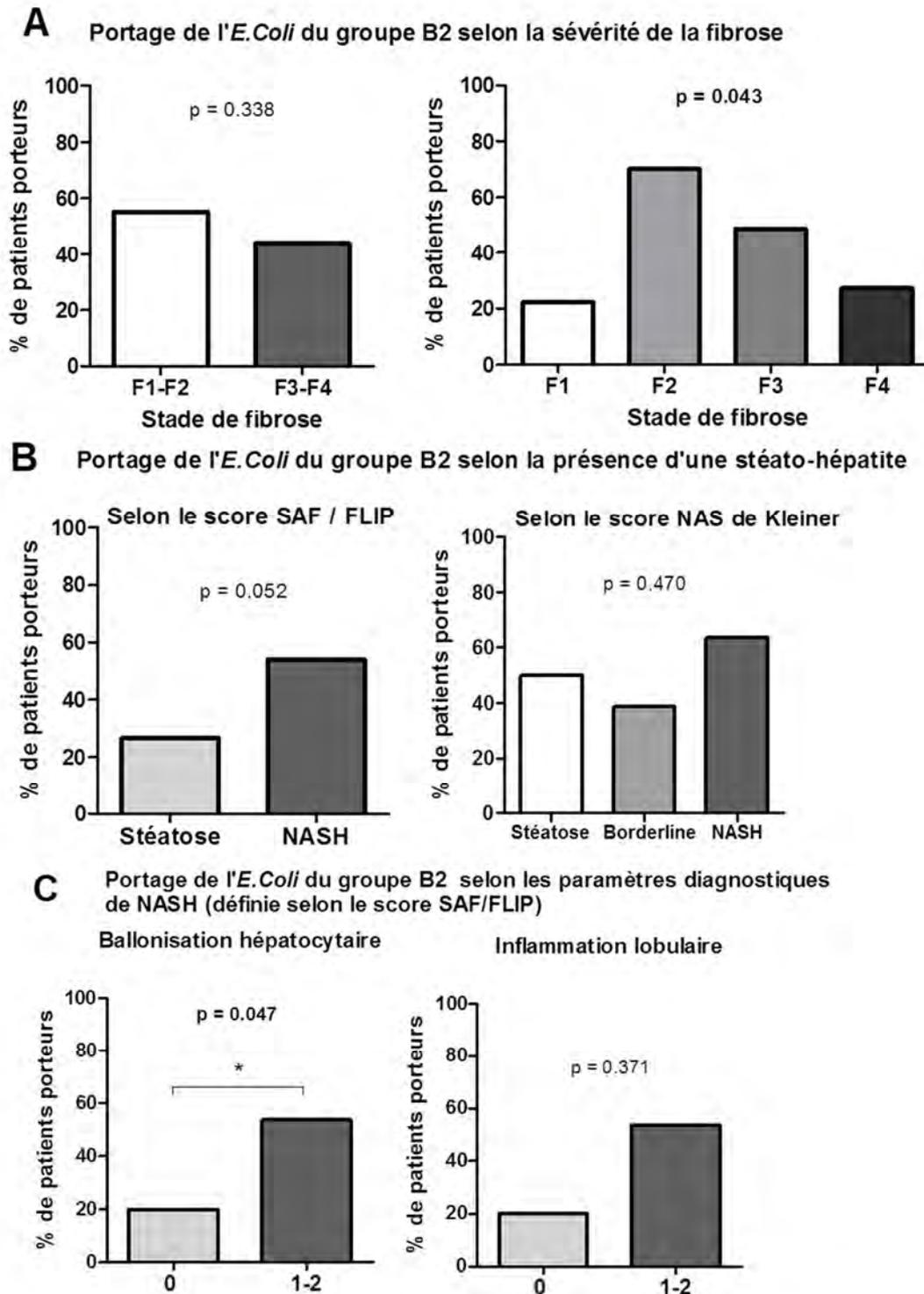
2) *Prévalence d'E. coli du groupe B2 en fonction de la présence d'une stéato-hépatite*

Nous avons observé une nette tendance ($p = 0,052$) en faveur d'un portage d'*E. coli* du groupe B2 plus important chez les patients présentant une stéato-hépatite définie par l'algorithme de FLIP à partir du score SAF par rapport aux patients avec stéatose pure (Figure 2B). Cette tendance n'était pas observée avec le score NAS de Kleiner qui prend en compte les patients « borderline » (Figure 2B).

Nous avons donc étudié la relation entre les paramètres définissant la stéato-hépatite par l'algorithme de FLIP selon le score SAF (stéatose ≥ 1 + inflammation lobulaire ≥ 1 + ballonnisation hépatocytaire ≥ 1) et le portage d'*E. coli* du groupe B2.

L'ensemble des patients porteurs d'*E. coli* du groupe B2 présentait une stéatose $\geq S1$ (Tableau 4). La prévalence du portage d'*E. coli* du groupe B2 était significativement plus élevée chez les patients présentant une ballonnisation hépatocytaire de grade 1 ou 2 ($p = 0.047$) tandis qu'elle ne variait pas avec l'inflammation lobulaire ($p = 0.371$) (Figure 2C).

Figure 2 : Prévalence de l'*E. coli* du groupe B2 chez les 79 patients analysés



A/ Prévalence de l'*E. coli* du groupe B2 selon la sévérité de la fibrose

B/ Prévalence de l'*E. coli* du groupe B2 selon la présence d'une stéato-hépatite

C/ Prévalence de l'*E. coli* du groupe B2 selon les paramètres diagnostiques de stéato-hépatite (score SAF/FLIP)

Les résultats sont présentés en effectifs (%).

E. Prévalence du portage de l'îlot *pks* codant pour la génotoxine colibactine chez les patients porteurs d'*E. coli* du groupe B2

Comme expliqué dans l'introduction, seules certaines souches d'*E. coli* du groupe B2 portent l'îlot génomique *pks* qui code pour la génotoxine colibactine. Nous avons donc recherché par qPCR parmi les 38 patients porteurs d'*E. coli* du groupe B2 ceux qui portaient l'îlot *pks*.

Sur les 38 patients porteurs d'*E. coli* du groupe B2, 18 patients (47.4%) étaient porteurs de l'îlot *pks*. La répartition des patients porteurs et non porteurs de l'îlot *pks* en fonction des stades de fibrose et de la présence d'une stéato-hépatite est détaillée dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Répartition du portage de l'îlot *pks* chez les patients porteurs d'*E. coli* du groupe B2

	Portage de l'îlot <i>pks</i> n = 18 (47,4%)	Absence de portage de l'îlot <i>pks</i> n = 20 (52,6%)
Fibrose - F0/F1/F2 - F3/F4	0 / 1 (5,5%) / 7 (38,9%) 8 (44,5%) / 2 (11,1%)	0 / 1 (5%) / 7 (35%) 11 (55%) / 1 (5%)
Stéato-hépatite selon le score NAS :		
*oui (≥ 5)	5 (27,8%)	8 (40%)
*borderline (3-4)	7 (38,9%)	4 (20%)
*NC	0	1 (5%)
Stéato-hépatite selon FLIP/SAF:	15 (83,3%)	19 (95%)
SAF, inflammation		
- 0	2 (11,1%)	0
- 1-2	16 (88,9%)	19 (95%)
- NC	0	1 (5%)
SAF, ballonnisation		
- 0	2 (11,1%)	0
- 1-2	16 (88,9%)	19 (95%)
- NC	0	1 (5%)

Les données sont présentées en effectif (%).

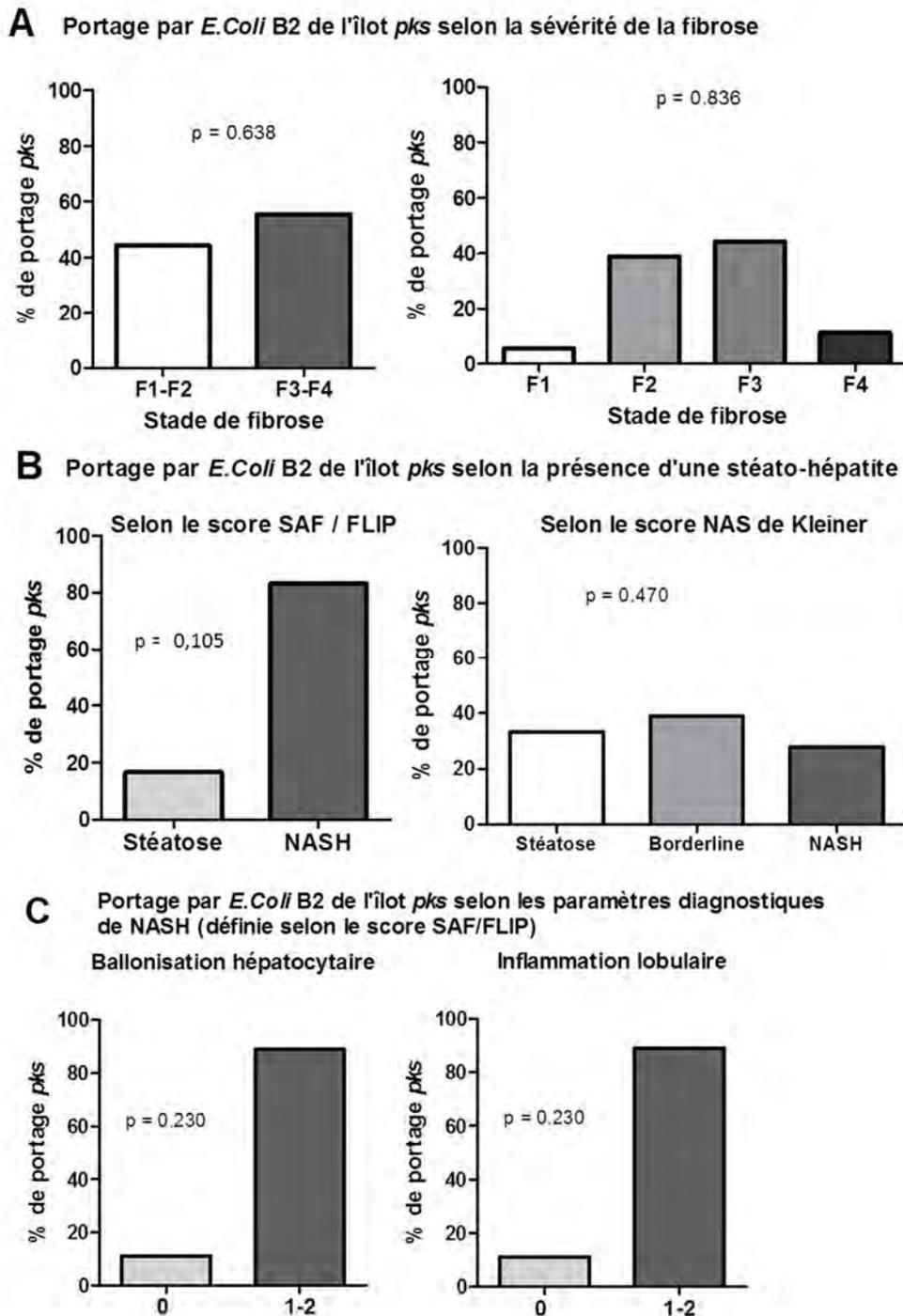
Abréviations : NAS : NAFLD Activity Score ; NC : non connu ; SAF : steatosis activity fibrosis.

Nous avons ensuite étudié la prévalence du portage de l'îlot *pks* en fonction de la sévérité de la fibrose d'une part et de la présence d'une stéato-hépatite d'autre part (Figure 3).

La prévalence de l'îlot *pks* chez les patients porteurs d'*E. coli* du groupe B2 n'était pas différente en fonction de la sévérité de la fibrose ($p = 0,638$ et $p = 0,836$) (Figure 3A) ou de la présence d'une stéato-hépatite ($p = 0,105$) (Figure 3B).

Il n'y avait pas non plus de différence de la prévalence de l'îlot *pks* chez les patients porteurs d'*E. coli* du groupe B2 en fonction du stade de ballonnisation hépatocytaire ou d'inflammation lobulaire ($p = 0,230$ et $p = 0,230$ respectivement) (Figure 3C).

Figure 3 : Prévalence du portage de l'îlot *pks* chez les patients porteurs d'*E. coli* du groupe B2



A/ Prévalence du portage de l'îlot *pks* selon la sévérité de la fibrose

B/ Prévalence du portage de l'îlot *pks* selon la présence d'une stéato-hépatite

C/ Prévalence du portage de l'îlot *pks* selon les paramètres diagnostiques de stéato-hépatite (score SAF/FLIP)

Les résultats sont présentés en effectifs (%).

F. Présence d'*E. coli* du groupe B2 dans le tissu hépatique

Aucune bactérie viable y compris l'*E. coli* du groupe B2 n'a été détectée dans les tissus hépatiques mis en culture chez les 7 premiers patients analysés. Cette recherche n'a donc pas été poursuivie sur l'ensemble des patients inclus.

IV. DISCUSSION

Notre étude visait à déterminer s'il existait une association entre la prévalence de l'*E. coli* du groupe B2 et des souches portant l'îlot *pks* codant pour la génotoxine colibactine, et la sévérité de la stéatopathie métabolique définie par la présence d'une stéato-hépatite ou d'une fibrose sévère (F3-F4).

L'analyse préliminaire portant sur les 79 premiers patients inclus parmi les 102 analysables a montré que 48% d'entre eux étaient porteurs d'*E. coli* du groupe B2 dans leurs selles. Parmi les patients porteurs d'*E. coli* du groupe B2, 47% portaient l'îlot *pks* qui code pour la génotoxine colibactine. La prévalence du portage d'*E. coli* du groupe B2 n'était pas différente en fonction de la sévérité de la fibrose. En revanche, le portage d'*E. coli* du groupe B2 semblait associé à la présence d'une stéato-hépatite ($p = 0,052$) et en particulier d'une ballonnisation hépatocytaire ($p = 0,047$). La recherche d'*E. coli* du groupe B2 dans le tissu hépatique par culture était négative chez 7 patients.

Dans la population générale, 95% sont porteurs d'*E. coli* dans les selles, et 30% sont porteurs du groupe phylogénétique B2. On assiste à une augmentation de cette prévalence ces dernières décennies dans les pays industrialisés possiblement secondaire à des modifications du mode de vie et des facteurs environnementaux [220]. Son implication dans certaines infections, maladies inflammatoires, immunes ou néoplasiques a été démontrée. Cependant, aucune étude n'avait étudié son rôle dans la St. Met.

Dans la St. Met, l'augmentation de la production d'éthanol par les bactéries du MI, notamment *E. coli*, favoriserait la perméabilité de la barrière intestinale et entraînerait l'accumulation de triglycérides et un stress oxydatif dans le foie [197]. Une étude préalable avait montré que le genre *Echerichia* pourrait être un facteur de risque de progression vers la stéato-hépatite chez des enfants obèses [213]. Dans une autre étude, *E. coli* était plus abondante chez les patients atteints de fibrose avancée (F3-F4) par rapport aux patients sans

fibrose avancée (F0-F2) (résultat non significatif) [215]. Notre étude est la première à s'intéresser à la prévalence du groupe B2 de l'*E. coli* chez des patients atteints de St. Met.

Nous avons observé dans cette analyse préliminaire une prévalence d'*E. coli* du groupe B2 supérieure à celle décrite dans la population générale (48% vs 30%). Des études complémentaires sont nécessaires pour expliquer les mécanismes physiopathologiques de la relation entre cette souche bactérienne et la St. Met.

Nous n'avons pas mis en évidence de différence dans la prévalence d'*E. coli* du groupe B2 en fonction de la sévérité de la fibrose dans la St. Met. A ce stade, et compte tenu du calcul d'effectif préalablement effectué pour mettre en évidence une différence, il n'est pas possible de conclure sur l'absence de relation ou sur un manque de puissance.

Néanmoins, nous avons observé une probable association ($p = 0.052$) entre l'augmentation du portage d'*E. coli* du groupe B2 et la présence d'une stéato-hépatite. L'analyse doit être complétée avec les 23 autres patients inclus dans l'étude pour voir si la tendance se confirme. De façon intéressante, l'analyse de chacun des paramètres définissant la stéato-hépatite a montré une ballonnisation hépatocytaire plus importante chez les porteurs d'*E. coli* du groupe B2 par rapport aux patients non porteurs ($p = 0,047$) tandis que l'inflammation hépatocytaire n'était pas différente entre les groupes porteurs et non porteurs. En effet, la colibactine semble jouer un rôle délétère sur l'ADN de l'hôte pouvant entraîner la mort cellulaire [227]. Son rôle sur les cellules hépatiques reste à démontrer.

Les souches d'*E. coli* du groupe B2 productrices de la génotoxine colibactine sont présentes relativement tôt dans la vie puisque 15% des nouveaux-nés français âgés de 3 jours présentent l'îlot *pks* dans leur MI et la colibactine pourrait être également à l'origine d'une altération de la barrière intestinale dès la naissance [228]. Chez l'adulte, la colibactine favorise la sénescence cellulaire, le cancer colorectal (66,7% de portage de l'îlot *pks* dans les biopsies digestives des patients atteints de cancer colorectal contre 20,8% chez les sujets sains) et l'inflammation dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (40% de portage) [227]. Dans notre étude, la prévalence de l'îlot *pks* atteignait 40% chez les porteurs de B2 au stade de stéato-hépatite.

Si l'*E. coli* du groupe B2 produisant cette génotoxine augmente la perméabilité intestinale, on peut faire l'hypothèse que cette colibactine pourrait en partie expliquer les mécanismes physiopathologiques de transition de la stéatose vers la stéato-hépatite. Dans notre étude, la prévalence de l'îlot *pks* n'était pas différente en fonction de la sévérité de la fibrose ou de la

présence d'une stéato-hépatite chez les patients porteurs de l'*E. coli* du groupe B2. Notre étude manque encore de puissance puisque l'îlot *pks* a été retrouvé seulement chez 18 patients des 38 patients porteurs de B2.

Des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer le lien entre l'augmentation du portage de l'*E. coli* du groupe B2 et le rôle de la colibactine dans l'altération de la barrière intestinale et la survenue de stéato-hépatite.

V. CONCLUSION

Ces résultats préliminaires suggèrent un lien entre l'*E. coli* du groupe phylogénétique B2 et la présence d'une stéato-hépatite dans une population de patients atteints de St. Met, en particulier dans la souffrance hépatocytaire (ballonisation). L'analyse de l'ensemble de notre population doit être poursuivie pour rechercher un lien entre la production de colibactine par certaines souches de ce groupe et la stéato-hépatite.

ETUDE 2

**Etude prospective du microbiote sanguin chez des patients
atteints de stéatopathie métabolique**

I. INTRODUCTION

A. Contexte et hypothèses

Les stéatopathies métaboliques (St. Met) deviennent la première cause d'hépatopathie chronique dans les pays occidentaux, avec une prévalence de 24% dans la population générale adulte [19]. La présence d'une stéato-hépatite expose à un risque d'évolution vers la cirrhose et le cancer du foie. Le pronostic est conditionné par la présence d'une fibrose [81, 82], avec une augmentation de la mortalité globale dès le stade de fibrose légère (F1) [81], et de la mortalité hépatique dès le stade de fibrose modérée (F2) [81]. En raison du caractère invasif et des limites de la biopsie hépatique, actuelle méthode diagnostique de référence, il apparaît indispensable de trouver des marqueurs diagnostiques capables d'identifier les patients à risque.

La St. Met est caractérisée par une dysbiose intestinale (modification de la composition et/ou de la fonction du microbiote intestinal) associée à une augmentation de la translocation bactérienne par augmentation de la perméabilité intestinale [192, 193, 196-202]. Le foie est le premier organe qui draine le sang en provenance de l'intestin via le système veineux porte. En l'absence de pathologie, une faible proportion de bactéries parvient ainsi au niveau du foie où elles sont prises en charge par le système immunitaire qui régule leur présence via les Toll-like récepteurs [172, 243].

Un lien entre le degré de sévérité de la St. Met et la composition taxonomique du microbiote intestinal a été démontré [212]. Cependant, l'analyse des selles comme marqueur de la sévérité de la St. Met présente des limites non négligeables (inconfort pour le patient, prélèvement non réalisable en consultation, etc...) qui nous conduisent à rechercher préférentiellement un biomarqueur diagnostique sanguin.

L'existence d'un « microbiote sanguin » a été mise en évidence sous forme d'ADN ribosomal 16S (ADNr 16S) issu de la translocation bactérienne dans le sang de souris présentant une stéatose hépatique induite par un régime hyperlipidique [193]. Chez l'Homme, la quantité d'ADNr 16S présente dans le sang était prédictive de la survenue de maladies cardiovasculaires [182]. En outre, il existe aussi un « microbiote tissulaire » comme démontré dans le tissu adipeux chez l'Homme, qui semble corrélé avec l'IMC [244], et qui pourrait être impliqué dans la survenue du diabète de type 2 et des maladies métaboliques [245] comme suggéré par les modèles murins.

Récemment, une étude a montré un lien entre la quantité d'ADNr 16s et la présence d'une fibrose hépatique dans une population de patients obèses morbides biopsiés du foie au cours d'une chirurgie bariatrique [214]. Dans cette étude, les patients qui présentaient une fibrose avaient également une moindre diversité dans les populations bactériennes circulant dans le sang, et une signature taxonomique sanguine spécifique par rapport aux patients obèses sans fibrose [214]. Cependant, il s'agissait d'une population très particulière de patients obèses morbides (IMC > 40), avec ou sans St. Met, composée majoritairement de femmes (72%). En outre, la présence d'une stéato-hépatite n'était pas recherchée et le spectre complet des stades de fibrose n'était pas représenté. Les effectifs de patients avec fibrose étaient faibles avec seulement 7 patients avec une fibrose légère et 4 une fibrose modérée à sévère. De plus, la signature taxonomique n'avait pas été confirmée dans leur cohorte de validation [214].

Nous avons fait l'hypothèse que la caractérisation du microbiote sanguin chez des patients présentant une St. Met pouvait permettre d'identifier un biomarqueur associé au degré de sévérité d'atteinte hépatique.

B. Objectif

L'objectif principal de notre étude était d'explorer la relation entre la quantité d'ADNr 16S dans le sang et le degré de sévérité de la fibrose hépatique dans une population de patients présentant une St. Met.

Les objectifs secondaires étaient :

- d'explorer la relation entre la quantité d'ADNr 16S dans le sang et la présence d'une stéato-hépatite
- d'analyser la composition taxonomique du microbiote sanguin et de la comparer entre les patients présentant une fibrose sévère (F3-F4) et ceux sans fibrose sévère (F0-F2).

II. PATIENTS ET METHODES

A. Schéma d'étude

Il s'agit d'une étude ancillaire de l'étude clinique prospective, observationnelle, descriptive, translationnelle, monocentrique ColiNASH (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02390232) conduite à l'hôpital Purpan, au CHU de Toulouse. Cette étude ancillaire appelée « *Identification d'un biomarqueur de fibrose hépatique issu du microbiote sanguin chez des patients atteints de stéatopathie métabolique* » (acronyme « Coli-NASH sanguin ») a obtenu

l'autorisation de l'ANSM le 24/11/2015 et du CPP le 16/12/2015. Tous les patients recevaient pour cette étude ancillaire une information orale et une note d'information écrite différente de celle de l'étude princeps et donnaient leur consentement par écrit sur un document spécifique à l'étude ancillaire, après un délai de réflexion qu'ils jugeaient nécessaire.

B. Critères d'éligibilité

1) Critères d'inclusion

Les 102 patients inclus et analysables dans l'étude princeps ColiNASH ont été considérés pour l'inclusion. Ont également été considérés pour l'inclusion les 12 patients inclus dans ColiNASH qui n'ont pas été analysés en raison d'un échantillon de selles manquant, mais dont l'échantillon de sang était disponible. Parmi ces 114 patients, seuls ceux qui ont signé un consentement spécifique pour l'étude ancillaire ont été inclus.

2) Critères de non inclusion ou d'exclusion

Étaient exclus les patients inclus et analysables dans ColiNASH chez qui le prélèvement de sang n'avait pas pu être réalisé. Les autres causes d'exclusion étaient communes à l'étude princeps.

C. Critères de jugement

Le critère de jugement principal était de comparer les concentrations d'ADNr 16S dans le sang selon le stade de sévérité de la fibrose F0-F2 (fibrose absente à modérée) versus F3-F4 (fibrose sévère ou cirrhose).

Les critères de jugement secondaires étaient :

- de comparer les concentrations d'ADNr 16S dans le sang selon la présence d'une stéato-hépatite (stéato-hépatite versus stéatose simple),
- de comparer la composition taxonomique du microbiote sanguin selon le stade de sévérité de la fibrose (F0-F2 versus F3-F4).

D. Etude du microbiote sanguin

Pour chaque patient, un échantillon de 200 µl de sang veineux périphérique total a été utilisé. Les analyses ont été réalisées par la société Vaiomer, située 516 rue Pierre et Marie Curie 31670 LABEGE. Ceci a été fait dans le cadre d'une convention passée entre le promoteur de l'étude : le CHU de Toulouse et la société VAIOMER. Les analyses de microbiote sanguin

ont été réalisées par Benjamin Lelouvier et Jérôme Lluch, les analyses bioinformatiques par Amandine Broha et Florence Servant (VAIOMER). Le Pr Jacques AMAR a contribué à la conception de l'étude, l'analyse et l'interprétation des données.

Les échantillons de sang étaient stockés dans le service d'hépatogastro-entérologie du CHU de Toulouse à -80°C puis envoyés à la société Vaiomer par transport carboglace de façon groupée.

1) Détermination quantitative de l'ADN bactérien circulant par dosage qPCR du gène bactérien 16S dans le sang

La quantité d'ADN bactérien dans le sang, reflet de la translocation bactérienne, était déterminée par technologie real time quantitative Polymerase Chain Reaction (rt-qPCR) optimisé spécifiquement pour le sang humain par la société Vaiomer. L'ADN bactérien était extrait du sang total par une méthode d'extraction optimisée. Une quantification par qPCR était ensuite réalisée en utilisant des amorces nucléiques universelles dirigées contre les régions V3-V4 du gène bactérien 16S et capable d'amplifier l'ADNr 16S de plus de 95 % des bactéries connues.

2) Analyse qualitative par séquençage métagénomique haut débit de l'ADNr 16S du microbiote sanguin

La caractérisation de la population bactérienne présente au sein des échantillons sanguins était déterminée par méthode de séquençage haut débit nouvelle génération des régions variables de l'ADNr 16S. Après extraction des ADN génomiques, et amplification des gènes bactériens 16S par PCR, la détection des fragments de séquençage générés était réalisée par la technologie Illumina MiSeq. Les données obtenues étaient ensuite analysées par bioinformatique permettant un regroupement en OTU (operational taxonomic units) et une assignation phylotypique (identification des taxons bactériens).

E. Calcul de la taille de l'étude

L'étude pilote préalable dans la population de patients obèses opérés de chirurgie bariatrique a montré qu'il existait une augmentation d'un facteur 2,7 du nombre de copies/ μ l de sang de l'ADNr 16S chez les patients présentant une fibrose par rapport aux patients sans fibrose (239 ± 186 vs 652 ± 285) [214]. Nous avons fait l'hypothèse qu'entre les patients présentant une fibrose absente à modérée (F0-F2) et ceux présentant une fibrose sévère (F3-F4), on

observerait un doublement de ce nombre de copie. Un effectif de 60 patients par groupe soit 120 patients au total permettrait de détecter cette différence avec une puissance de 95% et un risque de première espèce de 5%.

F. Méthodes statistiques

L'analyse bioinformatique et biostatistique des données était prise en charge dans le cadre d'une collaboration entre le CHU et la société Vaiomer.

L'analyse bioinformatique et biostatistique a été effectuée par un pipeline propriétaire de Vaiomer, basé entre autres sur les logiciels FROGS, LEFSE, environnement R et la base de donnée Silva. Les logiciels utilisés pour l'analyse des données statistiques et pour la réalisation des graphiques étaient respectivement les logiciels SPSS (version 19.0) et GraphPad Prism (version 5.00) pour Windows. L'analyse se faisait sur données contenant comme seul identifiant un numéro d'anonymat. Une description initiale de la population était faite en détaillant effectifs et pourcentages pour les variables qualitatives, moyennes et écart types pour les variables quantitatives de distribution normale. Les comparaisons des variables cliniques et biologiques entre les groupes de patients répartis selon la sévérité de leur fibrose étaient effectuées par tests de Chi-2 pour les variables catégorielles et par tests de Student pour les variables quantitatives. La proportion relative d'ADN bactérien était comparée à l'aide d'un test de Mann-Whitney en raison d'une distribution non gaussienne. Le seuil de significativité était fixé à 5%.

III. RESULTATS

A. Description de la population et comparaison des caractéristiques des patients selon la présence d'une fibrose sévère

Parmi les 114 patients considérés pour l'inclusion, 92 patients ont signé un consentement spécifique pour l'étude ancillaire et ont été inclus dans « ColiNASH sanguin ».

Leurs caractéristiques cliniques et biologiques sont détaillées dans le Tableau 1. Il y avait 50 hommes (54,3%) et 42 femmes (45,7%). En moyenne, cette population avait un âge de 58 ans, un poids de 100 kg, un IMC de 36,1 kg/m², et un tour de taille de 118 cm.

Deux tiers des femmes étaient ménopausées, avec un âge moyen de survenue de la ménopause à 48 ans, 7 d'entre elles ont été traitées par traitement hormonal de la ménopause.

Près de 54% des patients étaient fumeurs ou anciens fumeurs. Concernant les facteurs de risques métaboliques, 69,6% avait un diabète de type 2, 63% une hypertension artérielle, 67,4% présentait une dyslipidémie et 1/3 un syndrome d'apnées du sommeil.

Concernant les événements cardio-vasculaires, 2,2% avait présenté un AVC, 14,1% avait fait un infarctus du myocarde, et 5,4% présentait une AOMI.

Sur le plan biologique, les patients présentaient une cytolysse modérée, prédominante sur les ALAT, associée à une élévation de l'activité de la γ GT. Sur le plan métabolique, il a été retrouvé un taux de triglycérides élevé à $2,18 \pm 1,68$ g/l et une HbA1c à $7,4 \pm 1,5\%$.

Les tests d'évaluation non invasive de la fibrose (Tableau 2) montraient une médiane d'élasticité hépatique au FibroScan® à $12,8 \pm 7,1$ KPa, témoignant d'une fibrose sévère avec des critères d'interprétabilité fiables. La mesure de l'élasticité a échoué ou était ininterprétable chez 27,2% des patients. La moyenne du NAFLD Fibrosis Score se situait en zone indéterminée ($-0,31 \pm 1,41$). Enfin, sur le plan radiologique, plus de 80% des patients présentaient une stéatose hépatique à l'échographie abdominale.

Dans cette population, 51 (55.4%) patients avaient une fibrose sévère (F3-F4). Ces patients étaient plus fréquemment diabétiques, avaient un taux d'HDL-cholestérol plus bas, des taux d'ASAT et ALAT plus élevés, et un taux de plaquettes plus bas que les patients sans fibrose sévère (F0-F2) (Tableau 1). Comme attendu, les résultats du FibroScan® et du NAFLD Fibrosis Score étaient bien corrélés à la présence d'une fibrose sévère à la biopsie, confirmant l'efficacité de ces tests non invasifs (Tableau 2).

Tableau 1 : Données cliniques et biologiques de la population globale

	Population totale (n=92)	F0-F2 n = 41 (44,6%)	F3-F4 n = 51 (55,4%)	p valeur
Données cliniques				
Genre, homme	50 (54,3%)	20 (48,8%)	30 (58,8%)	0,336
Age à l'inclusion, ans	58 ± 12	56 ± 13	59 ± 12	0,170
Tabagisme actif ou sévère	50 (54,4%)	21 (51,2%)	29 (56,9%)	0,831
Poids, kg	100 ± 21,6	99,6 ± 23	100,3 ± 20,6	0,872
IMC, kg/m ²	36,1 ± 8,1	36,1 ± 8,4	36 ± 7,9	0,965
Tour de taille, cm	118 ± 15	115 ± 13	120 ± 15	0,136
Tour de hanche, cm	117 ± 14	118 ± 15	116 ± 12	0,533
Diabète de type 2	64 (69,6%)	22 (53,7%)	42 (82,4%)	0,003
Dyslipidémie	62 (67,4%)	25 (61%)	37 (72,5%)	0,239
HTA	58 (63%)	23 (56,1%)	35 (68,6%)	0,216
SAS	35 (38%)	16 (39%)	19 (37,3%)	0,862
AVC	2 (2,2%)	0	2 (3,9%)	0,200
IDM	13 (14,1%)	4 (9,8%)	9 (17,6%)	0,280
AOMI	5 (5,4%)	3 (7,3%)	2 (3,9%)	0,475
Données biologiques				
HDL-cholestérol, g/l	0,43 ± 0,13	0,46 ± 0,11	0,40 ± 0,14	0,029
LDL-cholestérol, g/l	1,03 ± 0,40	1,08 ± 0,41	0,99 ± 0,40	0,322
Triglycérides, g/l	2,18 ± 1,68	2,07 ± 1,58	2,26 ± 1,76	0,612
HbA1c, %	7,4 ± 1,5	6,9 ± 1,6	7,6 ± 1,3	0,061
ASAT, UI/l	40 ± 31	29 ± 11	48 ± 39	0,002
ALAT, UI/l	55 ± 29	46 ± 25	63 ± 31	0,004
γGT, UI/l	100 ± 122	82 ± 147	114 ± 96	0,212
Albumine sérique, g/L	40,3 ± 3,6	40 ± 4	40,4 ± 3,2	0,586
TP, %	97 ± 5	97 ± 4	96 ± 5	0,232
Plaquettes, g/l	238 ± 66	254 ± 75	225 ± 56	0,039
Créatinine, μmol/l	78 ± 24	82 ± 28	75 ± 20	0,235

Les données sont présentées en effectif (%) ou en moyenne ± écart-type.

Abréviations : ALAT : alanine aminotransférase ; AOMI : artériopathie oblitérante des membres inférieurs ; ASAT : aspartate aminotransférase ; AVC : accident vasculaire cérébral ; γ GT : gamma glutamyl transpeptidase ; HbA1c : hémoglobine glyquée ; HDL : High Density Lipoproteins ; HTA : hypertension artérielle ; IDM : infarctus du myocarde ; IMC : indice de masse corporelle ; LDL : Low Density Lipoproteins ; TP : taux de prothrombine ; SAS : syndrome d'apnée du sommeil.

Tableau 2 : Résultats des méthodes non invasives d'évaluation de la fibrose

	Population totale (n = 92)	F0-F2 n = 41 (44,6%)	F3-F4 n = 51 (55,4%)	p valeur
FibroScan®, kPa	12,8 ± 7,1	10,2 ± 2,3	15,4 ± 9	0,002
- ≥ 7,9	60 (65,2%)			
- ≤ 7,9	7 (7,6%)			
- Echec	25 (27,2%)			
NAFLD Fibrosis Score	-0,31 ± 1,41	-0,82 ± 1,34	0,13 ± 1,28	0,001
- > 0,675	26 (28,3%)			
- < -1,455	25 (27,2%)			
- Zone grise	37 (40,2%)			
- NC	4 (4,3%)			

Les données sont présentées en effectif (%) ou en moyenne ± écart-type.

Abréviations : IQR : interquartile range ; NC : non connu.

B. Résultats histologiques

La majorité des biopsies hépatiques a été réalisée par voie jugulaire en endoscopie (87%), et 13% par voie chirurgicale. Le gradient porto-systémique moyen était normal.

A l'histologie (Tableau 3), 43 patients (46,7%) avaient une fibrose sévère (F3) et 8 patients (8,7%) une cirrhose. Selon l'algorithme de FLIP définissant la stéato-hépatite à partir du score SAF, 75 (81,5%) patients présentaient une stéato-hépatite.

Le gradient porto-systémique était significativement plus élevé en cas de fibrose sévère par rapport à l'absence de fibrose sévère ($4,9 \pm 3,1$ vs $2,9 \pm 1,1$) ($p < 0,001$) bien que les valeurs moyennes soient dans les normes (< 5 mmHg). Il y avait significativement plus de stéato-hépatite chez les patients avec une fibrose sévère du fait d'une ballonnisation hépatocytaire plus marquée et non d'une inflammation plus sévère (Tableau 3).

Tableau 3 : Résultats histologiques de la ponction biopsie hépatique

		Population totale (n = 92)			F0-F2	F3-F4	p
					n = 41 (44,6%)	n = 51 (55,4%)	valeur
Stéatose - S0/S1 - S2/S3	4 (4,4%) / 35 (38%)	3 (7,3%) / 20 (48,8%)	1 (2%) / 15 (29,4%)	0,100			
	31 (33,7%) / 22 (23,9%)	10 (24,4%) / 8 (19,5%)	21 (41,2%) / 14 (27,5%)				
Fibrose - F0/F1/F2 - F3/F4	4 (4,4%) / 10 (10,9%) / 27 (29,3%)	4 (9,8%) / 10 (24,4%) / 27 (65,9%)	-	<0,001			
	43 (46,7%) / 8 (8,7%)	-	43 (84,3%) / 8 (15,7%)				
Score NAS	4,1 ± 1,7	3,5 ± 1,5	4,6 ± 1,6	0,001			
Stéato-hépatite selon le score NAS : oui (≥ 5) borderline (3-4) *NC	37 (40,2%)	11 (26,8%)	26 (51%)	0,045			
	41 (44,6%)	21 (51,2%)	20 (39,2%)				
	*1 (1,1%)		*1 (2%)				
Stéato-hépatite selon FLIP/SAF: *NC	75 (81,5%)	29 (70,7%)	46 (90,2%)	0,048			
	*1 (1,1%)	*1 (2,4%)					
SAF, inflammation	- NC/0	1 (2,4%) / 4 (9,8%)	0 / 5 (9,8%)	0,344			
	- 1/2	63 (68,5%) / 20 (21,7%)	30 (73,2%) / 6 (14,6%)	32 (62,7%) / 14 (27,5%)			
SAF, ballonnisation	- NC/0	1 (1,1%) / 12 (13%)	1 (2,4%) / 9 (22%)	<0,001			
	- 1/2	53 (57,6%) / 26 (28,3%)	28 (68,3%) / 3 (7,3%)	25 (49%) / 23 (45,1%)			
Activité SAF	- A0/A1	5 (5,4%) / 14 (15,2%)	3 (7,3%) / 9 (22%)	2 (3,9%) / 6 (11,8%)	0,013		
	- A2/A3/A4	40 (43,5%) / 16 (17,4%) / 17 (18,5%)	22 (53,7%) / 5 (12,2%) / 2 (4,9%)	17 (33,3%) / 11 (21,6%) / 15 (29,4%)			

Les données sont présentées en effectif (%). Abréviations : NAS : NAFLD Activity Score ; NC : non connu ; SAF : steatosis activity fibrosis.

C. Quantification de l'ADN bactérien dans le sang

Six patients ont été exclus de cette analyse en raison de profils « atypiques » avec des proportions de famille de bactéries anormales pouvant correspondre à une contamination du prélèvement ou bien une infection débutante. Les patients exclus présentaient une augmentation anormale de Moraxellaceae, Staphylococcaceae, Lactobacilaceae, Streptococcaceae ou de Bifidobacteriaceae.

Au total, 86 patients ont donc été analysés. Parmi ces 86 patients, 48 (55,8%) avaient une fibrose sévère F3-F4 et 70 (81,4%) une stéato-hépatite définie par le score SAF.

Nous avons étudié la relation entre les concentrations d'ADNr 16S et la sévérité de la fibrose, de la stéatose, et la présence d'une stéato-hépatite.

1) Quantification de l'ADNr 16S en fonction de la sévérité de la fibrose

La concentration moyenne d'ADNr 16S en fonction du stade de fibrose (Tableau 4) n'était pas différente ($p = 0,506$) (Figure 1A). Lorsqu'on comparait les groupes fibrose absente à modérée (F0-F2) et fibrose sévère ou cirrhose (F3-F4), il n'y avait pas de différence significative de la concentration d'ADNr 16S ($p = 0,608$) (Figure 1A).

Tableau 4 : Valeurs moyennes de la concentration d'ADNr 16S en fonction du stade de fibrose

	Concentration moyenne d'ADNr 16S (copies/ml)
F0	563 512,88 ± 366 677,85
F1	2 048 620,60 ± 1 760 654,03
F2	1 537 943,49 ± 983 601,68
F3	1 737 363,03 ± 1 627 148,24
F4	1 252 643,56 ± 1 422 166,49

Les données sont présentées en moyenne ± écart-type.

2) *Quantification de l'ADNr 16s en fonction de la sévérité de la stéatose*

Il n'y avait pas de différence de la concentration d'ADNr 16S entre le groupe stéatose absente à légère (S0-S1) (n = 36) et stéatose modérée à sévère (S2-S3) (n = 50) (p = 0,624) (Figure 1B).

3) *Quantification de l'ADNr 16s en fonction de la présence d'une stéato-hépatite*

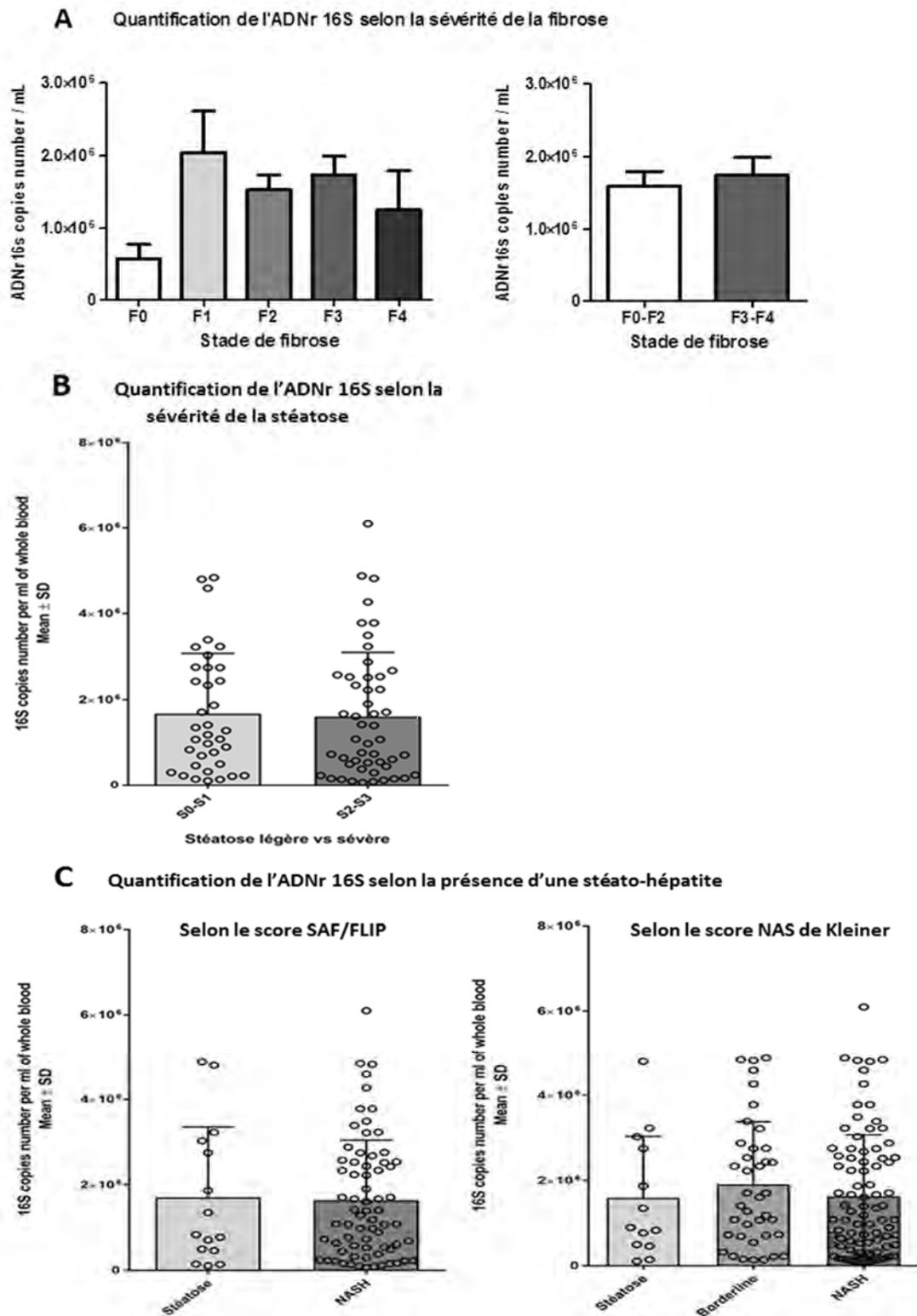
La concentration d'ADNr 16S n'était pas différente entre les groupes stéatose simple et stéato-hépatite selon l'algorithme FLIP à partir du score SAF ou selon le score NAS de Kleiner (p = 0,929 et p = 0,522 respectivement) (Figure 1C).

4) *Quantification de l'ADNr 16s en fonction de la présence d'une stéato-hépatite associée à une fibrose sévère*

Ce résultat n'était pas non plus significatif lorsqu'on comparait les patients qui associaient une stéato-hépatite et une fibrose sévère F3-F4 (n = 44) aux autres patients (fibrose sévère F3-F4 sans stéato-hépatite (n= 4), fibrose légère à modérée (F0-F2) avec ou sans stéato-hépatite (n = 37)) (p = 0,471) (Figure 2).

En synthèse, nous avons observé une augmentation non significative de la concentration d'ADNr 16S chez les patients atteints de St. Met présentant une fibrose (Figure 1A). Cependant, il n'y avait pas de différence dans les concentrations sanguines d'ADNr 16s en fonction de la présence d'une fibrose sévère, d'une stéatose sévère, ou d'une stéato-hépatite, ou encore de l'association d'une stéato-hépatite avec fibrose sévère.

Figure 1 : Quantification de l'ADNr 16S dans le sang



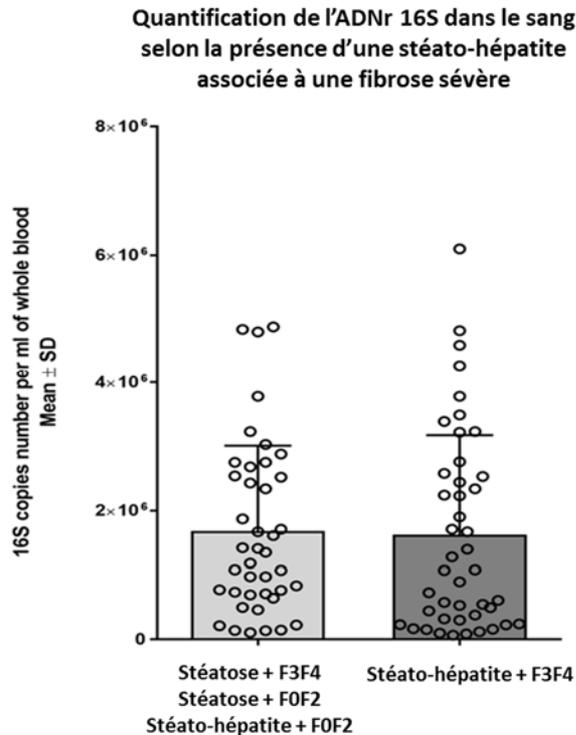
A/ Quantification de l'ADNr 16S en fonction de la sévérité de la fibrose

B/ Quantification de l'ADNr 16S en fonction de la stéatose

C/ Quantification de l'ADNr 16S en fonction de la présence d'une stéato-hépatite

Les résultats sont présentés en moyenne \pm écart-type (copies/ml).

Figure 2 : Quantification de l'ADNr 16S selon la présence d'une stéato-hépatite (définie par l'algorithme FLIP à partir du score SAF) associée à une fibrose sévère (F3-F4) en comparaison aux autres patients (stéato-hépatite sans fibrose sévère (F0-F2) ou avec une fibrose sévère (F3-F4) sans stéato-hépatite ou stéatose pure sans fibrose sévère (F0-F2))

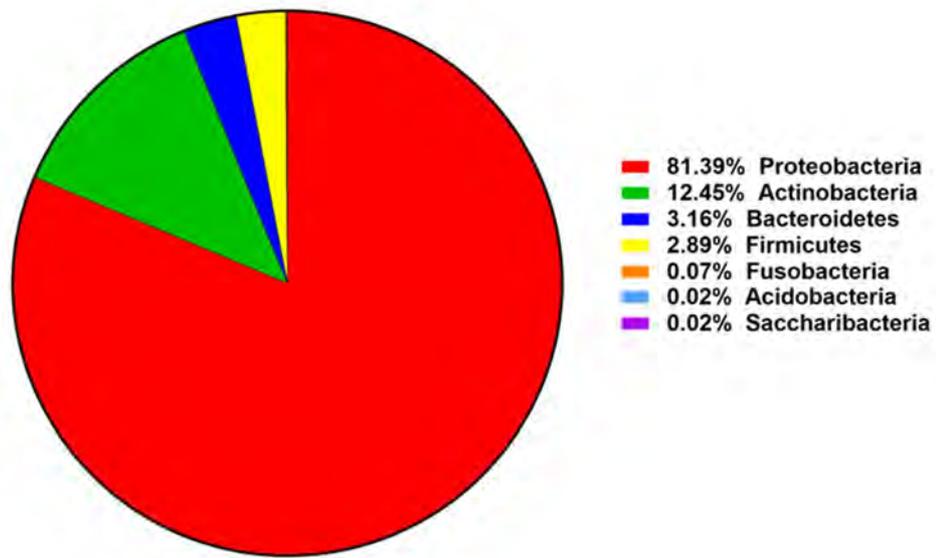


Les résultats sont présentés en moyenne \pm écart-type (copies/ml).

D. Séquençage du microbiote sanguin

L'analyse qualitative de la composition du microbiote sanguin par séquençage métagénomique de l'ADNr 16S dans le sang de la population totale (86 patients) retrouvait une majorité de Proteobacteria (81,4%) et d'Actinobacteria (12,5%) et dans une moindre mesure 3,2% de Bacteroides et 2,9% de Firmicutes (Figure 3), ce qui correspond aux proportions retrouvées dans une population d'individus sains [173].

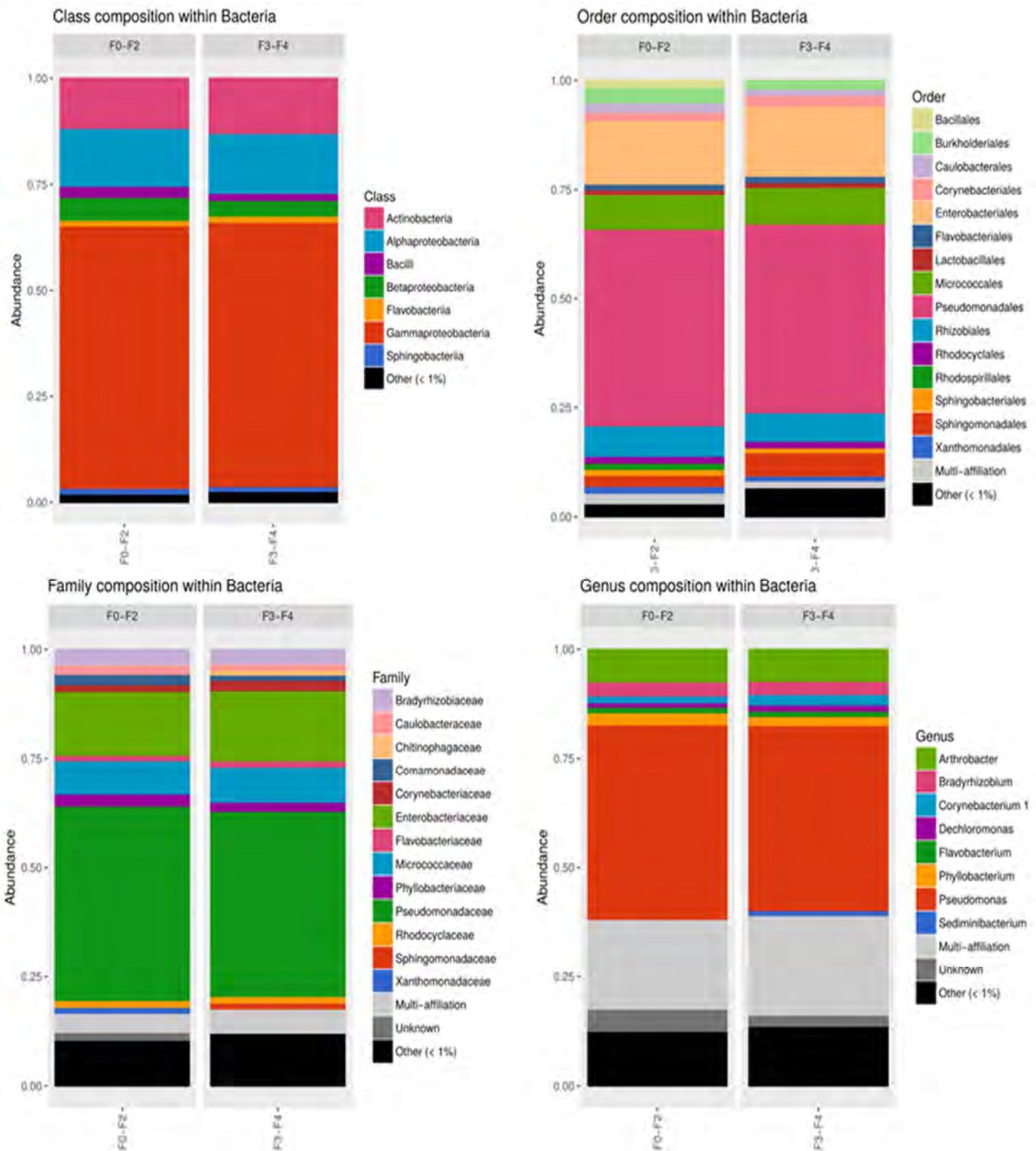
Figure 3 : Répartition des phyla bactériens dans le sang de la population totale (86 patients)



1) Composition taxonomique du microbiote sanguin selon la sévérité de la fibrose

La composition taxonomique du microbiote sanguin a ensuite été comparée entre les groupes fibrose absente à modérée (F0-F2) et fibrose sévère (F3-F4). Aucune différence n'a été observée à l'échelle du phylum. En revanche, des différences sont apparues à l'échelle de la classe, de l'ordre, de la famille et du genre (Figure 4).

Figure 4 : Composition taxonomique du microbiote sanguin (classe, ordre, famille et genre) en fonction du degré de sévérité de la fibrose (F0-F2 vs F3-F4)

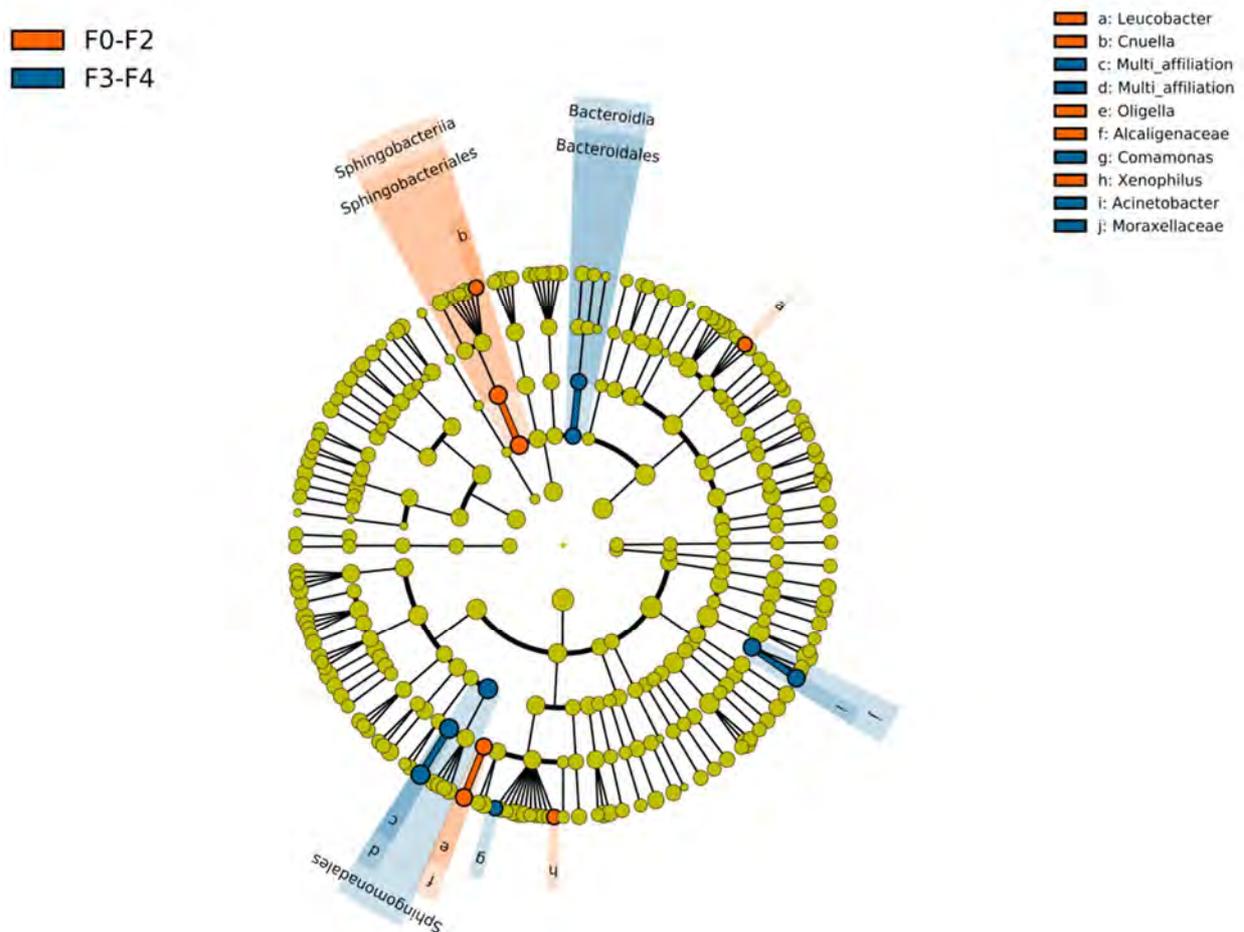


Les résultats sont présentés en effectifs (%).

Nous avons ensuite analysé les résultats du séquençage par l'algorithme LEfSe (linear discriminant analysis effect size) (Figure 5), une méthode qui permet d'identifier les modifications de taxons bactériens. Les taxons sont classés en arbre phylogénétique circulaire, représentés par des points allant du centre vers l'extérieur du cercle selon les rangs : phylum, classe, ordre, famille et genre. Les taxons significativement différents sont représentés en points colorés.

Nous avons observé des différences dans la proportion de certains taxons bactériens entre les deux groupes (Figure 5).

Figure 5 : Composition taxonomique du microbiote sanguin (classe, ordre, famille et genre) en fonction du degré de sévérité de la fibrose (F0-F2 vs F3-F4) selon l'algorithme LEfSe



Abréviations : LEfSe : linear discriminant analysis effect size.

Une analyse par le test de Mann-Whitney a permis de confirmer que ces différences de taxa bactériens entre les deux groupes étaient significatives. En effet, à l'échelle de l'ordre, de la famille et du genre, la proportion des Sphingomonadales, Sphingomonadaceae et *Sphingomonas* respectivement, était significativement augmentée dans le groupe F3-F4 par rapport au groupe F0-F2 ($p = 0,01$, $p = 0,01$ et $p = 0,016$ respectivement) (Figure 6A).

De plus, nous avons observé une proportion significativement plus importante des bactéries de la famille Moraxellaceae et du genre *Acinetobacter* dans le groupe F3-F4 par rapport au groupe F0-F2 ($p = 0,0026$ et $p = 0,0235$ respectivement) (Figure 6B).

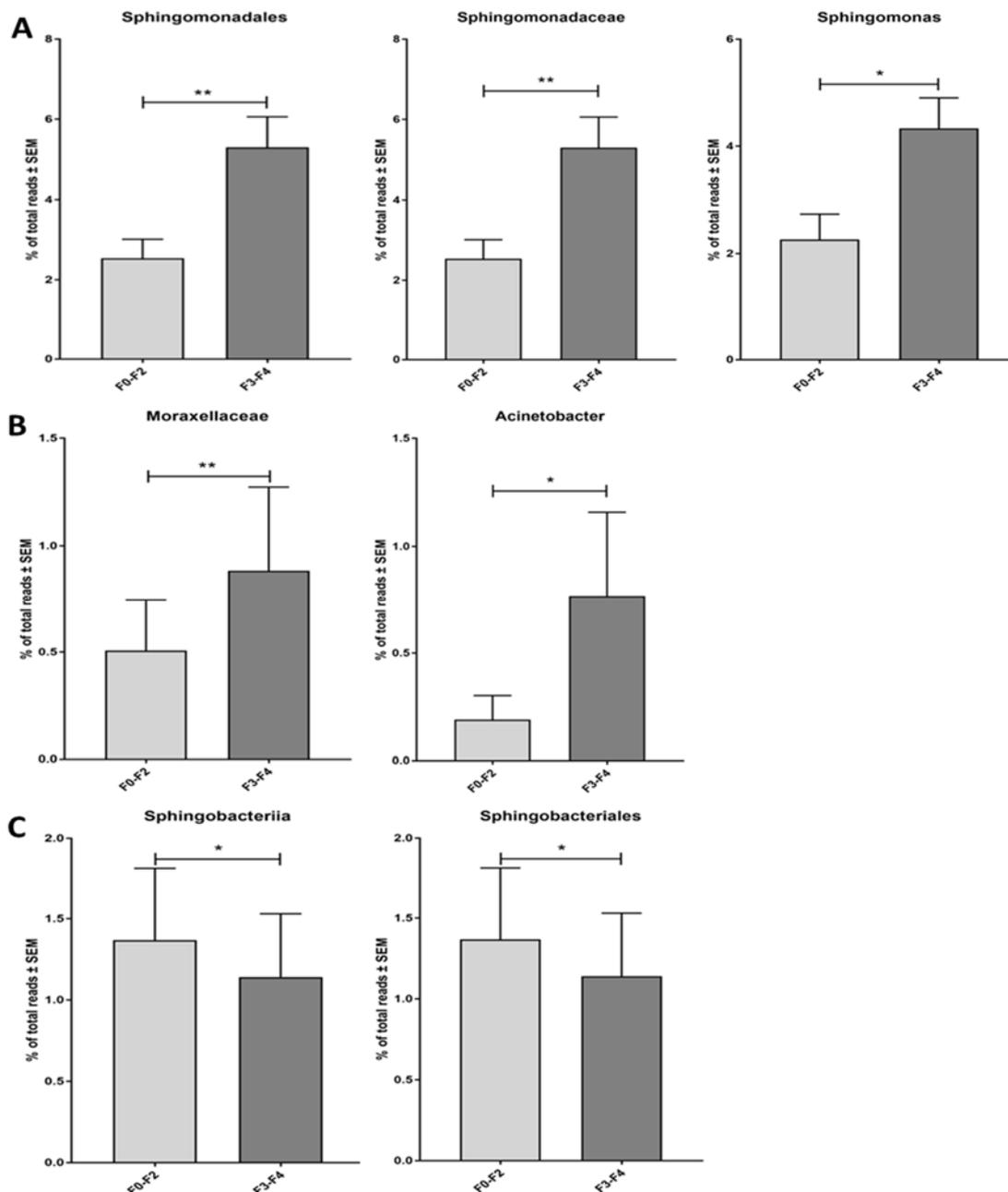
Enfin, la proportion des bactéries de la classe Sphingobacteria et de l'ordre Sphingobacteriales était significativement diminuée dans le groupe F3-F4 par rapport au groupe F0-F2 ($p = 0,0422$) (Figure 6C).

2) *Composition taxonomique du microbiote sanguin selon la présence d'une stéato-hépatite*

Il n'y avait pas de différence significative en fonction de la présence d'une stéato-hépatite après analyse du séquençage (données non représentées).

En synthèse, sur le plan qualitatif, nous avons observés des différences significatives dans la proportion de taxa bactériens en fonction de la sévérité de la fibrose, pouvant faire évoquer une signature taxonomique spécifique du MS chez des patients présentant une St. Met avec fibrose sévère. En revanche, il n'y avait pas de modification du MS en fonction de la présence d'une stéato-hépatite.

Figure 6 : Comparaison des proportions des taxa bactériens en fonction du degré de sévérité de la fibrose (F0F2 vs F3F4)



A/ Comparaison des proportions des bactéries de l'ordre Sphingomonadales, de la famille Sphingomonadaceae et du genre *Sphingomonas*

B/ Comparaison des proportions des bactéries de la famille Moraxellaceae et du genre *Acinetobacter*

C/ Comparaison des proportions des bactéries de la classe Sphingobacteria et de l'ordre Sphingobacteriales

Les résultats sont présentés en effectifs (%) ou en moyenne \pm écart-type. *correspond à la différence entre les groupes F0-F2 et F3-F4 : * $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

IV. DISCUSSION

Notre étude visait à explorer la relation entre le microbiote sanguin et la sévérité de la St. Met par quantification de l'ADNr 16S dans le sang et analyse taxonomique du microbiote sanguin. Nous avons observé une augmentation non significative de la concentration d'ADNr 16S sanguin chez les patients atteints de St. Met avec fibrose ($F \geq 1$). En revanche, la quantité d'ADNr 16S ne différait pas selon la présence d'une fibrose sévère, d'une stéato-hépatite ou de l'association des deux.

Après séquençage métagénomique de l'ADN bactérien sanguin, la répartition des principaux phyla bactériens était semblable à celle de la population générale. Cependant les analyses LEfSe ont mis en évidence une signature taxonomique spécifique dans le groupe fibrose sévère (F3-F4) à l'échelle de la classe, de l'ordre, de la famille et du genre. Il existait une augmentation significative de la proportion de Sphingomonadales, Sphingomonadaceae, *Sphingomonas*, Moraxellaceae, et *Acinetobacter*. Une diminution significative a été observée dans ce même groupe pour les Sphingobacteria et Sphingobacteriales. Cette signature était spécifique de la fibrose et non de la présence d'une stéato-hépatite.

Le MS provient en majeure partie du MI par des mécanismes de translocation bactérienne. Pourtant, les profils taxonomiques sont très différents entre le MI et le MS pour des raisons encore méconnues. A l'échelle des phyla, les Firmicutes (80%), Bacteroidetes (15%) et Actinobacteria (2%) prédominent dans le MI tandis que les Protéobacteria (> 80%) et Actinobacteria (de l'ordre de 10%) prédominent dans le MS. Il a été suggéré un rôle de filtre de la barrière intestinale et du système immunitaire [246]. De plus, le foie jouerait un rôle de « pare-feu » en éliminant les bactéries commensales qui circuleraient dans le sang [247].

Lorsque la translocation est augmentée, des quantités trop importantes de bactéries ou d'endotoxines se retrouvent dans le sang. Nous savons que la bactériémie et l'endotoxémie participent à la progression de la stéatose pure vers la stéato-hépatite et la fibrose par stimulation du système immunitaire inné, entraînant la production de cytokines pro-inflammatoires. Cependant le lien entre le degré de sévérité de la St. Met et le MS restait à établir.

Envisager le MS comme marqueur diagnostique et pronostique a comme intérêt la facilité d'obtention d'un échantillon de sang par rapport à un échantillon de foie ou de selles, ou encore le caractère objectif de l'analyse, non soumis à l'expérience de l'opérateur, ni aux limites de faisabilité comme l'obésité avec le FibroScan®.

Récemment, une étude a mis en évidence un lien entre l'endotoxémie et la sévérité de la St. Met : le taux sanguin de LBP, marqueur de l'endotoxémie, augmentait en cas de stéato-hépatite et de fibrose F2-F4 [216]. Une autre étude a montré une augmentation de la concentration d'ADNr 16S dans le sang des patients obèses morbides opérés d'une chirurgie bariatrique présentant une fibrose hépatique légère à modérée [214].

Notre étude est la première étude à analyser le MS en fonction de la sévérité de la fibrose et de la présence d'une stéato-hépatite dans une population de patients atteints de St. Met représentative de la population suivie en hépatologie. La quantité d'ADNr 16S semblait être augmentée, de façon non significative, chez les patients ayant une fibrose. Ce résultat pourrait conforter l'hypothèse d'une association entre la concentration d'ADN bactérien, reflet de la translocation bactérienne, et la présence d'une fibrose dans la St. Met. L'absence de différence pourrait être liée à un effectif trop faible dans le groupe sans fibrose (F0). A ce jour, nous ne savons pas si la bactériémie, secondaire à la translocation bactérienne, est un facteur de risque indépendant impliqué dans l'apparition de la St. Met ou bien si c'est un cofacteur dans la progression de la maladie.

La quantification de l'ADNr 16S dans le sang par qPCR est une technique disponible, facile à utiliser mais réalise une quantification relative de l'ADN bactérien ne permettant pas de comparer des populations indépendantes. En effet, il existe une variation importante du taux sanguin d'ADNr 16S inter- et intra-individuelle. Des études supplémentaires sont nécessaires à plus grande échelle avec une standardisation de la méthode de quantification de l'ADN bactérien afin de pouvoir évaluer la possibilité d'utiliser l'ADNr 16S sanguin comme biomarqueur de fibrose dans la St. Met.

L'étude de Lelouvier *et al.* avait montré que la dysbiose du MS était associée à la présence d'une fibrose modérée avec une signature taxonomique spécifique dans une cohorte de patients espagnols composée majoritairement de femme [214]. A l'échelle des phyla, la proportion d'Actinobacteria était diminuée et celle de Proteobacteria augmentée dans le groupe fibrose. Après séquençage, notre étude n'a pas retrouvé de modification significative des phyla bactériens. Cependant, nous avons mis en évidence une signature taxonomique spécifique à l'échelle de la classe, de l'ordre, de la famille et du genre. De façon intéressante, les Sphingomonadales, Sphingomonadaceae et *Sphingomonas* ont été retrouvés significativement augmentés dans le groupe fibrose sévère (F3-F4) par rapport aux patients sans fibrose sévère (F0-F2), comme dans l'étude pilote de Lelouvier *et al.* Ceci suggère une corrélation entre la sévérité de la fibrose hépatique et la richesse du MS en *Sphingomonas*.

Une cohorte de validation externe pourra être effectuée sur une population de patients atteints de St. Met suivie au CHU d'Angers.

Le séquençage métagénomique à haut débit de l'ADN bactérien sanguin, réalisé sur un faible échantillon de sang (200 µl), est efficace mais est lui aussi sujet à une grande variabilité inter- et intra-individuelle (modification des populations bactériennes après un repas, ou la prise d'antibiotique, au cours d'une infection débutante, ...etc). Dans cette étude, six patients ont dû être exclus des analyses en raison de profils de séquençage « atypiques ». De plus, cette technique est actuellement coûteuse, longue à réaliser et malgré une amélioration de la précision des rangs phylogénétiques, à ce jour le génome bactérien ne peut être déterminé dans son ensemble principalement à l'échelle des espèces (bactéries encore inconnues, difficiles à séquencer ou à différencier les unes des autres...).

L'identification de *Sphingomonas* dans deux populations très différentes est néanmoins très encourageante pour l'utilisation de cette bactérie comme biomarqueur sanguin de fibrose dans la St. Met voire comme cible d'intervention thérapeutique.

Sphingomonas est une bactérie aérobie stricte à Gram négatif. Son genre inclus plus de 20 espèces différentes. Certaines sont pathogènes pour l'Homme et sont responsables d'infections nosocomiales (ex : *Sphingomonas paucimobilis*). Cette bactérie possède des glycosylcéramides à la place des LPS sur sa membrane cellulaire, qui servent de cibles pour les lymphocytes iNKT (natural killer T invariants) en cas d'infection chez l'Homme [248]. Les lymphocytes iNKT reconnaissent la molécule présentatrice d'antigène CD1d. Le rôle de CD1d a été démontré comme essentiel dans la régulation des lymphocytes iNKT hépatiques afin de maintenir l'homéostasie immunologique et ainsi éviter une inflammation dans le foie [249]. L'interaction entre les glycosylcéramides de la membrane de *Sphingomonas* et les lymphocytes iNKT du foie via CD1d pourrait être impliquée dans la survenue de lésions hépatiques dans la St. Met.

Lorsque nous aurons réalisé le séquençage métagénomique du MI, il sera intéressant de comparer la dysbiose observée au sein du MI avec celle observée dans le sang. L'étude de Lelouvier *et al.* retrouve une composition taxonomique différente entre le sang et les selles des patients obèses morbides présentant une fibrose modérée, suggérant que le rôle de filtre de la barrière intestinale, du système immunitaire et du foie est altéré dans la St. Met.

Sur le plan thérapeutique, de nombreuses études évaluent l'impact des pro-biotiques, pré-biotiques ou antibiotiques sur le MI. Déterminer une signature taxonomique spécifique du MS

pourrait permettre d'étudier de nouvelles thérapeutiques ciblant directement dans le sang les bactéries « anormalement modifiées » afin de restaurer un équilibre au sein du MS.

V. CONCLUSION

Dans une population de patients atteints de stéatopathie métabolique, nous avons confirmé un enrichissement du microbiote sanguin en Sphingomonadales, Sphingomonadaceae et *Sphingomonas* associé à la présence d'une fibrose sévère. La réplication de ce résultat dans deux cohortes d'origine géographique distincte et dans des contextes cliniques et de sévérité de fibrose différents suggère d'explorer l'intérêt de cette signature comme biomarqueur de fibrose et le rôle causal de ce matériel bactérien dans la survenue de la fibrose.

Professeur Jean-Marie PERON
Service d'Hépatogastro-Entérologie
Fédération Digestive
CHU PURPAN - TSA 40031
31059 TOULOUSE Cedex 9



Vu permis d'imprimer
Le Doyen de la Faculté
de Médecine Toulouse - Purpan


Didier CARRIÉ

REFERENCES

1. Marchesini, G., et al., *Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome*. Hepatology, 2003. **37**(4): p. 917-23.
2. Pagano, G., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: further evidence for an etiologic association*. Hepatology, 2002. **35**(2): p. 367-72.
3. Ludwig, J., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease*. Mayo Clin Proc, 1980. **55**(7): p. 434-8.
4. Angulo, P., *Nonalcoholic fatty liver disease*. N Engl J Med, 2002. **346**(16): p. 1221-31.
5. Demir, M., S. Lang, and H.M. Steffen, *Nonalcoholic fatty liver disease: Current status and future directions*. J Dig Dis, 2015.
6. Bacon, B.R., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity*. Gastroenterology, 1994. **107**(4): p. 1103-9.
7. Brunt, E.M., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions*. Am J Gastroenterol, 1999. **94**(9): p. 2467-74.
8. Paradis, V. and P. Bedossa, *Definition and natural history of metabolic steatosis: histology and cellular aspects*. Diabetes Metab, 2008. **34**(6 Pt 2): p. 638-42.
9. Cohen, J.C., J.D. Horton, and H.H. Hobbs, *Human fatty liver disease: old questions and new insights*. Science, 2011. **332**(6037): p. 1519-23.
10. Tilg, H. and A.R. Moschen, *Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis*. Hepatology, 2010. **52**(5): p. 1836-46.
11. Postic, C. and J. Girard, *Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice*. J Clin Invest, 2008. **118**(3): p. 829-38.
12. Postic, C. and J. Girard, *The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis*. Diabetes Metab, 2008. **34**(6 Pt 2): p. 643-8.
13. Eguchi, Y., et al., *Visceral fat accumulation and insulin resistance are important factors in nonalcoholic fatty liver disease*. J Gastroenterol, 2006. **41**(5): p. 462-9.
14. Day, C.P., *Pathogenesis of steatohepatitis*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2002. **16**(5): p. 663-78.
15. Chitturi, S., et al., *NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome*. Hepatology, 2002. **35**(2): p. 373-9.
16. Neuschwander-Tetri, B.A., *Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites*. Hepatology, 2010. **52**(2): p. 774-88.
17. Zhu, L., R.D. Baker, and S.S. Baker, *Gut microbiome and nonalcoholic fatty liver diseases*. Pediatr Res, 2015. **77**(1-2): p. 245-51.
18. Mehal, W.Z., *The Gordian Knot of dysbiosis, obesity and NAFLD*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2013. **10**(11): p. 637-44.
19. Younossi, Z.M., et al., *Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes*. Hepatology, 2016. **64**(1): p. 73-84.
20. Younossi, Z.M., et al., *Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver diseases in the United States from 1988 to 2008*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2011. **9**(6): p. 524-530 e1; quiz e60.
21. Chalasani, N., et al., *The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association*,

- American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. Gastroenterology, 2012. 142(7): p. 1592-609.*
22. Leite, N.C., et al., *Prevalence and associated factors of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type-2 diabetes mellitus.* Liver Int, 2009. **29**(1): p. 113-9.
 23. Mohanty, S.R., et al., *Influence of ethnicity on histological differences in non-alcoholic fatty liver disease.* J Hepatol, 2009. **50**(4): p. 797-804.
 24. Browning, J.D., et al., *Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity.* Hepatology, 2004. **40**(6): p. 1387-95.
 25. Williams, C.D., et al., *Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study.* Gastroenterology, 2011. **140**(1): p. 124-31.
 26. Schneider, A.L., et al., *Racial differences in nonalcoholic fatty liver disease in the U.S. population.* Obesity (Silver Spring), 2014. **22**(1): p. 292-9.
 27. Vernon, G., A. Baranova, and Z.M. Younossi, *Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults.* Aliment Pharmacol Ther, 2011. **34**(3): p. 274-85.
 28. Argo, C.K. and S.H. Caldwell, *Epidemiology and natural history of non-alcoholic steatohepatitis.* Clin Liver Dis, 2009. **13**(4): p. 511-31.
 29. Poynard, T., et al., *Prevalence of liver fibrosis and risk factors in a general population using non-invasive biomarkers (FibroTest).* BMC Gastroenterol, 2010. **10**: p. 40.
 30. Marrero, J.A., et al., *NAFLD may be a common underlying liver disease in patients with hepatocellular carcinoma in the United States.* Hepatology, 2002. **36**(6): p. 1349-54.
 31. Charlton, M.R., et al., *Frequency and outcomes of liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis in the United States.* Gastroenterology, 2011. **141**(4): p. 1249-53.
 32. Whalley, S., et al., *Hepatology outpatient service provision in secondary care: a study of liver disease incidence and resource costs.* Clin Med, 2007. **7**(2): p. 119-24.
 33. Hamaguchi, M., et al., *The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease.* Ann Intern Med, 2005. **143**(10): p. 722-8.
 34. Ascha, M.S., et al., *The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis.* Hepatology, 2010. **51**(6): p. 1972-8.
 35. Bedogni, G., et al., *Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study.* Hepatology, 2005. **42**(1): p. 44-52.
 36. Boza, C., et al., *Predictors of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) in obese patients undergoing gastric bypass.* Obes Surg, 2005. **15**(8): p. 1148-53.
 37. Assy, N., et al., *Fatty infiltration of liver in hyperlipidemic patients.* Dig Dis Sci, 2000. **45**(10): p. 1929-34.
 38. Prashanth, M., et al., *Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus.* J Assoc Physicians India, 2009. **57**: p. 205-10.
 39. Gaharwar, R., et al., *Study of Clinical Profile of Patients of Non Alcoholic Fatty Liver Disease and its Association with Metabolic Syndrome.* J Assoc Physicians India, 2015. **63**(1): p. 12-6.
 40. Souza, M.R., et al., *Metabolic syndrome and risk factors for non-alcoholic fatty liver disease.* Arq Gastroenterol, 2012. **49**(1): p. 89-96.
 41. Kim, D. and W.R. Kim, *Nonobese Fatty Liver Disease.* Clin Gastroenterol Hepatol, 2017. **15**(4): p. 474-485.
 42. Feldman, A., et al., *Clinical and Metabolic Characterization of Lean Caucasian Subjects With Non-alcoholic Fatty Liver.* Am J Gastroenterol, 2017. **112**(1): p. 102-110.

43. Chen, Z.W., et al., *Relationship between alanine aminotransferase levels and metabolic syndrome in nonalcoholic fatty liver disease*. J Zhejiang Univ Sci B, 2008. **9**(8): p. 616-22.
44. Gutierrez-Grobe, Y., et al., *Prevalence of non alcoholic fatty liver disease in premenopausal, postmenopausal and polycystic ovary syndrome women. The role of estrogens*. Ann Hepatol, 2010. **9**(4): p. 402-9.
45. Yang, J.D., et al., *Gender and menopause impact severity of fibrosis among patients with nonalcoholic steatohepatitis*. Hepatology, 2014.
46. Frith, J., et al., *Non-alcoholic fatty liver disease in older people*. Gerontology, 2009. **55**(6): p. 607-13.
47. Suzuki, A. and M.F. Abdelmalek, *Nonalcoholic fatty liver disease in women*. Womens Health (Lond), 2009. **5**(2): p. 191-203.
48. Weston, S.R., et al., *Racial and ethnic distribution of nonalcoholic fatty liver in persons with newly diagnosed chronic liver disease*. Hepatology, 2005. **41**(2): p. 372-9.
49. Volzke, H., et al., *Menopausal status and hepatic steatosis in a general female population*. Gut, 2007. **56**(4): p. 594-5.
50. Yoneda, M., et al., *The Influence of Menopause on the Development of Hepatic Fibrosis in Non-obese Women with Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. Hepatology, 2014.
51. Romeo, S., et al., *Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease*. Nat Genet, 2008. **40**(12): p. 1461-5.
52. Sookoian, S. and C.J. Pirola, *Meta-analysis of the influence of I148M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2011. **53**(6): p. 1883-94.
53. Tan, H.L., et al., *Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase gene rs7946 polymorphism plays a role in risk of nonalcoholic fatty liver disease: evidence from meta-analysis*. Pharmacogenet Genomics, 2015.
54. Li, H.J., et al., *Association of Adiponectin gene polymorphisms and nonalcoholic fatty liver disease*. Int J Clin Exp Med, 2015. **8**(9): p. 16676-16681.
55. Liu, Y.L., et al., *TM6SF2 rs58542926 influences hepatic fibrosis progression in patients with non-alcoholic fatty liver disease*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 4309.
56. Vuppalanchi, R., et al., *Effects of liver biopsy sample length and number of readings on sampling variability in nonalcoholic Fatty liver disease*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2009. **7**(4): p. 481-6.
57. Byrne, C.D. and G. Targher, *NAFLD: a multisystem disease*. J Hepatol, 2015. **62**(1 Suppl): p. S47-64.
58. Dam-Larsen, S., et al., *Final results of a long-term, clinical follow-up in fatty liver patients*. Scand J Gastroenterol, 2009. **44**(10): p. 1236-43.
59. Pais, R., et al., *A systematic review of follow-up biopsies reveals disease progression in patients with non-alcoholic fatty liver*. J Hepatol, 2013. **59**(3): p. 550-6.
60. Adams, L.A. and V. Ratziu, *Non-alcoholic fatty liver - perhaps not so benign*. J Hepatol, 2015. **62**(5): p. 1002-4.
61. Kim, D., et al., *Association between noninvasive fibrosis markers and mortality among adults with nonalcoholic fatty liver disease in the United States*. Hepatology, 2013. **57**(4): p. 1357-65.
62. Singh, S., et al., *Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver vs nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2015. **13**(4): p. 643-54 e1-9; quiz e39-40.

63. McPherson, S., et al., *Evidence of NAFLD progression from steatosis to fibrosing-steatohepatitis using paired biopsies: implications for prognosis and clinical management.* J Hepatol, 2015. **62**(5): p. 1148-55.
64. Argo, C.K., et al., *Systematic review of risk factors for fibrosis progression in non-alcoholic steatohepatitis.* J Hepatol, 2009. **51**(2): p. 371-9.
65. Pais, R., et al., *A systematic review of follow-up biopsies reveals disease progression in patients with non-alcoholic fatty liver.* J Hepatol, 2013. **59**(3): p. 550-6.
66. Loomba, R., et al., *Association between diabetes, family history of diabetes, and risk of nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis.* Hepatology, 2012. **56**(3): p. 943-51.
67. Yatsuji, S., et al., *Influence of age and gender in Japanese patients with non-alcoholic steatohepatitis.* Hepatol Res, 2007. **37**(12): p. 1034-43.
68. Nouredin, M., et al., *Clinical and histological determinants of nonalcoholic steatohepatitis and advanced fibrosis in elderly patients.* Hepatology, 2013. **58**(5): p. 1644-54.
69. Leung, J.C., et al., *Histological severity and clinical outcomes of nonalcoholic fatty liver disease in nonobese patients.* Hepatology, 2017. **65**(1): p. 54-64.
70. de Ledinghen, V., et al., *Diagnostic and predictive factors of significant liver fibrosis and minimal lesions in patients with persistent unexplained elevated transaminases. A prospective multicenter study.* J Hepatol, 2006. **45**(4): p. 592-9.
71. Zein, C.O., et al., *Smoking and severity of hepatic fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease.* J Hepatol, 2011. **54**(4): p. 753-9.
72. Dunn, W., et al., *Modest alcohol consumption is associated with decreased prevalence of steatohepatitis in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD).* J Hepatol, 2012. **57**(2): p. 384-91.
73. Kwon, H.K., J.K. Greenson, and H.S. Conjeevaram, *Effect of lifetime alcohol consumption on the histological severity of non-alcoholic fatty liver disease.* Liver Int, 2014. **34**(1): p. 129-35.
74. Sookoian, S., G.O. Castano, and C.J. Pirola, *Modest alcohol consumption decreases the risk of non-alcoholic fatty liver disease: a meta-analysis of 43 175 individuals.* Gut, 2014. **63**(3): p. 530-2.
75. Hagstrom, H., et al., *Low to moderate lifetime alcohol consumption is associated with less advanced stages of fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease.* Scand J Gastroenterol, 2017. **52**(2): p. 159-165.
76. Miyake, T., et al., *Low alcohol consumption increases the risk of impaired glucose tolerance in patients with non-alcoholic fatty liver disease.* J Gastroenterol, 2016. **51**(11): p. 1090-1100.
77. Chen, S., et al., *Coffee and non-alcoholic fatty liver disease: brewing evidence for hepatoprotection?* J Gastroenterol Hepatol, 2014. **29**(3): p. 435-41.
78. Kowdley, K.V., et al., *Serum ferritin is an independent predictor of histologic severity and advanced fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease.* Hepatology, 2012. **55**(1): p. 77-85.
79. Afzali, A., et al., *Association between serum uric acid level and chronic liver disease in the United States.* Hepatology, 2010. **52**(2): p. 578-89.
80. Adams, L.A., et al., *The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study.* Gastroenterology, 2005. **129**(1): p. 113-21.
81. Dulai, P.S., et al., *Increased risk of mortality by fibrosis stage in non-alcoholic fatty liver disease: Systematic Review and Meta-analysis.* Hepatology, 2017.
82. Angulo, P., et al., *Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease.* Gastroenterology, 2015. **149**(2): p. 389-97 e10.

83. Ratziu, V., et al., *Survival, liver failure, and hepatocellular carcinoma in obesity-related cryptogenic cirrhosis*. Hepatology, 2002. **35**(6): p. 1485-93.
84. Ekstedt, M., et al., *Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up*. Hepatology, 2015. **61**(5): p. 1547-54.
85. Mittal, S., et al., *Hepatocellular Carcinoma in the Absence of Cirrhosis in US Veterans is Associated with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2015.
86. Starley, B.Q., C.J. Calcagno, and S.A. Harrison, *Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection*. Hepatology, 2010. **51**(5): p. 1820-32.
87. Calle, E.E., et al., *Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults*. N Engl J Med, 2003. **348**(17): p. 1625-38.
88. Wang, C., et al., *Increased risk of hepatocellular carcinoma in patients with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of cohort studies*. Int J Cancer, 2012. **130**(7): p. 1639-48.
89. Regimbeau, J.M., et al., *Obesity and diabetes as a risk factor for hepatocellular carcinoma*. Liver Transpl, 2004. **10**(2 Suppl 1): p. S69-73.
90. Younossi, Z.M., et al., *Association of Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) with Hepatocellular Carcinoma (HCC) in the United States from 2004-2009*. Hepatology, 2015.
91. Hashimoto, E., et al., *Hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis*. J Gastroenterol, 2009. **44 Suppl 19**: p. 89-95.
92. Bugianesi, E., et al., *Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma*. Gastroenterology, 2002. **123**(1): p. 134-40.
93. European Association for the Study of the Liver . Electronic address, e.e.e., D. European Association for the Study of, and O. European Association for the Study of, *EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease*. J Hepatol, 2016. **64**(6): p. 1388-402.
94. Wong, R.J., R. Cheung, and A. Ahmed, *Nonalcoholic steatohepatitis is the most rapidly growing indication for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma in the U.S*. Hepatology, 2014. **59**(6): p. 2188-95.
95. Wong, R.J., et al., *Nonalcoholic Steatohepatitis Is the Second Leading Etiology of Liver Disease Among Adults Awaiting Liver Transplantation in the United States*. Gastroenterology, 2015.
96. Welzel, T.M., et al., *Metabolic syndrome increases the risk of primary liver cancer in the United States: a study in the SEER-Medicare database*. Hepatology, 2011. **54**(2): p. 463-71.
97. Borena, W., et al., *Metabolic risk factors and primary liver cancer in a prospective study of 578,700 adults*. Int J Cancer, 2012. **131**(1): p. 193-200.
98. Cholankeril, G., et al., *Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic steatohepatitis: Current knowledge and implications for management*. World J Hepatol, 2017. **9**(11): p. 533-543.
99. Ryysy, L., et al., *Hepatic fat content and insulin action on free fatty acids and glucose metabolism rather than insulin absorption are associated with insulin requirements during insulin therapy in type 2 diabetic patients*. Diabetes, 2000. **49**(5): p. 749-58.
100. Goessling, W., et al., *Aminotransferase levels and 20-year risk of metabolic syndrome, diabetes, and cardiovascular disease*. Gastroenterology, 2008. **135**(6): p. 1935-44, 1944 e1.

101. McGarry, J.D., *Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes*. Diabetes, 2002. **51**(1): p. 7-18.
102. Ballestri, S., et al., *Nonalcoholic fatty liver disease is associated with an almost twofold increased risk of incident type 2 diabetes and metabolic syndrome. Evidence from a systematic review and meta-analysis*. J Gastroenterol Hepatol, 2016. **31**(5): p. 936-44.
103. Adams, L.A., et al., *NAFLD as a risk factor for the development of diabetes and the metabolic syndrome: an eleven-year follow-up study*. Am J Gastroenterol, 2009. **104**(4): p. 861-7.
104. Gastaldelli, A., et al., *Fatty liver is associated with insulin resistance, risk of coronary heart disease, and early atherosclerosis in a large European population*. Hepatology, 2009. **49**(5): p. 1537-44.
105. Villanova, N., et al., *Endothelial dysfunction and cardiovascular risk profile in nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2005. **42**(2): p. 473-80.
106. Petta, S., et al., *Epicardial Fat, Cardiac Geometry and Cardiac Function in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Association with the Severity of Liver Disease*. J Hepatol, 2014.
107. Pan, S., et al., *The relationship of nonalcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome for colonoscopy colorectal neoplasm*. Medicine (Baltimore), 2017. **96**(2): p. e5809.
108. Wong, V.W., et al., *High prevalence of colorectal neoplasm in patients with non-alcoholic steatohepatitis*. Gut, 2011. **60**(6): p. 829-36.
109. Sorensen, H.T., et al., *Risk of cancer in patients hospitalized with fatty liver: a Danish cohort study*. J Clin Gastroenterol, 2003. **36**(4): p. 356-9.
110. Uzel, M., Z. Sahiner, and L. Filik, *Non-alcoholic fatty liver disease, metabolic syndrome and gastric cancer: Single center experience*. J BUON, 2015. **20**(2): p. 662.
111. Sanna, C., et al., *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Extra-Hepatic Cancers*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(5).
112. Armstrong, M.J., et al., *Extrahepatic complications of nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2014. **59**(3): p. 1174-97.
113. Chalasani, N., et al., *The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association*. Hepatology, 2012. **55**(6): p. 2005-23.
114. Hashimoto, E., K. Tokushige, and J. Ludwig, *Diagnosis and classification of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis: Current concepts and remaining challenges*. Hepatol Res, 2015. **45**(1): p. 20-8.
115. Straub, B.K. and P. Schirmacher, *Pathology and biopsy assessment of non-alcoholic fatty liver disease*. Dig Dis, 2010. **28**(1): p. 197-202.
116. Kleiner, D.E., et al., *Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2005. **41**(6): p. 1313-21.
117. Bedossa, P., et al., *Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients*. Hepatology, 2012. **56**(5): p. 1751-9.
118. Bedossa, P. and F.P. Consortium, *Utility and appropriateness of the fatty liver inhibition of progression (FLIP) algorithm and steatosis, activity, and fibrosis (SAF) score in the evaluation of biopsies of nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2014. **60**(2): p. 565-75.
119. Dulai, P.S., C.B. Sirlin, and R. Loomba, *MRI and MRE for non-invasive quantitative assessment of hepatic steatosis and fibrosis in NAFLD and NASH: Clinical trials to clinical practice*. J Hepatol, 2016. **65**(5): p. 1006-1016.

120. Idilman, I.S., et al., *A comparison of liver fat content as determined by magnetic resonance imaging-proton density fat fraction and MRS versus liver histology in non-alcoholic fatty liver disease*. *Acta Radiol*, 2016. **57**(3): p. 271-8.
121. Saadeh, S., et al., *The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease*. *Gastroenterology*, 2002. **123**(3): p. 745-50.
122. Ryan, C.K., et al., *One hundred consecutive hepatic biopsies in the workup of living donors for right lobe liver transplantation*. *Liver Transpl*, 2002. **8**(12): p. 1114-22.
123. Sanyal, A.J. and A. American Gastroenterological, *AGA technical review on nonalcoholic fatty liver disease*. *Gastroenterology*, 2002. **123**(5): p. 1705-25.
124. Karlas, T., et al., *Non-invasive assessment of hepatic steatosis in patients with NAFLD using controlled attenuation parameter and 1H-MR spectroscopy*. *PLoS One*, 2014. **9**(3): p. e91987.
125. de Ledinghen, V., et al., *Non-invasive diagnosis of liver steatosis using controlled attenuation parameter (CAP) and transient elastography*. *Liver Int*, 2012. **32**(6): p. 911-8.
126. Sasso, M., et al., *Controlled attenuation parameter (CAP): a novel VCTE guided ultrasonic attenuation measurement for the evaluation of hepatic steatosis: preliminary study and validation in a cohort of patients with chronic liver disease from various causes*. *Ultrasound Med Biol*, 2010. **36**(11): p. 1825-35.
127. Myers, R.P., et al., *Controlled Attenuation Parameter (CAP): a noninvasive method for the detection of hepatic steatosis based on transient elastography*. *Liver Int*, 2012. **32**(6): p. 902-10.
128. Masaki, K., et al., *Utility of controlled attenuation parameter measurement for assessing liver steatosis in Japanese patients with chronic liver diseases*. *Hepatol Res*, 2013. **43**(11): p. 1182-9.
129. Chan, W.K., N.R. Nik Mustapha, and S. Mahadeva, *Controlled attenuation parameter for the detection and quantification of hepatic steatosis in nonalcoholic fatty liver disease*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2014. **29**(7): p. 1470-6.
130. Chon, Y.E., et al., *Controlled attenuation parameter (CAP) for detection of hepatic steatosis in patients with chronic liver diseases: a prospective study of a native Korean population*. *Liver Int*, 2014. **34**(1): p. 102-9.
131. Sasso, M., et al., *Liver Steatosis Assessed by Controlled Attenuation Parameter (CAP) Measured with the XL Probe of the FibroScan: A Pilot Study Assessing Diagnostic Accuracy*. *Ultrasound Med Biol*, 2016. **42**(1): p. 92-103.
132. Park, C.C., et al., *Magnetic Resonance Elastography vs Transient Elastography in Detection of Fibrosis and Noninvasive Measurement of Steatosis in Patients With Biopsy-Proven Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. *Gastroenterology*, 2017. **152**(3): p. 598-607 e2.
133. Fedchuk, L., et al., *Performance and limitations of steatosis biomarkers in patients with nonalcoholic fatty liver disease*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2014. **40**(10): p. 1209-22.
134. Papagianni, M., A. Sofogianni, and K. Tziomalos, *Non-invasive methods for the diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease*. *World J Hepatol*, 2015. **7**(4): p. 638-48.
135. Poynard, T., et al., *Diagnostic value of biochemical markers (NashTest) for the prediction of non alcoholo steato hepatitis in patients with non-alcoholic fatty liver disease*. *BMC Gastroenterol*, 2006. **6**: p. 34.
136. Tamimi, T.I., et al., *An apoptosis panel for nonalcoholic steatohepatitis diagnosis*. *J Hepatol*, 2011. **54**(6): p. 1224-9.
137. Lemoine, M., et al., *Serum adipokine levels predictive of liver injury in non-alcoholic fatty liver disease*. *Liver Int*, 2009. **29**(9): p. 1431-8.

138. McPherson, S., et al., *Simple non-invasive fibrosis scoring systems can reliably exclude advanced fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease*. Gut, 2010. **59**(9): p. 1265-9.
139. Angulo, P., et al., *Simple noninvasive systems predict long-term outcomes of patients with nonalcoholic fatty liver disease*. Gastroenterology, 2013. **145**(4): p. 782-9 e4.
140. Angulo, P., et al., *The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD*. Hepatology, 2007. **45**(4): p. 846-54.
141. Adams, L.A., et al., *Complex non-invasive fibrosis models are more accurate than simple models in non-alcoholic fatty liver disease*. J Gastroenterol Hepatol, 2011. **26**(10): p. 1536-43.
142. Harrison, S.A., et al., *Development and validation of a simple NAFLD clinical scoring system for identifying patients without advanced disease*. Gut, 2008. **57**(10): p. 1441-7.
143. Guha, I.N., et al., *Noninvasive markers of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: Validating the European Liver Fibrosis Panel and exploring simple markers*. Hepatology, 2008. **47**(2): p. 455-60.
144. Shah, A.G., et al., *Comparison of noninvasive markers of fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2009. **7**(10): p. 1104-12.
145. Wai, C.T., et al., *A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C*. Hepatology, 2003. **38**(2): p. 518-26.
146. Ratziu, V., et al., *Diagnostic value of biochemical markers (FibroTest-FibroSURE) for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease*. BMC Gastroenterol, 2006. **6**: p. 6.
147. Cales, P., et al., *Comparison of blood tests for liver fibrosis specific or not to NAFLD*. J Hepatol, 2009. **50**(1): p. 165-73.
148. Cales, P., et al., *A novel panel of blood markers to assess the degree of liver fibrosis*. Hepatology, 2005. **42**(6): p. 1373-81.
149. Eslam, M., et al., *FibroGENE: A gene-based model for staging liver fibrosis*. J Hepatol, 2015.
150. Lupsor, M., et al., *Performance of unidimensional transient elastography in staging non-alcoholic steatohepatitis*. J Gastrointestin Liver Dis, 2010. **19**(1): p. 53-60.
151. Musso, G., et al., *Meta-analysis: natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity*. Ann Med, 2011. **43**(8): p. 617-49.
152. Wong, V.W., et al., *Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2010. **51**(2): p. 454-62.
153. Wong, V.W., et al., *Liver stiffness measurement using XL probe in patients with nonalcoholic fatty liver disease*. Am J Gastroenterol, 2012. **107**(12): p. 1862-71.
154. Petta, S., et al., *Improved noninvasive prediction of liver fibrosis by liver stiffness measurement in patients with nonalcoholic fatty liver disease accounting for controlled attenuation parameter values*. Hepatology, 2017. **65**(4): p. 1145-1155.
155. Nierhoff, J., et al., *The efficiency of acoustic radiation force impulse imaging for the staging of liver fibrosis: a meta-analysis*. Eur Radiol, 2013. **23**(11): p. 3040-53.
156. Bota, S., et al., *Meta-analysis: ARFI elastography versus transient elastography for the evaluation of liver fibrosis*. Liver Int, 2013. **33**(8): p. 1138-47.
157. Feng, J.C., et al., *Diagnostic Accuracy of SuperSonic Shear Imaging for Staging of Liver Fibrosis: A Meta-analysis*. J Ultrasound Med, 2016. **35**(2): p. 329-39.
158. Cassinotto, C., et al., *Liver stiffness in nonalcoholic fatty liver disease: A comparison of Supersonic Shear Imaging, FibroScan and ARFI with liver biopsy*. Hepatology, 2015.

159. Poynard, T., et al., *Real-Time Shear Wave versus Transient Elastography for Predicting Fibrosis: Applicability, and Impact of Inflammation and Steatosis. A Non-Invasive Comparison.* PLoS One, 2016. **11**(10): p. e0163276.
160. Cui, J., et al., *Magnetic resonance elastography is superior to acoustic radiation force impulse for the Diagnosis of fibrosis in patients with biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease: A prospective study.* Hepatology, 2016. **63**(2): p. 453-61.
161. Boursier, J., et al., *Diagnostic accuracy and prognostic significance of blood fibrosis tests and liver stiffness measurement by FibroScan in non-alcoholic fatty liver disease.* J Hepatol, 2016. **65**(3): p. 570-8.
162. Boursier, J., et al., *A stepwise algorithm using an at-a-glance first-line test for the non-invasive diagnosis of advanced liver fibrosis and cirrhosis.* J Hepatol, 2017. **66**(6): p. 1158-1165.
163. European Association for Study of, L. and H. Asociacion Latinoamericana para el Estudio del, *EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis.* J Hepatol, 2015. **63**(1): p. 237-64.
164. Grundy, S.M., et al., *Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement.* Curr Opin Cardiol, 2006. **21**(1): p. 1-6.
165. Ekstedt, M., et al., *Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes.* Hepatology, 2006. **44**(4): p. 865-73.
166. Fassio, E., et al., *Natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a longitudinal study of repeat liver biopsies.* Hepatology, 2004. **40**(4): p. 820-6.
167. Angulo, P., et al., *Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis.* Hepatology, 1999. **30**(6): p. 1356-62.
168. Neuschwander-Tetri, B.A., et al., *Clinical, laboratory and histological associations in adults with nonalcoholic fatty liver disease.* Hepatology, 2010. **52**(3): p. 913-24.
169. Zoetendal, E.G., A.D. Akkermans, and W.M. De Vos, *Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria.* Appl Environ Microbiol, 1998. **64**(10): p. 3854-9.
170. Cheng, J., et al., *Contribution of the intestinal microbiota to human health: from birth to 100 years of age.* Curr Top Microbiol Immunol, 2013. **358**: p. 323-46.
171. Sekirov, I., et al., *Gut microbiota in health and disease.* Physiol Rev, 2010. **90**(3): p. 859-904.
172. Seki, E. and D.A. Brenner, *Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update.* Hepatology, 2008. **48**(1): p. 322-35.
173. Paise, S., et al., *Comprehensive description of blood microbiome from healthy donors assessed by 16S targeted metagenomic sequencing.* Transfusion, 2016. **56**(5): p. 1138-47.
174. Turnbaugh, P.J., et al., *The human microbiome project.* Nature, 2007. **449**(7164): p. 804-10.
175. Turnbaugh, P.J., et al., *An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest.* Nature, 2006. **444**(7122): p. 1027-31.
176. Tilg, H., A.R. Moschen, and A. Kaser, *Obesity and the microbiota.* Gastroenterology, 2009. **136**(5): p. 1476-83.
177. Duseja, A. and Y.K. Chawla, *Obesity and NAFLD: the role of bacteria and microbiota.* Clin Liver Dis, 2014. **18**(1): p. 59-71.
178. Ley, R.E., et al., *Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity.* Nature, 2006. **444**(7122): p. 1022-3.

179. Schwartz, A., et al., *Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects*. Obesity (Silver Spring), 2010. **18**(1): p. 190-5.
180. Cani, P.D., et al., *Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance*. Diabetes, 2007. **56**(7): p. 1761-72.
181. Halmos, T. and I. Suba, [*Physiological patterns of intestinal microbiota. The role of dysbacteriosis in obesity, insulin resistance, diabetes and metabolic syndrome*]. Orv Hetil, 2016. **157**(1): p. 13-22.
182. Amar, J., et al., *Blood microbiota dysbiosis is associated with the onset of cardiovascular events in a large general population: the D.E.S.I.R. study*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e54461.
183. Larsen, N., et al., *Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults*. PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9085.
184. Wu, X., et al., *Molecular characterisation of the faecal microbiota in patients with type II diabetes*. Curr Microbiol, 2010. **61**(1): p. 69-78.
185. Amar, J., et al., *Involvement of tissue bacteria in the onset of diabetes in humans: evidence for a concept*. Diabetologia, 2011. **54**(12): p. 3055-61.
186. Pussinen, P.J., et al., *Endotoxemia is associated with an increased risk of incident diabetes*. Diabetes Care, 2011. **34**(2): p. 392-7.
187. Rao, R.K., A. Seth, and P. Sheth, *Recent Advances in Alcoholic Liver Disease I. Role of intestinal permeability and endotoxemia in alcoholic liver disease*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. **286**(6): p. G881-4.
188. Keshavarzian, A., et al., *Evidence that chronic alcohol exposure promotes intestinal oxidative stress, intestinal hyperpermeability and endotoxemia prior to development of alcoholic steatohepatitis in rats*. J Hepatol, 2009. **50**(3): p. 538-47.
189. Keshavarzian, A., et al., *Leaky gut in alcoholic cirrhosis: a possible mechanism for alcohol-induced liver damage*. Am J Gastroenterol, 1999. **94**(1): p. 200-7.
190. Thakur, V., et al., *Regulation of macrophage activation in alcoholic liver disease*. J Gastroenterol Hepatol, 2007. **22 Suppl 1**: p. S53-6.
191. Yan, A.W., et al., *Enteric dysbiosis associated with a mouse model of alcoholic liver disease*. Hepatology, 2011. **53**(1): p. 96-105.
192. Miele, L., et al., *Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2009. **49**(6): p. 1877-87.
193. Miura, K., et al., *Toll-like receptor 9 promotes steatohepatitis by induction of interleukin-1beta in mice*. Gastroenterology, 2010. **139**(1): p. 323-34 e7.
194. Thuy, S., et al., *Nonalcoholic fatty liver disease in humans is associated with increased plasma endotoxin and plasminogen activator inhibitor 1 concentrations and with fructose intake*. J Nutr, 2008. **138**(8): p. 1452-5.
195. Harte, A.L., et al., *Elevated endotoxin levels in non-alcoholic fatty liver disease*. J Inflamm (Lond), 2010. **7**: p. 15.
196. Tremaroli, V. and F. Backhed, *Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism*. Nature, 2012. **489**(7415): p. 242-9.
197. Volynets, V., et al., *Nutrition, intestinal permeability, and blood ethanol levels are altered in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)*. Dig Dis Sci, 2012. **57**(7): p. 1932-41.
198. Schnabl, B. and D.A. Brenner, *Interactions between the intestinal microbiome and liver diseases*. Gastroenterology, 2014. **146**(6): p. 1513-24.
199. Spencer, M.D., et al., *Association between composition of the human gastrointestinal microbiome and development of fatty liver with choline deficiency*. Gastroenterology, 2011. **140**(3): p. 976-86.

200. He, X., et al., *Gut Microbiota and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Insights on Mechanism and Application of Metabolomics*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(3): p. 300.
201. Mouzaki, M., et al., *Bile Acids and Dysbiosis in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*. PLoS One, 2016. **11**(5): p. e0151829.
202. Ferslew, B.C., et al., *Altered Bile Acid Metabolome in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis*. Dig Dis Sci, 2015. **60**(11): p. 3318-28.
203. Wong, V.W., et al., *Bacterial endotoxin and non-alcoholic fatty liver disease in the general population: a prospective cohort study*. Aliment Pharmacol Ther, 2015. **42**(6): p. 731-40.
204. Henao-Mejia, J., et al., *Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity*. Nature, 2012. **482**(7384): p. 179-85.
205. Federico, A., et al., *Targeting gut-liver axis for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis: translational and clinical evidence*. Transl Res, 2016. **167**(1): p. 116-24.
206. Xiao, J. and G.L. Tipoe, *Inflammasomes in non-alcoholic fatty liver disease*. Front Biosci (Landmark Ed), 2016. **21**: p. 683-95.
207. Mehal, W.Z., *The inflammasome in liver injury and non-alcoholic fatty liver disease*. Dig Dis, 2014. **32**(5): p. 507-15.
208. Munukka, E., et al., *Gut-adipose tissue axis in hepatic fat accumulation in humans*. J Hepatol, 2014. **61**(1): p. 132-8.
209. Raman, M., et al., *Fecal microbiome and volatile organic compound metabolome in obese humans with nonalcoholic fatty liver disease*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2013. **11**(7): p. 868-75 e1-3.
210. Mouzaki, M., et al., *Intestinal microbiota in patients with nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2013. **58**(1): p. 120-7.
211. Wong, V.W., et al., *Molecular characterization of the fecal microbiota in patients with nonalcoholic steatohepatitis--a longitudinal study*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e62885.
212. Boursier, J., et al., *The severity of NAFLD is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota*. Hepatology, 2015.
213. Zhu, L., et al., *Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH*. Hepatology, 2013. **57**(2): p. 601-9.
214. Lelouvier, B., et al., *Changes in blood microbiota profiles associated with liver fibrosis in obese patients: A pilot analysis*. Hepatology, 2016.
215. Loomba, R., et al., *Gut Microbiome-Based Metagenomic Signature for Non-invasive Detection of Advanced Fibrosis in Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. Cell Metab, 2017. **25**(5): p. 1054-1062 e5.
216. Pang, J., et al., *Significant positive association of endotoxemia with histological severity in 237 patients with non-alcoholic fatty liver disease*. Aliment Pharmacol Ther, 2017.
217. Palmer, C., et al., *Development of the human infant intestinal microbiota*. PLoS Biol, 2007. **5**(7): p. e177.
218. Clermont, O., et al., *The Clermont Escherichia coli phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups*. Environ Microbiol Rep, 2013. **5**(1): p. 58-65.
219. Tenaille, O., et al., *The population genetics of commensal Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol, 2010. **8**(3): p. 207-17.
220. Massot, M., et al., *Phylogenetic, virulence and antibiotic resistance characteristics of commensal strain populations of Escherichia coli from community subjects in the*

- Paris area in 2010 and evolution over 30 years.* Microbiology, 2016. **162**(4): p. 642-50.
221. Bach, J.F., *The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases.* N Engl J Med, 2002. **347**(12): p. 911-20.
222. Nougayrede, J.P., et al., *Escherichia coli induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells.* Science, 2006. **313**(5788): p. 848-51.
223. Martin, P., et al., *Interplay between siderophores and colibactin genotoxin biosynthetic pathways in Escherichia coli.* PLoS Pathog, 2013. **9**(7): p. e1003437.
224. Darfeuille-Michaud, A., et al., *High prevalence of adherent-invasive Escherichia coli associated with ileal mucosa in Crohn's disease.* Gastroenterology, 2004. **127**(2): p. 412-21.
225. Secher, T., et al., *Escherichia coli producing colibactin triggers premature and transmissible senescence in mammalian cells.* PLoS One, 2013. **8**(10): p. e77157.
226. Cuevas-Ramos, G., et al., *Escherichia coli induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(25): p. 11537-42.
227. Arthur, J.C., et al., *Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota.* Science, 2012. **338**(6103): p. 120-3.
228. Payros, D., et al., *Maternally acquired genotoxic Escherichia coli alters offspring's intestinal homeostasis.* Gut Microbes, 2014. **5**(3): p. 313-25.
229. Cani, P.D., et al., *Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice.* Diabetes, 2008. **57**(6): p. 1470-81.
230. Membrez, M., et al., *Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice.* FASEB J, 2008. **22**(7): p. 2416-26.
231. Bergheim, I., et al., *Antibiotics protect against fructose-induced hepatic lipid accumulation in mice: role of endotoxin.* J Hepatol, 2008. **48**(6): p. 983-92.
232. Bass, N.M., et al., *Rifaximin treatment in hepatic encephalopathy.* N Engl J Med, 2010. **362**(12): p. 1071-81.
233. Ferolla, S.M., et al., *Probiotics as a complementary therapeutic approach in nonalcoholic fatty liver disease.* World J Hepatol, 2015. **7**(3): p. 559-65.
234. Loguercio, C., et al., *Beneficial effects of a probiotic VSL#3 on parameters of liver dysfunction in chronic liver diseases.* J Clin Gastroenterol, 2005. **39**(6): p. 540-3.
235. Parnell, J.A., et al., *The potential role of prebiotic fibre for treatment and management of non-alcoholic fatty liver disease and associated obesity and insulin resistance.* Liver Int, 2012. **32**(5): p. 701-11.
236. Lambert, J.E., et al., *Gut microbiota manipulation with prebiotics in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomized controlled trial protocol.* BMC Gastroenterol, 2015. **15**: p. 169.
237. Vrieze, A., et al., *Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome.* Gastroenterology, 2012. **143**(4): p. 913-6 e7.
238. Smits, L.P., et al., *Therapeutic potential of fecal microbiota transplantation.* Gastroenterology, 2013. **145**(5): p. 946-53.
239. Wieland, A., et al., *Systematic review: microbial dysbiosis and nonalcoholic fatty liver disease.* Aliment Pharmacol Ther, 2015. **42**(9): p. 1051-63.
240. Ratziu, V., et al., *A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference.* J Hepatol, 2010. **53**(2): p. 372-84.

241. Bacchetti De Gregoris, T., et al., *Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa*. J Microbiol Methods, 2011. **86**(3): p. 351-6.
242. Campbell, M.J., S.A. Julious, and D.G. Altman, *Estimating sample sizes for binary, ordered categorical, and continuous outcomes in two group comparisons*. BMJ, 1995. **311**(7013): p. 1145-8.
243. Crispe, I.N., *The liver as a lymphoid organ*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 147-63.
244. Burcelin, R., et al., *Metagenome and metabolism: the tissue microbiota hypothesis*. Diabetes Obes Metab, 2013. **15 Suppl 3**: p. 61-70.
245. Amar, J., et al., *Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment*. EMBO Mol Med, 2011. **3**(9): p. 559-72.
246. Garidou, L., et al., *The Gut Microbiota Regulates Intestinal CD4 T Cells Expressing RORgammat and Controls Metabolic Disease*. Cell Metab, 2015. **22**(1): p. 100-12.
247. Balmer, M.L., et al., *The liver may act as a firewall mediating mutualism between the host and its gut commensal microbiota*. Sci Transl Med, 2014. **6**(237): p. 237ra66.
248. Mattner, J., et al., *Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections*. Nature, 2005. **434**(7032): p. 525-9.
249. Zeissig, S., et al., *CD1d-Restricted pathways in hepatocytes control local natural killer T cell homeostasis and hepatic inflammation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(39): p. 10449-10454.

Etude prospective du microbiote intestinal et sanguin chez des patients atteints de stéatopathie métabolique

Introduction : La stéatopathie métabolique (St. Met) est associée à une dysbiose intestinale et à une augmentation de la translocation bactérienne. L'*Escherichia coli* du groupe B2 produisant la génotoxine colibactine altère la perméabilité intestinale mais son implication dans la physiopathologie des hépatopathies métaboliques n'est pas connue. Par ailleurs, le taux sanguin d'ADNr16S, reflet de l'endotoxémie, et la présence de *Sphingomonas* dans le sang est augmenté chez les patients obèses avec fibrose. L'objectif de notre travail était d'explorer dans une population de patients atteints de St. Met la relation entre le degré de sévérité de leur St. Met et 1/ la prévalence dans le microbiote intestinal de l'*E. coli* B2 et 2/ la quantité d'ADNr 16S dans le sang et la composition taxonomique du microbiote sanguin.

Patients et méthodes : Il s'agit d'une étude clinique prospective, translationnelle, monocentrique. Nous avons inclus 102 patients présentant une St. Met confirmée par biopsie. Des échantillons de selles et de sang étaient collectés le jour de la biopsie pour étudier respectivement 1/ la présence d'*E. coli* du groupe B2 et de l'îlot génomique *pks* qui code pour la colibactine ; 2/ la quantité d'ADNr 16S sanguin par rt qPCR et la composition taxonomique du microbiote sanguin par séquençage métagénomique haut débit.

Résultats : Etude 1 sur le microbiote intestinal : nous avons retrouvé une prévalence de 48% d'*E. coli* du groupe B2 qui ne différait pas selon la sévérité de la fibrose mais qui était associée à la présence d'une stéato-hépatite ($p=0.05$) et en particulier d'une ballonnisation hépatocytaire ($p=0.04$). Parmi les porteurs de B2, 47% exprimaient l'îlot *pks* mais nous n'avons pas observé de lien avec la stéato-hépatite ou la fibrose.

Etude 2 sur le microbiote sanguin : une augmentation non significative de la concentration d'ADNr 16S était observée chez les patients avec une fibrose. L'analyse taxonomique de l'ADNr 16S sanguin a montré une corrélation entre la fibrose sévère (F3-F4) et l'augmentation des Sphingomonadales, Sphingomonadaceae et *Sphingomonas* et la diminution des Sphingobacteria et Sphingobacteriales par rapport aux patients avec une fibrose légère à modérée (F0-F2) ($p < 0.05$).

Conclusion : Le portage d'*E. coli* du groupe B2 est augmenté chez les patients présentant une St. Met par rapport à la population générale (48% vs 34%). Le rôle de la colibactine dans la survenue d'une stéato-hépatite reste à établir. Il existe par ailleurs une corrélation entre la richesse du microbiote sanguin en *Sphingomonas* et la sévérité de la fibrose hépatique, comme observé dans une cohorte espagnole de chirurgie bariatrique. Ceci suggère d'explorer *Sphingomonas* comme un biomarqueur sanguin potentiel de fibrose et d'étudier son rôle causal sur le développement de la fibrose hépatique.

TITRE EN ANGLAIS: Prospective clinical study of gut and blood microbiota in NAFLD patients

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE: Médecine spécialisée clinique

MOTS-CLÉS: stéatopathie métabolique, microbiote intestinal, microbiote sanguin, *Escherichia coli* du groupe B2, ADNr 16S, *Sphingomonas*

Université Toulouse III-Paul Sabatier, Faculté de médecine Toulouse-Purpan,
37 Allées Jules Guesde 31000 Toulouse

Directeur de thèse : Docteur Maeva GUILLAUME