

UNIVERSITE TOULOUSE III – PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNEE : 2020

THESE 2020/TOU3/2087

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

par

BOQUET Edwige

**RELATIONS ENTRE STEATOSE HEPATIQUE NON
ALCOOLIQUE, INTESTIN ET CAVITE BUCCALE**

Mardi 8 Décembre 2020

Directeurs de thèse : Dr DOUIN Victorine et Dr BLASCO-BAQUE Vincent

JURY

Président :	Pr CUSSAC Daniel
1 ^{er} assesseur :	Dr DOUIN Victorine
2 ^{ème} assesseur :	Dr BLASCO-BAQUE Vincent
3 ^{ème} assesseur :	Dr MINTY Matthieu

UNIVERSITE TOULOUSE III – PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNEE : 2020

THESE 2020/TOU3/2087

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

par

BOQUET Edwige

**RELATIONS ENTRE STEATOSE HEPATIQUE NON
ALCOOLIQUE, INTESTIN ET CAVITE BUCCALE**

Mardi 8 Décembre 2020

Directeurs de thèse : Dr DOUIN Victorine et Dr BLASCO-BAQUE Vincent

JURY

Président :	Pr CUSSAC Daniel
1 ^{er} assesseur :	Dr DOUIN Victorine
2 ^{ème} assesseur :	Dr BLASCO-BAQUE Vincent
3 ^{ème} assesseur :	Dr MINTY Matthieu

PERSONNEL ENSEIGNANT
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier
au 1er octobre 2020

Professeurs Emérites

Mme BARRE A.	Biologie Cellulaire
M. BENOIST H.	Immunologie
M. BERNADOU J.	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
M. GARIN J.E.	Pharmacologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SALLES B.	Toxicologie

Professeurs des Universités

Hospitolo-Universitaires

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CESTAC P.	Pharmacie Clinique
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
Mme DE MAS MANSAT V.	Hématologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C. (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B.	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

Universitaires

Mme BERNARDES-GÉNISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme BOUTET E.	Toxicologie - Sémiologie
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Générique
M. GUIARD E.	Pharmacologie
M. LETISSE F.	Chimie pharmaceutique
Mme MÜLLER-STAUMONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme REYBIER-VUATTLOUX K.	Chimie analytique
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. SOUCHARD J.P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P.	Chimie Thérapeutique

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires

M. DELCOURT N.	Biochimie
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique
M. PUSSET F.	Pharmacie Clinique
Mme ROUCH L.	Pharmacie Clinique
Mme ROZAUD-LABORDE C.	Pharmacie Clinique
Mme SERONIE-VIVIEN B. (*)	Biochimie
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie

Universitaires

Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme BON C. (*)	Biophysique
M. BOUJILA J. (*)	Chimie analytique
M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
Mme CABOU C.	Physiologie
Mme CAZALBOU E. (*)	Pharmacie Galénique
Mme CHAPUY-REGAUD S.	Bactériologie - Virologie
Mme COLACIOS C.	Immunologie
Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
Mme DERAËVE C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme ECHINARD-DOUIN V.	Physiologie
Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
Mme FALLONE F.	Toxicologie
Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
Mme GADEÀ A.	Pharmacognosie
Mme HALOVA-LAJDIE B.	Chimie Pharmaceutique
Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
Mme LAJDIÉ-MAZENC I.	Biochimie
Mme LEFEVRE L.	Physiologie
Mme LE LAMER A.-C.	Pharmacognosie
M. LE NAOUR A.	Toxicologie
M. LEMARIE A.	Biochimie
M. MARTI G.	Pharmacognosie
Mme MONFERRAN S.	Biochimie
M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
M. STIGLIANI J.-L.	Chimie Pharmaceutique
M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
Mme TERRISSE A.-D.	Hématologie
Mme TOURRETTE-DIALLO A. (*)	Pharmacie Galénique
Mme VANSTEELENDT M.	Pharmacognosie
Mme WHITE-KONING M. (*)	Mathématiques

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires

Mme LARGEAUD L.	Immunologie
M. LE LOUEDEC F.	Pharmacologie
M. MOUMENI A.	Biochimie
M. PAGES A.	Pharmacie Clinique
Mme SALABERT A.S.	Biophysique
Mme TRIBAUDEAU L.	Droit Pharmaceutique

Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER)

M. François-Xavier TOUBLET	Chimie Thérapeutique
----------------------------	----------------------

REMERCIEMENTS

À mon jury de thèse,

À Monsieur le Professeur Daniel Cussac, je vous remercie de m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse. Veuillez trouver dans ce travail le témoignage de mon profond respect et de ma grande reconnaissance.

À Madame le Docteur Victorine Douin, je vous remercie d'avoir accepté de diriger cette thèse. Je vous suis sincèrement reconnaissante pour votre disponibilité, votre implication et votre accompagnement tout au long de ce travail. Je vous remercie pour vos corrections et vos précieux conseils. Que ce travail soit l'occasion de vous témoigner ma profonde gratitude.

À Monsieur le Docteur Vincent Blasco-Baque, je vous remercie d'avoir spontanément accepté de diriger cette thèse. Je vous suis très reconnaissante pour votre disponibilité et votre investissement dans ce travail. Votre soutien et vos encouragements ont été d'une grande aide. Merci de me faire l'honneur de continuer à me suivre ces prochaines années jusqu'à ma thèse en chirurgie-dentaire. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

À Monsieur le Docteur Matthieu Minty, je vous remercie d'avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse. Vous m'avez accueillie les jeudis à l'INSERM et avez su trouver le temps de répondre à mes questions, je vous en suis très reconnaissante. C'est un honneur pour moi de poursuivre vers l'élaboration d'un deuxième travail à vos côtés.

À mes parents,

À mon papa, Luc, merci de m'avoir toujours soutenue aveuglément, de continuer à me soutenir et de me permettre de réaliser mon rêve de devenir chirurgien-dentiste. Merci pour tous ces messages encourageants avant les moments importants et pour tous ceux exprimant ta fierté. Merci de m'avoir toujours poussée à me dépasser pour que je donne le meilleur de moi-même. Merci d'avoir cru en moi plus que je ne l'ai fait moi-même, j'espère te rendre fier encore aujourd'hui..

À ma maman, Nathalie, merci d'avoir toujours voulu le meilleur pour moi, de m'avoir encouragée à poursuivre mon rêve et d'avoir fait des sacrifices pour me permettre d'y accéder. Merci d'avoir réussi à canaliser mon émotion juste avant l'oral de passerelle qui a changé ma vie. Merci pour ta présence, ton dévouement et ton soutien quotidien. Merci de me donner l'envie de me surpasser pour te rendre fière, j'espère pouvoir t'en donner l'occasion aujourd'hui..

À ma sœur, Caroline, mon modèle, merci d'avoir toujours été là pour moi, d'avoir veillé sur moi et de m'avoir fait grandir. J'ai tellement de beaux souvenirs avec toi, merci d'avoir pris soin de moi. Mes week-ends à Bordeaux sont toujours aussi beaux bien que différents de ceux d'il y a 15 ans. Merci de m'accompagner avec bienveillance dans toutes les étapes de ma vie. Je suis fière de t'avoir comme grande sœur et je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu m'apportes, tu es pour moi un exemple à suivre, merci d'être toi.

À mon frère, Pierre-Antoine, merci de faire partie de ma vie, je suis heureuse de pouvoir partager des moments privilégiés avec toi et je suis fière d'être ta petite sœur. Merci de t'être spontanément impliqué dans mon projet de passerelle en me faisant rencontrer des dentistes.

À Michel, merci d'avoir été là depuis tant d'années et de m'avoir supportée. Merci pour ces moments de partage, pour ta générosité et tes attentions. Tu as fait énormément pour moi depuis que je suis petite sans que je m'en rende toujours compte, merci pour tout.

À Joseph, merci pour tes conseils bienveillants et ton franc-parler. Il me tarde qu'on se partage tous les deux un russe Artigarrede de 38 parts !!

À Sophie, merci pour tous ces moments, pour ces invitations le week-end qui ont souvent dérapé !! À quand une petite raclette ??

À mes neveux et nièces, Camille, Louis, Vadim et Gabin, merci pour votre joie de vivre, votre spontanéité et votre innocence. À Vadim, je suis si fière d'être ta marraine.

À Papy, je sais que tu serais fier de moi.

À Bonne-Maman.

À mes oncles, tantes, cousins et cousines.

À Agnès, merci de rendre mon père heureux.

À Juliette, merci d'être là depuis le lycée, dans les bons comme les mauvais moments. À notre belle amitié. À tous nos souvenirs et à ceux à venir... À tous nos fous rires, nos soirées, nos secrets, notre complicité, nos moments de doute et de remise en question. Merci de m'avoir soutenue durant les moments difficiles, j'espère être là pour toi comme tu l'as été pour moi... Que nos chemins ne se séparent jamais !

À Clémence, mon petit poulet, je suis tellement heureuse que le hasard nous ait fait nous rencontrer et que ce séjour linguistique n'ait été que le début d'une belle amitié. On est très vite devenues complices et on ne s'est jamais perdues de vue malgré la distance. Des voyages en Floride, aux semaines chez mon père en passant par les week-ends bordelais, je ne garde que de bons souvenirs et il y en aura beaucoup d'autres...

À Elsa, à nos révisions rue Duméril et à celles sur la plage à Saint Raphaël, à cette soirée au Toucan et à toutes les autres... Sans surprise, on aura toutes les deux attendu le dernier moment pour passer cette thèse ! Merci pour ces années pharma et pour celles à venir, j'ai de la chance d'avoir une amie comme toi. Mais tu me manques, reviens vite dans le sud !!

À Eloïse, à nos soirées sushis, nos soirées révisions et nos soirées arrosées... À toutes nos galères et tous ces moments partagés... Loin des yeux loin du cœur est un proverbe tellement faux parce que je sais que même malgré la distance tu seras toujours présente, merci pour ta sincère amitié.

À Hajar, on n'aura jamais autant profité que pendant ces années même si la vie nous a (un peu) calmées (heureusement pour nos foies). Merci d'avoir partagé les bons comme les mauvais moments, d'avoir toujours eu une oreille attentive et de m'avoir conseillé avec bienveillance. Merci pour ta joie de vivre, c'est un bonheur de t'avoir comme amie.

À Inès, je repense à notre anniversaire l'an dernier à Saint Tropez et cette année à Leucate, à nos soirées endiablées, à notre hystérie quand on chante du Céline ou du David Haliday et à toutes tes péripéties qui me font beaucoup trop rire... Je suis sincèrement heureuse d'être ton amie, même si j'aime moins que tu vives loin de moi !!

À Katinka, merci pour ton soutien et ta présence, surtout ces derniers temps. Je sais que je peux compter sur toi à n'importe quelle heure du jour ou de la nuit, merci pour tout ce que tu fais pour moi, je suis fière de te compter parmi mes amies.

À Melissa, je repense à la soirée du tartillon et ça me fait sourire... Merci pour ton amitié, pour ton enthousiasme et ton grain de folie. Même si quand tu n'es pas là mon foie se repose, tu me manques quand même beaucoup à Toulouse !!

À Martin, Sarah, Steven, Louise, Cindy, merci de faire partie de cette nouvelle aventure, je suis heureuse de vous avoir rencontrés. On fêtera notre thèse en dentaire en 2023 ensemble !!

À Virginie, je suis heureuse que notre rencontre lors de mon premier stage en pharmacie ait évolué vers une véritable amitié.

À Célyne, même si la vie nous a un peu séparées, je sais que tu es toujours là et c'est toujours un bonheur de te revoir.

À Nico, merci pour ta bonne humeur, hâte que les restaux réouvrent pour se raconter nos vies autour d'un bon repas et d'un grand Spritz.

À Elodie, toujours partante pour aller boire un verre et aussi toujours là pour moi, merci pour ton rire communicatif.

À Emma et Aurélie, à nos fous rires et nos soirées. Merci pour tous vos appels auxquels je n'ai jamais décroché puisque j'essayais de finir cette thèse, mais promis je me rattraperai !!

À Madame Rivière, Cathy, Céline Bibal et Camille Bonnet qui ont eu la gentillesse de m'accueillir dans leur officine au cours de mon cursus en pharmacie.

À Anne, tu as été une très belle rencontre, je garde ta thèse bien précieusement.

À Véro et Felana, des bons souvenirs partagés, de la pharmacie aux repas à la maison !

À Guillaume, à cette jolie année passée à tes côtés. Merci pour ton soutien et ta présence même si je ne suis pas toujours facile. Merci pour l'amour que tu me portes.

Et aux autres copains de fac ainsi qu'à toutes les personnes bienveillantes qui ont un jour croisé mon chemin.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	13
1 NAFLD	15
1.1 DEFINITION	15
1.1.1 <i>La Non Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)</i>	15
1.1.2 <i>La Non Alcoholic Steato-Hepatitis (NASH)</i>	16
1.2 ÉPIDEMIOLOGIE.....	18
1.2.1 <i>Incidence</i>	18
1.2.2 <i>Prévalence</i>	18
I. Dans le monde	18
II. Prévalence et comorbidités métaboliques	19
1.2.3 <i>Impact économique</i>	20
1.3 FACTEURS DE RISQUE.....	20
1.3.1 <i>Âge et sexe</i>	20
1.3.2 <i>Syndrome métabolique et diabète de type II</i>	21
1.3.3 <i>Génétique et ethnique</i>	21
1.4 PATHOGENESE.....	22
1.4.1 <i>De « l'hypothèse des deux coups » à la « théorie aux coups multiples »</i> 22	
1.4.2 <i>Insulinorésistance et stéatose hépatique</i>	22
1.4.3 <i>Immunité innée, microbiote intestinal et inflammation</i>	25
1.4.4 <i>Facteurs génétiques</i>	28
1.5 DIAGNOSTIC.....	29
1.5.1 <i>Méthode invasive : la biopsie hépatique</i>	30

1.5.2	<i>Méthodes non invasives</i>	31
I.	Imagerie	31
II.	Sérologie	33
III.	Élastographie	37
1.6	THERAPEUTIQUE	38
1.6.1	<i>Régime alimentaire et activité physique</i>	38
1.6.2	<i>Traitements pharmacologiques</i>	39
I.	Sensibilisateurs à l'insuline	40
II.	Agents anti-oxydants.....	41
III.	Agonistes de PPAR.....	41
IV.	Agoniste du récepteur farnésioïde X (FXR)	42
1.6.3	<i>Traitement chirurgical</i>	43
1.6.4	<i>Transplantation hépatique</i>	43
2	RELATIONS ENTRE MICROBIOTE ET NAFLD	44
2.1	ROLE DU MICROBIOTE INTESTINAL DANS LA NAFLD	44
2.1.1	<i>Qu'est-ce-que le microbiote intestinal ?</i>	44
2.1.2	<i>Dysbiose intestinale dans la NAFLD</i>	46
2.1.3	<i>Modifications de la composition du microbiote intestinal</i>	47
I.	Par l'alimentation.....	47
II.	Par les antibiotiques	48
III.	Par l'activité physique	49
2.1.4	<i>Mécanismes impliqués</i>	50
I.	Altération de la perméabilité intestinale et translocation bactérienne	50
II.	Métabolites bactériens	51
2.1.5	<i>Signalisation dépendante des TLR et cytokines pro-inflammatoires</i>	53

I.	Récepteurs TLR	53
II.	Cytokines pro-inflammatoires	55
2.2	ROLE DU MICROBIOTE BUCCAL DANS LA NAFLD	57
2.2.1	<i>Qu'est-ce que le microbiote buccal ?</i>	57
2.2.2	<i>Dysbiose orale et NAFLD</i>	57
2.2.3	<i>Mécanismes moléculaires impliqués</i>	59
I.	Réponse inflammatoire aux bactéries parodontopathogènes	59
II.	Stress oxydant	61
2.3	INTERVENTION NUTRITIONNELLE SUR LE MICROBIOTE	63
2.3.1	<i>Les probiotiques</i>	63
2.3.2	<i>Les prébiotiques</i>	65
2.3.3	<i>Les symbiotiques</i>	66
2.3.4	<i>La transplantation de microbiote fécal (FMT)</i>	66
3	IMPLICATION CLINIQUE DE <i>PORPHYROMONAS GINGIVALIS</i> ET	
	PROTOCOLE CLINIQUE	68
3.1	<i>PORPHYROMONAS GINGIVALIS</i>	68
3.1.1	<i>Description de la bactérie</i>	68
I.	Caractéristiques structurelles et conditions de croissance	68
II.	Invasion et survie dans l'hôte	69
III.	Facteurs de virulence	69
3.1.2	<i>Porphyromonas gingivalis et parodontite</i>	72
3.1.3	<i>Porphyromonas gingivalis et maladies systémiques</i>	73
I.	Diabétologie	74
II.	Risque cardiovasculaire	74
III.	Pneumologie	75

IV. Rhumatologie	75
V. Neurologie	75
VI. Oncologie	76
3.2 PROPOSITION DE PROTOCOLE CLINIQUE : ÉTUDE OBSERVATIONNELLE EXPLORANT LES RELATIONS ENTRE <i>PORPHYROMONAS GINGIVALIS</i> ET LA SEVERITE DE LA FIBROSE CHEZ DES PATIENTS ATTEINTS DE STEATOPATHIE METABOLIQUE	77
3.2.1 <i>Objectifs de l'étude</i>	78
I. Objectif principal	78
II. Objectifs secondaires	78
3.2.2 <i>Matériels et Méthodes</i>	79
I. Conception de l'étude et critères d'inclusion	79
II. Recueil des données	82
III. Analyse du microbiote	83
IV. Analyse statistique des données	84
CONCLUSION	86
4 BIBLIOGRAPHIE	88
5 ANNEXES	103
ANNEXE 1 : QUESTIONNAIRE HYGIENO-DIETETIQUE DESTINE AUX PATIENTS	103
ANNEXE 2 : FORMULAIRE DE CONSENTEMENT	107
ANNEXE 3 : PROTOCOLE D'EXTRACTION DE L'ADN SALIVAIRE	108

INTRODUCTION

En 1980, Ludwig et ses collaborateurs ont décrit pour la première fois la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) comme une pathologie entraînant des lésions comparables à celles observées dans la stéatose alcoolique et pouvant entraîner une cirrhose (1) (2).

Environ 25% de la population mondiale est atteinte de NAFLD, son incidence étant estimée entre 20 et 30% dans les pays occidentaux. L'augmentation de la prévalence de cette maladie chaque année dans le monde, en lien avec la généralisation d'une négligence alimentaire et d'un mode de vie sédentaire, est étroitement corrélée à celle du diabète et du syndrome métabolique (3). Au cours des deux dernières décennies, les avancées scientifiques dans le domaine ont permis de révéler que la NAFLD était intimement liée à l'épidémie dite de « *diabésité* » (4).

La stéatose hépatique non alcoolique représente la maladie hépatique chronique la plus courante dans les pays industrialisés (5) et pourrait devenir la principale indication pour la transplantation hépatique d'ici 2030 (6). Les patients atteints ont une mortalité globale plus élevée que la population générale, les complications cardiovasculaires étant la principale cause de décès, suivies de causes métaboliques et hépatiques (7).

Ainsi la NAFLD est devenue une réelle préoccupation de santé publique, constituant une charge clinique et économique substantielles pour de nombreuses sociétés dans le monde (4).

L'obésité, principal facteur de risque de la stéatose hépatique non alcoolique, étant le reflet d'une flore intestinale désorganisée, l'exploration du microbiote intestinal a permis une nouvelle approche de la NAFLD (8). Les scientifiques se sont également

intéressés au microbiote buccal et *Porphyromonas gingivalis* a été étudiée en tant que bactérie parodontale potentiellement impliquée dans la pathogenèse de la NAFLD (9) mais peu d'études ont été réalisées.

L'objectif principal est d'identifier des biomarqueurs issus du microbiote oral associés à la sévérité de la NAFLD. Pour répondre à cet objectif, une étude est en cours sur l'évaluation de l'état bucco-dentaire chez des patients atteints de NAFLD. Le bénéfice attendu de cette étude est d'obtenir une meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans la stéatose hépatique non alcoolique permettant de mieux appréhender ces facteurs et d'intervenir précocement chez les patients par des interventions simples sur le régime alimentaire ou l'activité physique mais aussi sur le microbiote buccal si un lien avec une bactérie est avéré.

1 NAFLD

1.1 Définition

1.1.1 La Non Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)

La stéatose hépatique non alcoolique ou NAFLD (*Non Alcoholic Fatty Liver Disease*) est la manifestation hépatique du syndrome métabolique (10). Elle regroupe une succession d'atteintes hépatiques, allant de la stéatose hépatique simple ou stéatose pure (*Non Alcoholic Fatty Liver - NAFL*) à la cirrhose et au carcinome hépatocellulaire, en passant par la stéatohépatite non alcoolique ou NASH (*Non Alcoholic Steato-Hepatitis*) avec ou sans fibrose (11) (12).

La NAFLD est déterminée par l'absence de causes secondaires de stéatose hépatique telles qu'une consommation quotidienne d'alcool supérieure à 20 grammes chez la femme et 30 grammes chez l'homme, une intoxication médicamenteuse, un facteur héréditaire ou une infection virale (10) (13) (14). La NAFLD est donc un diagnostic d'exclusion, après élimination de toutes les autres causes de maladie chronique du foie.

La NAFLD est définie histologiquement par un excès de graisses dans le foie (stéatose), et plus précisément par une accumulation de larges vacuoles lipidiques atteignant plus de 5% des hépatocytes ou plus de 5% du volume ou du poids du foie (13) (14). Ces vacuoles lipidiques résultent du stockage de triglycérides formés à partir d'acides gras dans le cytoplasme des hépatocytes, elles sont le plus souvent centrolobulaires, refoulant le noyau en périphérie de la cellule (14).

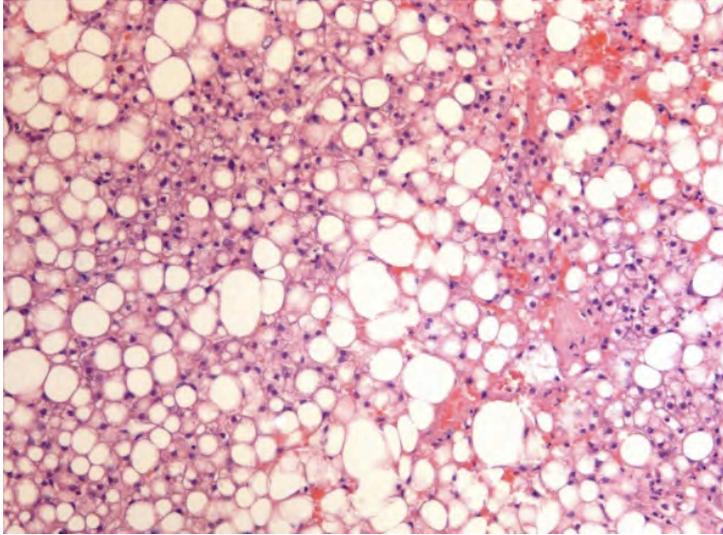
1.1.2 La Non Alcoholic Steato-Hepatitis (NASH)

La stéatose hépatique simple (NAFL) peut évoluer vers la stéatohépatite ou NASH, qui est caractérisée, en plus de la stéatose, par une inflammation lobulaire correspondant essentiellement à un infiltrat de polynucléaires neutrophiles (PNN) et de lymphocytes ainsi que par des lésions hépatocytaires, notamment une ballonnisation voire une nécrose des hépatocytes (14). Des agrégats de cytokératine appelés corps de Mallory peuvent également être observés en microscopie optique (14) (15).

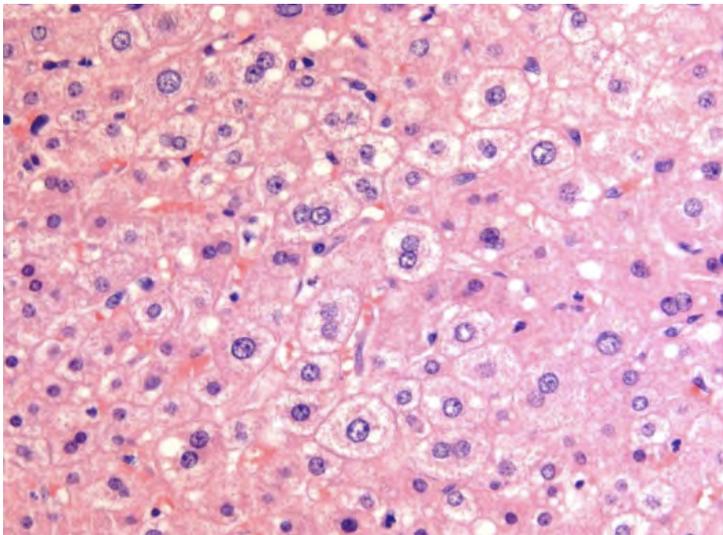
La composante inflammatoire et l'altération des hépatocytes sont les deux critères majeurs de la définition histologique de la NASH, les corps de Mallory ne sont en revanche pas toujours retrouvés. Des atteintes fibrotiques péri-sinusoïdales sont souvent associées à la stéatohépatite.

Bien que très proches de celles observées dans la stéatose hépatique alcoolique, les lésions de NASH sont moins marquées, l'activité inflammatoire plus modérée et les corps de Mallory moins fréquents (12).

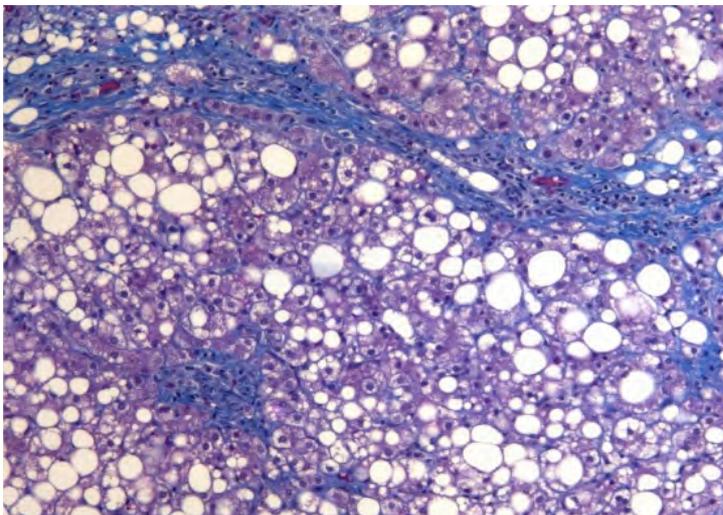
Les patients atteints de NASH présentent un risque beaucoup plus important de progression vers la fibrose ou la cirrhose et de développement d'un carcinome hépatocellulaire par rapport aux patients présentant une stéatose simple (16). Dans les 10 ans, 30 à 50% des NASH évoluent vers une cirrhose (17).



Stéatose. Coloration à l'hématoxyline-éosine



Hépatocytes gonflés. Coloration à l'hématoxyline-éosine



Fibrose périvenulaire / péricellulaire zone 3. Teinture trichrome Masson

Figure 1 : « Histopathologie de la NAFLD / NASH » (18)

1.2 Épidémiologie

1.2.1 Incidence

L'incidence de la NAFLD est en constante augmentation, principalement dans les pays occidentaux (6) (19). Elle est liée notamment à la hausse de l'obésité et de la sédentarité ainsi qu'à l'allongement de l'espérance de vie (10). Cependant, la NAFLD est le plus souvent une maladie silencieuse découverte de manière fortuite et les données divergent selon les études et les régions du monde, il reste donc difficile de chiffrer son incidence et elle est souvent sous-estimée (20).

1.2.2 Prévalence

I. Dans le monde

La prévalence mondiale des NAFLD est actuellement estimée à un milliard (19). Elle est variable selon la zone géographique ainsi que la méthode diagnostique utilisée.

Aux États-Unis, la NAFLD affecte environ 85 millions de personnes, soit 24 à 26% de la population. On suggère qu'entre 20 et 30% de ces cas (c'est-à-dire entre 17 et 25 millions d'Américains) sont atteints de NASH, dont 4 à 6% présentent une cirrhose. D'ici 2030, une hausse de 18,3% de la prévalence des NAFLD est envisagée, atteignant jusqu'à 100 millions d'Américains ; et une augmentation exponentielle de la NASH est prévue d'ici 2025, affectant près de 43 millions d'Américains. Ces estimations de la prévalence sont variables entre les études en fonction de la façon dont la NAFLD a été diagnostiquée dans chaque étude (16).

En France, la prévalence de la NAFLD était estimée en 2016 à 21,6%, parmi lesquels on recensait 16% de cas de NASH, soit 3,6% de la population française. En 2030, elle devrait atteindre 23,6% de la population dont 21% seraient des patients atteints de NASH, autrement dit 5% des Français (21).

En Europe, au Moyen Orient, en Chine et au Japon, les statistiques sont sensiblement identiques et révèlent qu'entre 20 et 30% de la population est atteinte de NAFLD.

En s'inspirant du modèle occidental par l'adoption de mauvaises habitudes alimentaires et d'un mode de vie sédentaire, les pays en voie de développement ont vu la prévalence de NAFLD augmenter ces dernières années. Notamment en Inde dans certaines régions urbaines où elle oscille entre 16 et 32%. Elle est néanmoins bien moins élevée, de l'ordre de 9%, dans les zones rurales défavorisées du pays.

Ainsi, les disparités du taux de prévalence de NAFLD s'expliquent par la sédentarité, de mauvaises habitudes nutritionnelles type « fast-food » et un niveau socio-économique plus important. Ces différences sont retrouvées d'une part entre les pays occidentaux développés et les pays en développement et d'autre part entre les régions urbaines et rurales d'un même pays en développement (22).

II. Prévalence et comorbidités métaboliques

Chez les patients diabétiques de type II, la prévalence de NAFLD atteint 30 à 50%, chez les adultes obèses 80 à 90%, et chez les patients souffrant d'hyperlipidémie plus de 90%. Chez les enfants, la prévalence varie entre 3 à 10% et entre 40 et 70% chez les enfants obèses (10).

1.2.3 Impact économique

Aux États-Unis, les coûts médicaux et sociétaux annuels actuels de la NAFLD sont estimés à 291 milliards de dollars : 103 milliards de dollars représentant les coûts directs des soins médicaux et 188 milliards de dollars pour les coûts sociétaux liés à la NAFLD (16). En Allemagne, en France, au Royaume-Uni et en Italie, les dépenses médicales liées à la pathologie sont de l'ordre de 35 milliards de dollars (17).

1.3 Facteurs de risque

1.3.1 Âge et sexe

Les conclusions quant à l'influence du genre dans la pathogénèse de la NAFLD divergent en fonction des études. Néanmoins, selon Lonardo et ses collaborateurs, avant 50 ans, la prévalence de NAFLD est globalement plus élevée chez les hommes (3). En effet, les femmes ont un risque réduit de développer la maladie durant leur période de reproduction, les œstrogènes leur conférant une protection vis-à-vis de la fibrose. Cependant, après la ménopause, cet effet bénéfique n'existe plus (19) (23) et une augmentation de l'incidence s'observe chez les femmes après 50 ans avec un pic à 60-69 ans.

De plus, la prévalence de la NAFLD augmente avec l'âge puisqu'elle est estimée à plus de 40% chez les plus de 60 ans, alors qu'elle avoisine les 20% chez les moins de 20 ans (3).

1.3.2 Syndrome métabolique et diabète de type II

Le syndrome métabolique correspond à un ensemble de facteurs de risque prédisposant à des maladies cardiovasculaires ainsi qu'au diabète de type II. On parle de syndrome métabolique lorsqu'au moins 3 des 5 critères suivants sont remplis : triglycérides ≥ 150 mg/dL, lipoprotéines-cholestérol haute densité (HDL) < 40 mg/dL chez les hommes et < 50 mg/dL chez les femmes, glycémie à jeun ≥ 100 g/dL, hypertension artérielle (pression artérielle systolique ≥ 130 mmHg ou pression artérielle diastolique ≥ 85 mmHg) et obésité abdominale. L'augmentation du taux de NAFLD est étroitement corrélée à celle du syndrome métabolique : il a été démontré que l'incidence de la NAFLD augmente en même temps que le nombre de critères du syndrome métabolique. De plus, les patients atteints de diabète de type II ont une concentration en graisse hépatique 80% plus élevée que des patients non diabétiques et présentent une prévalence de NAFLD plus importante (3).

1.3.3 Génétique et ethnique

La génétique semble aussi jouer un rôle dans l'établissement de la maladie : en 2008, la première étude d'association pangénomique sur la NAFLD chez plus de 2000 patients d'ethnies diverses a identifié l'allèle rs738409 1148M du gène *patatine-like phospholipase domain containing 3 (PNPLA3)* codant pour l'adiponutrine comme étant associé à une inflammation du foie ainsi qu'à un excès de graisse intra-hépatique. Cet allèle est retrouvé de manière prépondérante dans la population hispanique, leur conférant une plus grande susceptibilité à la maladie. Cette relation a été mise en évidence par la suite dans de nombreuses études, qui ont permis d'établir aussi le lien entre ce polymorphisme génétique et le spectre complet de la NAFLD, c'est-à-dire la

stéatose simple, la stéatohépatite, la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire (24). De plus, il semblerait être annonciateur d'une forme sévère de la pathologie.

1.4 Pathogénèse

1.4.1 De « l'hypothèse des deux coups » à la « théorie aux coups multiples »

On a longtemps admis que la pathogénèse de la NAFLD se résumait en « deux coups » : l'insulinorésistance étant le premier et provoquant une accumulation de triglycérides (TG) dans le foie, alors plus vulnérable face à un « second coup » donné par des cytokines, des adipokines, un dysfonctionnement mitochondrial et un stress oxydant, responsable d'inflammation et de fibrose. Cette hypothèse, estimée trop simpliste, est actuellement remise en cause en faveur d'une théorie multifactorielle dite « à plusieurs coups » : des facteurs métaboliques et environnementaux associés à une prédisposition génétique permettraient d'expliquer le processus complexe de développement de la maladie tant au niveau du foie qu'au niveau d'autres organes tels que les muscles squelettiques, le tissu adipeux ou encore l'intestin (25) (26).

1.4.2 Insulinorésistance et stéatose hépatique

L'insuline, de manière physiologique, stimule la lipogenèse et inhibe la lipolyse dans le tissu adipeux, induisant une baisse de production et d'afflux d'acides gras (AG) vers le foie, donc une diminution de synthèse d'acétyl-CoA et une réduction d'activité de la pyruvate carboxylase et par conséquent une baisse de production de glucose à partir du pyruvate (27). En plus de cette inhibition indirecte, la néoglucogénèse hépatique

est directement sous l'influence négative de l'insuline. Au niveau des muscles squelettiques, une cascade de signalisation initiée par l'insuline permet de capter le glucose et de le stocker sous forme de glycogène via la glycogénogenèse, la glycogénolyse est quant à elle inhibée (28).

En cas d'insulinorésistance, les cellules des organes cibles, c'est-à-dire les cellules adipeuses, hépatiques et musculaires, ne répondent plus de façon adaptée aux stimuli de l'insuline et le glucose n'est plus correctement utilisé. Il en découle un défaut de synthèse de glycogène dans les muscles et une hyperglycémie. Au niveau du tissu adipeux, la régulation négative de la lipolyse ne se fait plus : une grande quantité d'acides gras non estérifiés (AGNE) est sécrétée dans le sang et acheminée vers le foie, entraînant ensuite un dépôt de TG. La néoglucogenèse hépatique est stimulée alors que l'activation de la lipogenèse par l'insuline est paradoxalement toujours assurée (27) : on parle d'insulinorésistance hépatique sélective (28). Notons que les trois principales sources du dépôt de TG dans le foie sont la lipolyse du tissu adipeux pour 59%, la lipogenèse de novo pour 26% et l'apport alimentaire pour 15% (27).

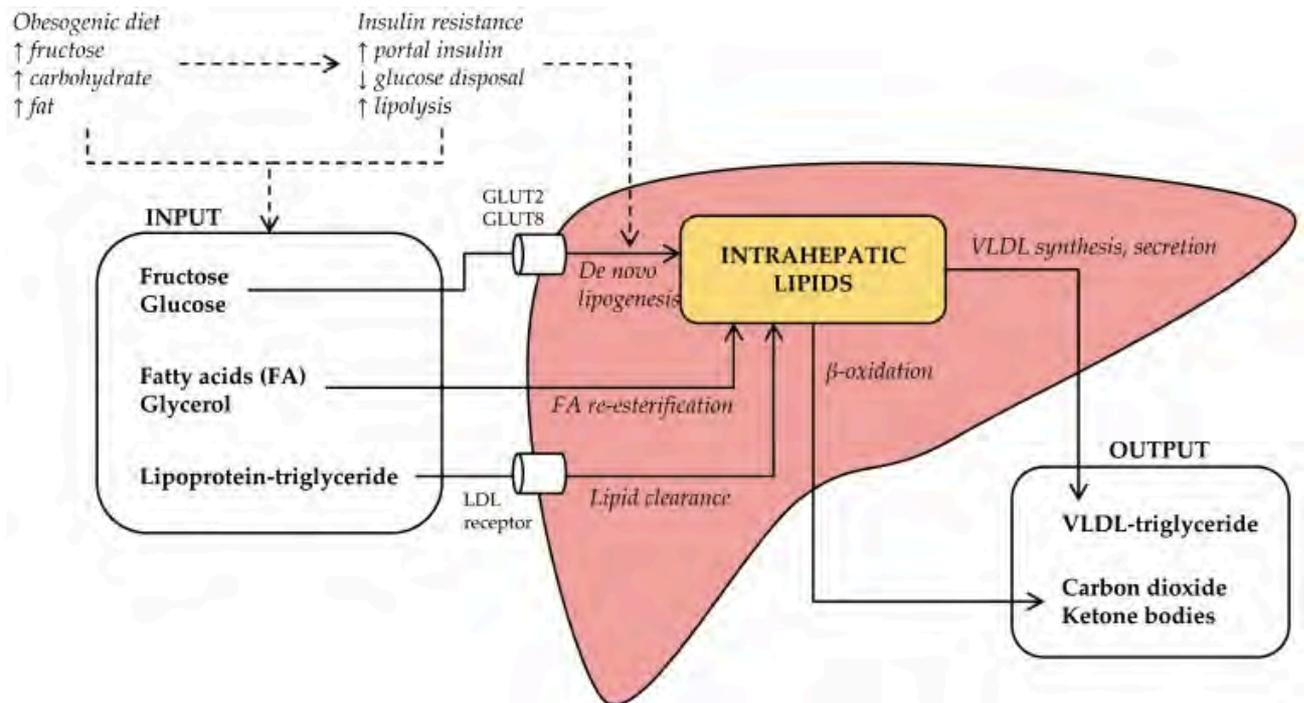


Figure 2 : « La stéatose hépatique se développe lorsque l'apport lipidique dépasse le débit lipidique » (29)

Input : L'apport lipidique correspond à :

- La lipogénèse de novo médiée par l'insulinorésistance provoquée par un régime riche en fructose, en carbohydrates et en graisses
- La ré-estérification d'acides gras (FA) issus de la lipolyse
- L'endocytose de TG via les récepteurs de lipoprotéines de basse densité (LDL)

Output : L'excrétion lipidique provient de :

- La β -oxydation
- La sécrétion de TG via les lipoprotéines de très basse densité (VLDL)

GLUT2 = transporteur de glucose 2

GLUT8 = transporteur de glucose 8

1.4.3 Immunité innée, microbiote intestinal et inflammation

Dans un contexte d'insulinorésistance, le tissu adipeux dysfonctionnel libère en excès des adipokines pro-inflammatoires, comme la leptine ou la résistine, alors que la synthèse d'adipokines anti-inflammatoires, notamment l'adiponectine, diminue nettement, favorisant la progression de la NAFLD.

La stéatose entraîne une lipotoxicité ainsi qu'un stress du réticulum endoplasmique et une atteinte mitochondriale. L'altération structurelle et fonctionnelle des mitochondries conduit à une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), avec génération d'un stress oxydant responsable de la mort des hépatocytes (17) (25).

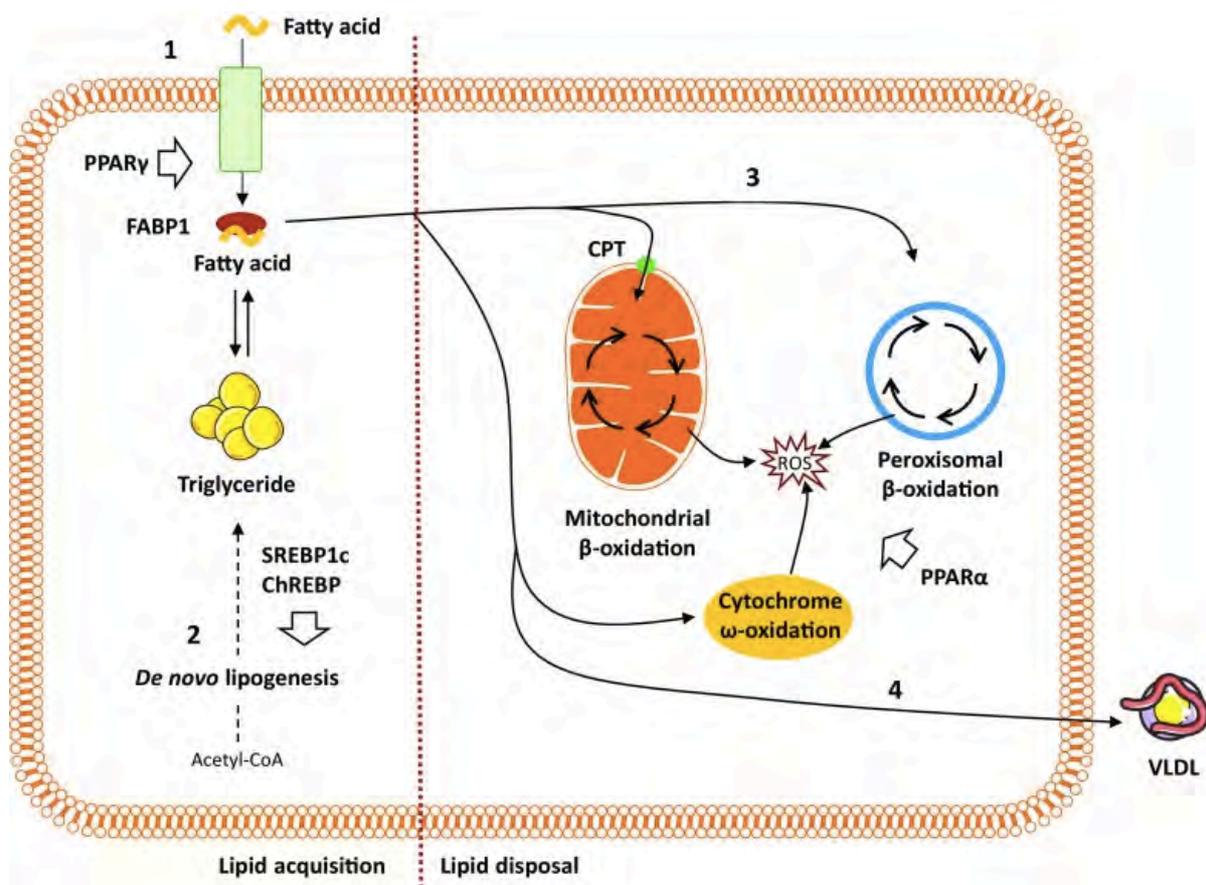


Figure 3 : « Vue d'ensemble du métabolisme hépatique des lipides » (30)

Entrée des lipides dans les hépatocytes :

1. Les AGL (acides gras libres) circulants pénètrent dans les hépatocytes via des transporteurs membranaires spécifiques, avec une régulation par PPAR γ (récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxyosome). Les AGL, transportés dans les compartiments cellulaires via FABP, sont ensuite estérifiés et stockés sous forme de TG.
2. Une autre source d'accumulation de TG est la lipogenèse de novo, sous le contrôle de SREBP1 et de ChREBP

Élimination des lipides :

3. L'élimination de la graisse hépatique est permise par l'oxydation des AGL, régulée par PPAR α (récepteur alpha activé par les proliférateurs de peroxyosome). Physiologiquement, les mitochondries sont les principaux organites impliqués ; cependant un excès graisseux ainsi qu'une dysfonction mitochondriale conduisent à une oxydation accrue des AGL dans les peroxyosomes et dans les cytochromes, à l'origine de ROS et d'un stress oxydant.
4. L'exportation de lipides hépatiques peut être effectuée par les VLDL.

La lipotoxicité engendrée par la stéatose induit la libération de motifs moléculaires associés aux dommages (DAMP) qui stimulent les cellules hépatiques, telles que les cellules de Kupffer (macrophages hépatiques résidents) et les cellules hépatiques étoilées, en se fixant à des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR) membranaires ou intracellulaires. Cette liaison entraîne une cascade de signalisation contribuant au processus inflammatoire local (31) via la sécrétion de

cytokines pro-inflammatoires, notamment $TNF\alpha$, et les interleukines (IL) IL-6 et IL-1 β (32).

L'axe intestin-foie est aussi impliqué, de manière bidirectionnelle, dans la progression de la NAFLD : en effet, une alimentation trop calorique, trop grasse et trop sucrée ainsi qu'une sédentarité altèrent le bon fonctionnement de la barrière intestinale et du microbiote intestinal. Celui-ci se retrouve modifié tant quantitativement que qualitativement avec une diminution de Bacteroidetes et une augmentation de Firmicutes (25) (27).

Cette dysbiose intestinale associée à l'augmentation de perméabilité de la muqueuse entraînent une translocation des produits bactériens vers le foie via la circulation porte. Les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) issus de ces bactéries vont pouvoir également activer certains PRR au niveau des cellules de Kupffer. Parmi ces PRR, il a été montré que l'activation de récepteurs Toll-Like (TLR – *Toll Like Receptors*), dont le TLR2, le TLR4 et le TLR9, joue un rôle dans la pathogenèse de la NAFLD.

Dans le sens foie-intestin, les acides biliaires, synthétisés par les hépatocytes et atteignant l'intestin par les voies biliaires, détériorent la muqueuse intestinale directement et indirectement en activant le récepteur nucléaire FXR (récepteur farnésoïde X) (25) (27).

L'activation des PRR par les PAMP et les DAMP contribue à la propagation de l'inflammation, via la production de cytokines pro-inflammatoires, la synthèse d'espèces réactives de l'oxygène et à la formation de l'inflammasome. En effet, les protéines de l'inflammasome comme NLRP3 sont assemblées suite à l'activation par ces produits bactériens de NLRs, récepteurs de type NOD (domaine d'oligomérisation nucléotidique), appartenant aussi à la famille des PRR. L'activation de l'inflammasome

est à l'origine d'un phénomène de mort cellulaire particulier appelé pyroptose hépatocytaire, suite à l'activation de la caspase-1 et le clivage de la gasdermine D, conduisant à la formation de pores au niveau de la membrane plasmique, la perte de l'intégrité membranaire et la lyse cellulaire. Ces pores permettent également la libération d'IL-1 et d'IL-18 matures. Les cytokines participent notamment à l'activation des deux principales voies de signalisation impliquées dans l'inflammation, c'est-à-dire le facteur de transcription NF- κ B et la protéine kinase JNK (25) (27) (31) (33).

1.4.4 Facteurs génétiques

Les facteurs métaboliques et environnementaux ne suffisant pas à expliquer à eux seuls la pathogenèse de la NAFLD, la communauté scientifique s'est intéressée au rôle de la génétique dans l'instauration et l'évolution de la maladie. Plusieurs gènes semblent avoir une influence tant sur les mécanismes inflammatoires, métaboliques et oxydants que sur l'insulinorésistance et le diabète de type 2 (26) (27).

Le gène PNPLA3 (ou adiponutrine) est le plus étudié et probablement le plus impliqué dans la pathogenèse de la NAFLD. Il code pour une protéine, située dans le foie et dans le tissu adipeux, à activité lipase, permettant l'hydrolyse des TG. Selon une étude d'association pangénomique, chez les patients présentant le polymorphisme rs738409 – I148M du gène PNPLA3, la teneur en graisse hépatique est doublée par rapport aux sujets ne portant pas cet allèle. Le variant I148M prédispose à l'accumulation de TG dans les hépatocytes et donc à la stéatose hépatique ainsi qu'au développement des lésions hépatiques, sans pour autant impacter la sensibilité des cellules à l'insuline. Les gouttelettes lipidiques se multiplient dans le foie tandis que le nombre de VLDL diminue. Ce polymorphisme génétique

régule à la baisse les taux d'adiponectine et modifie l'activité des cellules étoilées hépatiques, conduisant à un mécanisme pro-inflammatoire et pro-fibrogénétique, caractéristique de l'évolution de la stéatose vers la NASH. Cependant, l'impact de ce polymorphisme est modulable ; en effet il a été montré chez les enfants que ses effets étaient amoindris par la perte de poids et l'activité physique (25) (26) (27).

Le gène TM6SF2 est impliqué dans la régulation de la synthèse lipidique hépatique et le variant rs58542926 c.449 C > T (E167K) est associé à une perte de fonction de la protéine codée : il en résulte une diminution de sécrétion de VLDL donc une accumulation de TG intra-hépatiques, une inflammation et une progression vers la fibrose (25) (26) (27).

1.5 Diagnostic

Considérant la prévalence de la pathologie ainsi que ses conséquences sur le plan socio-économique et médical en termes de morbi-mortalité, il est essentiel de diagnostiquer la NAFLD de manière précoce afin de prévenir le développement d'une fibrose avancée.

Néanmoins, elle reste difficile à diagnostiquer étant donné que la plupart des techniques de routine actuelles ne sont pas capables de distinguer stéatose et NASH (17).

La maladie est le plus souvent révélée de manière fortuite par l'imagerie abdominale détectant de la graisse hépatique ou suite à l'apparition de complications métaboliques. Généralement, les transaminases hépatiques sont élevées (34). Cependant, une biopsie hépatique est nécessaire au diagnostic et à l'évaluation de la

gravité de la NASH : elle permet de déterminer l'activité nécro-inflammatoire ainsi que le degré de la fibrose (35).

1.5.1 Méthode invasive : la biopsie hépatique

Il s'agit du gold standard dans le diagnostic de certitude de la NAFLD. La biopsie différencie la stéatose de la NASH. Elle n'est en revanche pas utilisée en routine quotidienne du fait de son coût élevé et de son caractère invasif et donc du risque de complications et de saignement (17) ; elle est plutôt réservée aux patients à haut risque de progression vers la NASH (19).

Cette technique permet une analyse histologique du foie puisque l'observation microscopique des tissus met en évidence le degré de stéatose, l'inflammation, la ballonnisation des hépatocytes mais aussi la fibrose, facteur pronostique principal de la NASH (36). La présence de ces quatre éléments à la biopsie confirme le diagnostic de NASH (19). La biopsie permet donc d'évaluer la gravité mais aussi de prédire l'évolution de la maladie (37).

La classification de la NAFLD repose sur deux scores définissables à partir de la biopsie :

- Le NAS (NAFLD Activity Score), créé en 2005, est un score compris entre 0 et 8 prenant en compte le degré de stéatose (0-3), le gonflement (0-2) et l'inflammation lobulaire (0-3). Cependant, il ne tient pas compte de la présence de fibrose et donc du risque de mortalité hépatique et globale. De plus, il existe une forte variabilité inter-observateur.
- Le SAF (Steatosis, Activity, Fibrosis), score plus récent, évalue de manière indépendante la stéatose (0-3), l'activité (0-4) et la fibrose (0-4). L'activité est

caractérisée par le ballonnement et l'inflammation. Lorsque les trois paramètres constituant le SAF sont ≥ 1 , le diagnostic de NASH est confirmé. Ce score permet une meilleure reproductibilité et a l'avantage de prendre en considération la fibrose (25).

1.5.2 Méthodes non invasives

Actuellement, les méthodes non invasives sont validées pour diagnostiquer une fibrose ; en revanche la plupart ne le sont pas pour le diagnostic de NASH puisqu'elles ne permettent pas de mettre en évidence les lésions nécro-inflammatoires du foie.

I. Imagerie

a) Échographie

C'est l'examen d'imagerie de référence en cas de suspicion de NAFLD, révélant un foie hyperéchogène (38). L'utilisation des ultrasons dans le dépistage de la NAFLD en pratique courante est intéressante en raison de leur commodité et de leur coût peu élevé, cependant leur performance diagnostique reste limitée. Bien que la sensibilité de cette technique soit supérieure à 90% quand la stéatose intéresse plus de 30% du foie, lorsque celle-ci est inférieure à 30% la sensibilité diminue considérablement. De plus, le diagnostic peut être faussé chez un patient obèse puisque la stéatose peut être surestimée du fait de l'atténuation du faisceau ultrasonique par la graisse corporelle plutôt que par la graisse hépatique. L'interprétation de l'échographie est également soumise à la variabilité inter-observateurs, ce qui peut donc influencer le diagnostic (39) (40).

b) Tomodensitométrie (TDM)

Cette technique présente comme avantages une rapidité d'acquisition, une analyse simple ainsi que des résultats quantitatifs donc objectifs. Néanmoins, comme pour l'échographie, la précision du diagnostic diminue avec une gravité moindre de la stéatose. Pour une concentration hépatique graisseuse entre 10 et 20%, la sensibilité diagnostique de la TDM varie de 52 à 62%. De plus, l'atténuation du faisceau de rayons X dépend de la densité hépatique qui, elle-même, peut être influencée par la présence de fer, de cuivre et d'autres ions métalliques. Enfin, l'exposition aux rayonnements ionisants limite l'utilisation de cette méthode comme examen de dépistage ou de diagnostic précoce (7).

c) Fraction de graisse en densité de protons estimée par imagerie par résonance magnétique (IRM-PDFF)

Alors que l'IRM traditionnelle est imprécise pour mesurer la stéatose, l'IRM-PDFF quantifie directement la teneur adipeuse du foie et permet ainsi la détection de la totalité de la graisse hépatique. Elle est considérée comme la plus sensible et la plus spécifique des méthodes d'imagerie dans le diagnostic de la NAFLD. De plus, l'âge, le sexe, l'IMC ou encore les anomalies hépatiques concomitantes des patients n'affectent pas l'intensité du champ magnétique. En revanche, le temps d'acquisition de l'IRM-PDFF est long et son coût élevé (39) (41).

II. Sérologie

a) Marqueurs sériques de la stéatose

- **FLI (Fatty Liver Index)**

Le FLI est un indice prenant en considération quatre facteurs : l'IMC, le tour de taille, le taux de triglycérides et de γ -GT. Il est compris entre 0 et 100 : un score < 30 prédit l'absence de NAFLD tandis qu'un score > 60 est en faveur d'une stéatose. Cependant, le FLI distingue mal la stéatose modérée à sévère de la stéatose légère (38).

- **SteatoTest**

Le SteatoTest est un panel de biomarqueurs comprenant l'apha-2-macroglobuline, l'haptoglobine, l'apolipoprotéine-A1, la bilirubine totale, le γ -GT, l'ALAT, l'ASAT, la glycémie à jeun, le cholestérol total et les TG. Il est utilisé pour prédire le degré de graisse hépatique. Une méta-analyse a évalué la précision du SteatoTest dans la stéatose modérée à sévère comme acceptable pour une application clinique. Néanmoins, la formule n'a pas été révélée et aucune étude classique prospective ou à grande population n'a déterminé son exactitude et son efficacité (38) (39).

- **Indice de stéatose hépatique (HSI)**

Le HSI a été créé en 2010 à partir d'une étude transversale incluant 10 000 individus qui participaient à un bilan de santé (39). Il dépend de l'IMC (indice de masse corporelle), de la présence de diabète et du rapport alanine aminotransférase (ALAT) / aspartate aminotransférase (ASAT) (38). Un score inférieur à 30 permet d'exclure

une NAFLD tandis qu'au-delà de 36, la NAFLD est avérée (39). La sensibilité et la spécificité de ces deux seuils, 30 et 36, sont supérieures à 90%. Cependant, chez les enfants obèses, l'indice de stéatose hépatique est moins précis avec une sensibilité de 67% et une spécificité de 62%. De plus, comme le FLI, le HSI distingue mal la stéatose modérée à sévère de la stéatose légère (38).

b) Marqueurs sériques de la NASH

Les méthodes d'imagerie actuelle ne permettant pas de discriminer une stéato-hépatite d'une stéatose simple, des marqueurs sérologiques de substitution ainsi que des méthodes de tests sérologiques uniques ont été étudiés pour prédire la NASH.

Même si les marqueurs de substitution étudiés tels que le TNF- α (facteur de nécrose tumorale alpha), l'IL-6, la CRP (protéine C réactive), la pentraxine, la ferritine, la SPEA (serum prolidase enzyme activity) et le sRAGE prédisent une inflammation hépatique, ceux-ci nécessitent encore une validation externe approfondie (40).

- **Cytokeratin-18 (CK18)**

Le test unique le plus étudié concernant le diagnostic de NASH est la cytokératine-18 (CK-18), une phosphoglycoprotéine des filaments intermédiaires. Les fragments circulants de CK-18 marquent l'apoptose des hépatocytes et sont des prédictors modestes de la NASH puisqu'ils présentent une sensibilité de 66% et une spécificité de 82% (39) (40).

- **NASH Test**

Ce système de notation regroupe des facteurs démographiques (âge, sexe et IMC), des marqueurs sériques (aminotransférases et lipides) ainsi que la macroglobuline alpha-2, l'apolipoprotéine A1 et l'haptoglobine. La sensibilité et la spécificité du test NASH sont respectivement de 33% et 94%. Ce test a été validé sur un nombre réduit de patients et doit être expérimenté et confirmé à plus large échelle dans le futur (41).

c) Marqueurs sériques de la fibrose

Les hépatopathies chroniques, générant une inflammation permanente ainsi que des lésions tissulaires, augmentent la masse fibrotique du foie. La fibrose hépatique est à l'origine de nombreuses perturbations telles que des dysfonctions métaboliques, un risque accru de carcinome hépatocellulaire et des symptômes associés à l'hypertension portale, notamment une ascite et des varices gastro-œsophagiennes (2). De plus, la présence d'une fibrose augmente la mortalité globale chez les patients atteints de NAFLD. Il est donc important de pouvoir diagnostiquer la fibrose précoce au moyen de marqueurs non invasifs (38).

L'évaluation de la fibrose hépatique se fait soit par des marqueurs « indirects » reflétant des altérations de la fonction hépatique soit par des marqueurs « directs » du renouvellement de la matrice extracellulaire (41).

- **Marqueurs directs**

Quand les lésions du foie deviennent trop importantes, les cellules hépatiques sont remplacées par une matrice extracellulaire composée de collagène I, III et IV, de fibronectine, d'onduline, d'élastine, de laminine, d'hyaluronane et de protéoglycane 3.

Lorsque la production de collagène augmente, celle d'acide hyaluronique aussi : c'est donc un marqueur spécifique de la synthèse de matrice extracellulaire, donc de la fibrose (41).

Les autres biomarqueurs exclusifs de la fibrose sont le procollagène de type III (PIIINP), le précurseur de la protéine C3 (PRO-C3) qui est un marqueur du pro-peptide N-terminal du collagène III et TIMP1, reflétant le remodelage de la matrice tissulaire (38).

- **Marqueurs indirects**

Score de fibrose NAFLD (NFS)

Ce biomarqueur regroupe six facteurs cliniques et biochimiques aisément mesurables : l'âge, l'hyperglycémie, l'IMC, le taux de plaquettes, l'albumine et le ratio AST/ALT. Les valeurs prédictives positive et négative du NFS sont supérieures à 90% ; ainsi en ayant recours à cette méthode diagnostique, 75% des biopsies pourraient être évitées (38). De plus, les pays occidentaux ont validé en externe ce score, attestant de sa fiabilité par rapport à d'autres systèmes de prédiction de la fibrose et en en faisant le biomarqueur non invasif le plus courant pour déterminer la gravité de la fibrose (40).

Indice de rapport AST/plaquettes (APRI)

L'APRI a été utilisé dans un premier temps pour déterminer la sévérité de la fibrose dans l'hépatite C en tenant compte de deux facteurs, le taux d'AST et la numération plaquettaire (42). Cependant, malgré une spécificité élevée, cet indice présente une sensibilité relativement faible, allant de 33 à 73% selon les seuils (38).

FibroTest

Ce test combine cinq marqueurs biochimiques sériques : l'alpha-2-macroglobuline, l'apolipoprotéine A1, l'haptoglobine, la γ -glutamyltranspeptidase et la bilirubine. Son score est corrélé au degré de fibrose et a été validé pour le dépistage de fibrose sévère mais pas pour celui d'une fibrose légère à modérée. Par ailleurs, la positivité du FibroTest peut être modifiée par une inflammation aiguë entraînant une élévation des taux sanguins d'alpha-2-macroglobuline et d'haptoglobine, ou par le syndrome de Gilbert ou la cholestase qui provoquent une élévation de la bilirubine (43) (44).

BARD

Le score BARD s'appuie sur trois éléments (IMC > 28, rapport AST / ALT > 0,8 et diabète) pour prédire une fibrose hépatique avancée. Notamment grâce à sa valeur prédictive négative supérieure à 95%, ce marqueur permet d'exclure les patients sans fibrose avancée (2).

FIB-4

FIB-4 est un panel de biomarqueurs comprenant l'âge, la numération plaquettaire, l'AST et l'ALT. Il est utilisé pour évaluer la sévérité de l'atteinte fibrotique et a été initialement validé chez des patients co-infectés par le VIH et le VHC (38) (44).

III. Élastographie

La mesure de l'élasticité hépatique permet de détecter la présence de fibrose, caractérisée par une diminution de l'élasticité ou une augmentation de la rigidité. On

distingue deux sortes d'élastographie ultrasonore : l'élastographie de déformation (SE) et l'élastographie par ondes de cisaillement (SWE).

L'élastographie de déformation ou élastographie en temps réel est basée sur la compression des tissus par l'opérateur, permettant d'obtenir un résultat qualitatif de la rigidité hépatique.

L'élastographie par ondes de cisaillement analyse quantitativement la rigidité puisqu'elle permet de mesurer directement la vitesse de l'onde de cisaillement (mètres / seconde) ou le module de Young (kPa) après que la machine ait donné une impulsion mécanique ou acoustique (44). L'élastographie transitoire TE (Fibroscan) utilise des ondes de cisaillement à basse fréquence, dont la vitesse est corrélée à l'élasticité du tissu : elle est proportionnelle à sa rigidité et est exprimée en kPa. L'examen est rapide et objectif (absence de variabilité inter-observateur) et le résultat immédiat (43) (44). La sensibilité de TE est bonne, en revanche sa capacité à discriminer les stades de fibrose légère, notamment F0-F1 de F2, est moins bonne (44).

1.6 Thérapeutique

1.6.1 Régime alimentaire et activité physique

À l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement curatif de la NAFLD. L'alimentation et l'activité physique restent, comme pour la prise en charge du diabète de type 2, les deux principaux axes sur lesquels agir en première intention (38). On considère qu'une perte de poids de l'ordre de 5% diminue la stéatose alors qu'une action sur la NASH est observée à partir de 5-7%. Pour un retentissement sur la fibrose, une perte de

poids d'au moins 10% est attendue. Les apports en sucres quotidiens doivent être maintenus en-dessous de 10% de l'apport calorique total. Le fructose, principal sucre en cause dans la stéatose, la résistance à l'insuline et l'obésité, doit notamment être limité. Les graisses saturées et oméga 6 sont à proscrire ; au contraire les aliments riches en oméga 3 (acides gras polyinsaturés) comme le poisson et l'huile de poisson sont à privilégier étant donné qu'ils améliorent le profil lipidique et diminuent le stress oxydatif et la synthèse de cytokines (45). De plus, une diminution de la stéatose par une alimentation enrichie en oméga 3 a été constatée dans une étude (8).

La perte de poids doit se faire de manière progressive afin d'éviter une aggravation de l'altération du foie qui a été observée en cas de perte de poids trop rapide. La perte de poids permet aussi d'agir sur le risque cardiovasculaire (46).

L'exercice physique d'endurance et de haute intensité, en plus de participer à la perte de poids, permet de moduler l'inflammation et d'améliorer la sécrétion d'insuline ainsi que la sensibilité des tissus à l'insuline (47).

1.6.2 Traitements pharmacologiques

Le plus puissant prédicteur de mortalité hépatique dans la NAFLD étant la présence d'une fibrose hépatique de stade 2 au moins, un traitement pharmacologique devrait être mis en place chez ces patients, autrement dit en stade de NASH sévère. En revanche, selon l'American Association for the Study of Liver Disease (AASLD), le traitement ne devrait pas s'appliquer dans le cas de stéatose simple ou de NASH de stade 0 (38).

I. Sensibilisateurs à l'insuline

a) Metformine

La metformine, antidiabétique oral, diminue la résistance à l'insuline en ralentissant la lipogenèse, la néoglucogenèse hépatique et la réabsorption intestinale de glucose. Elle favorise la perte de poids, réduit le risque d'accidents cardiovasculaires, cependant elle n'a pas montré son efficacité en termes d'amélioration de l'histologie hépatique. Ainsi, dans la prise en charge de la stéatose hépatique, la metformine seule ne paraît pas efficace, elle aurait plutôt sa place dans une multi-thérapie (46) (48) (49).

b) Analogues de GLP-1

Le GLP-1 ("*Glucagon like peptide 1*") est une hormone produite par les cellules intestinales qui favorise la synthèse d'insuline et inhibe celle de glucagon. Ses agonistes auraient un intérêt dans le traitement de la stéatose hépatique car ils augmentent la sensibilité des cellules périphériques à l'insuline. En tant qu'incrétinomimétiques, ils réduisent l'appétit et contribuent ainsi à une perte de poids intéressante dans la NAFLD (34) (46) (50).

L'étude LEAN a permis de mettre en évidence les bénéfices du liraglutide, analogue GLP-1, notamment une amélioration de la sensibilité à l'insuline, une réduction de la lipogenèse et de la néoglucogenèse hépatique et une résolution histologique de la NASH (46) (48) (50).

II. Agents anti-oxydants

a) Vitamine E

La vitamine E a été étudiée dans le traitement de la NASH pour son action sur le stress oxydant. Elle a été associée sur le long terme (96 semaines) à une dose de 800 UI / j à une réduction des enzymes hépatiques et a démontré un effet bénéfique sur la stéatose, l'inflammation et le ballonnement hépatocellulaire mais pas sur la fibrose. Cette supplémentation à haute dose a cependant démontré une augmentation de la mortalité toutes causes confondues, il semblerait donc plus approprié de l'utiliser à une dose de 400 UI / j (46) (48) (49).

b) Glutathion

Une étude japonaise a montré qu'une dose quotidienne de 300 mg de glutathion, peptide anti-oxydant, durant 4 mois avait un effet bénéfique chez des patients atteints de stéatose hépatique sans fibrose sévère et sans diabète non contrôlé : une diminution des taux d'ALAT et de la stéatose a été constatée. Il reste à mener des études à plus grande échelle pour étayer ce premier essai (48).

III. Agonistes de PPAR

a) Thiazolidinediones

Les thiazolidinediones sont des agonistes du récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxydase (PPAR γ). Ils permettent une élévation de l'adiponectine plasmatique et donc une amélioration de la sensibilité à l'insuline. Une action anti-stéatosique et anti-inflammatoire avec une action sur la fibrose ainsi qu'un effet

bénéfique sur les taux d'aminotransférases ont été associés à la pioglitazone. Cependant, des effets indésirables peuvent apparaître dans le temps tels que prise de poids, rétention d'eau, ostéoporose, cancer de la vessie, insuffisance cardiaque congestive et maladies cardiovasculaires (34) (48) (49).

b) Elafibranor

C'est un agoniste des récepteurs PPAR α / δ , il agit sur la NASH en exerçant une action anti-inflammatoire, en augmentant l'oxydation des acides gras et en améliorant la sensibilité à l'insuline. Un essai de phase IIB a démontré qu'une administration quotidienne de 120 mg d'Elafibranor pendant un an diminuait significativement l'inflammation hépatique chez des patients atteints de NASH avec un NAS \geq 4, sans pour autant résoudre la NASH. Une étude de phase III est actuellement en cours afin d'évaluer et de confirmer l'efficacité de la molécule (34) (46) (48).

IV. Agoniste du récepteur farnésoïde X (FXR)

L'acide obéticholique (OCA) est un agoniste du récepteur nucléaire FXR à l'acide biliaire : l'activation de ce récepteur inhibe la lipogenèse, la néoglucogenèse hépatique, réduit la stéatose et augmente la sensibilité à l'insuline. Un essai multicentrique a permis de montrer les bénéfices de l'OCA chez des patients atteints de NAFLD avec une réduction du score NAS ainsi qu'une diminution de la stéatose et de la fibrose (46) (48) (50).

1.6.3 Traitement chirurgical

Lorsque la perte de poids est insuffisante ou difficile à obtenir par le rééquilibrage alimentaire et l'activité physique, il peut être proposé à certains patients le recours à la chirurgie bariatrique de l'intestin grêle. En plus d'une perte de poids durable, celle-ci améliore l'histologie et les enzymes hépatiques, réduit l'inflammation et le risque cardiovasculaire. La perte de poids engendre une diminution du tissu adipeux et par conséquent de la résistance à l'insuline, ce qui permet une amélioration du diabète et de la stéatose.

Cette solution est proposée chez des patients obèses avec un IMC d'au moins 35 kg/m². Néanmoins, l'intervention chirurgicale n'est pas sans risque puisqu'une insuffisance hépatique peut se développer en périopératoire, notamment chez les patients cirrhotiques (46) (51) (52) (53).

1.6.4 Transplantation hépatique

La NAFLD est la deuxième indication, après le virus de l'hépatite C, à la transplantation hépatique aux États-Unis et pourrait devenir la première d'ici 2030. Sont éligibles à ce moyen de dernier recours les patients atteints de NASH à un stade terminal (cirrhose) ou ayant développé un CHC (54). Les patients bénéficiant d'une greffe hépatique suite à une NASH à un stade cirrhotique ont un taux de survie équivalent à des patients greffés pour d'autres causes (55). Néanmoins, la transplantation ne remédiant pas au syndrome métabolique et aux comorbidités, il existe un risque de récurrence après la transplantation. C'est pourquoi le contrôle du poids et de l'alimentation doivent persister même après la greffe (46).

2 RELATIONS ENTRE MICROBIOTE ET NAFLD

2.1 Rôle du microbiote intestinal dans la NAFLD

Comme vu dans le 1.4.3, une altération du microbiote intestinal peut être à l'origine ou, du moins, participer au développement de la NAFLD. Les flores bactériennes digestive et hépatique sont en étroite corrélation depuis la vie foetale. Une relation de symbiose s'établit entre le microbiote intestinal et l'hôte dans des conditions nutritives et physiques normales : le métabolisme et le fonctionnement du système immunitaire dépendent de cet équilibre. Un déséquilibre de ce système ou dysbiose aurait des répercussions sur la santé de l'hôte (47), en perturbant les activités métaboliques et la réponse immunitaire, contribuant à l'obésité et aux complications associées, notamment la résistance à l'insuline et le diabète de type 2 ainsi que la stéatose hépatique (56).

2.1.1 Qu'est-ce-que le microbiote intestinal ?

Joshua Lederberg a défini pour la première fois le microbiote intestinal comme étant « la communauté écologique des microorganismes commensaux, symbiotiques et pathogènes qui partagent littéralement notre espace corporel et ont été ignorés en tant que déterminants des maladies de santé » (57). Le microbiote intestinal recense 10^{14} micro-organismes, comprenant des bactéries, protozoaires, archées, virus et champignons (58). Plus de 70% des micro-organismes du corps humain sont localisés dans le gros intestin (59).

Les cinq grands phyla constituant le microbiote intestinal sont les Firmicutes pour 79,4% (dont *Ruminococcus*, *Clostridium* et *Eubacteria*), les Bacteroidetes pour 16,9%

(*Prevotella*, *Porphyromonas*) et, bien moins représentés, les Actinobacteria pour 2,5% (dont le chef de file est *Bifidobacterium*), les Proteobacteria (dont les Entérobactéries) pour 1% et enfin Verrumicrobia à 0,1%. Un microbiote intestinal sain contient de petites quantités de *Lactobacilles* et *Streptocoques* (phylum des Firmicutes) et d'*Escherichia coli* (Proteobacteria) (60).

Bien que la génétique participe à l'élaboration du microbiote intestinal, les facteurs environnementaux sont particulièrement importants. Notamment le type d'accouchement (par voie basse ou césarienne) et le type d'alimentation durant les deux premières années de vie : ces deux facteurs influenceront la composition du microbiote à l'âge adulte. Au cours de la vie, la composition du microbiote intestinal sera influencée par l'âge, l'alimentation, les médicaments et l'environnement avec des variations observées d'un individu à l'autre (60).

Physiologiquement, le microbiote intestinal a un rôle dans l'établissement et la maturation du système immunitaire et dans la protection face à des agents pathogènes. Il participe également à l'intégrité de la barrière intestinale ainsi qu'aux activités métaboliques permettant l'extraction énergétique des nutriments et la libération de métabolites utilisés par l'hôte. Le métabolisme glucidique, via l'intervention d'enzymes générées par la flore intestinale, transforme les polymères glucidiques en oses, eux-mêmes dégradés en pyruvate par les bactéries glycolytiques, finalement fermenté en acides gras à chaînes courtes (AGCC). Le métabolisme protéique est quant à lui réalisé par les bactéries protéolytiques qui dégradent les protéines en peptides, eux-mêmes hydrolysés en acides aminés qui seront eux aussi fermentés en AGCC mais également en ammoniac, qui est soit absorbé par le côlon puis excrété sous forme d'urée dans les urines soit utilisé comme substrat par les bactéries intestinales pour la production d'azote, utile à la synthèse d'acides aminés.

Les composés phénoliques et indoliques également issus du métabolisme protéique et ayant un potentiel toxique sont absorbés dans le côlon, détoxifiés puis éliminés dans les urines. Le métabolisme lipidique permet la transformation des acides gras par les bactéries intestinales. Le cholestérol, majoritairement issu de la bile, est métabolisé en coprostanol, produit ensuite éliminé dans les fèces. Les acides biliaires entrent à 95% dans le cycle entéro-hépatique tandis que les 5% restants sont transformés en acides biliaires secondaires par les bactéries constituant la flore intestinale (61).

2.1.2 Dysbiose intestinale dans la NAFLD

De nombreuses études suggèrent qu'un microbiote intestinal perturbé (dysbiose) participe au développement de l'obésité et par conséquent à celui de la NAFLD : le rapport Firmicutes / Bacteroidetes semble être particulièrement impliqué dans la pathogénèse (58). En effet, des chercheurs ont prouvé que des souris obèses déficientes pour le gène de la leptine (hormone de la satiété) présentaient un taux bien trop important de Firmicutes et un taux très diminué de Bacteroidetes. L'implantation du microbiote de ces souris obèses chez des souris axéniques, exemptes de tout micro-organisme, entraînait une élévation de l'extraction énergétique des nutriments, une prise de poids mais également une accumulation de graisse hépatique. Comparativement à un individu mince, dans le microbiote fécal d'un patient obèse, des proportions diminuées de Bacteroidetes et augmentées de Firmicutes sont retrouvées. Ces éléments sont en faveur d'une étroite corrélation entre microbiote intestinal et obésité / NAFLD (56) (61).

Cet état dysbiotique caractéristique de NAFLD peut être la conséquence de plusieurs mécanismes parmi lesquels une alimentation trop grasse et trop sucrée, la prise répétée d'antibiotiques ou encore la sédentarité.

2.1.3 Modifications de la composition du microbiote intestinal

I. Par l'alimentation

Les changements alimentaires, qu'ils soient quantitatifs ou qualitatifs, peuvent impacter la composition et la répartition du microbiote intestinal. Selon les nutriments apportés par l'alimentation, les bactéries résidentes de l'intestin vont synthétiser des métabolites potentiellement impliqués dans la pathogénèse de la NAFLD (47). À chaque régime est associé un microbiote particulier (56).

Une alimentation à base de légumes et de fibres (glucides non digestibles) basée sur le modèle africain modifie la balance Firmicutes / Bacteroidetes avec une part relative plus importante de Bacteroidetes par rapport aux Firmicutes (47). De plus, le microbiote intestinal correspondant à ce régime est riche en espèces bactériennes des genres *Prevotella* et *Xylanibacter* (présentant des enzymes de dégradation des glucides non digestibles) et pauvre en entérobactéries pro-inflammatoires telles qu'*Escherichia* et *Shigella* (56).

Au contraire, un régime occidental gras et sucré est en faveur d'une élévation de Firmicutes et d'une diminution de Bacteroidetes (47). Dans ce régime, les glucides non digestibles du modèle africain sont remplacés par des glucides transformés tels que le fructose. Ce sucre, principalement métabolisé dans le foie, apparaît comme très impliqué dans la pathogénèse de la stéatose hépatique en perturbant notamment la

composition du microbiote intestinal avec une augmentation constatée d'*Erysipelotrichi* (47).

Les scientifiques se sont intéressés à *Akkermansia muciniphila*, une bactérie appartenant au phylum des Verrumicrobia : elle a été retrouvée en quantité nettement diminuée dans le microbiote intestinal de souris obèses et diabétiques. De plus, en administrant cette bactérie à des souris obèses et diabétiques, la prise de poids était deux fois moins importante que sans supplémentation par *Akkermansia muciniphila*, et cela sans modification du régime alimentaire ; et les souris ne présentaient plus d'insulinorésistance. Cette espèce bactérienne est en fait une composante du mucus protégeant l'épithélium intestinal du passage de bactéries présentes dans la lumière intestinale. L'administration chez l'animal d'*Akkermansia muciniphila* a augmenté l'épaisseur de la couche de mucus tandis que celle-ci s'est montrée diminuée chez les animaux obèses et diabétiques, avec une altération de la fonction barrière. Chez l'Homme, l'obésité et le diabète de type 2 ont aussi été associés à une quantité diminuée d'*Akkermansia muciniphila* dans le microbiote intestinal (62).

II. Par les antibiotiques

Une surexposition aux antibiotiques, en plus d'engendrer des antibio-résistances, a un effet délétère sur le microbiote intestinal (63). En effet, la prise répétée d'antibiotiques pendant l'enfance peut, à long terme, impacter la flore bactérienne intestinale et participer à la pathogénèse de l'obésité et de la NAFLD (58). Il a été prouvé que le microbiote de souris exposées à des antibiotiques subissait une perte d'espèces et de biodiversité, entraînant des conséquences néfastes sur le métabolisme des lipides et sur le développement du système immunitaire. Et c'est durant les deux premières

année de vie, alors que la vulnérabilité du microbiote intestinal est la plus importante, que sont majoritairement consommés les antibiotiques (63).

III. Par l'activité physique

Bien que les effets bénéfiques de l'exercice physique sur le contrôle de l'obésité et de la NAFLD aient été constatés, le lien entre activité physique et microbiote intestinal reste plus difficile à prouver. Ces dernières années, plusieurs études portant sur cette relation ont vu le jour et ont apporté des preuves émergentes.

Il apparaît que la flore bactérienne intestinale est plus diversifiée et enrichie en espèces bactériennes favorables à la santé (*Akkermansia* notamment) chez les sportifs en comparaison aux individus sédentaires. Cependant, les sujets sportifs diffèrent le plus souvent des sédentaires non seulement par la pratique d'une activité physique mais aussi par une alimentation équilibrée, qui joue un rôle prépondérant sur la composition du microbiote intestinal.

Afin d'isoler le rôle de l'activité physique sur le microbiote, trois études récentes ont examiné l'impact d'un exercice régulier sur la flore intestinale sans changement de l'alimentation : elles ont toutes montré des modifications du microbiote révélant notamment une augmentation d'espèces de Bacteroidetes et de Verrucomicrobia (*Akkermansia*).

Il s'agit en fait d'une relation bidirectionnelle entre l'activité physique et le microbiote intestinal. D'une part, la pratique d'un exercice régulier influence la composition de la flore intestinale ; et d'autre part, la composition et le métabolisme du microbiote intestinal améliorent la digestion et la récolte énergétique au cours de l'activité.

Lors d'un exercice physique anaérobie, les muscles libèrent du lactate, alors utilisé par certaines bactéries intestinales qui sécrètent ensuite des métabolites comme le propionate, participant à améliorer les performances physiques.

Selon l'OMS, une moyenne hebdomadaire de 150 minutes d'exercice d'intensité modérée suffirait pour modifier la composition du microbiote intestinal (64).

2.1.4 Mécanismes impliqués

I. Altération de la perméabilité intestinale et translocation bactérienne

L'un des mécanismes-clé impliquant le microbiote intestinal dans la progression de la NAFLD est l'augmentation de la perméabilité de la muqueuse intestinale, qui entraîne une translocation bactérienne (56). Différentes études sur des patients atteints de NAFLD ont montré que l'augmentation de la perméabilité intestinale était corrélée à une prolifération bactérienne intestinale ou *small intestinal bacterial overgrowth* (SIBO) (65).

Nous avons vu que dans un contexte d'obésité et de diabète, la présence diminuée d'*Akkermansia muciniphila* dans la couche de mucus intestinal était à l'origine d'un amincissement de celle-ci, réduisant ainsi son efficacité en tant que barrière physique. Par ailleurs, la diminution d'*Akkermansia muciniphila* est corrélée à une baisse de production de RegIII γ (regenerating islet-derived 3-gamma), une lectine de type C à activité antimicrobienne envers les bactéries à Gram positif : les bactéries ne sont donc plus maintenues à distance des cellules épithéliales intestinales et peuvent ainsi coloniser la surface de la couche de mucus (62).

Les jonctions serrées de l'intestin sont formées par des protéines transmembranaires telles que les claudines, l'occludine et la tricelluline qui relient les cellules adjacentes au cytosquelette d'actine via les protéines de zonula occludens (ZO), notamment ZO-1, ZO-2 et ZO-3 (66). Chez des souris obèses, une perméabilité augmentée de la barrière intestinale a été constatée, en lien avec des altérations importantes de la distribution de l'occludine et de ZO-1 (67).

Les lipopolysaccharides (LPS) ou endotoxines sont transloqués dans la circulation porte en passant entre les jonctions serrées de l'épithélium intestinal qui sont interrompues : c'est l'endotoxémie (65) et ce phénomène est accentué par la réduction de l'épaisseur de la couche de mucus engendrée par une diminution de l'abondance d'*Akkermansia muciniphila*, empêchant le maintien des bactéries dans la lumière intestinale (62). Ces LPS présents dans la membrane des bactéries à Gram - entraînent, en se liant aux TLR (TLR 4) au niveau du foie, la production de cytokines pro-inflammatoires et donc une inflammation. Il a même été démontré dans une étude menée par Werdam et ses collaborateurs la présence augmentée d'anticorps anti-LPS chez les patients atteints de NASH en comparaison aux patients sains, avec, de plus, une augmentation des taux d'anticorps corrélée à la gravité de la maladie.

II. Métabolites bactériens

Un autre phénomène entrant en jeu dans la progression de la NAFLD est le métabolisme de la choline : un régime riche en graisses modifie le microbiote intestinal en induisant une augmentation d'*Erysipelotrichi* (Firmicutes) et une diminution des gammaprotéobactéries. Cette dysbiose mène à une déficience en choline, qui est métabolisée dans le foie en TMAO (triméthylamine N-oxyde), un composé toxique

capable de perturber le métabolisme des acides biliaires et d'inhiber le récepteur FXR (47) (56). La perturbation du métabolisme de la choline entraîne également une réduction de la sécrétion par le foie de VLDL, accentuant l'accumulation hépatique de lipides (68)

Un autre métabolite toxique est impliqué dans la pathogénèse de la NAFLD : il s'agit de l'éthanol endogène, produit par fermentation bactérienne de certaines espèces de *Lactobacillus*, *Escherichia* ou encore *Ruminococcus* et générant un stress oxydant et une inflammation (56) (69). Une étude menée par Zhu et ses collaborateurs sur des enfants présentant une NASH a mis en évidence des éthanolémies plus élevées en rapport avec des bactéries productrices d'éthanol plus nombreuses que chez des enfants sains (69).

Enfin, un dernier type de métabolites bactériens très étudiés sont les acides gras à chaîne courte (AGCC) tels que l'acétate, le butyrate et le propionate. Ils sont obtenus par fermentation de fibres alimentaires par certaines bactéries intestinales et constituent une source énergétique pour l'épithélium intestinal favorisant l'intégrité de la barrière intestinale et protégeant ainsi de l'endotoxémie. Ils ont également un rôle bénéfique dans la réponse immunitaire, le métabolisme lipidique et le métabolisme glucidique en régulant positivement la sensibilité à l'insuline. Les AGCC contribuent ainsi de manière indirecte à une protection vis-à-vis de la NAFLD. En revanche, ces métabolites, et particulièrement l'acétate, ont la capacité d'atteindre le foie par la veine porte et donc d'impacter directement le métabolisme hépatique et de favoriser le développement de la NAFLD. Ainsi, l'impact physiopathologique des AGCC varie selon les auteurs puisqu'il est bénéfique pour certains et plutôt impliqué dans la pathologie pour d'autres (47) (70) (71).

2.1.5 Signalisation dépendante des TLR et cytokines pro-inflammatoires

Le microbiote intestinal constituant un réservoir de ligands des TLR, son altération et sa modification peut augmenter la quantité de ligands délivrés au foie. L'interaction entre ces ligands et les cellules hépatiques conduit ensuite à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. En conditions normales, le foie exprime un nombre minimal de TLR et présente une tolérance vis-à-vis des ligands des TLR. En cas de stéatose hépatique, le microbiote intestinal étant altéré et la perméabilité épithéliale augmentée permettant ainsi la translocation bactérienne dans la circulation porte, la stimulation des cellules hépatiques via l'interaction ligand / TLR est exacerbée et la production de molécules pro-inflammatoires augmentée (72).

I. Récepteurs TLR

Les TLR appartiennent à la superfamille des récepteurs reconnaissant des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PRR), et sont donc activés par liaison avec des déterminants moléculaires issus de bactéries ou de virus. L'activation de TLR, absente dans un foie sain, est initiée lorsque des déterminants moléculaires dérivant de bactéries sont déversés dans la circulation portale et atteignent le foie. Les scientifiques se sont accordés pour affirmer que le TLR2, le TLR4, le TLR5 et le TLR9 sont les principaux TLR impliqués dans la pathogenèse de la NAFLD.

Les LPS, constituants cellulaires des bactéries à Gram négatif, se lient aux TLR4 au niveau du foie. Chez des souris qui ont développé une NAFLD en ayant suivi un régime riche en graisse, riche en fructose, carencé en méthionine et choline ou carencé en acides aminés, des taux élevés de LPS circulants ont été constatés, associés à une

sur-expression de TLR4 et une synthèse accrue de cytokines pro-inflammatoires. Ces mêmes souris, traitées avec des LPS, présentent une aggravation des lésions hépatiques et une hausse des cytokines pro-inflammatoires. L'injection de LPS chez des souris nourries de manière conventionnelle a également déclenché une NAFLD. De plus, des souris déficientes pour le TLR4 ne développent pas de NAFLD, même en recevant des perfusions de LPS, et n'expriment pas de cytokines pro-inflammatoires. Les patients atteints de NAFLD présentent aussi des niveaux importants de LPS dans le sang. Toutes ces données suggèrent que l'interaction LPS / TLR4 joue un rôle majeur dans la pathogenèse de la stéatose hépatique.

Le TLR9 est un récepteur interagissant avec l'ADN bactérien : il est surexprimé dans le foie de patients atteints de NASH. En comparaison avec des souris nourries de façon standardisée, un régime pauvre en acides aminés a permis de déceler de l'ADN bactérien dans le sang de ces souris. Ce même régime pauvre en acides aminés a été administré à des souris WT ainsi qu'à des souris KO pour le TLR9 : ces dernières ont développé une stéatose, une inflammation et une fibrose moindre par rapport aux souris WT. Ainsi, le TLR9 semble impliqué dans la progression de la NASH, et plus précisément est corrélé à l'activation de l'inflammasome, favorisant la production d'IL-1 β .

Le TLR2, quant à lui, reconnaît le peptidoglycane et l'acide lipotéichoïque qui sont des constituants membranaires des bactéries à Gram positif comme les Firmicutes. Chez des souris obèses ayant suivi un régime riche en graisse, le taux de Firmicutes est augmenté, suggérant que leur microbiote est riche en ligands du TLR2. Un régime carencé en acides aminés normalement inducteur de stéatohépatite, administré à des souris déficientes pour le TLR2, conduit à une résistance à la NASH.

Enfin, le TLR5 reconnaît la flagelline bactérienne ; même si son rôle au niveau hépatique n'est pas élucidé, ce récepteur protège l'épithélium intestinal. Il est aussi impliqué dans le syndrome métabolique puisque des souris déficientes pour le TLR5 développent obésité et stéatose (72).

II. Cytokines pro-inflammatoires

En réponse à la stimulation des cellules hépatiques et à l'activation des TLR par des motifs bactériens, des cytokines pro-inflammatoires sont produites et constituent un mécanisme de protection vis-à-vis des pathogènes. Seulement, une stimulation hépatique permanente mène à une signalisation accrue et la synthèse continue de cytokines devient néfaste pour l'organisme (72). En induisant l'inflammation, l'apoptose et la fibrose hépatiques, les cytokines se révèlent être activement impliquées dans la pathogenèse de la NAFLD (73).

Au niveau hépatique, le TNF- α est produit en réponse à une stimulation TLR2-dépendante par les hépatocytes et les cellules de Kupffer. Il est également sécrété par le tissu adipeux et provoque une inflammation et une résistance à l'insuline. Cependant, bien que son implication dans la progression dans la NAFLD ait été démontrée dans de nombreuses études, d'autres n'ont trouvé aucune preuve de ce lien (73).

L'IL-1 β , tout comme le TNF- α , favorise la pathogenèse de la stéatose hépatique. Suite à l'interaction du TLR9 avec son ligand et à l'activation de l'inflammasome, l'IL-1 β est sécrétée et participe à l'accumulation de triglycérides dans les hépatocytes ainsi qu'à leur apoptose (73).

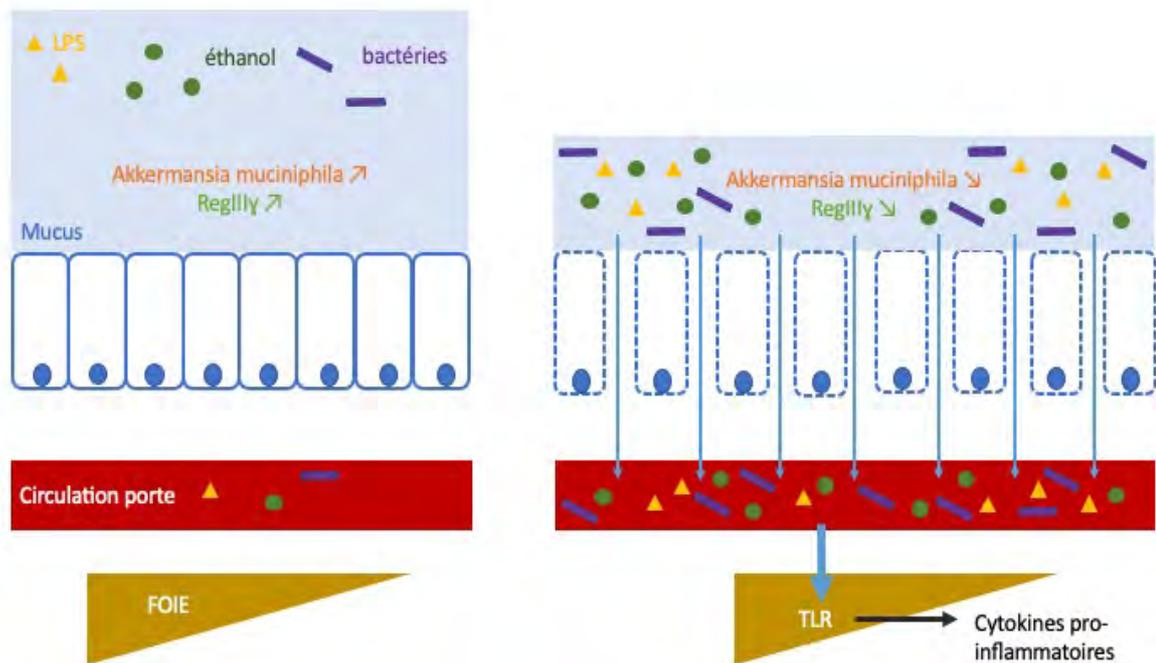


Figure 4 : « Modifications de la perméabilité intestinale en situation d'obésité »
(inspirée de (68) et (62))

À gauche : en conditions normales, une épaisseur importante de mucus est maintenue par la présence d'*Akkermansia muciniphila*, associée à une production de RegIII γ et à la présence de jonctions serrées ; ces facteurs contribuent à l'intégrité de la barrière intestinale et empêchent la translocation des bactéries et de leurs composants dans le système porte.

À droite : en situation d'obésité, une diminution de la quantité d'*Akkermansia muciniphila* entraîne un amincissement de la couche de mucus et une baisse de production de RegIII γ . De plus, les jonctions serrées sont interrompues et n'assurent plus leur rôle. L'altération de la barrière intestinale accentuée par la présence d'éthanol favorise la translocation bactérienne dans la circulation porte. Les produits bactériens interagissent avec les TLR hépatiques, induisant la synthèse de cytokines pro-inflammatoires favorisant la progression de la simple stéatose à la NASH.

2.2 Rôle du microbiote buccal dans la NAFLD

2.2.1 Qu'est-ce que le microbiote buccal ?

La cavité orale représente, après le microbiote intestinal, le deuxième plus grand et plus diversifié microbiote de l'organisme. Plus de 700 espèces bactériennes y sont présentes, dont 96% appartenant aux phyla des Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, Spirochetes et Fusobacteria. En conditions physiologiques, 1 mL de salive contient 100 millions de bactéries dont 200 à 300 espèces. Les micro-organismes cohabitent dans la cavité buccale et colonisent les surfaces dentaires ainsi que les muqueuses. La flore bactérienne buccale se forme lors d'un premier contact avec les bactéries vaginales maternelles au cours de l'accouchement. Néanmoins, plusieurs études ont proposé que l'inoculation bactérienne débutait *in utero* via la colonisation placentaire par des bactéries orales et intestinales de la mère. Plus tard, le microbiote oral est influencé par l'atmosphère, l'alimentation puis par l'éruption dentaire et les différentes dentitions (74) (75).

Cet écosystème oral contribue à de nombreuses fonctions telles que la digestion, la cavité buccale étant le premier organe de l'appareil digestif. Il participe également à l'éducation du système immunitaire et à la protection contre des agents pathogènes.

2.2.2 Dysbiose orale et NAFLD

Nous avons vu que des perturbations de la flore intestinale pouvaient avoir des conséquences néfastes sur le foie et pouvaient notamment favoriser le développement de la NAFLD. Cependant, il semblerait que des bactéries pathogènes de la cavité orale soient aussi impliquées dans la pathogenèse de la stéatose hépatique.

Une première hypothèse désormais admise était la translocation de bactéries orales dans la circulation systémique provoquant une bactériémie, la libération de LPS avec endotoxémie et sécrétion de cytokines pro-inflammatoires déclenchant une inflammation de bas grade. Par la suite, des mécanismes impliquant le microbiote intestinal ont été exposés. Un être humain avale chaque jour 1 à 1,5 L de salive, soit environ 10^{11} micro-organismes, ce qui implique que de nombreuses bactéries présentes dans la cavité orale sont transportées dans l'intestin (74).

Afin d'analyser ce lien entre cavité buccale, intestin et foie, ce sont principalement les bactéries parodontopathogènes, et plus particulièrement *Porphyromonas gingivalis*, qui ont été étudiées et mises en cause. En effet, après avoir administré des cultures de *Porphyromonas gingivalis* à des souris, des chercheurs ont constaté des perturbations de la composition de la flore intestinale ainsi que de l'intégrité de la barrière intestinale, entraînant une dissémination d'entérobactéries et une endotoxémie, associées à une résistance à l'insuline et à une inflammation adipeuse et hépatique (76). Cependant, étant donné que *Porphyromonas gingivalis* n'a pas été retrouvée dans le sang des souris lors de cette étude, il paraîtrait plus cohérent que c'est l'altération du microbiote intestinal causée par *Porphyromonas gingivalis* qui est en cause dans la NAFLD plutôt que l'impact direct de cette bactérie sur le foie (77). De façon contradictoire, une étude a montré que l'ADN de bactéries traversant l'épithélium parodontal est retrouvé dans le sang et dans le foie (78). Une autre bactérie parodontopathogène, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, altère le microbiote intestinal et contribue à la pathogenèse de la NAFLD (79).

Par ailleurs, une étude japonaise de grande taille a montré que les taux de γ -GT et d'ALAT étaient plus élevés chez des patients présentant des poches parodontales d'au moins 4 mm par rapport à des sujets sains. Une autre étude a démontré que des

patients atteints de NAFLD recevant des traitements parodontaux présentaient une amélioration de la fonction hépatique avec diminution des taux d'ASAT et d'ALAT. Ces deux études semblent être évocatrices d'une corrélation entre maladie parodontale et NAFLD (80).

2.2.3 Mécanismes moléculaires impliqués

I. Réponse inflammatoire aux bactéries parodontopathogènes

Récemment, le rôle des médiateurs pro-inflammatoires induits par les bactéries parodontopathogènes a été étudié et notamment leur impact sur le foie via l'activation de polynucléaires neutrophiles (PNN) et via la génération d'un stress oxydant.

Dans un contexte de parodontite, en réponse aux composés bactériens tels que le LPS ou le peptidoglycane, le parodonte sécrète des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-12, IL-6, TNF- α et INF- γ) participant à l'altération du tissu hépatique via leur translocation dans la circulation sanguine jusqu'au foie.

De plus, les LPS issus des bactéries orales à Gram négatif comme *Porphyromonas gingivalis*, en interagissant avec les récepteurs TLR2 et TLR4 des cellules de Kupffer, induisent à leur tour la production de cytokines pro-inflammatoires et d'espèces réactives de l'oxygène. En effet, bien que l'interaction des LPS avec les TLR2 soit moindre et ait lieu préférentiellement avec les TLR4, la preuve a été apportée chez la souris que l'interaction du TNF- α induit par le LPS avec la signalisation TLR2 favorisait la NASH (80). Par ailleurs, il a été proposé que la présence de plusieurs espèces lipidiques A dans le LPS de *Porphyromonas gingivalis* participe à l'activation des cellules via le TLR2 et le TLR4 (81). La liaison des LPS aux TLR4 favorise aussi l'expression de CD80 et CD86, des molécules de co-stimulation. Enfin, ces LPS ont

également la capacité d'activer les lymphocytes T qui vont alors générer des cytokines et amplifier l'inflammation hépatique.

De même, les peptidoglycanes des bactéries orales à Gram négatif et surtout à Gram positif activent d'une part les cellules immunitaires telles que les PNN et les lymphocytes NK en se liant aux récepteurs TLR2, et d'autre part stimulent les macrophages via d'autres récepteurs spécifiques, les NOD1 et 2 (82). Ces deux mécanismes conduisent à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires via l'activation du facteur nucléaire kappa B (NF- κ B) (80).

Face à une situation de stress, les cellules de l'organisme expriment des protéines de choc thermique ou HSP (Heat Shock Proteins), protéines antigéniques également exprimées par les bactéries (83). Les antigènes GroEL bactériens exprimés par les bactéries parodontopathogènes comme *Porphyromonas gingivalis* ou *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* appartiennent au groupe des HSP60 (80). En raison du fort degré d'homologie entre les GroEL (HSP60 bactériennes) et les HSP60 humaines (hHSP60) ou HSP60 du soi, l'anticorps anti-hHSP60 présente une réaction croisée avec l'antigène bactérien GroEL (80) (83). Ainsi, dans un contexte parodontal, les lymphocytes T spécifiques des HSP bactériennes peuvent également reconnaître les hHSP et les anticorps anti-HSP peuvent déclencher une réaction auto-immune, du fait de cette réaction croisée. L'activation des lymphocytes conduit ensuite à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, et surtout des quantités importantes d'IFN- γ (80) (84). Bien que l'implication des HSP dans des maladies systémiques telles que les maladies cardio-vasculaires ait été établie (83) (85), et malgré la forte homologie qui existe entre HSP humains et bactériens qui soutiendrait l'hypothèse que ces protéines jouent un rôle dans la progression de l'hépatite, des preuves doivent être apportées pour établir un lien entre HSP et NAFLD dans un contexte de maladie parodontale (80).

II. Stress oxydant

Le stress oxydant provient d'un déséquilibre entre synthèse et dégradation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), d'espèces réactives de l'azote (RNS) et de radicaux libres induisant la fragmentation de l'ADN, une peroxydation lipidique et une oxydation des protéines, responsables de dommages cellulaires. Les ROS sont particulièrement impliqués dans la toxicité hépatique.

Le malondialdéhyde (MDA), marqueur de peroxydation lipidique, est retrouvé à des taux très élevés dans le liquide gingival de patients atteints de parodontite en comparaison à des sujets sains, traduisant une quantité accrue de ROS.

Dans une étude menée en conditions hypoxiques ou inflammatoires, la stimulation de fibroblastes desmodontaux par des LPS issus de *Porphyromonas gingivalis* a déclenché une augmentation significative des taux de NADPH oxydase 4 (NOX4), associée à une élévation significative des ROS.

Une étude cas-témoins a révélé des taux significativement réduits de glutathion, de catalase et de sélénium, qui sont des composants antioxydants, chez les patients présentant une parodontite en comparaison avec les sujets sains.

Enfin, le traitement parodontal de patients atteints de parodontite chronique a permis de réduire le stress oxydant circulant de patients atteints de parodontite chronique.

Ces données suggèrent que les ROS induits par la parodontite peuvent être impliqués dans la progression NAFLD via leur diffusion dans la circulation (80).

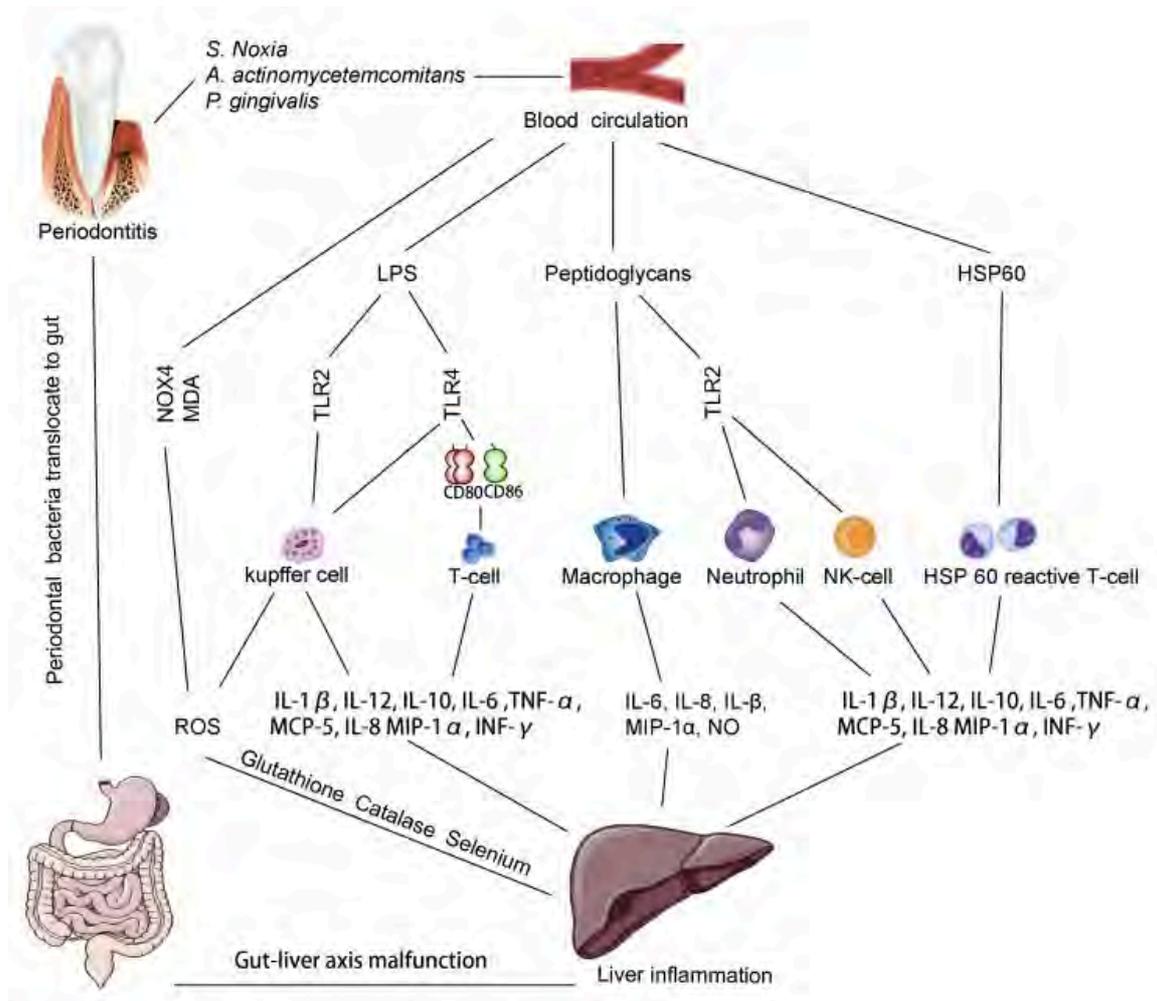


Figure 5 : « Rôle de la parodontite dans l'inflammation du foie » (80)

Les bactéries parodontopathogènes sont transloquées vers l'intestin, entraînant des modifications du microbiote intestinal et une perturbation de l'axe intestin-foie. Les composés bactériens (LPS et peptidoglycane) interagissent avec des récepteurs au niveau des cellules de Kupffer et des cellules immunitaires et induisent la production de médiateurs pro-inflammatoires. La HSP60 bactérienne active les lymphocytes T qui sécrètent aussi des cytokines pro-inflammatoires. La parodontite régule à la hausse les taux de NOX4 et de MDA et à la baisse les niveaux de glutathion, de catalase et de sélénium, aboutissant à une augmentation des ROS impliquées dans l'inflammation du foie.

2.3 Intervention nutritionnelle sur le microbiote

Nous avons vu précédemment les différents traitements pharmacologiques potentiellement impliqués dans l'amélioration de la NAFLD ainsi que le rôle de l'alimentation sur le microbiote. Le microbiote intestinal peut également être modulé par l'apport de probiotiques, de prébiotiques, de symbiotiques ou d'antibiotiques, cette modification de la flore ayant un impact sur la NAFLD (60).

2.3.1 Les probiotiques

L'OMS définit les probiotiques comme « des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent des effets positifs sur la santé ». Plusieurs études ont étudié leurs fonctions et ont révélé leur impact sur la modulation du microbiote intestinal dans la NAFLD (72).

Les bactéries des genres *Bifidobacterium* (phylum Actinobacteria) et *Lactobacillus* (phylum Firmicutes) sont les plus utilisées en tant que probiotiques. Dans des modèles humains et murins de NAFLD, les quantités de *Bifidobacterium* se sont en effet révélées être abaissées, suggérant le rôle bénéfique de ce genre bactérien dans le maintien de la santé hépatique (58) (72). Plusieurs études réalisées sur des souris ont appuyé cette théorie : l'inoculation de *Bifidobacterium spp* a montré un effet hypocholestérolémiant ainsi qu'une réduction des graisses viscérales et de la résistance à l'insuline (58) tandis que l'administration de *Lactobacillus casei Shirota* s'est avérée protéger de la stéatose hépatique induite par le fructose (86) et de la NASH induite par un régime carencé en méthionine et en choline (87).

VSL # 3, un mélange bactérien composé de 8 souches de probiotiques (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*,

Bifidobacterium breve, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis* et *Streptococcus thermophilus*), a montré une réduction des lésions hépatiques dans la stéatose hépatique non alcoolique (60). Li et ses collaborateurs ont démontré que l'administration de VSL # 3 à des souris obèses réduisait l'obésité et la résistance à l'insuline et améliorait les marqueurs histologiques du foie avec une réduction de l'ALAT et des AG hépatiques. Dans cette étude, les propriétés anti-TNF α de VSL # 3 ont été mises en évidence et expliqueraient les effets bénéfiques constatés de ce probiotique sur le foie (88). Une autre étude animale menée par Ma et ses collaborateurs a prouvé que VSL # 3 induisait une réduction significative de la stéatose et de la résistance à l'insuline (88) (89).

L'administration simultanée de *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus acidophilus* durant 8 semaines à des rats suivant un régime riche en fructose a montré une réduction de la résistance à l'insuline et du taux de MDA, limitant la peroxydation lipidique et le stress oxydant (88).

Certains probiotiques tels que *Bifidobacterium lactis* 420 ou *Lactobacillus plantarum* semblent aussi améliorer la barrière intestinale en diminuant sa perméabilité par augmentation de l'expression des protéines de jonctions serrées (72).

À ce jour chez l'Homme, un nombre limité d'essais cliniques étudiant l'impact des probiotiques sur la NAFLD a été réalisés. Bien que la plupart aient montré une amélioration des marqueurs histologiques et des marqueurs de peroxydation lipidique (88), des études cliniques approfondies sont nécessaires afin d'apporter plus de preuves quant à l'efficacité des probiotiques dans la prise en charge de la stéatose hépatique non alcoolique. Les principaux enjeux de ces essais sont l'identification des souches les plus actives ainsi que les doses et durées d'administration efficaces (90).

En France, la majorité des probiotiques sont considérés comme des compléments alimentaires, seuls quelques-uns détiennent une AMM et sont de ce fait classés en tant que médicaments. La commercialisation de probiotiques en tant que compléments alimentaires nécessite leur déclaration à la DGCCRF.

2.3.2 Les prébiotiques

Les prébiotiques sont des substances non digestibles contenues dans l'alimentation telles que l'inuline ou les fructooligosaccharides (FOS) qui agissent sur le métabolisme des lipides, sur la perméabilité de la barrière intestinale et sur la flore intestinale en modifiant sa composition (72). Les principales sources alimentaires naturelles de prébiotiques sont les oignons, les asperges, l'ail, les poireaux, les céréales, les légumineuses et les pommes de terre.

Les prébiotiques favorisent la prolifération des *Bifidobacteria*, des *Lactobacillus* (91) et d'*Akkermansia muciniphila* (62), qui sont des bactéries bénéfiques pour la santé de l'hôte. Dans l'intestin, les FOS sont fermentés par certaines bactéries en AGCC capables d'interagir avec des récepteurs spécifiques couplés aux protéines G (RCPG-41 et RCPG-43) exprimés sur les cellules entéro-endocrines, entraînant la production de GLP-1 qui régule la sensibilité à l'insuline et de GLP-2 qui renforce la barrière intestinale (92). L'administration de prébiotiques à des souris obèses a conduit à une diminution de l'inflammation hépatique grâce notamment à l'action de GLP-2 sur la barrière intestinale (60).

Quelques essais cliniques portant sur un nombre limité de sujets ont été réalisés allant dans le sens d'un effet bénéfique prometteur des prébiotiques dans la NAFLD, mais

nécessiteraient d'être complétés par d'autres études sur de plus grands effectifs, apportant des preuves réelles de cette corrélation (60).

2.3.3 Les symbiotiques

Certaines études suggèrent que l'effet modulateur des probiotiques sur le microbiote intestinal est augmenté par l'ajout de prébiotiques : cette association probiotique-prébiotique constitue un symbiotique (59).

Une étude menée sur des patients atteints de NAFLD a montré que l'association de probiotiques et de prébiotiques réduisait significativement les taux d'ALAT et d'ASAT ainsi que la stéatose hépatique (60).

2.3.4 La transplantation de microbiote fécal (FMT)

La FMT consiste à transplanter le microbiote fécal d'individus sains chez des patients présentant une dysbiose intestinale. Cette méthode est actuellement testée dans le traitement de la NAFLD.

Une étude de FMT chez des souris présentant une stéatohépatite induite par un régime riche en graisses a rapporté une atténuation de la NASH via une amélioration de l'accumulation lipidique dans le foie, de l'insulinorésistance et de l'équilibre cytokines anti-inflammatoires / cytokines pro-inflammatoires (93). La FMT de patients maigres en bonne santé chez des patients atteints de syndrome métabolique, dans un essai clinique randomisé, a montré après 6 semaines une augmentation de la sensibilité à l'insuline et de la diversité bactérienne intestinale. Des preuves

supplémentaires sont cependant nécessaires afin d'affirmer l'efficacité de la FMT dans la modulation du microbiote intestinal et dans la NAFLD (58).

3 IMPLICATION CLINIQUE DE PORPHYROMONAS GINGIVALIS ET PROTOCOLE CLINIQUE

3.1 *Porphyromonas gingivalis*

3.1.1 Description de la bactérie

Porphyromonas gingivalis est une espèce bactérienne anaérobie orale à Gram négatif, elle appartient au phylum des Bacteroidetes et est présente en petite quantité dans le microbiote oral physiologique. Cependant, elle peut proliférer et devenir parodontopathogène, notamment via l'action de ses facteurs de virulence spécialisés. Avec *Treponema denticola* et *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* constitue le « complexe rouge » de la cavité orale, l'ensemble bactérien le plus néfaste pour la santé parodontale et le plus impliqué dans la pathogenèse de la parodontite (94).

I. Caractéristiques structurelles et conditions de croissance

Porphyromonas gingivalis est une bactérie en forme de bâtonnet non mobile, asaccharolytique. Elle trouve sa source d'énergie dans les acides aminés qu'elle fermente, notamment dans les poches profondes parodontales où les oses sont rares (95). Elle forme des colonies noires lorsqu'elle est cultivée sur des plaques de gélose au sang, correspondant à de l'hème agglutiné à sa surface. En effet, en plus de conditions anaérobies, la présence d'hème et de vitamine K est nécessaire à la croissance de *Porphyromonas gingivalis* (96).

II. Invasion et survie dans l'hôte

La colonisation de l'hôte se fait via l'envahissement des cellules et des tissus par *Porphyromonas gingivalis*, qui utilise ses facteurs de virulence spécifiques pour échapper au système immunitaire. Après avoir adhéré à la cellule cible, *Porphyromonas gingivalis* est internalisée puis refoulée dans les phagosomes dans lesquels elle va initier l'autophagie cellulaire permettant de fournir des protéines pour la réplication bactérienne. De plus, la bactérie inhibe l'apoptose cellulaire, ce qui permet sa survie dans la cellule. Ensuite, elle se propage d'une cellule à l'autre via les ponts du cytosquelette d'actine (94) (96).

III. Facteurs de virulence

La pathogénicité de *Porphyromonas gingivalis* repose notamment sur ses facteurs de virulence, des molécules capables de permettre sa survie et d'induire des effets néfastes sur les cellules hôtes (96).

a) Fimbriae

Les fimbriae, de fins filaments présents à la surface des bactéries à Gram négatif telles que *Porphyromonas gingivalis*, permettent leur adhésion à d'autres cellules procaryotes ou eucaryotes ainsi qu'à des protéines (96). Deux sortes de fimbriae sont présents sur *Porphyromonas gingivalis*, à savoir les fimbriae majeurs longs exprimant la sous-unité FimA (fimbrilline) et les fimbriae mineurs courts exprimant Mfa1 (97).

Les fimbriae permettent également d'induire une réaction inflammatoire en produisant des cytokines pro-inflammatoires et des métalloprotéinases (MMP) comme l'IL-1, l'IL-

6, l'IL-8, le TNF- α et la MMP-9 via le TLR2 et le TLR4 notamment. L'interaction de *Porphyromonas gingivalis* via ses fimbriae avec le TLR2 est facilitée par CD14 et entraîne l'activation de NF- κ B et la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. Cette interaction permet d'activer la conformation du récepteur du complément 3 (CR3) ayant une affinité élevée pour *Porphyromonas gingivalis*. Ainsi, par un mécanisme de signalisation à l'envers, l'interaction fimbriae / CR3 induit l'internalisation de *Porphyromonas gingivalis* dans les macrophages et la baisse de synthèse d'IL-12, ces deux mécanismes empêchant la clairance bactérienne et induisant la persistance de *Porphyromonas gingivalis* (96) (98).

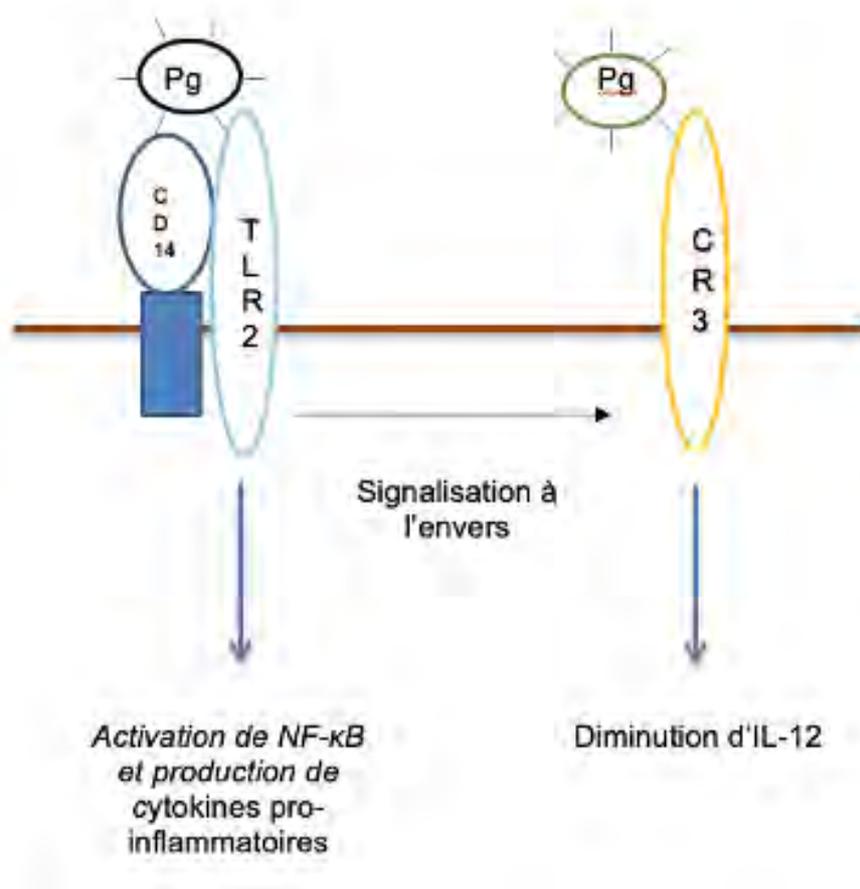


Figure 6 : « Interaction de *Porphyromonas gingivalis* (Pg) avec TLR2 et CR3 dans les macrophages »

b) Gingipaïnes

Les gingipaïnes sont des cystéine-protéases sécrétées par *Porphyromonas gingivalis* mais également présentes à leur surface (96). Il en existe deux types, classées en fonction de leur spécificité de substrat : les gingipaïnes K clivent après les résidus lysine et les gingipaïnes R clivent après les résidus arginine (94). Elles sont responsables de 85% de l'activité protéolytique de *Porphyromonas gingivalis* (96) (97) et ont la capacité de dégrader les composants de la matrice extracellulaire et d'agir sur la réponse immunitaire en dégradant les cytokines, les immunoglobulines ou encore les facteurs du complément et en clivant les récepteurs CD2, CD4 et CD8 aux LT (96).

c) LPS

Les LPS de *Porphyromonas gingivalis*, en plus d'induire une réponse pro-inflammatoire via l'activation de cellules immunitaires et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, stimulent la résorption osseuse (96).

d) Capsule

La présence d'une capsule autour de *Porphyromonas gingivalis* lui confère une meilleure adhésion ainsi qu'une virulence augmentée et induit une baisse de la réponse inflammatoire de l'hôte et une résistance à la phagocytose (99).

3.1.2 *Porphyromonas gingivalis* et parodontite

La parodontite est une pathologie infectieuse d'origine bactérienne caractérisée par une inflammation du parodonte superficiel (gencive) et une destruction irréversible des tissus de soutien de la dent, c'est-à-dire du parodonte profond (desmodonte, cément, os alvéolaire). Elle induit une perte d'attache ainsi qu'une alvéolyse et peut conduire à la formation de poches parodontales profondes et à une mobilité dentaire (100). Bien que considérée comme une maladie plurifactorielle, le biofilm bactérien est le principal agent étiologique de la parodontite et *Porphyromonas gingivalis*, appartenant au complexe rouge de Socransky, est particulièrement impliquée dans la pathogenèse puisqu'elle est la bactérie la plus fortement associée à la parodontite chronique (96).

Plusieurs études animales ont révélé que l'administration de *Porphyromonas gingivalis* entraînait une réaction inflammatoire et une résorption osseuse parodontale (96), suggérant le rôle de cette bactérie dans le développement de la parodontite.

C'est principalement grâce à ses facteurs de virulence que *Porphyromonas gingivalis* exerce son agressivité. En effet, elle adhère aux cellules épithéliales gingivales via une interaction entre les fimbriae de sa paroi et les β 1-intégrines présentes à la surface de ces cellules, puis est internalisée et peut se répliquer. Ses fimbriae lui permettent aussi d'adhérer aux bactéries colonisatrices précoces du biofilm et d'induire le développement de celui-ci. Enfin, via la signalisation passant par TLR2 et TLR4, les fimbriae entraînent la synthèse d'IL-6 et de TNF- α et inhibent la production d'IFN- γ par les LT et d'IL-12 par les macrophages, réprimant ainsi leur activité bactéricide et permettant la survie de *Porphyromonas gingivalis*.

Les gingipaïnes qu'elle sécrète sont capables de stimuler l'expression des récepteurs activés par la protéinase-2 (PAR-2) dans les PNN, les cellules épithéliales gingivales,

les fibroblastes gingivaux et les LT, induisant ainsi la production de cytokines et l'inflammation chronique caractéristiques de la parodontite (96) (101). Ces protéases peuvent aussi augmenter la perméabilité vasculaire et l'afflux de PNN au site parodontal. Enfin, en clivant le fibrinogène, les gingipaines inhibent la coagulation : il en résulte des saignements parodontaux avec une augmentation de l'hème disponible pour la croissance de *Porphyromonas gingivalis* (96).

Les LPS de *Porphyromonas gingivalis* induisent la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-6 qui contribuent à la destruction des tissus parodontaux (94). De plus, ils inhibent l'ostéogenèse et donc la régénération parodontale (97).

L'encapsulation de *Porphyromonas gingivalis*, quant à elle, permet une propagation de l'infection et une accélération de la perte osseuse (96).

Porphyromonas gingivalis envahit donc localement les tissus parodontaux et met en place, via ses facteurs de virulence, un système qui lui permet d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte soit en la dérégulant soit en se cachant pour l'éviter, sans pour autant inhiber la réponse inflammatoire globale (94).

3.1.3 *Porphyromonas gingivalis* et maladies systémiques

En plus d'être impliquée dans la pathogenèse de la maladie parodontale, *Porphyromonas gingivalis* semble aussi être associée au développement de pathologies systémiques. La réaction immuno-inflammatoire locale qu'elle déclenche au niveau parodontal augmente la perméabilité épithéliale orale, induisant sa translocation et celle de son LPS dans la circulation sanguine et vers d'autres tissus, où les cellules immunitaires sont activées, déclenchant une réponse cytokinique pro-inflammatoire (102). Au-delà de l'impact que peut avoir *Porphyromonas gingivalis* sur

la NAFLD comme nous l'avons vu précédemment, intéressons-nous désormais à son influence sur d'autres pathologies systémiques.

I. Diabétologie

L'inflammation systémique engendrée par *Porphyromonas gingivalis* peut conduire au développement ou à l'aggravation d'un diabète de type 2 en augmentant l'insulinorésistance, donc la glycémie. Le traitement parodontal a révélé améliorer l'équilibre glycémique chez des patients diabétiques (95) (102).

II. Risque cardiovasculaire

Les pathogènes parodontaux tels que *Porphyromonas gingivalis* augmenteraient le risque d'athérosclérose et d'affections cardiovasculaires, notamment d'infarctus du myocarde et d'accident vasculaire cérébral (AVC) (103). Il a été proposé par Reyes et ses collaborateurs que les bactéries parodontales pouvaient passer à travers les tissus vasculaires et engendrer une athérosclérose, sans pour autant que *Porphyromonas gingivalis* n'ait été retrouvée dans des plaques d'athérome (95). Huck et ses collaborateurs suggèrent aussi que *Porphyromonas gingivalis* est impliquée dans la progression de l'athérosclérose et qu'un traitement parodontal améliore l'affection (104). Il a par ailleurs été prouvé que *Porphyromonas gingivalis* peut détériorer les cellules coronaires endothéliales et ainsi altérer la vasodilatation, via ses pouvoirs d'adhésion, d'invasion et de prolifération (95). Une autre étude a révélé la présence de *Porphyromonas gingivalis* dans la paroi aortique de patients ayant été victimes d'anévrisme (102).

III. Pneumologie

Plusieurs études ont identifié *Porphyromonas gingivalis* dans les poumons de patients atteints de pneumonie (105) et il a été admis que les infections parodontales étaient associées à un risque élevé d'infection pulmonaire ou de surinfection d'une atteinte pulmonaire (102).

IV. Rhumatologie

Le rôle de *Porphyromonas gingivalis* dans la pathogenèse de la polyarthrite rhumatoïde (PR) a plusieurs fois été évoqué. Des similitudes immunopathologiques entre maladie parodontale et PR ont été retrouvées dans de nombreuses études et l'ADN de *Porphyromonas gingivalis* a été identifié dans les synoviales de PR. La PR est associée à la production d'anticorps anti-citrulline (AAC), qui forment ensuite des complexes immuns responsables des atteintes articulaires caractéristiques de la maladie. Or, *Porphyromonas gingivalis* a la capacité de transformer l'arginine de protéines du liquide synovial en citrulline grâce à l'activité enzymatique de la peptidyl-arginine-désiminase (PAD), favorisant ainsi la synthèse d'AAC (95) (102).

V. Neurologie

Porphyromonas gingivalis et son LPS ont été observés dans le cerveau de patients atteints de maladie d'Alzheimer, de même que des gingipaines. La gingipaine a montré une neurotoxicité *in vitro* et *in vivo* en exerçant des effets délétères sur la protéine tau, qui est impliquée dans le fonctionnement neuronal normal. D'autre part, l'administration orale de *Porphyromonas gingivalis* chez des souris a induit une

invasion bactérienne cérébrale ainsi qu'une augmentation d'Aβ1–42, peptide formant les plaques amyloïdes caractéristiques de la maladie d'Alzheimer (95) (106).

VI. Oncologie

La littérature scientifique recense de plus en plus d'articles étudiant le rôle étiologique de *Porphyromonas gingivalis* dans le développement de cancers buccaux, gastro-intestinaux et pancréatiques (107). Une étude clinique a démontré que l'augmentation du risque de mortalité par cancer oro-digestif était proportionnelle à la gravité de la maladie parodontale et au taux d'anticorps dirigés contre *Porphyromonas gingivalis* et les résultats étaient statistiquement significatifs. Dans cette même étude, Ahn et ses collaborateurs ont été les premiers à associer, de manière indépendante de la maladie parodontale, *Porphyromonas gingivalis* à une augmentation de la mortalité par cancer oro-digestif (108). Par ailleurs, des quantités importantes de *Porphyromonas gingivalis* ont été observées dans un carcinome épidermoïde buccal. De plus, *Porphyromonas gingivalis* favorise l'apparition de métastases à distance ainsi que la chimiorésistance et accélère la prolifération cellulaire tumorale. Enfin, elle peut intervenir dans la formation de lésions précancéreuses gastriques et coliques, dans la carcinogenèse de l'œsophage, de la tête et du cou et du pancréas (107).

3.2 Proposition de protocole clinique : Étude observationnelle explorant les relations entre *Porphyromonas gingivalis* et la sévérité de la fibrose chez des patients atteints de stéatopathie métabolique

Les stéatopathies métaboliques (NAFLD) occupent la première place parmi les maladies hépatiques chroniques avec une prévalence de 25% dans le monde. Dans 10 à 25% des cas, la stéatose progresse vers une fibrose pouvant conduire à une cirrhose ou un carcinome hépatocellulaire (109). Le degré de fibrose est un facteur prédictif du risque de mortalité (110) : les patients ne présentant pas de fibrose (F0) ou présentant une fibrose légère (F1) à modérée (F2) ont un meilleur pronostic que ceux atteints de fibrose sévère (F3) ou de cirrhose (F4) (109). Le diagnostic du stade de la fibrose est histologique mais l'aggravation de la fibrose reste méconnue. Il est donc indispensable de mettre en place une surveillance régulière des patients.

Comme présenté dans la section précédente, la dysbiose intestinale est impliquée dans la pathogenèse de la NAFLD, de même que la dysbiose orale caractéristique de la maladie parodontale. Et c'est *Porphyromonas gingivalis* qui attire particulièrement l'attention des scientifiques, elle serait responsable d'une inflammation systémique via la translocation de son LPS dans la circulation sanguine (74).

Le but de cette recherche est de comparer dans la salive la fréquence de *Porphyromonas gingivalis* chez les patients atteints de fibrose hépatique quel que soit le stade de la fibrose (du stade F1 au stade F4). L'hypothèse émise est que la fréquence de cette bactérie serait augmentée chez les patients atteints de fibrose sévère (F3-F4) par rapports à ceux atteints de fibrose légère à modérée (F0-F2).

Une meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans la NAFLD permettrait de mieux appréhender ces facteurs et d'intervenir précocement chez les patients via des actions sur le régime alimentaire ou l'activité physique et évidemment sur le microbiote buccal si un lien avec une bactérie est avéré.

De multiples facteurs en lien avec la composition du microbiote buccal et l'état bucco-dentaire des patients doivent être analysés en parallèle. C'est le cas des habitudes hygiéno-diététiques qui seront évaluées, ainsi que la qualité de vie ressentie par les sujets.

3.2.1 Objectifs de l'étude

I. Objectif principal

L'objectif principal est de comparer la fréquence moyenne de *Porphyromonas gingivalis* dans la salive des personnes atteintes de NAFLD de stade F1-F2 versus les personnes atteintes de stade F3-F4.

II. Objectifs secondaires

Les objectifs secondaires sont :

- 1) De comparer la distribution de la fréquence moyenne de *Porphyromonas gingivalis* dans la plaque parodontale des personnes atteintes de NAFLD de stade F1-F2 versus les personnes atteintes de stade F3-F4 ;
- 2) D'évaluer la composition microbiologique de la salive et de la plaque parodontale des patients atteints de NAFLD ;
- 3) D'évaluer l'état de santé bucco-dentaire des patients ;

- 4) D'évaluer les habitudes hygiéno-diététiques des sujets ;
- 5) D'évaluer la qualité de vie orale et générale des sujets ;
- 6) De comparer la composition inflammatoire et immunitaire de la salive des personnes atteintes de NAFLD de stade F1-F2 versus les personnes atteintes de stade F3-F4.

3.2.2 Matériels et Méthodes

Cette étude a obtenu l'avis favorable du Comité de Protection des Personnes (CPP) et porte le numéro 2019-A00383-54.

I. Conception de l'étude et critères d'inclusion

a) Schéma de l'étude

Il s'agit d'une étude non interventionnelle transversale comparative avec recrutement prospectif et consécutif des participants.

Les sujets seront recrutés dans les centres de soins d'Hépatogastro-entérologie de Purpan des Hôpitaux de Toulouse pour être adressés au service d'Odontologie (site de Rangueil ou Hôtel Dieu).

b) Taille de l'étude

Le calcul du nombre de sujets nécessaires est basé sur les résultats d'une étude déjà réalisée chez des patients atteints de stéatopathie métabolique. La fréquence moyenne de *Porphyromonas gingivalis* était de 0,12% chez les sujets sains et de

2,25% chez les sujets malades. Ainsi, nous prenons comme hypothèse de départ pour notre étude une différence moindre de fréquence moyenne de la bactérie entre les 2 groupes de patients malades (estimée à 0,5%), estimant ainsi la fréquence moyenne de *Porphyromonas gingivalis* chez les sujets les plus atteints (stade F3-F4) à 2,5%, et celle des sujets les moins atteints (stade F1-F2) à 2,0%. Avec un écart-type de 1,2%, une puissance fixée à 80% et un risque de première espèce bilatéral à 5%, le nombre total de sujets nécessaires est de 182 (rapport 1 : 1, soit 91 sujets par groupe).

c) Critères d'inclusion

Pour être éligibles à l'inclusion, les patients devront :

- Être atteint d'une stéatopathie métabolique prouvée par une biopsie datant de moins d'un an ;
- Être en capacité de recevoir l'information sur le déroulé de l'étude et de comprendre le formulaire d'information pour participer à l'étude. Cela implique :
 - o De maîtriser la langue française
 - o Personne non soumise à une restriction de droits par les autorités judiciaire ;
- Être âgés d'au moins 18 ans ;
- Avoir donné leur non opposition pour participer à l'étude (ANNEXE 2)

d) Critères de non inclusion

Ne pourront pas être inclus dans l'étude les patients :

- Présentant une autre cause associée d'hépatopathie ou de stéatose comme infections virales et maladie auto-immune ;
- Présentant une consommation d'alcool >30g/j (homme) ou 20g/j (femme) ;
- Présentant des antécédents de décompensation de cirrhose ;
- Ayant pris des antibiotiques, des prébiotiques ou probiotiques dans le mois précédent l'inclusion ;
- Présentant une maladie gastro-intestinale chronique ou aiguë ;
- Présentant des antécédents de chirurgie gastro-intestinale modifiant l'anatomie ;
- En cours de grossesse ou d'allaitement ;
- Présentant des antécédents de chirurgie orale dans le mois précédent l'inclusion ;
- Pour lesquels une chirurgie orale est prévue entre le recueil de la non opposition et l'inclusion dans le service d'odontologie ;
- A risque d'infection (existence d'une ou plusieurs pathologies infectieuses chroniques connues : VIH, VHB, VHC et mononucléose) et/ou insuffisance rénale chronique (clairance créatinine < 60ml/min) ;
- Atteints d'une pathologie générale contre-indiquant la réalisation d'actes de diagnostic comme le sondage parodontal (patients à haut risque d'endocardite infectieuse selon l'Agence Nationale Française de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé ANSM) ;

- Sous sauvegarde de justice, dépendant, sous tutelle ou curatelle.

e) Caractéristiques médicales et sociodémographiques

La collecte des données médicales et sociodémographiques a été réalisée à l'aide d'un questionnaire standardisé (ANNEXE 1) portant sur :

- La fréquentation des services médicaux et dentaires (raisons de la dernière visite chez le dentiste, niveau de stress marqué sur une échelle de 10 points, fréquence des visites) ;
- Les comportements liés à l'hygiène buccale (nombre de brossages quotidiens, temps de brossage).

II. Recueil des données

« Suite à votre consultation dans le service d'hépatogastro-entérologie, nous vous proposons de réaliser, au sein du service d'Odontologie de Ranguel, un examen bucco-dentaire complet qui nous permettra de faire le bilan de vos dents et de votre parodonte (gencives). Les échantillons prélevés seront analysés dans notre laboratoire puis congelés en vue d'une réutilisation ultérieure éventuelle. »

Toutes les données sont recueillies selon les mêmes conditions de procédure.

Lors de la consultation clinique, nous réalisons :

- Un examen clinique dentaire complet ;
- Un prélèvement salivaire par crachat ;
- Un prélèvement parodontal réalisé à la suite d'un sondage parodontal à l'aide de pointes de papier stériles (minimum 3 et maximum 10 par patient) afin

- d'objectiver les poches parodontales les plus importantes ;
- Une radiographie panoramique ;
 - La collecte du questionnaire hygiéno-diététique et nutritionnel complété par les sujets participant à cette étude.

III. Analyse du microbiote

- La flore microbienne est étudiée de façon quantitative par ensemencement sur des plaques d'agar non sélectives ou sélectives, permettant ainsi la culture et l'identification des bactéries présentes dans la salive analysée. La détermination du nombre de bactéries putatives est effectuée selon les critères décrits dans le « Bergey's Manual of determinative Bacteriology » (111)
- La salive est congelée à -80°C pour l'analyse qualitative, taxonomique du microbiote oral :
 - o Les extractions d'ADN à partir des prélèvements salivaires sont réalisées dans le laboratoire de l'INSERM Unité 2 sous le contrôle des chercheurs et techniciens de cette unité. La manipulation consiste donc à extraire l'ADN de ces échantillons en utilisant un kit d'extraction (*QIAamp cadof Pathogen Mini Kit 250*). Le protocole détaillé est joint en annexe (ANNEXE 3).
 - o Une fois l'extraction réalisée, la concentration en ADN des échantillons est estimée au Nanodrop, permettant ainsi de calculer le ratio d'absorption à 260 nm et à 280 nm et d'estimer la quantité d'ADN récupérée par échantillon.
 - o Une fois la totalité des prélèvements recueillis, les échantillons seront préparés pour être envoyés à séquencer dans le laboratoire de la

Société VAIOMER SAS. La totalité de la région V2 de l'ADN bactérien 16S sera ciblée par les amorces 28F-519R et la technique MiSeq sera appliquée pour générer une moyenne de 10000 séquences par échantillon.

IV. Analyse statistique des données

Des analyses bi-variées entre les patients atteints de NAFLD stade F1-F2 et stade F3-F4 seront menées avec tests de comparaison de pourcentages (test du Chi-2 ou test exact de Fisher si les conditions d'application du premier ne sont pas respectées) pour les variables qualitatives et tests de comparaison de distribution (t-test de Student ou test de Mann-Whitney Wilcoxon si les conditions d'application du premier ne sont pas respectées) pour les variables quantitatives.

- Variables qualitatives :
 - o Questionnaire général (données relatives au sexe, pathologies, traitements...)
 - o Questionnaire hygiéno-diététique

- Variables quantitatives :
 - o Identification quantitative de la présence de *Porphyromonas gingivalis*
 - o Analyse taxonomique (MiSEQ) de la composition microbiologique de la salive
 - o Indice de plaque
 - o Indice gingival

- Indice CAOD (nombre moyen de dents cariées, absentes ou obturées)
- Indice CPITN (indice communautaire des besoins de traitements parodontaux)
- pH
- Dosage des cytokines inflammatoires
- Caractéristiques générales (âge)
- Questionnaires de qualité de vie (EQ-5D-5L et GOHAI)

Des analyses multivariées seront menées pour prendre en compte les données confondantes. La fréquence moyenne de *Porphyromonas gingivalis* sera comparée entre les patients atteints de NAFLD stade F1-F2 et stade F3-F4 par un t-test de valeur quantitative ou test de Mann-Whitney Wilcoxon si les conditions d'application du premier ne sont pas respectées.

La base de données sera constituée sur Microsoft Excel® puis les analyses seront menées grâce aux logiciels Stata v.13® et GraphPad Prism 5®.

En ce qui concerne mon implication personnelle dans cette étude, je participerai à la mise en culture bactérienne sur gélose ainsi qu'à l'extraction d'ADN salivaire.

CONCLUSION

Ces dernières années, les scientifiques ont mis en évidence le rôle du microbiote intestinal et du microbiote buccal dans le développement et la progression de la stéatose hépatique non alcoolique.

Des modifications qualitatives et quantitatives de la flore bactérienne intestinale principalement par une alimentation riche en graisses et en sucres ont un impact sur le foie et la pathogenèse de la NAFLD via la translocation de produits bactériens (LPS) dans la circulation portale et via la synthèse de métabolites bactériens.

Un microbiote oral modifié, notamment dans un contexte de maladie parodontale, exerce aussi des effets délétères sur le foie. Les bactéries parodontopathogènes peuvent exercer leur action soit via leur translocation dans la circulation sanguine et la libération de produits bactériens provoquant une inflammation hépatique soit via leur transport vers l'intestin provoquant un déséquilibre du microbiote intestinal.

Ainsi l'identification de ces deux facteurs comme impliqués dans la pathogenèse de la NAFLD permet de comprendre l'importance d'une prise en charge globale et pluridisciplinaire des patients. D'une part, le pharmacien, en plus d'insister sur les recommandations en termes d'alimentation et d'activité physique, sera amené à proposer en complément de ces mesures des probiotiques et / ou prébiotiques permettant d'améliorer et de réguler la composition du microbiote intestinal. D'autre part, le chirurgien-dentiste intervient sur le microbiote oral par des actions préventives et thérapeutiques sur la maladie parodontale.

Des études supplémentaires sont cependant encore nécessaires afin de mieux appréhender le rôle des bactéries parodontopathogènes, notamment de *Porphyromonas gingivalis*, dans la NAFLD. L'importance de cette bactérie dans la

sévérité de la fibrose pourrait être mise en évidence par l'étude observationnelle en cours comparant la proportion de *Porphyromonas gingivalis* du microbiote oral des patients atteints de fibrose légère à modérée (F1-F2) aux patients atteints de fibrose sévère ou de cirrhose (F3-F4).

4 BIBLIOGRAPHIE

1. Drew L. Fatty liver disease: turning the tide. *Nature*. oct 2017;550(7675):S101-S101.
2. Enomoto H, Bando Y, Nakamura H, Nishiguchi S, Koga M. Liver fibrosis markers of nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol*. 28 juin 2015;21(24):7427-35.
3. Benedict M, Zhang X. Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. *World J Hepatol*. 8 juin 2017;9(16):715-32.
4. Lonardo A, Targher G. NAFLD: Is There Anything New under the Sun? *Int J Mol Sci* [Internet]. 12 sept 2017 [cité 16 juin 2020];18(9). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5618604/>
5. Akshintala D, Chugh R, Amer F, Cusi K. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The Overlooked Complication of Type 2 Diabetes. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, et al., éditeurs. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000 [cité 9 juin 2020]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544043/>
6. Byrne CD, Targher G. NAFLD: A multisystem disease. *Journal of Hepatology*. avr 2015;62(1):S47-64.
7. Zhang YN, Fowler KJ, Hamilton G, Cui JY, Sy EZ, Balanay M, et al. Liver fat imaging—a clinical overview of ultrasound, CT, and MR imaging. *Br J Radiol* [Internet]. sept 2018 [cité 17 juin 2020];91(1089). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6223150/>

8. Buffet Cat, Buffet Cam. Les hépatopathies stéatosiques non alcooliques et le microbiote intestinal. *Médecine des Maladies Métaboliques*. 1 mai 2015;9(3):301-10.
9. Yoneda M, Naka S, Nakano K, Wada K, Endo H, Mawatari H, et al. Involvement of a periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis* on the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol*. 16 févr 2012;12:16.
10. Kudaravalli P, John S. Nonalcoholic Fatty Liver. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 [cité 11 nov 2019]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541033/>
11. Bugianesi E, Gastaldelli A, Vanni E, Gambino R, Cassader M, Baldi S, et al. Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. *Diabetologia*. avr 2005;48(4):634-42.
12. Van Wagner LB, Rinella ME. The role of insulin-sensitizing agents in the treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Therap Adv Gastroenterol*. juill 2011;4(4):249-63.
13. Abd El-Kader SM, El-Den Ashmawy EMS. Non-alcoholic fatty liver disease: The diagnosis and management. *World J Hepatol*. 28 avr 2015;7(6):846-58.
14. Lemoine M, Serfaty L. Stéatopathies métaboliques. *La Presse Médicale*. févr 2012;41(2):169-89.
15. Ratziu V, Tahiri M, Bonyhay L. La stéatohépatite non alcoolique. /data/revues/00034266/00662-C2/1S71/ [Internet]. 16 févr 2008 [cité 9 juin 2020]; Disponible sur: <http://emvmsa1a.jouve-hdi.com/en/article/76375>
16. Shetty A, Syn W-K. Health and Economic Burden of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in the United States and Its Impact on Veterans. *Fed Pract*. janv 2019;36(1):14-9.

17. Cobbina E, Akhlaghi F. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) - Pathogenesis, Classification, and Effect on Drug Metabolizing Enzymes and Transporters. *Drug Metab Rev.* mai 2017;49(2):197-211.
18. Cabezas J, Mayorga M, Crespo J. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Pathological View. *Liver Biopsy - Indications, Procedures, Results* [Internet]. 21 nov 2012 [cité 10 nov 2020]; Disponible sur: <https://www.intechopen.com/books/liver-biopsy-indications-procedures-results/nonalcoholic-fatty-liver-disease-a-pathological-view>
19. Perumpail BJ, Khan MA, Yoo ER, Cholankeril G, Kim D, Ahmed A. Clinical epidemiology and disease burden of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 21 déc 2017;23(47):8263-76.
20. Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease. *Metabolism.* 1 août 2016;65(8):1017-25.
21. Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016–2030. *Journal of Hepatology.* 1 oct 2018;69(4):896-904.
22. Pais R. L'inflammation hépatique dans les formes sévères de NAFLD: implications cliniques, médiateurs et stratégies diagnostiques. :256.
23. Yang JD, Abdelmalek MF, Pang H, Guy CD, Smith AD, Diehl AM, et al. Gender and menopause impact severity of fibrosis among patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* avr 2014;59(4):1406-14.
24. Del Campo JA, Gallego-Durán R, Gallego P, Grande L. Genetic and Epigenetic Regulation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Int J Mol Sci* [Internet]. 19 mars 2018 [cité 20 juill 2020];19(3). Disponible sur:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5877772/>

25. Lonardo A, Nascimbeni F, Maurantonio M, Marrazzo A, Rinaldi L, Adinolfi LE. Nonalcoholic fatty liver disease: Evolving paradigms. *World J Gastroenterol*. 28 sept 2017;23(36):6571-92.
26. Marchisello S, Di Pino A, Scicali R, Urbano F, Piro S, Purrello F, et al. Pathophysiological, Molecular and Therapeutic Issues of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: An Overview. *Int J Mol Sci* [Internet]. 20 avr 2019 [cité 28 juill 2020];20(8). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6514656/>
27. Fang Y-L, Chen H, Wang C-L, Liang L. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease in children and adolescence: From “two hit theory” to “multiple hit model”. *World Journal of Gastroenterology*. 21 juill 2018;24(27):2974.
28. Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol Rev*. 1 oct 2018;98(4):2133-223.
29. ter Horst KW, Serlie MJ. Fructose Consumption, Lipogenesis, and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrients* [Internet]. 6 sept 2017 [cité 10 nov 2020];9(9). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5622741/>
30. Ipsen DH, Lykkesfeldt J, Tveden-Nyborg P. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(18):3313-27.
31. Arrese M, Cabrera D, Kalergis AM, Feldstein AE. Innate immunity and inflammation in NAFLD/NASH. *Dig Dis Sci*. mai 2016;61(5):1294-303.
32. Ganz M, Szabo G. Immune and inflammatory pathways in NASH. *Hepatol Int*. 30 août 2013;7(Suppl 2):771-81.

33. Alisi A, Carpino G, Oliveira FL, Panera N, Nobili V, Gaudio E. The Role of Tissue Macrophage-Mediated Inflammation on NAFLD Pathogenesis and Its Clinical Implications. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2017 [cité 10 août 2020];2017. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5237469/>
34. Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, Sanyal AJ. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med*. juill 2018;24(7):908-22.
35. Pattnaik K, Bhuyan P, Singh A, Singh SP, Nath P, Kar S, et al. Biopsy Proven Fibrosis in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: An Analysis of Risk Factors. *J Clin Exp Hepatol*. déc 2018;8(4):367-74.
36. Brunt EM, Wong VW-S, Nobili V, Day CP, Sookoian S, Maher JJ, et al. Nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Dis Primers*. 17 2015;1:15080.
37. Spengler EK, Loomba R. Recommendations for Diagnosis, Referral for Liver Biopsy, and Treatment of NAFLD and NASH. *Mayo Clin Proc*. sept 2015;90(9):1233-46.
38. Zhou J-H, Cai J-J, She Z-G, Li H-L. Noninvasive evaluation of nonalcoholic fatty liver disease: Current evidence and practice. *World J Gastroenterol*. 21 mars 2019;25(11):1307-26.
39. Zhang J-Z, Cai J-J, Yu Y, She Z-G, Li H. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: An Update on the Diagnosis. *Gene Expr*. 6 nov 2019;19(3):187-98.
40. Oh H, Jun DW, Saeed WK, Nguyen MH. Non-alcoholic fatty liver diseases: update on the challenge of diagnosis and treatment. *Clin Mol Hepatol*. sept 2016;22(3):327-35.
41. Younossi ZM, Loomba R, Anstee QM, Rinella ME, Bugianesi E, Marchesini G, et al. Diagnostic Modalities for Nonalcoholic Fatty Liver Disease, Nonalcoholic

Steatohepatitis, and Associated Fibrosis. *Hepatology*. juill 2018;68(1):349-60.

42. Boursier J, Dib N, Oberti F, Calès P. Caractéristiques et interprétation des tests sanguins de fibrose hépatique. /data/revues/03998320/00310005/511/ [Internet]. 26 mars 2008 [cité 24 juin 2020]; Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/en/article/130205>

43. Karanjia RN, Crossey MME, Cox IJ, Fye HKS, Njie R, Goldin RD, et al. Hepatic steatosis and fibrosis: Non-invasive assessment. *World J Gastroenterol*. 7 déc 2016;22(45):9880-97.

44. Lurie Y, Webb M, Cytter-Kuint R, Shteingart S, Lederkremer GZ. Non-invasive diagnosis of liver fibrosis and cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 7 nov 2015;21(41):11567-83.

45. Al-Gayyar MMH, Shams MEE, Barakat EAME. Fish oil improves lipid metabolism and ameliorates inflammation in patients with metabolic syndrome: Impact of nonalcoholic fatty liver disease. *Pharmaceutical Biology*. 1 mars 2012;50(3):297-303.

46. Singh S, Osna NA, Kharbanda KK. Treatment options for alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease: A review. *World J Gastroenterol*. 28 sept 2017;23(36):6549-70.

47. Houghton D, Stewart CJ, Day CP, Trenell M. Gut Microbiota and Lifestyle Interventions in NAFLD. *International Journal of Molecular Sciences*. avr 2016;17(4):447.

48. Sumida Y, Yoneda M. Current and future pharmacological therapies for NAFLD/NASH. *J Gastroenterol*. 2018;53(3):362-76.

49. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, et al. The

diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2018;67(1):328-57.

50. Oseini A, Sanyal AJ. Therapies In Non-Alcoholic Steatohepatitis (Nash). *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. janv 2017;37(Suppl 1):97.

51. Ganguli S, DeLeeuw P, Satapathy SK. A Review Of Current And Upcoming Treatment Modalities In Non-Alcoholic Fatty Liver Disease And Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Hepat Med*. 15 nov 2019;11:159-78.

52. Fielding CM, Angulo P. Hepatic steatosis and steatohepatitis: Are they really two distinct entities? *Curr Hepatol Rep*. 1 juin 2014;13(2):151-8.

53. Leoni S, Tovoli F, Napoli L, Serio I, Ferri S, Bolondi L. Current guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review with comparative analysis. *World J Gastroenterol*. 14 août 2018;24(30):3361-73.

54. Mikolasevic I, Filipec-Kanizaj T, Mijic M, Jakopcic I, Milic S, Hrstic I, et al. Nonalcoholic fatty liver disease and liver transplantation - Where do we stand? *World J Gastroenterol*. 14 avr 2018;24(14):1491-506.

55. Younossi ZM, Loomba R, Rinella ME, Bugianesi E, Marchesini G, Neuschwander-Tetri BA, et al. Current and Future Therapeutic Regimens for Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology*. juill 2018;68(1):361-71.

56. Machado MV, Cortez-Pinto H. Diet, Microbiota, Obesity, and NAFLD: A Dangerous Quartet. *Int J Mol Sci [Internet]*. 1 avr 2016 [cité 21 sept 2020];17(4). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4848937/>

57. Azad MdAK, Sarker M, Li T, Yin J. Probiotic Species in the Modulation of Gut Microbiota: An Overview. *Biomed Res Int* [Internet]. 8 mai 2018 [cité 20 oct 2020];2018. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5964481/>
58. Liu Q, Liu S, Chen L, Zhao Z, Du S, Dong Q, et al. Role and effective therapeutic target of gut microbiota in NAFLD/NASH. *Exp Ther Med*. sept 2019;18(3):1935-44.
59. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*. 7 août 2015;21(29):8787-803.
60. Milosevic I, Vujovic A, Barac A, Djelic M, Korac M, Spurnic AR, et al. Gut-Liver Axis, Gut Microbiota, and Its Modulation in the Management of Liver Diseases: A Review of the Literature. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. janv 2019 [cité 21 oct 2020];20(2). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov-pmc/articles/PMC6358912/>
61. Landman C, Quévrain E. Le microbiote intestinal : description, rôle et implication physiopathologique. *La Revue de Médecine Interne*. 1 juin 2016;37(6):418-23.
62. Cani PD, Everard A. *Akkermansia muciniphila*: Une nouvelle cible pour contrôler l'obésité, le diabète de type 2 et l'inflammation? *Med Sci (Paris)*. févr 2014;30(2):125-7.
63. Blaser MJ. Antibiotic use and its consequences for the normal microbiome. *Science*. 29 avr 2016;352(6285):544-5.
64. Marttinen M, Ala-Jaakkola R, Laitila A, Lehtinen MJ. Gut Microbiota, Probiotics and Physical Performance in Athletes and Physically Active Individuals. *Nutrients*. oct 2020;12(10):2936.
65. Shen T-CD, Pysopoulos N, Rustgi VK. Microbiota and the liver. *Liver*

Transplantation. 1 avr 2018;24(4):539-50.

66. Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, Ockhuizen T, Schulzke J-D, Serino M, et al. Intestinal permeability – a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol* [Internet]. 18 nov 2014 [cité 18 nov 2020];14. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4253991/>

67. Nicoletti A, Ponziani FR, Biolato M, Valenza V, Marrone G, Sganga G, et al. Intestinal permeability in the pathogenesis of liver damage: From non-alcoholic fatty liver disease to liver transplantation. *World J Gastroenterol*. 7 sept 2019;25(33):4814-34.

68. Poeta M, Pierri L, Vajro P. Gut–Liver Axis Derangement in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Children (Basel)* [Internet]. 2 août 2017 [cité 21 oct 2020];4(8). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5575588/>

69. Zhou D, Fan J-G. Microbial metabolites in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 7 mai 2019;25(17):2019-28.

70. Ji Y, Yin Y, Li Z, Zhang W. Gut Microbiota-Derived Components and Metabolites in the Progression of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Nutrients* [Internet]. 25 juill 2019 [cité 21 oct 2020];11(8). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6724003/>

71. Ding Y, Yanagi K, Cheng C, Alaniz RC, Lee K, Jayaraman A. Interactions between gut microbiota and non-alcoholic liver disease: the role of microbiota-derived metabolites. *Pharmacol Res*. mars 2019;141:521-9.

72. Miura K, Ohnishi H. Role of gut microbiota and Toll-like receptors in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 21 juin 2014;20(23):7381-91.

73. Braunersreuther V, Viviani GL, Mach F, Montecucco F. Role of cytokines and

chemokines in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 28 févr 2012;18(8):727-35.

74. Kern T, Nielsen T. Oral Microbiota and Liver Disease. In: Krag A, Hansen T, éditeurs. *The Human Gut-Liver-Axis in Health and Disease* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2019 [cité 28 oct 2020]. p. 105-20. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-3-319-98890-0_7

75. Deo PN, Deshmukh R. Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2019;23(1):122-8.

76. Nakajima M, Arimatsu K, Kato T, Matsuda Y, Minagawa T, Takahashi N, et al. Oral Administration of *P. gingivalis* Induces Dysbiosis of Gut Microbiota and Impaired Barrier Function Leading to Dissemination of Enterobacteria to the Liver. *PLoS One* [Internet]. 28 juill 2015 [cité 28 oct 2020];10(7). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4517782/>

77. Arimatsu K, Yamada H, Miyazawa H, Minagawa T, Nakajima M, Ryder MI, et al. Oral pathobiont induces systemic inflammation and metabolic changes associated with alteration of gut microbiota. *Sci Rep* [Internet]. 6 mai 2014 [cité 30 oct 2020];4. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4010932/>

78. Burcelin R, Nicolas S, Blasco-Baque V. Microbiotes et maladies métaboliques - De nouveaux concepts pour de nouvelles stratégies thérapeutiques. *Med Sci (Paris)*. 1 nov 2016;32(11):952-60.

79. Sasaki N, Katagiri S, Komazaki R, Watanabe K, Maekawa S, Shiba T, et al. Endotoxemia by *Porphyromonas gingivalis* Injection Aggravates Non-alcoholic Fatty Liver Disease, Disrupts Glucose/Lipid Metabolism, and Alters Gut Microbiota in Mice. *Front Microbiol* [Internet]. 24 oct 2018 [cité 30 oct 2020];9. Disponible sur:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6207869/>

80. Han P, Sun D, Yang J. Interaction between periodontitis and liver diseases. *Biomed Rep.* sept 2016;5(3):267-76.
81. Darveau RP, Pham T-TT, Lemley K, Reife RA, Bainbridge BW, Coats SR, et al. Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide Contains Multiple Lipid A Species That Functionally Interact with Both Toll-Like Receptors 2 and 4. *Infect Immun.* sept 2004;72(9):5041-51.
82. Marijke Keestra-Gounder A, Tsolis RM. NOD1 and NOD2: beyond peptidoglycan sensing. *Trends Immunol.* oct 2017;38(10):758-67.
83. Seymour GJ, Ford PJ, Cullinan MP, Leishman S, Yamazaki K. Relationship between periodontal infections and systemic disease. *Clinical Microbiology and Infection.* 2007;13(s4):3-10.
84. Yamazaki K, Ohsawa Y, Tabeta K, Ito H, Ueki K, Oda T, et al. Accumulation of Human Heat Shock Protein 60-Reactive T Cells in the Gingival Tissues of Periodontitis Patients. *Infect Immun.* mai 2002;70(5):2492-501.
85. Cullinan MP, Ford PJ, Seymour GJ. Periodontal disease and systemic health: current status. *Australian Dental Journal.* 2009;54(s1):S62-9.
86. Wagnerberger S, Spruss A, Kanuri G, Stahl C, Schröder M, Vetter W, et al. Lactobacillus casei Shirota protects from fructose-induced liver steatosis: A mouse model. *The Journal of Nutritional Biochemistry.* 1 mars 2013;24(3):531-8.
87. Okubo H, Sakoda H, Kushiya A, Fujishiro M, Nakatsu Y, Fukushima T, et al. Lactobacillus casei strain Shirota protects against nonalcoholic steatohepatitis development in a rodent model. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and*

Liver Physiology. 10 oct 2013;305(12):G911-8.

88. Kelishadi R, Farajian S, Mirlohi M. Probiotics as a Novel Treatment for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease; A Systematic Review on the Current Evidences. *Hepat Mon* [Internet]. 9 avr 2013 [cité 4 nov 2020];13(4). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3719124/>

89. Ma X, Hua J, Li Z. Probiotics Improve High Fat Diet-induced Hepatic Steatosis and Insulin Resistance by Increasing Hepatic NKT cells. *J Hepatol*. nov 2008;49(5):821-30.

90. Meroni M, Longo M, Dongiovanni P. The Role of Probiotics in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A New Insight into Therapeutic Strategies. *Nutrients* [Internet]. 4 nov 2019 [cité 4 nov 2020];11(11). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6893730/>

91. Mokhtari Z, Gibson DL, Hekmatdoost A. Nonalcoholic Fatty Liver Disease, the Gut Microbiome, and Diet¹². *Adv Nutr*. 10 mars 2017;8(2):240-52.

92. Wieërs G, Belkhir L, Enaud R, Leclercq S, Philippart de Foy J-M, Dequenne I, et al. How Probiotics Affect the Microbiota. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 15 janv 2020 [cité 5 nov 2020];9. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6974441/>

93. Zhou D, Pan Q, Shen F, Cao H, Ding W, Chen Y, et al. Total fecal microbiota transplantation alleviates high-fat diet-induced steatohepatitis in mice via beneficial regulation of gut microbiota. *Sci Rep* [Internet]. 8 mai 2017 [cité 5 nov 2020];7. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5431549/>

94. Mysak J, Podzimek S, Sommerova P, Lyuya-Mi Y, Bartova J, Janatova T, et al. *Porphyromonas gingivalis*: Major Periodontopathic Pathogen Overview. *J Immunol*

Res [Internet]. 2014 [cité 7 nov 2020];2014. Disponible sur:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3984870/>

95. Fiorillo L, Cervino G, Laino L, D'Amico C, Mauceri R, Tozum TF, et al. Porphyromonas gingivalis, Periodontal and Systemic Implications: A Systematic Review. Dent J (Basel) [Internet]. 11 déc 2019 [cité 7 nov 2020];7(4). Disponible sur:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6960968/>

96. Bostanci N, Belibasakis GN. Porphyromonas gingivalis: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. FEMS Microbiol Lett. 1 août 2012;333(1):1-9.

97. Jia L, Han N, Du J, Guo L, Luo Z, Liu Y. Pathogenesis of Important Virulence Factors of Porphyromonas gingivalis via Toll-Like Receptors. Front Cell Infect Microbiol [Internet]. 18 juill 2019 [cité 7 nov 2020];9. Disponible sur:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6657652/>

98. Hajishengallis G, Shakhathreh M-AK, Wang M, Liang S. Complement Receptor 3 Blockade Promotes IL-12-Mediated Clearance of Porphyromonas gingivalis and Negates Its Virulence In Vivo. The Journal of Immunology. 15 août 2007;179(4):2359-67.

99. Singh A, Wyant T, Anaya-Bergman C, Aduse-Opoku J, Brunner J, Laine ML, et al. The Capsule of Porphyromonas gingivalis Leads to a Reduction in the Host Inflammatory Response, Evasion of Phagocytosis, and Increase in Virulence ∇ . Infect Immun. nov 2011;79(11):4533-42.

100. Duyninh T, Jame O, Bousquet P, Gibert P, Orti V. Classification des maladies parodontales. EMC - Odontologie. 1 mars 2005;1(1):58-66.

101. Loubakos A, Chinni C, Thompson P, Potempa J, Travis J, Mackie EJ, et al. Cleavage and activation of proteinase-activated receptor-2 on human neutrophils by

gingipain-R from *Porphyromonas gingivalis*. FEBS Letters. 11 sept 1998;435(1):45-8.

102. Gauzeran D. MALADIES PARODONTALES CHEZ L'HOMME ET MALADIES SYSTÉMIQUES. Bul de l'Ac Vét de France. 2014;(1-3):19.

103. Buxeraud J. Conséquences systémiques des maladies parodontales. Actualités Pharmaceutiques. 1 juin 2017;56(567):47-50.

104. Evaluating periodontal risk for patients at risk of or suffering from atherosclerosis: Recent biological hypotheses and therapeutic consequences. Archives of Cardiovascular Diseases. 1 mai 2011;104(5):352-8.

105. Kumar PS. From focal sepsis to periodontal medicine: a century of exploring the role of the oral microbiome in systemic disease. J Physiol. 15 janv 2017;595(2):465-76.

106. Dominy SS, Lynch C, Ermini F, Benedyk M, Marczyk A, Konradi A, et al. *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. Sci Adv [Internet]. 23 janv 2019 [cité 9 nov 2020];5(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6357742/>

107. Olsen I, Yilmaz Ö. Possible role of *Porphyromonas gingivalis* in orodigestive cancers. J Oral Microbiol [Internet]. 9 janv 2019 [cité 9 nov 2020];11(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6327928/>

108. Ahn J, Segers S, Hayes RB. Periodontal disease, *Porphyromonas gingivalis* serum antibody levels and orodigestive cancer mortality. Carcinogenesis. mai 2012;33(5):1055-8.

109. Farrell GC, van Rooyen D, Gan L, Chitturi S. NASH is an Inflammatory Disorder: Pathogenic, Prognostic and Therapeutic Implications. Gut Liver. avr 2012;6(2):149-71.

110. Siddiqui MS, Yamada G, Vuppalanchi R, Van Natta M, Loomba R, Guy C, et al. Diagnostic Accuracy of Non-Invasive Fibrosis Models to Detect Change in Fibrosis Stage. *Clin Gastroenterol Hepatol.* août 2019;17(9):1877-1885.e5.
111. Young CC. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* Am J Public Health (N Y). mai 1926;16(5):520-1.

5 ANNEXES

ANNEXE 1 : Questionnaire hygiéno-diététique destiné aux patients

Questionnaire hygiéno-diététique

Numéro d'anonymat :

INDICE CAO :

	Nombre	Dents Causales
Caries		
Obturation		
Absente		

QUESTIONNAIRE :

Partie 1 ORDRE GENERAL :

- Âge au recueil des données :
- Pays de naissance : Nationalité :
- Sexe : Femme | ou Homme
- Taille (cm) :
- Poids (kg) :
- Quel est votre niveau d'étude ?
 Primaire | Collège/CAP/BEP | Lycée | Bac | Bac+1à+3 | Bac ≥+4
- Quel sport pratiquez-vous ?
- A quelle fréquence ?
 Plusieurs fois / semaines | 1 fois / semaine | <1 fois / semaine | <1 fois / mois | Rarement ou jamais
- Fumez-vous ? Oui | Non | Ancien fumeur
Si oui depuis combien de temps :

Et combien de cigarettes par jour :

⇒ Score paquet/années (= nombre de paquets par jour x nombre d'années) =

- Présentez-vous des allergies ? Oui | Non

Si

oui

lesquelles :

.....
.....
.....
.....

- Quel est la date de votre dernière visite chez le Chirurgien-dentiste :

- Souffrez-vous d'une maladie cardio-vasculaire : Oui | Non

- Si oui, merci de préciser lesquelles et depuis combien de temps :

.....
.....
.....

- Prenez-vous un/des traitement(s) pour cette maladie cardio-vasculaire : Oui | Non

- Si oui, merci de préciser lesquels et depuis combien de temps :

.....
.....
.....

- Ce traitement a-t-il déjà été modifié ou arrêté ? Oui | Non

- Si oui, merci de détailler :

.....
.....
.....

- Souffrez-vous d'une autre maladie générale : Oui | Non

- Si oui, merci de préciser laquelle et depuis combien de temps :

.....
.....
.....

- Prenez-vous des médicaments autres que ceux pour la maladie cardio-vasculaire : Oui

Non

- Si oui, merci de préciser lesquels et depuis combien de temps :

.....
.....
.....

- Pouvez-vous évaluer votre niveau de stress avec un score de 0 (stress nul) à 10 (stress absolu)

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Partie 2 SANTE BUCCO-DENTAIRE :

- Quel est votre fréquence de brossage des dents :
Jamais Tous les mois Toutes les semaines Une fois par jour
Au moins deux fois par jour Au moins trois fois par jour
- Combien de temps vous brossez vous les dents :
Moins de 30 secondes Entre 30 secondes et 1 minute Entre 1 minute et 2 minutes
Plus de 2 minutes
- Quel(s) moment(s) de la journée ?
Matin Midi Soir Aléatoire
- Quel type de brosse à dent ?
Plutôt souple Medium Rigide Électrique
- Quel est votre fréquence d'utilisation du fil dentaire :
Jamais Tous les mois Toutes les semaines Une fois par jour
Au moins deux fois par jour
- Quel est votre fréquence d'utilisation du bain de bouche :
Jamais Tous les mois Toutes les semaines Une fois par jour
Au moins deux fois par jour
Si oui quel produit utilisez-vous ?
- Quel est votre fréquence d'utilisation des brossettes inter-dentaires :
Jamais Tous les mois Toutes les semaines Une fois par jour
Au moins deux fois par jour
- Quelle est en moyenne votre fréquence de consultation chez le chirurgien-dentiste ?
Moins d'une fois tous les deux ans 1 fois tous les 2 ans 1 fois par an
Au moins 2 fois par an
- Allez-vous chez le dentiste alors que vous n'avez pas mal (simple visite de contrôle) ?
Oui Non
- Êtes-vous à l'aise lorsque vous êtes assis sur le fauteuil dentaire ou dans la salle d'attente ?
Oui Non
- Vous sentez vous assez informé sur les mesures d'hygiène bucco-dentaire ?
Oui Non

PARTIE 3 : QUESTIONNAIRE ALIMENTAIRE

Tableau : combien de fois par semaine mangez-vous... ?

	Plusieurs fois par jour	Une fois par jour	Plusieurs fois par semaine	Une à deux fois par mois	Jamais
Du pain, des biscottes ou des céréales spéciales « petit déjeuner »					
Du riz, des pâtes, de la semoule ou des pommes de terre					
Des légumes ou des fruits secs (haricots, pois...)					
Des légumes (autres que légumes secs)					
Des fruits (jus de fruits 100% pur jus y compris)					
Des produits laitiers (yaourt, lait, fromage...)					
De la viande ou des œufs					
Du poisson ou tout autre produit issu de la pêche					
Des plats « prêts à consommer » (surgelés, frais ou en conserve)					
Des produits sucrés (viennoiseries, biscuits, pâtisseries, barres chocolatées...)					
Des biscuits d'apéritifs, des chips ou des biscuits de goûter					
Des compléments alimentaires					
Des boissons sucrées (soda, jus de fruits, sirop...)					
Des boissons alcoolisées (vin, bière, alcools forts, cocktails...)					

Question 1 : diriez-vous que vous arrivez à suivre la recommandation de consommation des 5 fruits et légumes par jour ?

Oui Non

Question 2 : avez-vous déjà connu des épisodes de boulimie ?

Oui actuellement Par le passé Non jamais

ANNEXE 2 : Formulaire de consentement

FORMULAIRE DE CONSENTEMENT

Étude observationnelle analytique explorant les relations entre microbiote buccal et sévérité de la stéatopathie métabolique dans l'objectif d'identifier un marqueur diagnostique non invasif.

« Bucco-NASH »

CODE PROMOTEUR

Version n°2 du 08/09/2018

Promoteur de la recherche : *CHU Toulouse*

Investigateur principal : Dr Maeva GUILLAUME, Dr Vincent BLASCO - BAQUE, Dr Matthieu MINTY

Je soussigné(e) (nom, prénom) certifie avoir lu et compris la note d'information qui m'a été remise.

J'ai eu la possibilité de poser toutes les questions que je souhaitais au Pr/Dr (nom, prénom) qui m'a expliqué la nature, les objectifs, les risques potentiels et les contraintes liées à ma participation à cette recherche.

Je connais la possibilité qui m'est réservée d'interrompre ma participation à cette recherche à tout moment sans avoir à justifier ma décision et je ferai mon possible pour en informer le médecin qui me suit dans la recherche. Cela ne remettra naturellement pas en cause la qualité des soins ultérieurs.

J'ai eu l'assurance que les décisions qui s'imposent pour ma santé seront prises à tout moment, conformément à l'état actuel des connaissances médicales.

Je suis informé(e) que la possibilité qu'une partie des prélèvements effectués à l'occasion de ce protocole de recherche soit conservée pour une utilisation ultérieure à des fins de recherche. J'ai également été informé(e) de mon droit à m'opposer à ce que cette conservation et cette utilisation ultérieure à des fins de recherche aient lieu.

J'ai pris connaissance que cette recherche a reçu l'avis favorable du Comité de Protection des Personnes de *nom du CPP (catégories 1, 2 et 3)* et l'autorisation de l'ANSM (*catégorie 1*) et a fait l'objet d'une déclaration à la Commission Nationale Informatique et Libertés (CNIL).

J'accepte que les personnes qui collaborent à cette recherche ou qui sont mandatées par le promoteur, ainsi qu'éventuellement le représentant des Autorités de Santé, aient accès à l'information dans le respect le plus strict de la confidentialité.

J'accepte que les données enregistrées à l'occasion de cette recherche puissent faire l'objet d'un traitement informatisé sous la responsabilité du promoteur.

J'ai bien noté que, conformément aux dispositions de la loi relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés, je dispose d'un droit d'accès et de rectification. Je dispose également d'un droit d'opposition à la transmission des données couvertes par le secret professionnel susceptibles d'être utilisées dans le cadre de cette recherche et d'être traitées. Ces droits s'exercent auprès du médecin qui me suit dans le cadre de cette recherche et qui connaît mon identité.

Si données génétiques : J'accepte que les données enregistrées à l'occasion de cette recherche comportant des données génétiques et notamment des données génétiques puissent faire l'objet d'un traitement informatisé par le promoteur ou pour son compte. J'ai bien noté que le droit d'accès prévu par la loi du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés (article 39) s'exerce à tout moment auprès du médecin qui me suit dans le cadre de la recherche et qui connaît mon identité. Je pourrai exercer mon droit de rectification et d'opposition auprès de ce même médecin qui contactera le promoteur de la recherche.

Mon consentement ne décharge en rien l'investigateur et le promoteur de la recherche de leurs responsabilités à mon égard. Je conserve tous les droits garantis par la loi.

Les résultats globaux de la recherche me seront communiqués directement, si je le souhaite, conformément à la loi du 4 mars 2002 relative aux droits des malades et à la qualité du système de santé.

Ayant disposé d'un temps de réflexion suffisant avant de prendre ma décision, j'accepte librement et volontairement de participer à la recherche

J'accepte librement et volontairement de participer à la collection biologique, et que mes échantillons soient analysés dans le cadre de recherches dans le domaine des maladies cardiovasculaires et métaboliques :

oui non

Je pourrai à tout moment demander des informations complémentaires au médecin qui m'a proposé de participer à cette recherche, n° téléphone :

Fait à le

Fait à le

Signature du patient/sujet :

Signature du médecin :

ANNEXE 3 : Protocole d'extraction de l'ADN salivaire

Protocole extraction échantillon ADN salivaire

- Sortir les échantillons par 12 /24 du congélateur (décongélation lente de préférence)
- Centrifuger 5 min à 14000 g à 4°C
- Sortir le kit d'extraction QiAmp Cador Pathogen Mini Kit QiAgen
- Enlever le surnageant avec une pipette pour ne garder que le culot (verser le tube si le culot tient bien + finir de pipeter)
- Rajouter 200 µL de PBS (prélever à partir d'un alicot de la solution mère toujours)
- Rajouter 100 µL de VXL mélangé avec du Carner RNA 1 µg/ µL du congélateur à -20° avec une dilution au 1000^{ème} donc mettre dans 2mL de VXL 2 µL RNA puis prélever 100 µL à rajouter à chaque échantillon : minifuger le mini-échantillon pour pouvoir récupérer la goutte + vortex
- Rajouter 20 µL de protéinase K (petit flacon)
- Vortexer pour mélanger les échantillons et éviter d'avoir trop de culot
- Incuber 15 min à 25°C dans un bain à SEC !
- Après avoir incubé à sec, rajouter 350 µL ACB puis vortexer / minifuger puis rajout sur colonne (numérotée et donc ajouter la correspondance des échantillons ☺ rajout sur colonne par pipetage environ 700uL sur colonne.
- Centrifuger 12000 g a 2 min : changer de tube et prendre un tube récolteur dans lequel on transfère juste le filtre récupéré puis rajout AW (éthanol) pour laver la colonne
- Ajouter 600 µL AW1
- Centrifuger 12000 g 3 min
- Ajouter 600 µL AW2
- Centrifuger 12000 g 3 min
- Centrifuger 20 000 g 5 min à VIDE
- Prendre des tubes récolteurs de 1,5 mL, couper le bouchon, rajouter les colonnes
- Rajouter 50 µL AVE dans les tubes collecteurs sur la colonne,
- Attendre 2 min le temps que le filtre se lave (mais pas plus) à T° ambiante
- Centrifuger 20 000 g pendant 2 min
- Nanodrop

TITLE

RELATIONSHIPS BETWEEN NON-ALCOHOLIC HEPATIC STEATOSIS,
INTESTINE AND ORAL CAVITY

ABSTRACT

In a society in which lifestyles evolve towards a fat and sugar-rich diet as well as a sedentary lifestyle, the incidence of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is increasing, correlated with that of obesity and diabetes. As NAFLD affects one out of four people worldwide, understanding the mechanisms involved in the disease's pathogenesis is essential to treat patients early, before the disease worsens. The study of the oral and intestinal microbiota revealed that dysbiosis could lead to NAFLD or promote its evolution. Relationships between oral cavity, intestine and non-alcoholic fatty liver disease have been established; and *Porphyromonas gingivalis*, a bacterium involved in periodontal disease, has been brought into question. A clinical study assessing the correlation between this periodontopathogens and the severity of fibrosis in NAFLD is currently under way. In addition to a specific individual assessment of oral health, the expected collective benefit is a better understanding of the relationships between the oral microbiota and non-alcoholic fatty liver disease in order to offer appropriate patient care by the gastroenterologist and the dentist.

RÉSUMÉ en français

Dans une société dans laquelle les modes de vie évoluent vers une alimentation grasse et sucrée ainsi qu'une sédentarité, l'incidence de la stéatose hépatique non alcoolique ou NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease) ne cesse d'augmenter, corrélée à celle de l'obésité et du diabète. Affectant près d'une personne sur quatre dans le monde, la compréhension des mécanismes mis en jeu dans la pathogenèse de la maladie est primordiale afin d'agir précocement chez les patients. L'étude des microbiotes buccal et intestinal a révélé qu'une dysbiose pouvait être à l'origine de la NAFLD ou favoriser sa progression. Des relations entre cavité orale, intestin et stéatose hépatique non alcoolique ont ainsi pu être établies ; et *Porphyromonas gingivalis*, une bactérie impliquée dans la maladie parodontale, a notamment été mise en cause. Une étude clinique est actuellement en cours afin d'évaluer la corrélation de cette bactérie parodontopathogène avec la sévérité de la fibrose dans la NAFLD. En plus d'une évaluation individuelle précise de la santé bucco-dentaire, le bénéfice collectif attendu est une meilleure connaissance des relations entre le microbiote oral et la stéatose hépatique non alcoolique afin de proposer une prise en charge adaptée par le gastro-entérologue et le chirurgien-dentiste.

TITRE ET RESUMÉ EN ANGLAIS

Voir au recto de la dernière page de la thèse

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE

Pharmacie

MOTS-CLÉS

- Stéatose hépatique non alcoolique
- NAFLD - NASH
- Microbiote intestinal
- Microbiote buccal
- Maladie parodontale
- *Porphyromonas gingivalis*

INTITULÉ ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE

Université Paul Sabatier,
Faculté de Pharmacie,
35, Chemin des Maraîchers
31062 Toulouse Cedex 4, France

Directeurs de thèse : Dr DOUIN Victorine et Dr BLASCO-BAQUE Vincent