



HAL
open science

Diagnostic non-invasif des stéatohépatites non alcooliques : évaluation de nouveaux candidats biomarqueurs plasmatiques

Justine Barthelon

► **To cite this version:**

Justine Barthelon. Diagnostic non-invasif des stéatohépatites non alcooliques : évaluation de nouveaux candidats biomarqueurs plasmatiques. Médecine humaine et pathologie. 2016. dumas-01387098

HAL Id: dumas-01387098

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01387098>

Submitted on 25 Oct 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE GRENOBLE ALPES
FACULTE DE MEDECINE

Année universitaire 2015 – 2016

Diagnostic non-invasif de la stéatohépatite non alcoolique : évaluation de nouveaux candidats biomarqueurs plasmatiques

THESE PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN MEDECINE

DIPLÔME D'ETAT en Gastro-entérologie et Hépatologie

JUSTINE BARTHELON

[Données à caractère personnel]

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE MEDECINE DE GRENOBLE*

Le Mercredi 19 Octobre 2016

DEVANT LE JURY COMPOSE DE

Président du jury : Mr le Professeur Jean-Pierre Zarski

Directeur de thèse : Mr le Professeur Vincent Leroy

Membres :

- Mme le Docteur Virginie Brun
- Mme Le Professeur Nathalie Sturm
- Mme le Docteur Marie-Noëlle Hilleret
- Mr le Professeur Jérôme Boursier

**La Faculté de Médecine de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.*

Table des matières

TABLE DES MATIERES	2
REMERCIEMENTS	3
LISTE DES PU-PH ET MCU-PH POUR L'ANNEE 2016-2017	4
LISTE DES ABREVIATIONS	8
RESUME	9
INTRODUCTION	11
ARTICLE	18
ABSTRACT	21
INTRODUCTION	23
PATIENTS AND METHODS	26
RESULTS	32
DISCUSSION	34
TABLES	37
FIGURES	42
SUPPLEMENTARY DATA	47
SUPPLEMENTARY TABLES & FIGURES	53
DISCUSSION	56
REFERENCES	65
ANNEXES	73
CONCLUSION	75
SERMENT D'HIPPOCRATE	77

Remerciements

Je remercie les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail :

Au président de ce jury, Monsieur le Professeur Jean-Pierre Zarski, merci infiniment de participer à ce titre. Je suis fière d'avoir pu bénéficier de votre enseignement durant mon internat. J'espère que ce travail sera à la hauteur de vos attentes.

A mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur Vincent Leroy, pour avoir accepté de diriger ce travail et s'y être investi. Merci de nous transmettre dès nos premiers semestres au CHU votre passion pour l'hépatologie. Je vous suis profondément reconnaissante pour votre enseignement et la confiance que vous m'accordez.

A Monsieur le Professeur Jérôme Boursier, pour votre expertise dans le domaine des marqueurs non-invasifs, pour avoir accepté de traverser la France pour cette singulière occasion. J'espère que votre regard expert sera indulgent. Au plaisir de pouvoir travailler conjointement entre nos deux CHU.

A Madame le Professeur Nathalie Sturm, pour votre expertise dans ce domaine bien particulier, pour votre précieuse aide sur l'interprétation des biopsies hépatiques, les lumières mises sur les scores anatomopathologiques (notamment le nouveau SAF !), et les remarques pertinentes sur la façon d'implémenter la base de données.

A Madame le Docteur Virginie Brun, pour ta bonne humeur permanente, ta patience inépuisable l'an passé quand il s'agissait de m'apprendre à faire des dilutions ou lire des résultats de MS, pour ton dynamisme inestimable ayant permis de mener à bien ce master 2. Merci de m'avoir ouvert les portes du monde mystérieux de la Recherche. Tu as presque réussi à me convaincre de me lancer en thèse de science !

A Madame le Docteur Marie-Noëlle Hilleret, pour t'être prêtée au jeu le plus assidûment dans l'inclusion de cette base (la reine du périmètre de hanches !), pour tes bons conseils, que ce soit en termes de transplantation hépatique ou de ski de fond. Merci de ta façon de nous former à l'hépatologie « socio-addicto-psychiatrique » grâce à tes patients des plus reconnaissables, et aux moments de détente « look » précédant souvent le début de la visite le mardi.

Liste des PU-PH et MCU-PH pour l'année 2016-2017



Doyen de la Faculté : M. le Pr. Jean Paul ROMANET

Année 2016-2017

ENSEIGNANTS A L'UFR DE MEDECINE

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH	ALBALADEJO Pierre	Anesthésiologie réanimation
PU-PH	APEL Florent	Ophthalmologie
PU-PH	ARVIEUX-BARTHELEMY Catherine	Chirurgie générale
PU-PH	BALOSSO Jacques	Radiothérapie
PU-PH	BARONE-ROCHETTE Gilles	Cardiologie
PU-PH	BARRET Luc	Médecine légale et droit de la santé
PU-PH	BAYAT Sam	Physiologie
PU-PH	BENHAMOU Pierre Yves	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	BERGER François	Biologie cellulaire
MCU-PH	BIDART-COUTTON Marie	Biologie cellulaire
MCU-PH	BOISSET Sandrine	Agents infectieux
PU-PH	BONAZ Bruno	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie
PU-PH	BONNETERRE Vincent	Médecine et santé au travail
PU-PH	BOREL Anne-Laure	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	BOSSON Jean-Luc	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	BOTTARI Serge	Biologie cellulaire
PU-PH	BOUGEROL Thierry	Psychiatrie d'adultes
PU-PH	BOUILLET Laurence	Médecine interne
PU-PH	BOUZAT Pierre	Réanimation
PU-PH	BRAMBILLA Christian	Pneumologie
MCU-PH	BRENIER-PINCHART Marie Pierre	Parasitologie et mycologie
PU-PH	BRICAULT Ivan	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	BRICHON Pierre-Yves	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
MCU-PH	BRIOT Raphaël	Thérapeutique, médecine d'urgence
MCU-PH	BROUILLET Sophie	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
PU-PH	CAHN Jean-Yves	Hématologie
MCU-PH	CALLANAN-WILSON Mary	Hématologie, transfusion
PU-PH	CARPENTIER Françoise	Thérapeutique, médecine d'urgence
PU-PH	CARPENTIER Patrick	Chirurgie vasculaire, médecine vasculaire
PU-PH	CESBRON Jean-Yves	Immunologie
PU-PH	CHABARDES Stephan	Neurochirurgie
PU-PH	CHABRE Olivier	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	CHAFFANJON Philippe	Anatomie

PU-PH	CHARLES Julie	Dermatologie
PU-PH	CHAVANON Olivier	Chirurgie thoracique et cardio- vasculaire
PU-PH	CHIQUET Christophe	Ophthalmologie
PU-PH	CINQUIN Philippe	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	COHEN Olivier	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	COUTURIER Pascal	Gériatrie et biologie du vieillissement
PU-PH	CRACOWSKI Jean-Luc	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
PU-PH	CURE Hervé	Oncologie
PU-PH	DEBILLON Thierry	Pédiatrie
PU-PH	DECAENS Thomas	Gastro-entérologie, Hépatologie
PU-PH	DEMATTEIS Maurice	Addictologie
MCU-PH	DERANSART Colin	Physiologie
PU-PH	DESCOTES Jean-Luc	Urologie
MCU-PH	DETANTE Olivier	Neurologie
MCU-PH	DIETERICH Klaus	Génétique et procréation
MCU-PH	DOUTRELEAU Stéphane	Physiologie
MCU-PH	DUMESTRE-PERARD Chantal	Immunologie
PU-PH	EPAULARD Olivier	Maladies Infectieuses et Tropicales
PU-PH	ESTEVE François	Biophysique et médecine nucléaire
MCU-PH	EYSSERIC Hélène	Médecine légale et droit de la santé
PU-PH	FAGRET Daniel	Biophysique et médecine nucléaire
PU-PH	FAUCHERON Jean-Luc	Chirurgie générale
MCU-PH	FAURE Julien	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	FERRETTI Gilbert	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	FEUERSTEIN Claude	Physiologie
PU-PH	FONTAINE Éric	Nutrition
PU-PH	FRANCOIS Patrice	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
MCU-MG	GABOREAU Yoann	Médecine Générale
PU-PH	GARBAN Frédéric	Hématologie, transfusion
PU-PH	GAUDIN Philippe	Rhumatologie
PU-PH	GAVAZZI Gaétan	Gériatrie et biologie du vieillissement
PU-PH	GAY Emmanuel	Neurochirurgie
MCU-PH	GILLOIS Pierre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	GRAND Sylvie	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	GRIFFET Jacques	Chirurgie infantile
PU-PH	GUEBRE-EGZIABHER Fitsum	Néphrologie
MCU-PH	GUZUN Rita	Endocrinologie, diabétologie, nutrition, éducation thérapeutique
PU-PH	HAINAUT Pierre	Biochimie, biologie moléculaire
PU-PH	HENNEBICQ Sylviane	Génétique et procréation
PU-PH	HOFFMANN Pascale	Gynécologie obstétrique
PU-PH	HOMMEL Marc	Neurologie
PU-MG	IMBERT Patrick	Médecine Générale
PU-PH	JOUK Pierre-Simon	Génétique
PU-PH	JUVIN Robert	Rhumatologie

PU-PH	KAHANE Philippe	Physiologie
PU-PH	KRACK Paul	Neurologie
PU-PH	KRAINIK Alexandre	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	LABARERE José	Epidémiologie ; Eco. de la Santé
MCU-PH	LANDELLE Caroline	Bactériologie - virologie
MCU-PH	LAPORTE François	Biochimie et biologie moléculaire
MCU-PH	LARDY Bernard	Biochimie et biologie moléculaire
MCU-PH	LARRAT Sylvie	Bactériologie, virologie
MCU - PH	LE GOUËLLEC Audrey	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	LECCIA Marie-Thérèse	Dermato-vénérologie
PU-PH	LEROUX Dominique	Génétique
PU-PH	LEROY Vincent	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie
PU-PH	LEVY Patrick	Physiologie
MCU-PH	LONG Jean-Alexandre	Urologie
PU-PH	MAGNE Jean-Luc	Chirurgie vasculaire
MCU-PH	MAIGNAN Maxime	Thérapeutique, médecine d'urgence
PU-PH	MAITRE Anne	Médecine et santé au travail
MCU-PH	MALLARET Marie-Reine	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
MCU-PH	MARLU Raphaël	Hématologie, transfusion
MCU-PH	MAUBON Danièle	Parasitologie et mycologie
PU-PH	MAURIN Max	Bactériologie - virologie
MCU-PH	MC LEER Anne	Cytologie et histologie
PU-PH	MERLOZ Philippe	Chirurgie orthopédique et traumatologie
PU-PH	MORAND Patrice	Bactériologie - virologie
PU-PH	MOREAU-GAUDRY Alexandre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	MORO Elena	Neurologie
PU-PH	MORO-SIBILOT Denis	Pneumologie
PU-PH	MOUSSEAU Mireille	Cancérologie
PU-PH	MOUTET François	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie
MCU-PH	PACLET Marie-Hélène	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	PALOMBI Olivier	Anatomie
PU-PH	PARK Sophie	Hémato - transfusion
PU-PH	PASSAGGIA Jean-Guy	Anatomie
PU-PH	PAYEN DE LA GARANDERIE Jean-François	Anesthésiologie réanimation
MCU-PH	PAYSANT François	Médecine légale et droit de la santé
MCU-PH	PELLETIER Laurent	Biologie cellulaire
PU-PH	PELLOUX Hervé	Parasitologie et mycologie
PU-PH	PEPIN Jean-Louis	Physiologie
PU-PH	PERENNOU Dominique	Médecine physique et de réadaptation
PU-PH	PERNOD Gilles	Médecine vasculaire
PU-PH	PIOLAT Christian	Chirurgie infantile
PU-PH	PISON Christophe	Pneumologie
PU-PH	PLANTAZ Dominique	Pédiatrie
PU-PH	POIGNARD Pascal	Virologie

PU-PH	POLACK Benoît	Hématologie
PU-PH	POLOSAN Mircea	Psychiatrie d'adultes
PU-PH	PONS Jean-Claude	Gynécologie obstétrique
PU-PH	RAMBEAUD Jacques	Urologie
PU-PH	RAY Pierre	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
PU-PH	REYT Émile	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH	RIGHINI Christian	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH	ROMANET Jean Paul	Ophthalmologie
PU-PH	ROSTAING Lionel	Néphrologie
MCU-PH	ROUSTIT Matthieu	Pharmacologie fondamentale, pharmaco clinique, addictologie
MCU-PH	ROUX-BUISSON Nathalie	Biochimie, toxicologie et pharmacologie
MCU-PH	RUBIO Amandine	Pédiatrie
PU-PH	SARAGAGLIA Dominique	Chirurgie orthopédique et traumatologie
MCU-PH	SATRE Véronique	Génétique
PU-PH	SAUDOU Frédéric	Biologie Cellulaire
PU-PH	SCHMERBER Sébastien	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH	SCHWEBEL-CANALI Carole	Réanimation médicale
PU-PH	SCOLAN Virginie	Médecine légale et droit de la santé
MCU-PH	SEIGNEURIN Arnaud	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	STAHL Jean-Paul	Maladies infectieuses, maladies tropicales
PU-PH	STANKE Françoise	Pharmacologie fondamentale
MCU-PH	STASIA Marie-José	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	STURM Nathalie	Anatomie et cytologie pathologiques
PU-PH	TAMISIER Renaud	Physiologie
PU-PH	TERZI Nicolas	Réanimation
MCU-PH	TOFFART Anne-Claire	Pneumologie
PU-PH	TONETTI Jérôme	Chirurgie orthopédique et traumatologie
PU-PH	TOUSSAINT Bertrand	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	VANZETTO Gérald	Cardiologie
PU-PH	VUILLEZ Jean-Philippe	Biophysique et médecine nucléaire
PU-PH	WEIL Georges	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	ZAOUI Philippe	Néphrologie
PU-PH	ZARSKI Jean-Pierre	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie

PU-PH : Professeur des Universités et Praticiens Hospitaliers

MCU-PH : Maître de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers

PU-MG : Professeur des Universités de Médecine Générale

MCU-MG : Maître de Conférences des Universités de Médecine Générale

Liste des abréviations

Par ordre alphabétique :

ADH1B: Alcohol Dehydrogenase 1B

ADH4: Alcohol Dehydrogenase 4

AHA: American Heart Association

ALT: Alanine Transaminase

AQUA: Accurately QUantitate low Abundance protein

AST: Aspartate Transaminase

BHMT1: Betaine-homocysteine Methyl-Transferase 1

CK18: Cytokeratin 18

CNIL: Commission Nationale Informatique et Liberté

EASL: European Association for the Study of Liver

ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay

HDLc: HDL cholesterol

HMGB1: High Mobility Group Box 1

HNF4 α : Hepatocyte Nuclear Factor 4 α

IDF: International Diabetes Federation

LC-MS/SRM: Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry/Selected Reaction Monitoring

MS: Mass Spectrometry

NAFL: Non Alcoholic Fatty Liver

NAFLD: Non Alcoholic Fatty Liver Disease

NAS: NAFLD Activity Score

NASH: Non Alcoholic Steato-Hepatitis

NGAL: Neutrophil gelatin associated lipocalin

NHLBO: National Heart, Lung and Blood Institute Organization

PSAQ: Protein Standard for Absolute Quantification

PT: Prothrombin Time

SAF: Steatosis, Activity, Fibrosis

SAS: Sleep Apnea Syndrom

SRM: Selected Reaction Monitoring

TSC: Transferrin Saturated Coefficient

WHO: World Health Organization

Résumé

Les stéatopathies dysmétaboliques, ou NAFLD, sont devenues un véritable problème de santé publique, en lien avec l'explosion épidémiologique de l'obésité et du syndrome métabolique dans le monde. La biopsie hépatique reste à ce jour l'examen de référence, permettant un diagnostic positif fiable et une évaluation robuste de la sévérité de la maladie hépatique. Cependant, elle reste un mauvais gold standard, en raison de nombreuses limites. Les alternatives moins invasives, biologiques notamment, manquent de spécificité (transaminases). Il existe donc un réel besoin de biomarqueurs circulants capables de limiter le recours à la biopsie. L'objectif principal de cette étude est d'évaluer une sélection de candidats biomarqueurs plasmatiques, clarifiant la sévérité de la NAFLD, en particulier la distinction entre stéatose et stéatohépatite.

Nous avons sélectionné 4 candidats protéiques (i.e BHMT1, ADH1B, ADH4 and CK18), par le biais de recherches bibliographiques exhaustives, de données "omiques", et d'investigations préalables de notre équipe en protéomiques. Les concentrations de chaque candidat ont été obtenues pour 53 plasmas issus de patients porteurs d'une NAFLD prouvée histologiquement. Deux sous-groupes ont été définis selon le score SAF. La combinaison de tests immunologiques et d'analyses protéomique ciblée (mode LC-MS/SRM) fait la force de ce travail.

Les résultats obtenus pour CK18 concordent avec ceux de la littérature, avec des taux plasmatiques plus élevés dans le groupe "maladie significativement active", comparativement au groupe "maladie modérément active", que ce soit pour la forme complète de CK18 M65, que pour son fragment M30 (respectivement $p=0.0001$; $p=0.0004$). Ces deux formes de CK18 sont corrélées avec les paramètres

histologiques de necroinflammation, tout comme la stéatose et la fibrose, ce qui en fait un biomarqueur de choix pour évaluer la sévérité globale des NAFLD. BHMT1 n'a en revanche pas pu être quantifié par test ELISA. Aucune différence n'a été observée entre les deux sous-groupes pour ADH1B et ADH4.

CK18 reste une protéine très intéressante pour l'appréciation de la sévérité globale des NAFLD. Concernant BHMT1, ADH1B et ADH4, les résultats d'analyses en protéomique ciblée manquent incontestablement pour se prononcer.

Introduction

Les modifications récentes des comportements sociaux et environnementaux ont changé le profil épidémiologique des hépatopathies. Certaines ont émergé comme de nouveaux problèmes de santé publique¹. Ainsi, les stéatopathies métaboliques ou NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Disease) sont actuellement la cause la plus fréquente de maladie hépatique chronique aux Etats- Unis, affectant approximativement 80 millions de personnes². Elle est en passe de devenir, dans la décennie qui vient, la première hépatopathie conduisant à la transplantation hépatique^{3,4}. Sous ce terme de NAFLD sont en fait rassemblées plusieurs entités histo-pathologiques allant de la stéatose pure (ou NAFL pour Non Alcoholic Fatty Liver) considérée comme relativement bénigne, à la stéatohépatite (ou NASH pour Non Alcoholic Steatohepatitis), qui peut être associée à une fibrose d'intensité variable pouvant aller jusqu'à la cirrhose, et faire le lit du carcinome hépatocellulaire⁵. Le plus souvent observée chez des malades porteurs d'un syndrome métabolique, elle est considérée comme la manifestation hépatique de ce syndrome. La prévalence de la stéatose à l'échelle mondiale varie entre 6,3% et 33% avec une médiane de 20% en population générale. La prévalence estimée pour la NASH s'échelonne entre 3 et 5% selon les études. Dans certains groupes à risque, tels que les patients obèses subissant une chirurgie bariatrique, la prévalence des NAFLD peut atteindre 90%, dont 5% sont déjà au stade de cirrhose infra clinique⁶. Parmi les patients diabétiques de type 2, celle-ci peut dépasser les 22%⁷.

Plusieurs études ont montré qu'il existait une hausse de la mortalité toutes causes confondues chez les patients atteints de NAFLD, comparativement à la population générale ; en revanche seuls les patients porteurs d'une NASH ont une mortalité d'origine hépatique plus élevée^{8,9}. Celle-ci est dix fois supérieure chez les sujets

NASH comparativement à la population générale⁹. Considérant le lien étroit entre NAFLD et syndrome dysmétabolique, sans surprise, la première cause de mortalité est cardiovasculaire, représentant 38% des étiologies^{6,10,11}.

La biopsie hépatique est à ce jour le seul examen permettant de confirmer le diagnostic de NAFLD, plus spécifiquement de NASH, et d'en établir la sévérité. Il s'agit toutefois d'un acte invasif, coûteux, dont le taux de complication grave est de l'ordre de 1%^{12,13}. Ses performances ne sont pas parfaites, en raison de problèmes de variabilité d'échantillonnage de la biopsie, et de reproductibilité des scores histologiques¹⁴. Il est de plus évident que cette procédure n'est pas appropriée en tant que test de dépistage.

Les dosages utilisés en clinique quotidienne telles que les transaminases (ALAT et ASAT) ne répondent pas à ces critères. Elles ne sont pas un bon outil de dépistage, avec une sensibilité de 40% dans une population d'obèses opérées par by-pass. En outre, des lésions de NASH peuvent être observées chez des patients à transaminases normales¹⁵. Inversement, chez les patients ayant une cytolysse inexpliquée, seul un tiers ont des lésions de NASH à la biopsie¹⁶. Des scores composites clinico-biologiques ont fait l'objet de nombreuses publications ces dernières années, s'attendant sur l'évaluation de la fibrose (Fibromètre¹⁷, NAFLD Fibrosis Score¹⁸), sur celle de la stéatose (Steatotest)¹⁹, ou encore de la composante nécrotico-inflammatoire amenant au diagnostic de NASH (oxNASH²⁰, Nashtest²¹). Tous se heurtent malheureusement à des problèmes de définition de seuils optimaux, limitant les intervalles de diagnostic fiable et laissant de nombreuses zones diagnostiques grises. D'ailleurs, les dernières recommandations européennes sur les tests non-invasifs de fibrose hépatique, éditées en 2015, stipulent le manque d'études de validation externe dans le champ des NAFLD²².

Certaines publications récentes soulèvent néanmoins des résultats encourageants, notamment concernant la corrélation pronostique de ces tests^{23,24}.

Sur le plan biologique, seulement quelques candidats biomarqueurs protéiques ont émergé ces dernières années. Cela concerne notamment la cytokératine 18 (CK18), intégrale, nommée antigène M65, et surtout son fragment clivé par la caspase 3 (nommé antigène M30), reflétant respectivement la mort cellulaire, et l'apoptose hépatocytaire^{25,26}. Néanmoins, un manque de spécificité compromet toujours son utilisation, et donc sa disponibilité en routine clinique. En association au sein de scores composites, tels que le Nice Model²⁷ ou le NASH Model of NAFLD Diagnostic Panel²⁸, la problématique de définition de seuils optimaux permettant un compromis entre sensibilité et spécificité reste de mise.

Par conséquent, il existe un réel besoin de mise au point de biomarqueurs circulants, qui à la fois permettraient la distinction entre NASH et NAFL, mais aussi évalueraient la sévérité de l'hépatopathie (*i.e* « stage » et « grade »).

Une des raisons à cette carence de biomarqueurs en hépatologie clinique provient du phénomène “d’entonnoir” technologique concernant leur développement. Ce dit “pipeline” correspond au processus amenant de la découverte à l'utilisation quotidienne du biomarqueur en clinique. Il souffre d'un manque de continuité entre laboratoires académiques et industrie orientée dans la mise au point de tels outils diagnostiques. Nos méthodes d'analyses doivent aussi être développées pour accéder plus rapidement à la phase d'évaluation des candidats, précédant la validation de ces derniers. Durant cette phase, la spécificité des candidats doit être étudiée²⁹. Ceci implique la sélection des candidats qui se révèlent significativement différents entre patients et donneurs sains. Généralement le test ELISA quantitatif est le test analytique privilégié pour ces études d'évaluation, grâce à sa haute

sensibilité et son important rendement. Néanmoins, comme la plupart des candidats échoueront en tant que biomarqueurs, le développement de ces tests immunologiques pour chaque candidat n'est pas viable³⁰. En revanche, les analyses en spectrométrie de masse (MS) quantitative sont de plus en plus utilisées dans ce domaine. Lorsque le type d'échantillon est complexe, tel que le plasma, l'analyse MS est réalisée en mode "ciblé", dit "targeted". Parmi d'autres, le mode Selected Reaction Monitoring (SRM) s'avère prometteur pour palier à ces obstacles technologiques^{31,32}, grâce à sa capacité d'analyse multiplexée. Cette approche repose sur l'analyse sélective préalable de peptides "signatures" issus des candidats biomarqueurs. Pour leur quantification absolue, c'est-à-dire pour déterminer leur concentration dans le plasma étudié, des standards isotopiques marqués sont couramment utilisés. Ces standards peuvent être des peptides ou des protéines, et génèrent les mêmes peptides signature que les protéines candidates³³. Grâce au marquage isotopique, ils peuvent alors être détectés distinctement pendant l'analyse MS. La quantification est possible par la comparaison des signaux obtenus par les peptides signatures non marqués, avec ceux obtenus pour les marqués (qui sont injectés à des concentrations connues préalablement définies). Parmi les méthodes d'analyse MS quantitative ayant recours à des peptides isotopiquement marqués, la méthode PSAQ™ fournit les meilleures performances analytiques³⁴. Cette méthode utilise des protéines intégrales entièrement marquées isotopiquement, comme standard de quantification. Comme ces standards PSAQ sont ajoutés directement dans les échantillons à la phase initiale, ils suivent l'exact même processus analytique que les cibles protéiques, et fournissent donc des résultats quantitatifs robustes.

Les mécanismes physiopathologiques en jeu dans la stéatose et ses complications

fibro-inflammatoires sont complexes et probablement multiples. L'insulinorésistance joue un rôle central dans la pathogénie de ces lésions^{35,36}. Le stress oxydant, l'apoptose, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α sont incontestablement impliqués. L'hypothèse historique du « double-hit » (accumulation lipidique hépatique relative au mode de vie et à l'insulinorésistance, responsable secondairement d'une sorte de sensibilisation du foie à une cascade d'évènements biochimiques promoteurs de fibrogénèse et d'inflammation), est maintenant abandonnée, au profit du « multiple-hit », développé par Buzzetti³⁷ récemment. Basé sur les principaux acteurs de la pathogénèse, ce projet s'inscrit dans le cadre des recherches translationnelles visant à utiliser les données et les méthodes d'analyse protéomique comme outil de développement de nouveaux biomarqueurs. Dans le domaine de l'hépatologie, ces nouveaux biomarqueurs permettront de restreindre les indications et donc la morbidité des biopsies hépatiques. Ainsi, ce travail prend part à un plus vaste projet qui a permis la sélection initiale d'un pool de protéines candidates : BHMT1 (Betaine-Homocysteine-S-Methyltransferase 1), ADH1B et 4 (Alcohol Deshydrogenase 1B et 4), NGAL (Neutrophil Gelatinated Associated Lipocalin), HMGB1 (High Mobility Group Box 1), HNF4 α (Hepatocyte Nuclear Factor 4 α), auxquelles CK18 a été ajoutée. Ces protéines, exprimées par le foie et détectables dans le plasma, ont été obtenues en croisant des bases de données bioinformatiques, génomiques et protéomiques, développées plus loin.

L'objectif de cette étude est d'évaluer ces protéines candidates biomarqueurs pour le diagnostic différentiel entre stéatose et NASH, reposant sur le pouvoir analytique de la protéomique "ciblée", consolidé par des tests immunologiques. Les objectifs en toile de fond sont de permettre le diagnostic plus précoce de la progression au sein du spectre NAFLD, donc de mieux en apprécier le pronostic, ainsi qu'à long terme

pouvoir optimiser la prise en charge thérapeutique.

Article

Non-invasive diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis: evaluation of new plasma biomarker candidates

Justine Barthelon^{2,3,4}, Floriane Pailleux^{1,2,3}, Michel Jaquinod^{1,2,3}, Ninon Zala^{1,2,3},
Mathilde Louwagie^{1,2,3}, Benoit Gilquin^{1,2,3}, Cindy Fenoll⁴, Laure Bordy⁴, Marie-Noëlle
Hilleret⁴, Thomas Decaens⁴, Jean-Pierre Zarski⁴, Nathalie Sturm⁵, Virginie Brun^{1,2,3},
Vincent Leroy⁴

1: CEA, iRTSV-BGE, F-38000 Grenoble, France

2: INSERM, BGE, F-38000 Grenoble, France

3: Université Grenoble Alpes, iRTSV-BGE, F-38000 Grenoble, France

4: Clinique universitaire d'Hépatogastroentérologie, CHU A. Michallon, F-38000 Grenoble, France

5 : Service d'anatomopathologie, CHU A. Michallon, F-38000 Grenoble, France

Corresponding authors :

- Barthelon Justine: Clinique universitaire d'Hépatogastroentérologie, CHU A. Michallon, F-38000 Grenoble, France ; Tel +33 4 76 76 54 50 ; E-Mail :

jbarthelon@chu-grenoble.fr

- Brun Virginie: CEA, IRTSV, Biologie à Grande Echelle, F-38054 Grenoble, France ; Tel +33 4 38 78 96 57 ; Fax +33 4 38 78 50 51 ; E-Mail : virginie.brun@cea.fr

- **Leroy Vincent**: Clinique universitaire d'Hépatogastroentérologie, CHU A. Michallon, F-38000 Grenoble, France ; Tel +33 4 76 76 54 50 ; E-Mail : vleroy@chu-grenoble.fr

Keywords: NAFLD, NASH, biomarkers, proteomic, SRM, ELISA, plasma, steatosis

Abbreviations: in order of appearance

NAFLD: Non Alcoholic Fatty Liver Disease

NAFL: Non Alcoholic Fatty Liver

NASH: Non Alcoholic Steato-Hepatitis

AST: Aspartate Transaminase

ALT: Alanine Transaminase

CK18: Cytokeratin 18

ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay

MS: Mass Spectrometry

SRM: Selected Reaction Monitoring

PSAQ: Protein Standard for Absolute Quantification

IDF: International Diabetes Federation

AHA: American Heart Association

NHLBO: National Heart, Lung and Blood Institute Organization

WHO: World Health Organization

CNIL: Commission Nationale Informatique et Liberté

SAF: Steatosis, Activity, Fibrosis

EASL : European Association for the Study of Liver

HNF4 α : Hepatocyte Nuclear Factor 4 α

HMGB1: High Mobility Group Box 1

BHMT1: Betaine-homocysteine Methyl-Transferase 1

NGAL: Neutrophil gelatin associated lipocalin

ADH1B: Alcohol Dehydrogenase 1B

ADH4: Alcohol Dehydrogenase 4

AQUA: Accurately QUantitate low Abundance protein

LC-MS/SRM: Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry/Selected Reaction Monitoring

SAS: Sleep Apnea Syndrom

TSC: Transferrin Saturated Coefficient

PT: Prothrombin Time

HDLc: HDL cholesterom

NAS: NAFLD Activity Score

Abstract

Background

In parallel with obesity and metabolic syndrome, NAFLD has become a Public Health problem in developed countries. Liver biopsy remains as the gold standard examination for reliable diagnosis and staging. However limitations, such as cost, stay problematical. Alternatives (transaminases, alone or integrated to composite scores) lack specificity. Thereby there is a clear need for circulating biomarkers. Our main objective was to evaluate some biomarker candidates in human plasma for assessing the severity of NAFLD, in particular discriminating NASH from steatosis.

Methods

We have selected 4 biomarker candidates (i.e BHMT1, ADH1B, ADH4 and CK18) from *omics* databases, literature searches and previous proteomics/immunoassays investigations. Concentrations of the candidates have been determined in 53 plasmas from biopsy-proven NAFLD patients thanks to immunoassays. Two subgroups were defined according to SAF score. Orthogonal analyses thanks to targeted proteomics in the LC-MS/SRM mode, coupled with isotope dilution standards, are about to be finished.

Results

Quantification of CK18 with ELISA confirmed literature data, by the demonstration of higher plasmatic concentrations among significant disease group compared to mild disease group, for total as well as caspase-cleaved CK18 (respectively $p=0.0001$; $p=0.0004$). Both CK18 are correlated with necroinflammatory histological parameters, but also steatosis and fibrosis, looking as accurate biomarker for appreciating overall NAFLD severity. BHMT1 was not quantifiable by immunoassay.

No difference has been observed between 2 subgroups in terms of ADH1B and ADH4 plasma levels. Results from LC-MS/SRM are only preliminary.

Conclusions

Total CK18 and CK18 fragments are serious candidate biomarkers for assessing NAFLD severity, including discriminate NASH from NAFL. Regarding BHMT1, ADH1B and ADH4, results from targeted proteomics are long awaited. Larger-scale studies are necessary to confirm these preliminary results.

Introduction

Along with the spread of obesity, insulin-resistance and metabolic syndrome in Western countries, NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Disease) has reached epidemic proportions and has emerged as a major public health concern³⁸. This syndrome includes several histopathological entities, such as simple steatosis (NAFL: Non Alcoholic Fatty Liver) or NASH (Non Alcoholic SteatoHepatitis). While NAFL is considered as relatively benign, NASH can evolve rapidly to hepatocarcinoma and/or cirrhosis. The worldwide prevalence for steatosis ranges from 6.3% to 33% with a median of 20% in the general population, whereas the estimated prevalence for NASH ranges from 3 to 5%³⁹. In high-risk groups, such as severely obese patients undergoing bariatric surgery, the prevalence of NAFLD can exceed 90% and up to 5% of patients may have unsuspected cirrhosis³⁹. Among type 2 diabetes patients, NAFLD prevalence could reach at least 22.3%⁴⁰. Several studies have proven that patients with NAFLD have increased overall mortality compared to matched control population, but only those with NASH have an increased liver-related mortality rate^{41,42}.

Liver biopsy remains as the gold standard examination for reliable diagnosis, in other words to stage NAFLD, to differentiate NASH from simple steatosis, and to grade fibrosis. However, this procedure is hampered by cost, invasiveness (severe complication rate is about 1%^{43,44}) and its performances are still imperfect (sampling variability, histological scores reproducibility)⁴⁵. Moreover, it is not appropriate as a screening test.

Thus, there is a clear need for circulating biomarkers that both accurately distinguishes NASH from NAFL, and determine stage and grade of the disease. To achieve this goal, NAFLD pathogenesis should be explored *via* different molecular

aspects, including necroinflammation (apoptosis⁴⁶) - partly relative to steatosis - and fibrogenesis.

The dosage of transaminases (AST, ALT) is not suited for this application, because of a lack of sensibility and sensitivity. For instance, only 40% sensitivity for ALT was observed in a by-passed obese population. On the contrary histological NASH lesions can be noted among patients with normal transaminases⁴⁷. Some composite scores have been proposed, focusing either on fibrosis staging, such as Fibrometer⁴⁸ or NAFLD Fibrosis Score¹⁸, or on steatosis and/or necroinflammation severity assessment, such as Steatotest¹⁹. These scores meet with some troubles regarding the definition of optimal thresholds, limiting reliable diagnosis^{21,49}. Notably, few plasma biomarker candidates have recently been described. This is the case of CK18 (cytokeratin18), under both total and caspase-cleaved fragment, whom respective assays M65 and M30 measure total cell death and hepatocyte apoptosis^{25,26}. Nevertheless, a lack of specificity still hampers its isolated use in daily practice.

A main reason for the dearth of new biomarkers in clinical Hepatology is a technological bottleneck in the biomarker development pipeline. The biomarker development pipeline is the process leading from discovery to the clinical use of biomarker. This pipeline suffers from a lack of follow-through and synergy between the activities of academic laboratories and the diagnostics industry. Analytical tools must also be developed to help speeding the evaluation phase. During evaluation, the specificity of candidates must be checked by assaying them in plasma and determining their reference concentration intervals²⁹. This involves first the selection of candidates that display different and significant abundances between patients and healthy donors. Most often quantitative ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent

Assay) is the favourite assay format for evaluation studies, thanks to its high sensitivity and high throughput. Nonetheless, as most candidates are likely to fail as pertinent biomarkers, ELISA development for all candidates is not feasible³⁰. Quantitative mass spectrometry-based analysis is increasingly used to evaluate protein biomarker candidates. When working with highly complex samples like plasma, MS analysis (mass spectrometry) is generally performed in a “targeted” mode. Among others, Selected Reaction Monitoring (SRM) has shown promise as a solution to this technological hindrance^{31,32}, thanks to high multiplexing capacities. This approach involves the selective analysis of signature peptides produced from biomarker candidates. For absolute quantification of these biomarker candidates, *i.e.* to determine their concentrations in the samples studied, stable-isotope labeled standards are commonly used. These standards can be peptides or proteins and generate the same signature peptides as the target biomarkers³³. Thanks to the isotopic labeling they can be distinguished from their non-labeled counterparts during MS analysis. Quantification is performed by comparing the signals generated by the non-labeled signature peptides to those generated by the corresponding labeled peptides (which are present at known concentrations). Among the quantitative MS-based methods using stable isotope standards, the PSAQ™ method provides the best analytical performance³⁴. This method uses whole isotopically labeled proteins as quantification standards. As PSAQ standards are spiked directly into the samples, they follow the same analytical process as their target analytes and provide highly accurate quantification results.

The goal of this study was to assess new protein biomarker candidates in plasma, for the differential diagnosis between steatosis and NASH, leaning on analytical power of targeted proteomics and immunoassays.

Patients and methods

Clinical samples

A prospective cohort of Caucasian patients suffering from NAFLD (i.e. “NAFLD cohort”) has been constituted within the Hepatology Clinic of Grenoble’s University Hospital, starting from November 2014. Inclusion period extended from November 2014 to May 2016. They were untreated, over the age of legal majority patients consulting for persistent increases of liver enzyme levels and/or steatosis discovered through ultrasonography, nearby one of the five hepatologists of the Clinic. Each patient who presented a cytolysis (AST and/or ALT > N), and/or GGT > 1N and/or hyperferritinemia (>200 µg/L), in the presence of at least one component of metabolic syndrome (according to the IDF/AHA/NHLBO definition in 2009⁵⁰; see Supplementary Table 1) could be suspected of NAFLD, and thus be proposed for inclusion in the cohort. Alcohol daily consumption had to respect World Health Organization (WHO)’s standards (i.e ≤ 30g/j or 21 units per week for men and ≤ 20g/j or 14 units per week for women).

Liver disease of other evident aetiologies such as alcohol-induced or drug-induced liver disease, viral hepatitis, cholestatic or metabolic/genetic liver disease (including hemochromatosis), and malignancies, were systematically searched, using specific clinical, laboratory, radiographic and/or histological criteria. Patients were excluded if such cofactor was identified. Subjects in whom an alcohol history was not provided, or when history was not enough precise concerning years ago, were also excluded. Serology for viral hepatitis B and C, as well as HIV, was performed in all patients, and all tested negative.

A total of 53 patients were identified. A complete medical history and physical examination was performed in all patients at the time of the first senior consultation.

Extensive laboratory data were collected thanks to twelve hours-fasting blood samples, taken once for each patient, of which a part was collected in EDTA tubes (BD Biosciences) to implement a bio-bank. These tubes were next centrifuged at 4400 g for 10 min to obtain plasma supernatants, immediately aliquoted and frozen at -80°C. Plasma samples from 11 healthy donors, paired by sex and age for 11 patients, were also collected during the same period, recruited on a voluntary basis. The study protocol conforms to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki as reflected in *a priori* approval by the institution's human research committee (registered number from the hospital's institutional review board: DC 2008-727; registered number from the National Commission for Data Protection and Liberties (CNIL-France): 1806433v0). Written informed consent was obtained from each patient included in the study (See Supplementary Data section I).

Liver Histology

A liver biopsy was systematically performed to confirm the diagnosis of NAFLD, as the reference for the definitive diagnosis of NASH. Delay between collecting blood samples (most often the day of the first appointment or the day of the liver biopsy) and liver biopsy had to be less than 26 weeks. Histologic examinations were performed by two experienced hepatopathologists. Histopathological findings were reported according to the Non-Alcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network Scoring System⁵¹, and the SAF score⁵², now recommended by EASL⁵³ (See Supplementary Table 2A et 2B). Grade of steatosis (S from 0 to 3), grade of activity (A from 0 to 4) calculated by addition of grades of ballooning (from 0 to 2) and lobular inflammation (from 0 to 2) were separately assessed. Stage of fibrosis was defined using a 4-point scale according to Kleiner system⁵¹ (0 = no fibrosis; 1 =

perisinusoidal or portal; 2 = perisinusoidal and portal /periportal; 3 = septal or bridging fibrosis; 4 = cirrhosis). We did not consider the subtypes 1 a-b-c because of the small size of our cohort, but preferred the simplified pattern. Biopsies were split into 2 subgroups according to SAF, as defined by Bedossa⁵⁴: mild disease ($A < 2$ and $F < 2$) and significant disease ($A \geq 2$ and/or $F \geq 2$). This strategy allows a definition of overall histological severity of disease independently of a diagnosis of NASH, but based on activity and fibrosis.

Selection of protein biomarker candidates

This study fits into a larger project that is still in progress, which has started with the selection of plasma biomarker candidates thanks to an original bioinformatics approach (see Supplementary Data section II for detailed explanations). Five targeted proteins have been selected. All are implicated in cellular death mechanisms and/or inflammation, except HNF4 α (Hepatocyte Nuclear Factor 4 α) involved in lipid metabolism. These included HMGB1 (High Mobility Group Box 1), BHMT1 (Betaine-homocysteine Methyltransferase 1), NGAL (Neutrophil gelatin associated lipocalin), ADH1B (Alcohol Dehydrogenase 1B), HNF4 α , to whom CK18 (cytokeratin 18) is added as an already “reference” biomarker (under both total and caspase-cleaved fragment).

Screening of candidates

Next step was about selecting those proteins clinically relevant for NASH diagnosis. Concentrations have been determined in 11 plasma from NASH patients compared to 11 plasma from healthy donors, paired by sex and age. To complete the multiplex dosage of these candidates, we harnessed the analytical power of targeted

proteomics in the LC-MS/SRM mode, coupled with isotope dilution PSAQ standards (for BHMT1, ADH1B and NGAL provided by Promise Advanced Proteomics). Immunoassays have been used for orthogonal analytical validation. HMGB1, HNF4 α , and CK18 (total and caspase-cleaved fragment) plasmatic concentrations in the 22 samples were determined using Human HMGB1 ELISA Kit (IBL International), Human HNF4 α ELISA Kit (BlueGene), Human M65 + Human M30 ELISA Kit (Peviva VLV Bio), respectively. Plasmatic concentrations were defined using the ELISA analysis software (<http://www.elisaanalysis.com/app>). Four-parameter logistic or polynomial cubic regressions have been used for fitting algorithm, as recommended by providers.

Evaluation of candidates

Then we focused on the 2 biomarker candidates that performed well in this previous step (*i.e* BHMT1, ADH1B). This involved evaluation of their specificity among the cohort of 53 patients described above, thanks to targeted proteomics in the LC-MS/SRM mode, and immunoassays. ADH4 (Alcohol Dehydrogenase 4) was added to the panel, whereas CK18 (total and caspase-cleaved) was kept as a control candidate.

Biochemical preparation and LC-MS/SRM Analysis

This step is still in progress. Samples are submitted to the same kind of biochemical process than for screening set. LC-MS/SRM method has been developed to be more accurate.

ELISA Assays

CK18 (total M65 and caspase-cleaved fragment) plasmatic concentrations in the 53 samples were determined using the same kit as previously. ADH4, ADH1B and BHMT1 plasmatic concentrations in the 53 samples were determined using the Human ADH4 BioAssay™ ELISA Kit (US Biological life sciences), Human ADH1B ELISA Kit (Cloud-clone corp) and Human BHMT1 ELISA Kit (Cusabio). The three kits were purchased *via* Antibodiesonline website. Assays and data analysis were performed in accordance with the manufacturer's instructions. Concentrations from immunoassays that were above the highest concentration standard were controlled after a dilution of plasma sample according to the manufacturer's instructions and submitted to a new assay. The optical density was measured at 450 nm using a microplate reader (BMG Labtech). Plasmatic concentrations were defined using the same ELISA analysis software. Four-parameter logistic or linear regressions have been used for fitting algorithm. ELISA assays were performed for all samples in a single session by two trained investigators.

Statistical analysis

Statistics were calculated with Excel 2010, online website BiostaTGV (<http://marne.u707.jussieu.fr/biostatgv/>), and Prism software (Version 2014). Descriptive statistics were computed for all variables, including medians, 25th and 75th percentiles for continuous factors. Percentages were calculated for categorical variables. Mann-Whitney's tests were used to assess if there were any differences in terms of continuous clinical ou biological characteristics between the 2 groups. Fisher's exact test was used for categorical factors. Spearman's correlation test was

used to evaluate the association between each protein candidate and several factors of interest, mainly histological. $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

Results

Patients and biopsies

Table 1 sums up baseline clinical and biological characteristics of patients cohort, whereas Table 2 their histological characteristics. There was no statistical difference between two subgroups except for diabetes, waist circumference, HDL cholesterol, hyaluronic acid, revised Quicki. There was no statistical difference either regarding biopsy length, with a median of 26 mm.

Screening of candidates

LC-MS/SRM underlined higher plasma levels of BHMT1 and ADH1B in NASH patients compared to healthy donors ($p=0.004$; $p=0.008$ respectively). Respective box plots are presented in Figure 1A/B. Quantification of CK18 with ELISA confirmed literature data, by the demonstration of higher plasmatic concentrations among NASH patients compared to controls ($p=0.001$ for M65; $p=0.002$ for M30). NGAL, HMGB1 and HNF4 α were not quantifiable by mass spectrometry, essentially because of a low signal/noise ratio, suggesting low plasma levels, with a LC-MS/SRM method insufficiently sensitive for reliable quantification. No difference has been observed between NASH and controls using ELISA assays for HMGB1 and HNF4 α (respectively $p=0.42$; $p=0.77$).

Evaluation of candidates

We focused on BHMT1, ADH1B, ADH4 and CK18 under both total and fragment forms.

LC-MS/SRM Analysis

No result can be developed at this point. Analyses are still in progress, especially concerning BHMT1.

ELISA Assays

Tables 3 and 4 sum up statistical results for biomarker candidates.

Regarding CK18, total as well as caspase-cleaved, statistical differences between mild and significant diseases (respectively $p=0,0001$ and $p=0,0004$) were underlined. Indeed we observed higher plasma levels in the subgroup with significant disease, compared to the second one. This suggests that both proteins are linked with the severity of NAFLD. Logically we observe correlations between plasma levels and histological parameters of necro-inflammation (*i.e* ballooning and lobular inflammation), but also with steatosis (especially for M30; $p<0,0001$) and fibrosis (see Figure 2A/B/C).

Regarding both ADH, we could not show any statistical differences in terms of concentrations between mild and significant diseases (see Figure 3A). No correlation could be observed either with the main histological variables (see Figure 3B/C).

Interestingly, looking at routinely used prediction scores of liver fibrosis in NAFLD, we noted that Fibroscan seemed to be more accurate than Fibrotest (respectively $p=0,008$; $p=0,41$), as summarized in Table 5.

We could not obtain any reliable data concerning BHMT1 dosage. Thus far there is no robust commercialized immunoassay available.

Discussion

NAFLD is nowadays the most common liver disorder in Western countries and Americas, reaching between 10 and 30% of adults, depending on age, sex, ethnicity, and diagnostic method. Presence of metabolic syndrome, or at least some components, can seriously increase its prevalence⁵⁵. Moreover mortality is directly impacted by the presence of NAFLD or NASH⁵. Fibrosis is its main prognostic factor^{10,11} demonstrated at this time. Liver biopsy stays the only reliable way to assess activity (*i.e* steatosis, necroinflammation) and severity (*i.e* fibrosis), but its invasiveness, variability and cost remain unsolvable problems in front of epidemic incidence. Therefore we need to deliver new biomarker candidates to overcome these limits, to achieve earlier prediction of disease progression (prognosis) and to improve therapeutic management.

Our investigations enabled the qualification of biomarker candidates with the selection of those that were effectively leaked in the plasma and that display different abundances between patients and healthy donors (*i.e* ADH1B, BHMT1, total CK18 and CK18 fragments). Then, adding ADH4, we evaluated their capacity to differentiate NASH from NAFL, and to assess fibrosis, compared to histological standardized parameters. Currently none of our candidates seem to be able to reach the performances of CK18. Nevertheless these first conclusions rest only on non-clinical immunoassays, and we are undeniably missing data from LC-MS/SRM, particularly concerning BHMT1. Thus we can point out some strengths of this work. To our best knowledge, we are among the first teams using SAF score for histological description, more accurate than NAS. In parallel we chose to classify patients according to overall histological severity, as proposed by Bedossa²⁸. Among

other advantages, this attitude allows to better classify NASH patients with advanced fibrosis and consecutively more or less no activity. In most previous published studies regarding non-invasive biomarkers^{27,56}, categorizing patients (« NASH », « Non-NASH », +/- « Borderline NASH ») was performed only with respect to NAS. Obviously this study has some limitations, whose several are shared with many previous studies in fact. First the size of our cohort is surely being power insufficiency. Second alcohol intake was only declarative, which can lead to underestimation of drinking, particularly in France. Usefulness of questionnaires, such as AUDIT^{57,58}, has been demonstrated to limit this confusion factor. Thirdly liver histology was taken as reference but we know that it is an imperfect standard, as previously exposed. We did not perform double blinded analyses of liver biopsies either. Moreover delay between plasma collection and biopsy was fixed to a maximum of 26 weeks. Ideally any delay should be respected to minimize differences due to changes over time. Besides our data suffer from « one-time » point regarding biological and histological variables. Indeed variations of biomarkers over time compared to histology are probably more interesting to point out some correlations⁵⁹.

The idea of finding a test that can diagnose NASH at a given moment looks really difficult, if not impossible. In 2014 Chan⁶⁰ hypothesized that it may be more realistic to search for biomarkers or composite scores that would reflect changes in severity of NASH when followed over time. Better than focusing on NASH, we should be able to detect during follow-up the time when necroinflammatory processes starts.

Facing epidemic proportions of NAFLD worldwide, find a way to accurately identify patients with active and/or advanced disease is mandatory. Test combinations with different biological biomarkers may be the best option. CK 18 has definitely proved

its interest in assessing NAFLD activity. BHMT1 and both ADH could be promising additional biomarkers, subject to proteomics awaited results. Longitudinal data correlating changes in histological severity and non-invasive measurement are urgently needed.

Tables

Table 1. Clinical and laboratory characteristics of Patient population

Variables	All Subjects (n=53)	Mild disease (n = 13)	Significant disease (n = 40)	p value*
Sex				
Female, n (%)	23 (43,4)	6 (46,2)	17 (42,5)	1
Male, n (%)	30 (56,6)	7 (43,8)	23 (57,5)	
Age at enrollment, yrs, median (IQR)	61,5 (46,9 - 68,1)	53,7 (37,9 - 65,4)	62 (47,8 - 68,3)	0,19
BMI, kg/m ² , median (IQR)	28,7 (26 - 31,9)	27,9 (27,6 - 28,7)	29,2 (25,4 - 33,1)	
< 25, n (%)	7 (13,2)	3 (15,4)	5 (12,5)	0,189
25 < BMI < 30, n (%)	24 (45,2)	8 (61,5)	16 (40)	
≥ 30, n (%)	22 (41,5)	3 (23,1)	19 (47,5)	
Abdominal circumference				
Female, median (IQR)	101 (95 - 111)	102 (101 - 103)	99 (93 - 113)	0,048
Male, median (IQR)	107 (97 - 118)	93 (89 - 99)	111 (103 - 120)	
diabetes, yes, n (%)	22 (41,5)	1 (7,7)	21 (52,5)	0,007
High Blood Pressure, yes, n (%)	28 (52,8)	4 (30,8)	24 (60)	0,11
Dyslipidemia, yes, n (%)	25 (47,2)	5 (38,5)	20 (50)	0,54
SAS, yes, n (%)	12 (22,6)	1 (7,7)	11 (27,5)	0,25
Smoking				
Former and non smoker, n (%)	47 (88,7)	12 (92,3)	35 (87,5)	1
Current, n (%)	6 (11,3)	1 (7,7)	5 (12,5)	
AST, UI/L	37 (27 - 54)	27 (21 - 48)	37 (29 - 55)	0,069
ALT, UI/L	59 (43 - 89)	51 (41 - 89)	59 (45 - 89)	0,57
PAL, UI/L	77 (60 - 106)	78 (65 - 103)	75 (60 - 107)	0,63
GGT, UI/L	93 (84 - 174)	117 (44 - 276)	81 (46 - 160)	0,627
total bilirubin level	11 (8 - 15)	13 (11 - 15)	9,5 (7 - 12,5)	0,068
ferritinemia, µg/L	243 (136 - 409)	236 (99 - 315)	243 (137 - 447)	0,57
TSC, %	28 (21 - 36)	27 (26 - 29)	28 (20 - 38)	0,83
Platelets, × 10 ⁹	217 (186 - 245)	206 (186 - 245)	219 (186 - 245)	0,85
TP, %	97 (91 - 100)	100 (95 - 100)	97 (90 - 100)	0,058
Albumin, g/L	44 (41 - 46)	44 (40 - 45)	44 (42 - 46)	0,73
Triglycerids, g/l	1,16 (0,99 - 1,85)	1,10 (0,84 - 1,3)	1,27 (1,0 - 1,86)	0,469
HDLc, g/l	0,45 (0,37 - 0,52)	0,51 (0,46 - 0,54)	0,42 (0,34 - 0,49)	0,0069
fasting glycaemia, mmol/L	5,4 (5,1 - 6,16)	5,20 (4,7 - 5,9)	5,48 (5,1 - 6,73)	0,42
us CRP, mg/L	1,8 (1,1 - 3,7)	1,70 (1,1 - 2,6)	1,85 (1,1 - 5,1)	0,49
hyaluronic acid, µg/L	50 (28,3 - 81,3)	31 (19,5 - 41)	55 (33,5 - 86,7)	0,01
HOMA	2,97 (1,83 - 4,38)	1,99 (1,14 - 3,02)	3,19 (2,21 - 4,43)	0,058
revised QUICKI	0,35 (0,33 - 0,37)	0,36 (0,35 - 0,41)	0,34 (0,33 - 0,37)	0,037

* p value corresponds to the comparison of the two subject groups

Table 2. Histological characteristics of Patient population

Histological characteristics	All Subjects n = 53, (%)	Mild disease n = 13, (%)	Significant disease n = 40, (%)
Liver biopsy length, mm, median (IQR)	26 (22 - 35)	30 (25 - 35)	25 (21 - 34)
Number of portal tracts, median (IQR)	12 (10 - 15)	14 (12 - 17)	12 (9 - 15)
NAS, median (IQR)	4 (2)	2 (3)	5 (2)
0	4 (7,55)	4 (31)	0 (0)
1	2 (3,77)	2 (15,3)	0 (0)
2	4 (7,55)	3 (23,1)	1 (2,5)
3	9 (16,98)	2 (15,3)	7 (17,5)
4	8 (15,10)	2 (15,3)	6 (15)
5	14 (26,41)	0 (0)	14 (35)
6	10 (18,87)	0 (0)	10 (25)
7	2 (3,77)	0 (0)	2 (5)
8	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Steatose			
< 5%	5 (9,43)	5 (38,5)	0 (0)
5% - 33%	11 (20,75)	3 (23,1)	8 (20)
33% - 65%	16 (30,20)	3 (23,1)	13 (32,5)
≥ 66%	21 (39,62)	2 (15,3)	19 (47,5)
Ballooning			
None	8 (15,10)	8 (61,5)	0 (0)
Few	18 (33,96)	5 (38,5)	13 (32,5)
Many	27 (50,94)	0 (0)	27 (67,5)
Lobular inflammation			
< 2 under 20×	21 (39,62)	11 (84,7)	10 (25)
2 - 4 under 20×	29 (54,72)	2 (15,3)	27 (67,5)
> 4 under 20×	3 (5,66)	0 (0)	3 (7,5)
Fibrosis (Kleiner)			
0	9 (16,98)	9 (69)	0 (0)
1	9 (16,98)	4 (31)	5 (12,5)
2	14 (26,41)	0 (0)	14 (35)
3	8 (15,10)	0 (0)	8 (20)
4	13 (24,53)	0 (0)	13 (32,5)

Table 3. Plasmatic concentrations for each protein biomarker candidate according to Mann-Whitney's test.

Calculated concentration for each biomarker	All Subjects n = 53 median (IQR)	Mild disease n = 13 median (IQR)	Significant disease n = 40 median (IQR)	<i>p</i> value*
CK18 M30 (U/L)	171 (121 - 332)	121 (105 - 135)	228 (136 - 386)	0,00041
CK18 M65 (U/L)	344 (261 - 583)	234 (189 - 276)	423 (302 - 643)	0,00014
ADH1B (pg/mL)	284 (230 - 371)	263 (233 - 319)	291 (229 - 375)	0,362
ADH4 (ng/mL)	47 (35,1 - 59)	49 (37 - 55)	45 (34,5 - 59)	0,893

* *p* value corresponds to the comparison of the two subject groups

Table 4. Spearman's correlation test between biomarker candidates and main histological parameters

n = 53	Fibrosis	Steatosis	Ballooning	Lobular inflammation	SAF Activity	NAS
CK18 M30						
<i>p</i> value	<0,0001	<0,0001	0,042	0,033	0,004	<0,0001
<i>r</i>	0,53	0,52	0,39	0,29	0,39	0,53
95% CI	0,30 - 0,71	0,29 - 0,70	0,12 - 0,60	0,017 - 0,53	0,12 - 0,60	0,29 - 0,70
CK18 M65						
<i>p</i> value	0,002	0,003	0,004	0,006	0,001	0,0001
<i>r</i>	0,41	0,4	0,39	0,37	0,44	0,5
95% CI	0,15 - 0,62	0,14 - 0,61	0,13 - 0,60	0,11 - 0,60	0,18 - 0,64	0,26 - 0,68
ADH1B						
<i>p</i> value	0,2	0,9	0,79	0,48	0,86	0,73
<i>r</i>	0,18	0,018	-0,037	0,099	-0,02	0,048
95% CI	-0,10 - 0,43	-0,26 - 0,29	-0,31 - 0,24	-0,18 - 0,37	-0,30 - 0,25	-0,23 - 0,32
ADH4						
<i>p</i> value	0,06	0,85	0,45	0,21	0,23	0,22
<i>r</i>	0,26	0,026	0,11	0,17	0,17	0,17
95% CI	-0,016 - 0,50	-0,25 - 0,30	-0,18 - 0,37	-0,11 - 0,43	-0,11 - 0,42	-0,11 - 0,43

Table 5. Performance of non-invasive routinely used fibrosis tests

Fibrosis assessment	All Subjects n = 53 median (IQR)	Mild disease n = 13 median (IQR)	Significant disease n = 40° median (IQR)	p value*
Fibroscan	11,5 (8,5 - 20,2)	8,85 (6,8 - 10,7)	15,6 (8,9 - 23,1)	0,008
Fibrotest	0,44 (0,21 - 0,64)	0,34 (0,21 - 0,55)	0,47 (0,26 - 0,65)	0,41

* p value corresponds to the comparison of the two subject groups

° n = 35 for elasticity in the significant disease subgroup

Figures

Figure 1A. Box plot comparing plasma levels of BHMT1 between healthy donors (n = 11) and NASH patients (n = 11)

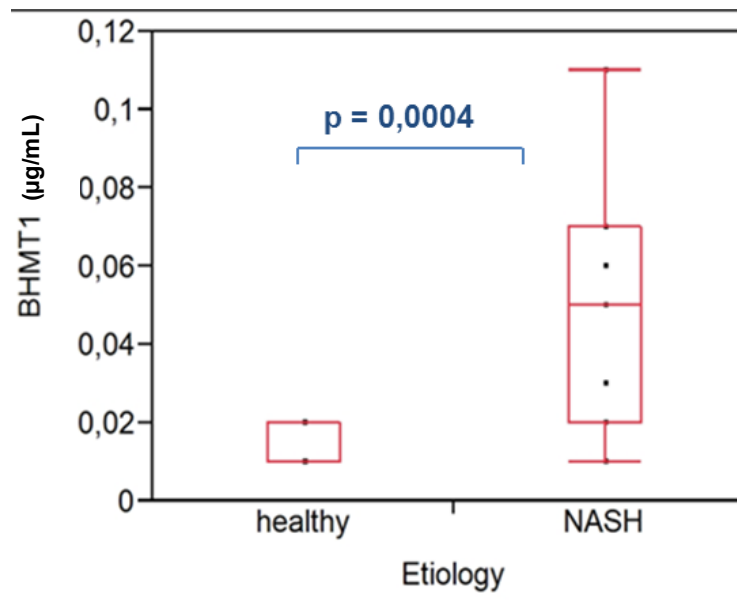
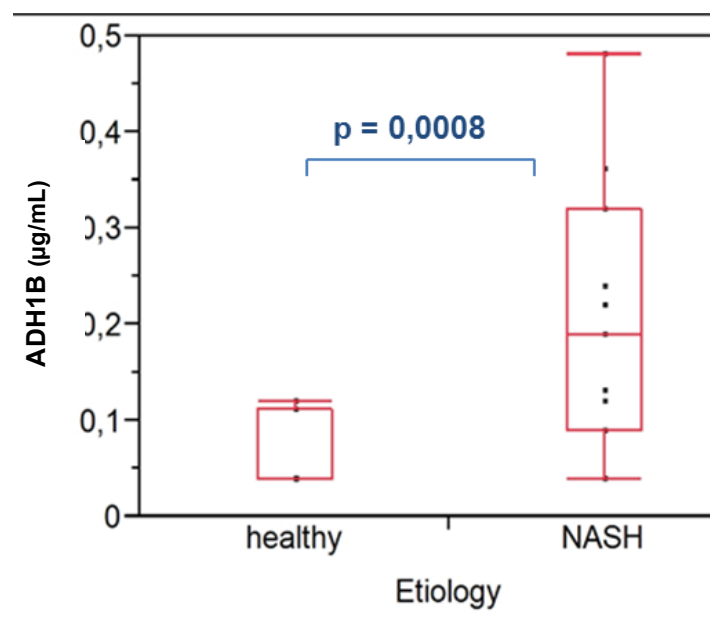


Figure 1B. Box plot comparing plasma levels of ADH1B between healthy donors (n = 11) and NASH patients (n = 11)



Mann-Whitney's test was applied for both. $p < 0.05$ was considered as threshold of significance.

Figure 2A. Scatter-plot representing CK18 plasmatic levels according to histological activity of NAFLD (Mann-Whitney's test)

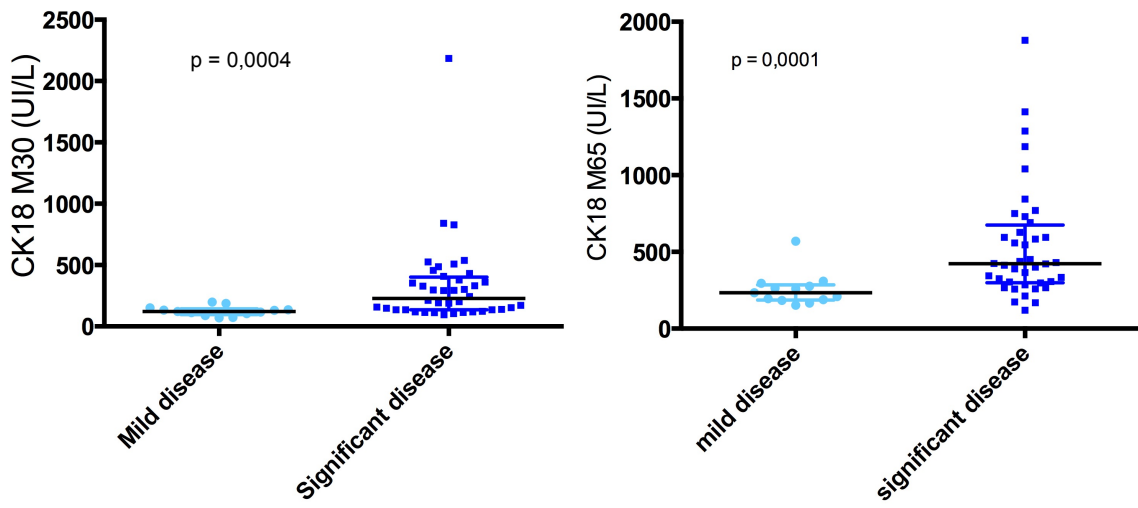


Figure 2B. Individual data for total CK18 according to main histological parameters (Spearman's correlation test). Statistical significance was obtained for the four tests.

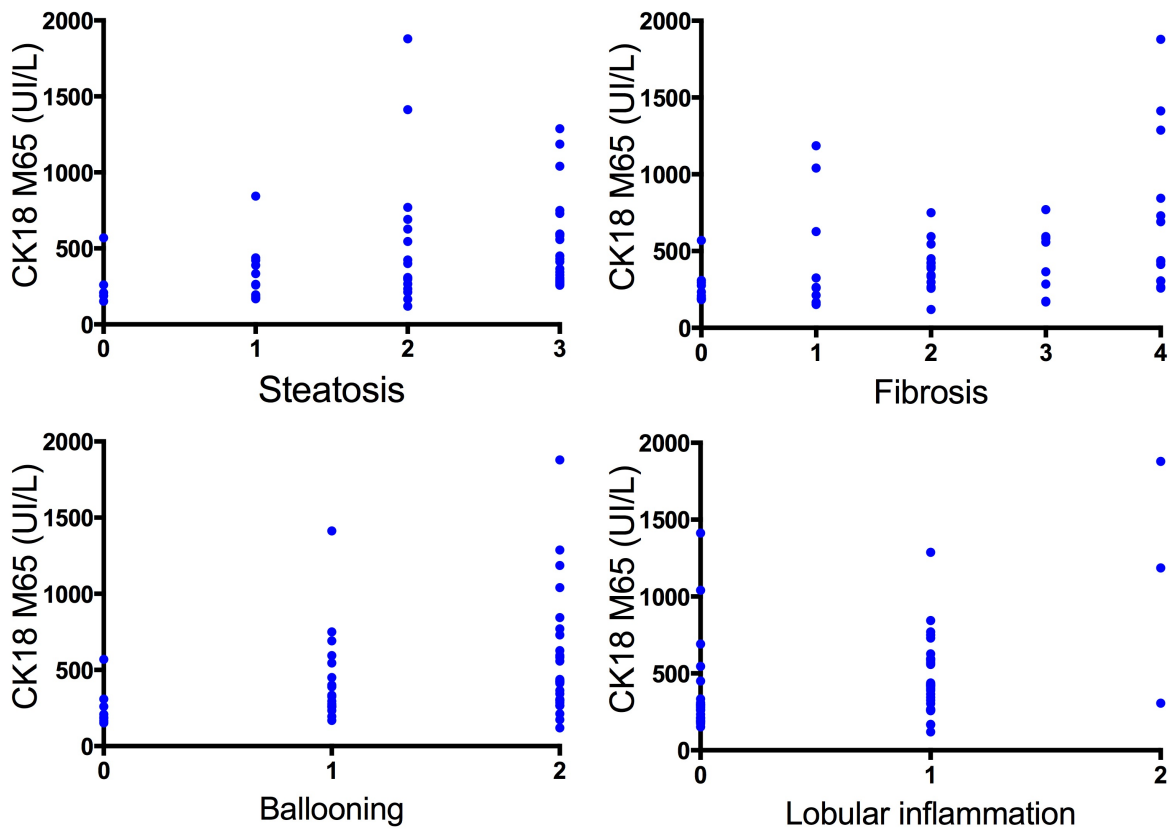


Figure 2C. Individual data for CK18 fragments according to main histological parameters (Spearman's correlation test). Statistical significance was obtained for the four tests.

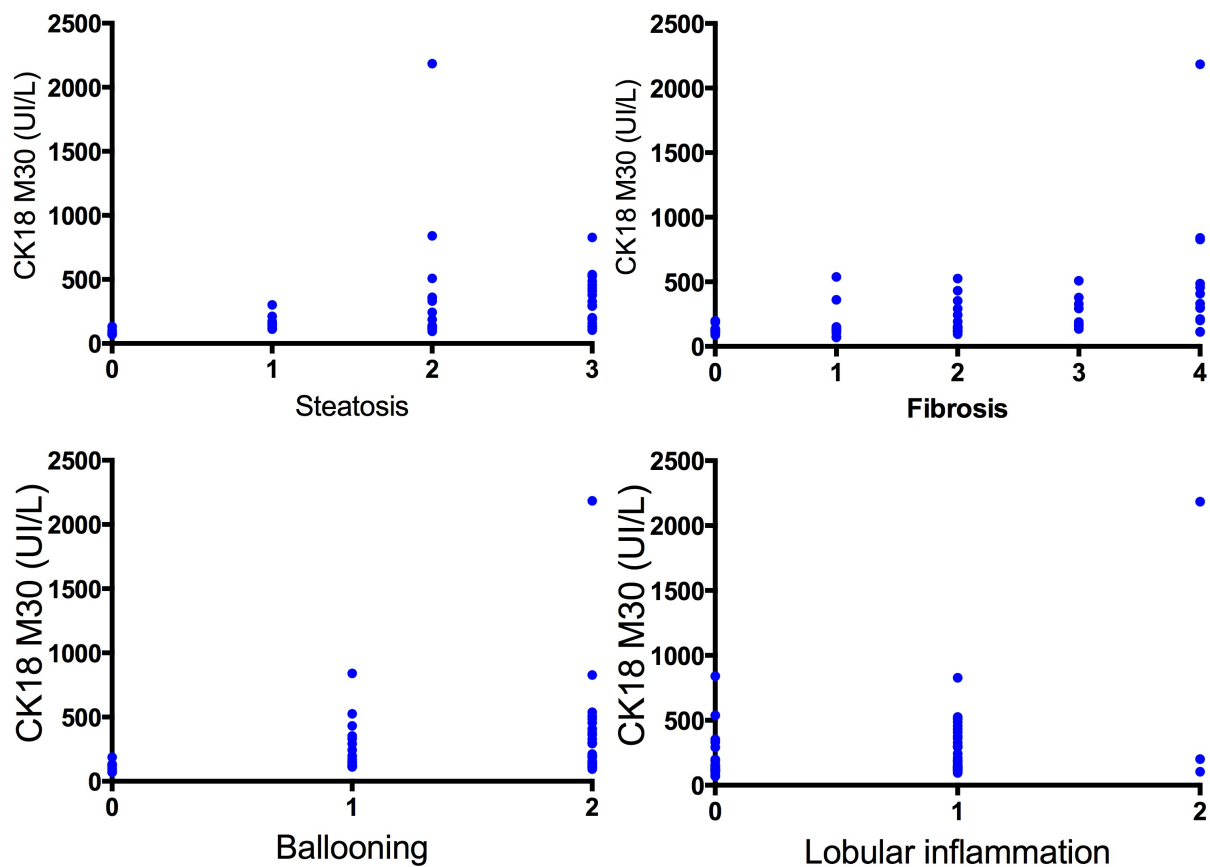


Figure 3A. Scatter-plot representing ADH1B and ADH4 plasmatic levels according to histological activity of NAFLD (Mann-Whitney's test)

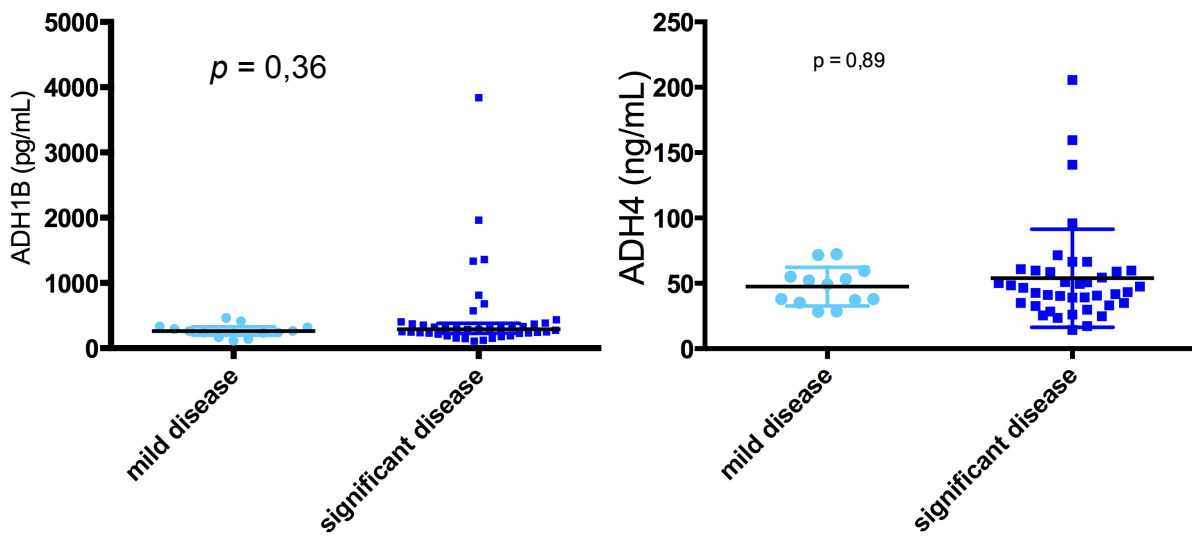


Figure 3B. Individual data for ADH1B according to main histological parameters (Spearman's correlation test). No statistical difference was reported.

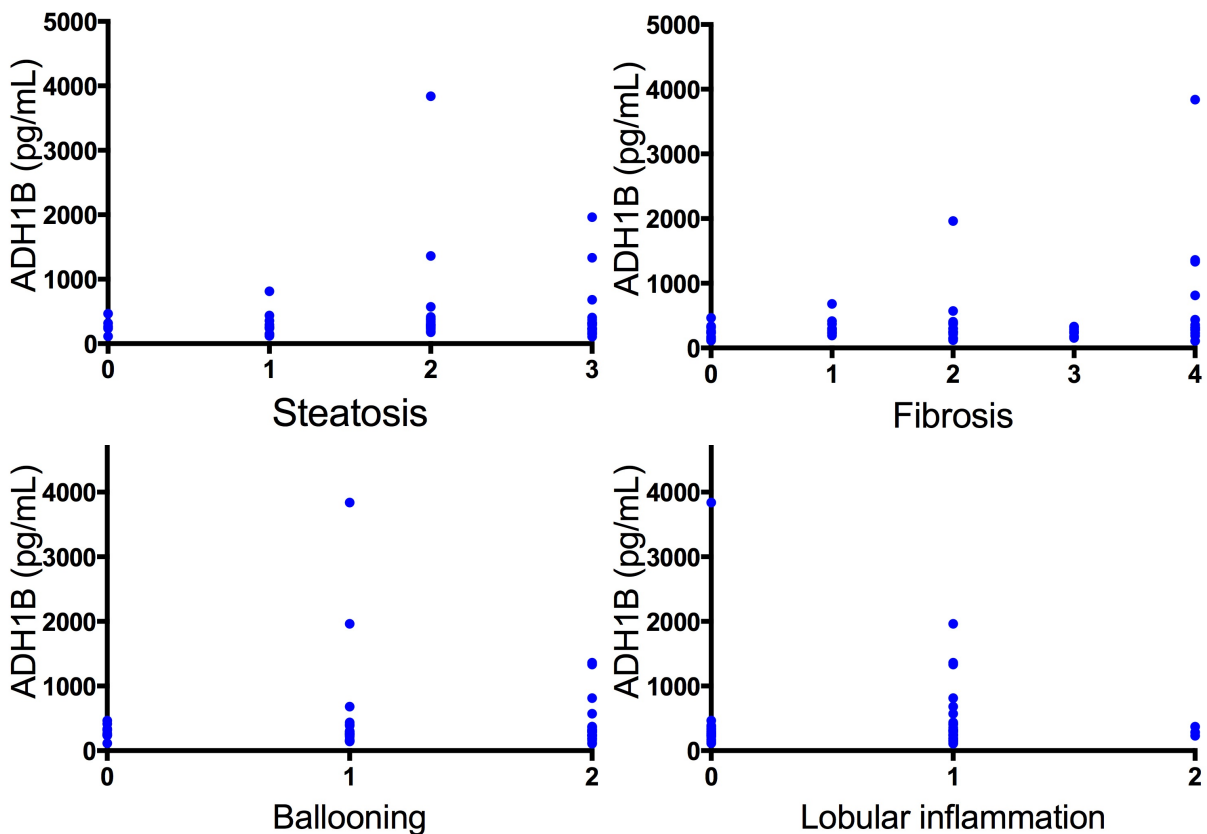
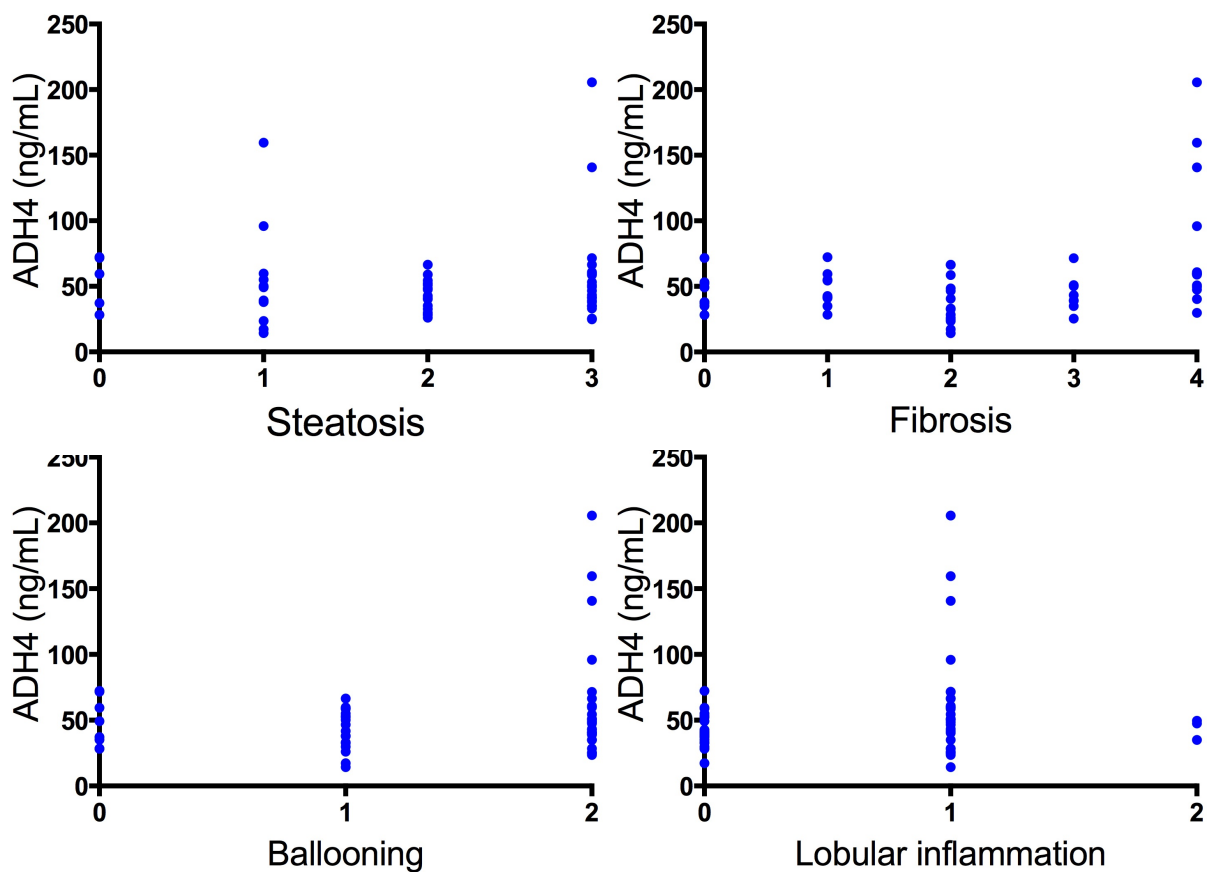


Figure 3C. Individual data for ADH4 according to main histological parameters (Spearman's correlation test). No statistical difference was reported.



Supplementary Data

I – Patients: Information and consent



Clinique d'HEPATO-GASTROENTEROLOGIE
Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble
CS 10217 – 38043 Grenoble Cedex 9

FORMULAIRE D'INFORMATION CONCERNANT LA REALISATION D'UNE BIOTHEQUE (PLASMATHEQUE, SEROTHEQUE, DNATHEQUE)

Madame, Monsieur,

Vous venez d'être reçu(e) en consultation spécialisée pour explorer des manifestations médicales d'ordre hépatique. Au décours de cette consultation, nous allons réaliser différents types de prélèvements tels que des prélèvements sanguins ou de tissus, qui serviront au diagnostic de votre maladie ou à l'adaptation du traitement qui vous sera proposé.

Le service d'hépatogastroentérologie travaille sur la mise en place de banques biologiques pour l'évaluation de bio-marqueurs diagnostiques et pronostiques dans les pathologies hépatiques.

Objectifs de ces banques biologiques :

- 1) Faciliter la recherche médicale fondamentale et appliquée dans le domaine des maladies hépatiques, pour mieux les comprendre, et développer des traitements adaptés afin d'optimiser le suivi thérapeutique.
- 2) Améliorer la mise au point de techniques de laboratoire dans ce domaine.

Ces collections biologiques sont cruciales pour favoriser les progrès de notre discipline médicale.

Ce que nous vous proposons...

Nous vous proposons de conserver une partie de vos échantillons biologiques (plasma, sérum, ADN et tissus) à -80°C, dans le strict respect de la confidentialité et de l'anonymat, de façon à constituer des banques biologiques spécifiques. Ces recherches pourront éventuellement concerner vos caractéristiques génétiques mais ne porteront en aucun cas sur votre identification génétique, autrement dit, elles n'auront pas pour objet de créer des données nominatives, mais elles permettront d'accroître les connaissances de façon globale sur le rôle de facteurs génétiques dans votre maladie.

Conformément à la loi (art. 16-1 et 16-6 du code civil), ces prélèvements ne pourront pas être cédés à titre commercial ni donner lieu à une rémunération à votre bénéfice. Ils pourront être utilisés pour des recherches effectuées en partenariat avec un ou plusieurs organismes de recherche publics ou privés.

Cette constitution de banque biologique doit se faire avec votre consentement. Si vous acceptez de participer à la constitution de ces banques, les échantillons concernés rejoindront la Biothèque du CHU de Grenoble, officiellement déclarée auprès de notre ministère de tutelle (n° d'enregistrement DC 2008-727 et DC 2014-2295), dont le fonctionnement est légalement encadré. En cas de refus, cela ne modifiera en rien vos relations avec l'équipe médicale et la prise en charge qui est adaptée à votre cas.

Contrôle des données vous concernant :

Cette procédure est réalisée sous le contrôle strict des autorités sanitaires et est conforme à la Loi de Bioéthique du 6 août 2004. Vos données médicales associées au prélèvement seront réunies dans un fichier informatique anonymisé permettant leur traitement statistique en cas de projet de recherches. Ce fichier est soumis à l'autorisation de la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL), conformément à la loi « Informatique et Libertés » du 6 janvier 1978 modifiée en 2004.

Vous bénéficiez d'un droit d'accès et de rectification aux informations qui vous concernent, droit que vous pouvez faire valoir auprès de votre médecin. Vous pouvez également, pour des motifs légitimes, vous opposer au traitement des données vous concernant.

FORMULAIRE DE CONSENTEMENT CONCERNANT LA REALISATION D'UNE BIOTHEQUE

Je soussigné(e).....

Né(e) le

Certifie avoir pris connaissance du document d'information sur la constitution de banques biologiques en Hépatogastroentérologie au CHU de Grenoble, qui m'a été remis lors de ma consultation.

- J'autorise que des prélèvements de sang et de tissus soient utilisés à des fins de recherche.
- Je m'oppose à ce que des prélèvements de sang et de tissus soient utilisés à des fins de recherche.

- J'autorise les recherches sur les caractéristiques génétiques (ADN).
- Je m'oppose aux recherches sur les caractéristiques génétiques.

Je suis informé(e) que mon consentement est révoquant à tout moment auprès des médecins suivants :

Dr Hilleret 04 76 76 62 57 / Pr Leroy 04 76 76 93 68 / Dr Decaens 04 76 76 93 68 / Pr Zarski 04 76 76 54 41

<p><u>Fait à :</u></p> <p><u>Le :</u></p>	<p><u>Signature du patient :</u></p>
--	---

Nom et signature du médecin ayant recueilli le consentement :

<p><u>Fait à :</u></p> <p><u>Le :</u></p>	<p><u>Dr :</u></p> <p><u>Signature du médecin:</u></p>
--	---

Fait en 2 exemplaires :

- 1 exemplaire conservé dans le dossier du patient
- 1 exemplaire remis au patient

II – Methods

Selection of protein biomarker candidates

This study fits into a larger project that is still in progress, which has started with the selection of plasma biomarker candidates thanks to an original bioinformatics approach. First, we established lists of proteins with liver-restricted or liver-predominant expression (in fact, less than 2% of human proteins have a unique tissue profile). For this, we combined data from two main databases: TIGER (<http://bioinfo.wilmer.jhu.edu/tiger/>), which provides information about tissue-specific gene expression profiles, and Human Protein Atlas (www.proteinatlas.org), which presents the tissue and cellular expression profiles for human proteins using data from antibody-based analyses.

Second, the list of proteins was filtered to retain only those with a cytosolic localization, as we hypothesized that cytosolic proteins would reach the bloodstream faster, as cardiac biomarkers (*i.e* troponin). For each protein, we also confirmed its tissue-specific function based on entries in the KEGG database (<http://www.genome.jp/kegg/>) for metabolic pathways, the GO database (<http://www.geneontology.org>) and/or the scientific literature.

Thirdly, we searched for clues indicating that these proteins would be detectable in plasma thanks to targeted proteomics (and of course immunoassays). We used the Peptide Atlas database (www.peptideatlas.org), which is a multi-organism, web-accessible repertoire of peptides (obtained from protein trypsin digestion), which have been previously detected by mass spectrometry in a variety of matrices, including human plasma.

Finally five targeted proteins have been selected. All are implicated in cellular death mechanisms and/or inflammation, except HNF4 α involved in lipid metabolism. These

included HMGB1, BHMT1, NGAL, ADH1B, HNF4 α , to whom CK18 is added as an already “reference” biomarker (under both total and caspase-cleaved fragment).

Screening of candidates

Next step was about selecting those proteins clinically relevant for NASH diagnosis. Concentrations have been determined in 11 plasma from NASH patients compared to 11 plasma from healthy donors, paired by sex and age. To complete the multiplex dosage of these candidates, we harnessed the analytical power of targeted proteomics in the LC-MS/SRM mode, coupled with isotope dilution PSAQ standards (for BHMT1, ADH1B and NGAL provided by Promise Advanced Proteomics). AQUA peptides were used for HNF4 α and HMGB1 quantification (Thermo Fisher Scientific). Samples (14 μ L) were submitted to a biochemical process starting with the depletion of the six most abundant proteins using the Human Multiple Affinity Removal Spin cartridge (Agilent technologies). Then in-solution digestion was performed using Trypsin/Lys-C mix (Promega), before purification using a C18 reverse-phase column (Harvard Apparatus). Finally LC-MS/SRM analyses were performed randomly, in a single batch, on a 6500 QTrap mass spectrometer (400 to 1000 m/z range) equipped with a TurboV™ source and operating with Analyst™ Software (version 1.6.1, AB Sciex), coupled to an Ultimate 3000 micro-LC system (Thermo Scientific). Data analysis was performed using Skyline.

Immunoassays have been used for orthogonal analytical validation. HMGB1, HNF4 α , and CK18 (total and caspase-cleaved fragment) plasmatic concentrations in the 22 samples were determined using Human HMGB1 ELISA Kit (IBL International), Human HNF4 α ELISA Kit (BlueGene), Human M65 + Human M30 ELISA Kit (Peviva VLV Bio), respectively. Plasmatic concentrations were defined using the ELISA

analysis software (<http://www.elisaanalysis.com/app>). Four-parameter logistic or polynomial cubic regressions have been used for fitting algorithm, as recommended by providers.

Evaluation of candidates

Then we focused on the 2 biomarker candidates that performed well in this previous step (*i.e* BHMT1, ADH1B). This involved evaluation of their specificity among the cohort of 53 patients described above, harnessing again analytical power of targeted proteomics in the LC-MS/SRM mode, and immunoassays. ADH4 was added to the panel, whereas CK18 (total and caspase-cleaved) was kept as a control candidate.

Biochemical preparation and LC-MS/SRM Analysis

This step is still in progress. Samples are submitted to the same kind of biochemical process than for screening set. LC-MS/SRM method has been developed to be more accurate.

ELISA Assays

CK18 (total M65 and caspase-cleaved fragment) plasmatic concentrations in the 53 samples were determined using the same kit as previously. ADH4, ADH1B and BHMT1 plasmatic concentrations in the 53 samples were determined using the Human ADH4 BioAssay™ ELISA Kit (US Biological life sciences, purchased *via* Antibodiesonline), Human ADH1B ELISA Kit (Cloud-clone corp, bought *via* Antibodiesonline) and Human BHMT1 ELISA Kit (Cusabio, acquired *via* Antibodiesonline), respectively. Assays and data analysis were performed in accordance with the manufacturer's instructions. Concentrations from

immunoassays that were above the highest concentration standard were controlled after a dilution of plasma sample according to the manufacturer's instructions and submitted to a new assay. The optical density was measured at 450 nm using a microplate reader (BMG Labtech). Plasmatic concentrations were defined using the same ELISA analysis software. Four-parameter logistic or linear regressions have been used for fitting algorithm. ELISA assays were performed for all samples in a single session by two trained investigators.

Supplementary Tables & Figures

Table 1. IDF/AHA/NHLBO definition of metabolic syndrome

Triglycerides > 1.5g/L or under treatment
Waist circumference > 94 cm for men and > 80 cm for women (European population)
High blood pressure with systolic > 130 mmHg and/or diastolic > 85 mmHg or under treatment
HDLc < 0.4 g/L for men and < 0.5 g/L for women
Fasting glycaemia > 1 g/L or under treatment for diabetes

Table 2A. NASH-CRN scoring system (components of NAS only shown here)

Item	Definition	Score/Code
Steatosis Grade	Low- to medium-power evaluation of parenchymal involvement by steatosis	
	<5%	0
	5%-33%	1
	>33%-66%	2
	>66%	3
Fibrosis Stage	None	0
	Perisinusoidal or periportal	1
	Mild, zone 3, perisinusoidal	1A
	Moderate, zone 3, perisinusoidal	1B
	Portal/periportal	1C
	Perisinusoidal and portal/periportal	2
	Bridging fibrosis	3
	Cirrhosis	4
Inflammation Lobular inflammation	Overall assessment of all inflammatory foci	
	No foci	0
	<2 foci per 200× field	1
	2-4 foci per 200× field	2
	>4 foci per 200× field	3
Ballooning*	None	0
	Few balloon cells	1
	Many cells/prominent ballooning	2

Table 2B. SAF score

Item	Definition	Score/Code
Steatosis		
<i>Grade</i>	<i>% of hepatocytes with large and medium-sized intracytoplasmic lipid droplets</i>	
	< 5%	0
	5 - 33%	1
	34-66%	2
	> 66%	3
Activity	Sum of ballooning grade and inflammation grade	
<i>Grade of ballooning</i>	Normal hepatocytes with cuboid shape, sharp angles and pink eosinophilic cytoplasm	0
	Presence of clusters of hepatocytes with a rounded shape and pale cytoplasm usually reticulated	1
	Same as above but with enlarged hepatocytes, at least 2-fold that of normal cells	2
<i>Grade of lobular inflammation</i>	<i>focus of 2 or more inflammatory cells within the lobule (Foci counted at 20x)</i>	
	No foci	0
	≤ 2 foci	1
	> 2 foci	2
Fibrosis		
<i>Stage</i>	None	0
	perisinusoidal or periportal	1
	perisinusoidal and portal/periportal without bridging	2
	perisinusoidal and portal/periportal bridging fibrosis	3
	cirrhosis	4

Discussion

Cette étude a permis de soulever plusieurs problèmes actuellement rencontrés en recherche clinique sur les stéatopathies métaboliques.

Tout d'abord, se pose la question de l'utilisation des scores histologiques, la biopsie étant encore à ce jour un incontournable au diagnostic de NASH. Elle constitue la pierre angulaire dans l'évaluation des études sur les NAFLD, qu'elles concernent les performances d'un outil diagnostique, la définition de critères pronostiques, d'un essai thérapeutique...Notamment, le choix des critères histologiques utilisés pour classer les malades impactent directement sur notre façon d'interpréter les résultats. Ainsi, pendant plusieurs années, le score NAS, développé par Kleiner⁵¹, a été utilisé pour séparer les patients en plusieurs catégories (« NASH – Non-NASH » ou « NASH, Borderline, Not-NASH »), où certains seuils du score, notamment $NAS \geq 5$, a été pris -probablement « abusivement »- comme substitut au diagnostic histologique de NASH. Ce score n'est pas par définition un score diagnostique, en attestent différents avertissements de la part des anatomopathologistes, menée par E. Brunt, D. Kleiner et P. Bedossa⁶¹⁻⁶³. Dès la publication du score semi-quantitatif, D. Kleiner écrivait : « the primary purpose of the NAS is to assess overall histological change; it is not intended that numeric values replace the pathologist's diagnostic determination of steatohepatitis. The NAS has not also been studied as a measure of the rapidity of disease progression, nor should it be taken as an absolute severity scale»⁵¹. Ceci est d'autant plus vrai que cette façon de séparer les malades, par manque de stringence du score (mais il n'est pas fait pour ça !), peut être générateur de classification erronée de certains patients. En effet, il n'est pas rare de constater que les patients atteints d'une cirrhose NASH avancée puissent avoir de rares ballonisations ainsi qu'un infiltrat inflammatoire polymorphe très modéré, se traduisant par un score NAS facilement ≤ 4 , alors que le diagnostic de NASH est

avéré. En 2016, l'EASL suggère le score SAF comme alternative au NAS ; propose d'ailleurs de ne plus avoir recours au terme « borderline » ; et évoque le terme « burned-out NASH » pour désigner le cas des NASH à un stade de fibrose avancé avec régression des lésions princeps⁵³. Le score NAS n'est par ailleurs pas corrélé à la mortalité^{64,65}, et sa valeur pronostique n'est toujours pas établie^{61,62,66}. Pourtant il a été utilisé comme critère de jugement principal dans nombreux essais thérapeutiques, notamment les essais PIVENS et FLINT⁶⁷⁻⁶⁹.

De façon plus globale, certains patients sont également « oubliés » des études, le cas par exemple des patients non NASH mais porteurs d'une stéatose avec un fond d'activité, qui restent à risque de progression malgré tout, comme Adams *et al* le mettent en avant⁷⁰. Aussi, deux études récentes, basées sur la comparaison de couple de biopsies hépatiques, constatent que la progression vers la fibrose se voit chez les patients NASH, tout comme les patients NAFL^{71,72}, bien que dans une proportion moindre pour ces derniers.

Ces données soulignent aussi le problème de l'évaluation jusqu'à présent trop « statique » des variables, telles que la fibrose⁷³, puisque fondées sur l'histologie (il n'est pas éthique d'envisager biopsier les patients tous les ans, bien que tentant sur le plan intellectuel). Or, les études physiopathologiques sont de plus en plus nombreuses à souligner l'importance de la continuité entre stéatose et stéatohépatite³⁷, et l'impact de multiples facteurs intriqués sur la progression de la fibrose. L'enjeu serait donc davantage de trouver des outils non invasifs pour dépister et suivre les patients NAFLD, en termes de grading (*i.e* activité) et de staging (*i.e* fibrose), en intégrant la notion de marqueurs « cinétiques » reproductibles. Ce point est d'ailleurs abordé selon une perspective très intéressante par J. Boursier *et al.*²³ concernant l'évaluation de la fibrose par marqueurs non-

invasifs, en introduisant le concept d'échelle semi-quantitative pronostique du Fibroscan® et du Fibromètre®, sans recours à la biopsie.

En ce sens, notre étude présente l'avantage de se pencher sur l'utilisation du score SAF au travers d'une cohorte prospective de patients de «vraie vie », en optant pour une classification des patients en fonction de la sévérité globale histologique de leur NAFLD, et non du NAS exclusivement. Il est néanmoins vrai qu'à ce jour le SAF n'a pas été étudié pour savoir s'il est corrélé avec la mortalité.

En outre, nos résultats sont concordants avec les données de la littérature au regard de la cytokératine 18, pour laquelle les dosages ELISA sont validés, bien que non encore du domaine de la routine clinique. Son intérêt au sein de scores composites ne fait plus de doute. Pour n'en citer que deux, Polyzos *et al.*⁷⁴ ont introduit un index nommé CHAI (acronyme pour CK18 M30, HOMA-IR, AST, Index), visant à la distinction entre NAFL et NASH. CHAI était significativement plus élevé chez les NASH (24.2 [15.1-214.0]) comparativement aux NAFL (15.7 [6.8-22.7]) et aux contrôles (5.1 [2.4-7.6]) ($p < 0.001$). Il était d'autant plus élevé que les lésions histologiques princeps étaient avancées. De façon similaire, Grigorescu *et al.*⁷⁵ ont comparé les taux plasmatiques de CK18 M65 entre 20 patients "non-NASH" and 59 NASH. En analyse multivariée, M65 était un facteur prédictif indépendant de NASH, avec une AUROC à 0.791. Associée avec l'adiponectine et l'IL-6, l'AUROC atteignait 0.903, avec 85.7% de spécificité et 84.5% de sensibilité.

Ce n'est pas le cas des ELISA utilisés pour le dosage de nos candidats biomarqueurs, notamment pour BHMT1. En effet les dosages ont été tentés avec différents kits mais les gammes de standard se sont avérées incohérentes, remettant en cause la fiabilité des produits. La mise au point d'une méthode protéomique ciblée SRM est en cours d'optimisation, qui sera indéniablement plus

sensible et plus spécifique, donc plus robuste. Nous sommes particulièrement impatients des résultats, ce d'autant plus que cette protéine s'est révélée prometteuse lors de la phase de screening.

Concernant ADH1B, nous n'avons pas confirmé, par le biais des ELISA, les résultats de la phase de screening, où les concentrations plasmatiques étaient plus élevées chez les patients NASH *versus* sujets sains, établis alors par LC-MS/SRM. Là encore, les résultats des dosages par LC-MS/SRM sur notre cohorte de 53 patients sont grandement attendus, la robustesse des ELISA non destinés à un usage clinique pouvant être remise en cause. Néanmoins, ces résultats préliminaires soulèvent déjà une question physiopathologique intéressante : par quel mécanisme les ADH sont-elles impliquées dans l'histoire naturelle des NAFLD ? Une étude transcriptomique publiée par Baker *et al.*⁷⁶ a récemment exploré le rôle des enzymes du métabolisme de l'alcool au sein du parenchyme hépatique de patients porteurs d'une NASH. Les microarrays ont révélé une augmentation de la transcription des gènes codant pour ces alcool dehydrogenases (ADH). Les Western-blot ont confirmé cette hausse pour ADH1 et ADH4.

D'autre part, lors du screening de la première sélection de candidats biomarqueurs, nous nous sommes d'emblée heurtés à des difficultés de détection en LC-MS/SRM de NGAL, HMGB1 et HNF4 α . Ceci est la conséquence de limites analytiques (sensibilité insuffisante), pouvant être expliquée en grande partie biologiquement. En effet, comme NGAL est une protéine sécrétée en réponse à une ischémie ou un sepsis, il n'est pas surprenant de ne pas la détecter dans les échantillons de plasma issus de donneurs sains. Au contraire, cela prouve que nos contrôles étaient pertinents. Concernant HNF4 α et HMGB1, leur localisation intracellulaire nucléaire

(et non cytosolique) a pu restreindre leur libération dans la circulation, et donc leur détectabilité.

Par ailleurs, les dernières publications concernant les marqueurs non-invasifs de NAFLD se concentrent essentiellement sur l'évaluation de la fibrose, principal marqueur pronostique à ce jour. Finalement seul un faible impact des lésions de NAFLD/NASH a été démontré. Pourtant, les lésions de stéatohépatite sont indirectement corrélées à la réduction en terme de survie des patients NAFLD, puisqu'elles font le lit de la fibrogénèse⁷⁷. Les recherches pré-cliniques sur la réversibilité de ces lésions « primitives » restent donc essentielles pour espérer améliorer le pronostic hépatique (et idéalement global), notamment dans l'optique du développement pharmaceutique. En effet, dans les essais thérapeutiques sur les NASH, il est à l'heure actuelle validé que la régression de la stéatohépatite (avec retour à de la stéatose voire foie sain) est un critère de jugement principal robuste pour évaluer l'efficacité « histologique » de nouvelles molécules^{78,79}. C'est l'une des raisons pour laquelle notre étude cible des protéines impliquées dans les mécanismes de mort cellulaire et d'inflammation. Néanmoins, si l'on repart du principe que les NAFLD sont l'expression hépatique du syndrome métabolique, et que la première cause de mortalité reste cardiovasculaire chez ces patients^{64,65}, on peut se demander si le critère de jugement le plus pertinent pour les essais thérapeutiques ne devrait être la survenue ou non d'évènements cardiovasculaires, mais avec la contrainte d'un suivi longitudinal de longue durée des patients. Ce point de vue est remis en perspective par différents travaux pointant les facteurs qui dirigent la progression des NAFLD, tant sur le plan hépatique, qu'en terme de retentissement extra hépatique. Buzzetti *et al.*³⁷ soulignent, dans une revue très intéressante soulevant le « multiple hit hypothesis » (cf. Annexe 1), la place centrale

de l'insulinorésistance dans l'histoire naturelle des NAFLD, par le biais de l'augmentation de la lipogenèse de novo intra-hépatique, et d'un dysfonctionnement de la lipolyse du tissu adipeux. L'équipe insiste d'une part sur le rôle du « gut-liver axis », jusque là sous-estimé. Francque *et al.*⁸⁰ vont même jusqu'à renverser le concept « NAFLD = manifestation hépatique du syndrome métabolique », en pointant par différents mécanismes, les relations bidirectionnelles complexes entre NAFLD et maladie cardiovasculaire (cf. annexe 2). Les NAFLD seraient donc à la fois conséquences du syndrome métabolique, mais aussi précurseurs de certains de ses éléments.

Ceci est rendu d'autant plus complexe quand on considère l'existence de déterminants génétiques aujourd'hui incontournables. On arriverait presque à dichotomiser les NAFLD en deux catégories : NAFLD avec syndrome métabolique « dogmatique » et NAFLD « génétique » sans syndrome métabolique voire même sans insulinorésistance. En effet, la portée des polymorphismes génétiques, notamment PNPLA3 (la mutation rs738409 est corrélée à la sévérité de la NAFLD⁸¹) et de TM6SF2 (la mutation rs58542926 impacte sur la progression de la fibrose⁸²), nous amène à reconsidérer à nouveau la pathogénèse des stéatopathies métaboliques. Le constat des disparités ethniques ne fait que souligner l'importance de la contribution du patrimoine génétique, avec des susceptibilités différentes pour certains facteurs de risques. En effet, en Asie par exemple, il existe une proportion non négligeable de NAFLD non obèse. En Corée plus particulièrement, la prévalence des NAFLD en population générale atteint les 30%, alors que le nombre de diabétiques est de seulement 8%, *versus* 30% de dyslipidémiques⁸³.

Notre étude présente certaines limites. Tout d'abord, nous n'avons pas réalisé de double lecture en aveugle des biopsies hépatiques. La variabilité inter-observatrice

dans l'évaluation des lésions n'est donc pas minimisée. De plus, la consommation d'alcool était chiffrée uniquement sur la base de données déclarative simple, pouvant être à l'origine d'une sous-estimation, et donc l'inclusion de forme mixte d'hépatopathies, dont l'histoire naturelle est différente. L'utilisation de questionnaires, tels que l'AUDIT, a démontré la limitation de ce facteur de confusion^{57,58}. Par ailleurs, le délai entre la biopsie et la biologie pouvait atteindre 26 semaines. Idéalement, il serait souhaitable qu'aucun délai ne soit respecté, afin de minimiser les différences induites par le temps. En parallèle, nos résultats ne sont pas basés que sur des variables biologiques et histologiques prises à un instant t. Vuppalanchi *et al.* soulèvent le fait que les fluctuations dans le temps des biomarqueurs comparativement à l'histologie sont probablement plus adaptées pour mettre en évidence certaines corrélations⁵⁹. En 2014 Chan *et al.*⁶⁰ conclut d'ailleurs que «mettre au point un test capable de diagnostiquer une NASH à un instant t semble particulièrement complexe, si ce n'est impossible». Ils émettent alors l'hypothèse qu'il soit plus réaliste de trouver des biomarqueurs, seuls ou associés en score composite, qui refléteraient les changements dans la sévérité des NAFLD au cours du temps. En d'autres termes, il semblerait plus pertinent d'être capable de détecter au cours du suivi longitudinal le moment où le processus amenant aux lésions nécro-inflammatoires s'enclenche. Enfin, ce travail reste contraint par un manque de puissance, ne permettant pas des analyses de sous-groupes approfondies, et reste dans l'expectative des résultats de la LC-MS/SRM.

En conclusion, la cytokératine 18, sous ses deux formes, est un biomarqueur d'intérêt pour l'évaluation et le suivi des NAFLD. Les résultats des analyses en protéomique ciblée nous manquent pour en dire autant de BHMT1, ADH1B et ADH4. Des études longitudinales à plus grande échelle et sur du long terme restent

indispensables pour permettre de mieux corréler par test non invasifs les changements histologiques signant la progression des NAFLD.

Références

1. Chalasani, N. *et al.* The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. *Gastroenterology* **142**, 1592–1609 (2012).
2. Angulo, P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N. Engl. J. Med.* **346**, 1221–1231 (2002).
3. Wong, R. J. *et al.* Nonalcoholic steatohepatitis is the second leading etiology of liver disease among adults awaiting liver transplantation in the United States. *Gastroenterology* **148**, 547–555 (2015).
4. Charlton, M. R. *et al.* Frequency and outcomes of liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis in the United States. *Gastroenterology* **141**, 1249–1253 (2011).
5. Baffy, G., Brunt, E. M. & Caldwell, S. H. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: an emerging menace. *J. Hepatol.* **56**, 1384–1391 (2012).
6. Vernon, G., Baranova, A. & Younossi, Z. M. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **34**, 274–285 (2011).
7. Williams, C. D. *et al.* Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology* **140**, 124–131 (2011).
8. Adams, L. A. *et al.* The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology* **129**, 113–121 (2005).
9. Ekstedt, M. *et al.* Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatol. Baltim. Md* **44**, 865–873 (2006).
10. Angulo, P. *et al.* Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* **149**, 389–397.e10 (2015).
11. Ekstedt, M. *et al.* Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatol. Baltim. Md* **61**, 1547–1554 (2015).

12. Cadranel, J. F., Rufat, P. & Degos, F. Practices of liver biopsy in France: results of a prospective nationwide survey. For the Group of Epidemiology of the French Association for the Study of the Liver (AFEF). *Hepatology*. **32**, 477–481 (2000).
13. Rockey, D. C. *et al.* Liver biopsy. *Hepatology*. **49**, 1017–1044 (2009).
14. Bedossa, P., Dargère, D. & Paradis, V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology*. **38**, 1449–1457 (2003).
15. Fracanzani, A. L. *et al.* Risk of severe liver disease in nonalcoholic fatty liver disease with normal aminotransferase levels: a role for insulin resistance and diabetes. *Hepatology*. **48**, 792–798 (2008).
16. de Lédinghen, V. *et al.* Diagnostic and predictive factors of significant liver fibrosis and minimal lesions in patients with persistent unexplained elevated transaminases. A prospective multicenter study. *J. Hepatology*. **45**, 592–599 (2006).
17. Calès, P. *et al.* Diagnosis of different liver fibrosis characteristics by blood tests in non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* **30**, 1346–1354 (2010).
18. Angulo, P. *et al.* Simple noninvasive systems predict long-term outcomes of patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* **145**, 782–789.e4 (2013).
19. Poynard, T. *et al.* The diagnostic value of biomarkers (SteatoTest) for the prediction of liver steatosis. *Comp. Hepatology*. **4**, 10 (2005).
20. Feldstein, A. E. *et al.* Mass spectrometric profiling of oxidized lipid products in human nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *J. Lipid Res.* **51**, 3046–3054 (2010).
21. Poynard, T. *et al.* Diagnostic value of biochemical markers (NashTest) for the prediction of non alcoholic steato hepatitis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol.* **6**, 34 (2006).
22. European Association for Study of Liver & Asociacion Latinoamericana para el Estudio del Hgado. EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis. *J. Hepatology*. **63**, 237–264 (2015).
23. Boursier, J. *et al.* Diagnostic accuracy and prognostic significance of blood fibrosis tests and liver stiffness measurement by Fibroscan in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatology*. (2016). doi:10.1016/j.jhep.2016.04.023

24. Sebastiani, G. *et al.* Prognostic Value of Non-Invasive Fibrosis and Steatosis Tools, Hepatic Venous Pressure Gradient (HVPG) and Histology in Nonalcoholic Steatohepatitis. *PLoS One* **10**, e0128774 (2015).
25. Chen, J., Zhu, Y., Zheng, Q. & Jiang, J. Serum cytokeratin-18 in the diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis: A meta-analysis. *Hepatol. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hepatol.* **44**, 854–862 (2014).
26. Kwok, R. *et al.* Systematic review with meta-analysis: non-invasive assessment of non-alcoholic fatty liver disease--the role of transient elastography and plasma cytokeratin-18 fragments. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **39**, 254–269 (2014).
27. Anty, R. *et al.* A new composite model including metabolic syndrome, alanine aminotransferase and cytokeratin-18 for the diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **32**, 1315–1322 (2010).
28. Younossi, Z. M. *et al.* A biomarker panel for non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and NASH-related fibrosis. *Obes. Surg.* **21**, 431–439 (2011).
29. Rifai, N., Gillette, M. A. & Carr, S. A. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat. Biotechnol.* **24**, 971–983 (2006).
30. Paulovich, A. G., Whiteaker, J. R., Hoofnagle, A. N. & Wang, P. The interface between biomarker discovery and clinical validation: The tar pit of the protein biomarker pipeline. *Proteomics Clin. Appl.* **2**, 1386–1402 (2008).
31. Hüttenhain, R., Malmström, J., Picotti, P. & Aebersold, R. Perspectives of targeted mass spectrometry for protein biomarker verification. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **13**, 518–525 (2009).
32. Sajic, T., Liu, Y. & Aebersold, R. Using data-independent, high-resolution mass spectrometry in protein biomarker research: Perspectives and clinical applications. *Proteomics Clin. Appl.* (2014). doi:10.1002/prca.201400117
33. Brun, V. *et al.* Isotope-labeled protein standards: toward absolute quantitative proteomics. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **6**, 2139–2149 (2007).
34. Huillet, C. *et al.* Accurate quantification of cardiovascular biomarkers in serum using Protein Standard Absolute Quantification (PSAQ™) and selected reaction monitoring. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **11**, M111.008235 (2012).
35. Marchesini, G. *et al.* Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am. J. Med.* **107**, 450–455 (1999).

36. Bugianesi, E., McCullough, A. J. & Marchesini, G. Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatol. Baltim. Md* **42**, 987–1000 (2005).
37. Buzzetti, E., Pinzani, M. & Tsochatzis, E. A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*. **65**, 1038–1048 (2016).
38. Chalasani, N. *et al.* The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. *Gastroenterology* **142**, 1592–1609 (2012).
39. Vernon, G., Baranova, A. & Younossi, Z. M. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **34**, 274–285 (2011).
40. Williams, C. D. *et al.* Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology* **140**, 124–131 (2011).
41. Ekstedt, M. *et al.* Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatol. Baltim. Md* **44**, 865–873 (2006).
42. Adams, L. A. *et al.* The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology* **129**, 113–121 (2005).
43. Cadranel, J. F., Rufat, P. & Degos, F. Practices of liver biopsy in France: results of a prospective nationwide survey. For the Group of Epidemiology of the French Association for the Study of the Liver (AFEF). *Hepatol. Baltim. Md* **32**, 477–481 (2000).
44. Rockey, D. C. *et al.* Liver biopsy. *Hepatol. Baltim. Md* **49**, 1017–1044 (2009).
45. Bedossa, P., Dargère, D. & Paradis, V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatol. Baltim. Md* **38**, 1449–1457 (2003).
46. Feldstein, A. E. & Gores, G. J. Apoptosis in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **10**, 3093–3099 (2005).
47. Fracanzani, A. L. *et al.* Risk of severe liver disease in nonalcoholic fatty liver disease with normal aminotransferase levels: a role for insulin resistance and diabetes. *Hepatol. Baltim. Md* **48**, 792–798 (2008).
48. Calès, P. *et al.* Diagnosis of different liver fibrosis characteristics by blood tests in non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* **30**, 1346–1354 (2010).

49. Poynard, T. *et al.* Performance of biomarkers FibroTest, ActiTest, SteatoTest, and NashTest in patients with severe obesity: meta analysis of individual patient data. *PLoS One* **7**, e30325 (2012).
50. Alberti, K. G. M. M. *et al.* Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* **120**, 1640–1645 (2009).
51. Kleiner, D. E. *et al.* Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **41**, 1313–1321 (2005).
52. Bedossa, P. *et al.* Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology* **56**, 1751–1759 (2012).
53. European Association for the Study of the Liver (EASL). Electronic address: easloffice@easloffice.eu, European Association for the Study of Diabetes (EASD) & European Association for the Study of Obesity (EASO). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatology* **64**, 1388–1402 (2016).
54. Bedossa, P. & FLIP Pathology Consortium. Utility and appropriateness of the fatty liver inhibition of progression (FLIP) algorithm and steatosis, activity, and fibrosis (SAF) score in the evaluation of biopsies of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **60**, 565–575 (2014).
55. Bhala, N., Jouness, R. I. K. & Bugianesi, E. Epidemiology and natural history of patients with NAFLD. *Curr. Pharm. Des.* **19**, 5169–5176 (2013).
56. Feldstein, A. E. *et al.* Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: a multicenter validation study. *Hepatology* **50**, 1072–1078 (2009).
57. Saunders, J. B., Aasland, O. G., Babor, T. F., de la Fuente, J. R. & Grant, M. Development of the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT): WHO Collaborative Project on Early Detection of Persons with Harmful Alcohol Consumption--II. *Addict.* **88**, 791–804 (1993).
58. Fiellin, D. A., Reid, M. C. & O'Connor, P. G. Screening for alcohol problems in primary care: a systematic review. *Arch. Intern. Med.* **160**, 1977–1989 (2000).

59. Vuppalanchi, R. *et al.* Relationship between changes in serum levels of keratin 18 and changes in liver histology in children and adults with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* **12**, 2121-2130–2 (2014).
60. Chan, W.-K., Sthaneshwar, P., Nik Mustapha, N. R. & Mahadeva, S. Limited utility of plasma M30 in discriminating non-alcoholic steatohepatitis from steatosis--a comparison with routine biochemical markers. *PloS One* **9**, e105903 (2014).
61. Brunt, E. M. *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score and the histopathologic diagnosis in NAFLD: distinct clinicopathologic meanings. *Hepatol. Baltim. Md* **53**, 810–820 (2011).
62. Bedossa, P. Current histological classification of NAFLD: strength and limitations. *Hepatol. Int.* **7 Suppl 2**, 765–770 (2013).
63. Nalbantoglu, I. L. K. & Brunt, E. M. Role of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* **20**, 9026–9037 (2014).
64. Ekstedt, M. *et al.* Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatol. Baltim. Md* **61**, 1547–1554 (2015).
65. Angulo, P. *et al.* Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* **149**, 389–397.e10 (2015).
66. Ekstedt, M., Franzén, L. E., Mathiesen, U. L. & Kechagias, S. Low clinical relevance of the nonalcoholic fatty liver disease activity score (NAS) in predicting fibrosis progression. *Scand. J. Gastroenterol.* **47**, 108–115 (2012).
67. Neuschwander-Tetri, B. A. *et al.* Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* **385**, 956–965 (2015).
68. Promrat, K. *et al.* Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol. Baltim. Md* **51**, 121–129 (2010).
69. Sanyal, A. J. *et al.* Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N. Engl. J. Med.* **362**, 1675–1685 (2010).
70. Adams, L. A. & Ratziu, V. Non-alcoholic fatty liver - perhaps not so benign. *J. Hepatol.* **62**, 1002–1004 (2015).

71. Singh, S. *et al.* Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver vs nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* **13**, 643-654-9-40 (2015).
72. McPherson, S. *et al.* Evidence of NAFLD progression from steatosis to fibrosing-steatohepatitis using paired biopsies: implications for prognosis and clinical management. *J. Hepatol.* **62**, 1148–1155 (2015).
73. Argo, C. K., Northup, P. G., Al-Osaimi, A. M. S. & Caldwell, S. H. Systematic review of risk factors for fibrosis progression in non-alcoholic steatohepatitis. *J. Hepatol.* **51**, 371–379 (2009).
74. Polyzos, S. A. *et al.* Adipocytokines and cytokeratin-18 in patients with nonalcoholic fatty liver disease: Introduction of CHA index. *Ann. Hepatol.* **12**, 749–757 (2013).
75. Grigorescu, M. *et al.* A novel pathophysiological-based panel of biomarkers for the diagnosis of nonalcoholic steatohepatitis. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* **63**, 347–353 (2012).
76. Baker, S. S., Baker, R. D., Liu, W., Nowak, N. J. & Zhu, L. Role of alcohol metabolism in non-alcoholic steatohepatitis. *PLoS One* **5**, e9570 (2010).
77. Younossi, Z. M. *et al.* Pathologic criteria for nonalcoholic steatohepatitis: interprotocol agreement and ability to predict liver-related mortality. *Hepatol. Baltim. Md* **53**, 1874–1882 (2011).
78. Sanyal, A. J. *et al.* Challenges and opportunities in drug and biomarker development for nonalcoholic steatohepatitis: findings and recommendations from an American Association for the Study of Liver Diseases-U.S. Food and Drug Administration Joint Workshop. *Hepatol. Baltim. Md* **61**, 1392–1405 (2015).
79. Sanyal, A. J., Neuschwander-Tetri, B. A. & Tonascia, J. End Points Must Be Clinically Meaningful for Drug Development in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* **150**, 11–13 (2016).
80. Francque, S. M., van der Graaff, D. & Kwanten, W. J. Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk: Pathophysiological mechanisms and implications. *J. Hepatol.* **65**, 425–443 (2016).
81. Romeo, S. *et al.* Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Genet.* **40**, 1461–1465 (2008).

82. Liu, Y.-L. *et al.* TM6SF2 rs58542926 influences hepatic fibrosis progression in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nat. Commun.* **5**, 4309 (2014).
83. Lee, H. W. *et al.* Discrimination of Nonalcoholic Steatohepatitis Using Transient Elastography in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *PloS One* **11**, e0157358 (2016).

Annexes

Annexe 1. L'hypothèse physiopathologique du « multiple hits » concernant le développement des NAFLD.

D'après Buzzetti *et al.*, Metabolism 2016

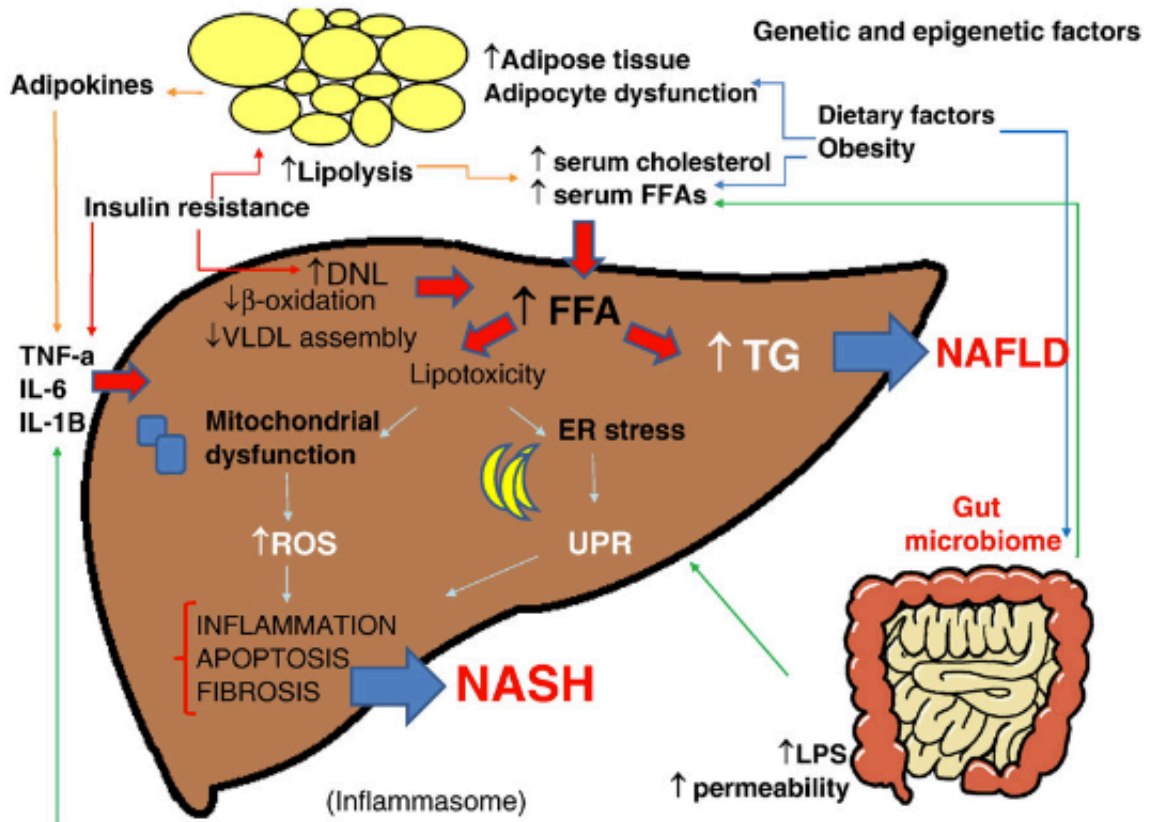


Fig. 2 – Multiple hit hypothesis for the development of NAFLD. Abbreviations: FFAs, free fatty acids; DNL, de novo lipogenesis; VLDL, very low density lipoproteins; CH, cholesterol; TNF- α , tumor necrosis factor alpha; IL-6, interleukin 6; TG, triglycerides; ROS, reactive oxygen species; ER, endoplasmic reticulum; UPR, unfolded protein response; LPS, lipopolysaccharide; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; NASH, non-alcoholic steatohepatitis. Dietary and environmental factors, together with obesity, lead to raised serum levels of fatty acids (FFAs) and cholesterol (CH), development of insulin resistance, adipocyte proliferation and dysfunction and changes in the intestinal microbiome. Insulin resistance acts on adipose tissue worsening adipocyte dysfunction, induces lipolysis and release of adipokines and proinflammatory cytokines such as TNF- α and IL-6, which also contribute to maintain the insulin resistance state. In the liver, insulin resistance amplifies DNL. The increased hepatic FFAs flux which derives from the above processes and from an altered activity of the gut microbiome leads to two different situations: synthesis and accumulation of triglycerides (TG) and 'toxic' levels of fatty acids, free cholesterol and other lipid metabolites which cause mitochondrial dysfunction with oxidative stress and production of ROS and endoplasmic reticulum (ER) stress with activation of UPR, all leading to hepatic inflammation. Also, small bowel permeability can be enhanced with consequent raised circulating levels of molecules which contribute to the activation of inflammasome and ER stress, such as LPS, and to the release of pro-inflammatory cytokines. Genetic factors or epigenetic modifications affect hepatocyte fat content, enzymatic processes and liver inflammatory environment, thus influencing the risk of progression to inflammation and fibrosis (NASH) or persistence in a stable stage of disease (NAFLD).

Annexe 2. NAFLD, syndrome métabolique, facteurs de risque cardiovasculaires et maladie cardiovasculaire : des interactions complexes.
D'après Franque *et al.*, Journal of Hepatology 2016

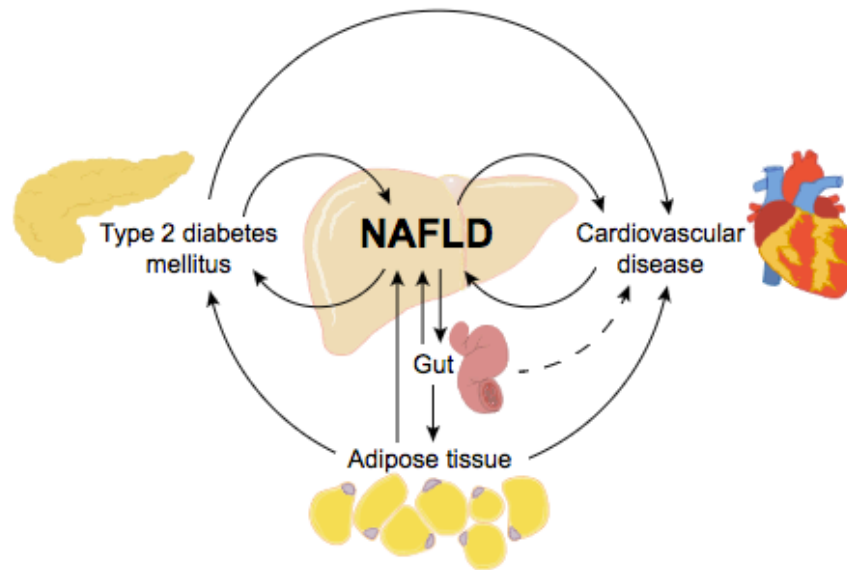


Fig. 1. Complex interplay of NAFLD and cardiovascular disease. The liver is centrally positioned in the metabolic syndrome, where NAFLD can be considered as the consequence of mechanism driven by the other components of the metabolic syndrome. However, reciprocal crosstalk exists, wherein the liver may actually drive diabetes mellitus or cardiovascular disease. These synergetic effects become more complex and create a vicious circle. NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease.

Conclusion

THESE SOUTENUE PAR : Justine BARTHELON

TITRE : Diagnostic non invasif de la stéatohépatite non alcoolique : évaluation de nouveaux candidats biomarqueurs plasmatiques

CONCLUSION

Les stéatopathies dysmétaboliques, ou NAFLD, sont devenues un véritable problème de santé publique, en lien avec l'explosion épidémiologique de l'obésité et du syndrome métabolique dans le monde. La biopsie hépatique reste à ce jour l'examen de référence, permettant un diagnostic positif fiable et une évaluation robuste de la sévérité de l'hépatopathie. Cependant, elle reste un mauvais gold standard, en raison de nombreuses limites. Les alternatives moins invasives, biologiques notamment, manquent de spécificité (transaminases). Il existe donc un réel besoin de biomarqueurs circulants capables de limiter le recours à la biopsie. L'objectif principal de cette étude est d'évaluer une sélection de candidats biomarqueurs plasmatiques, capables de définir la sévérité de la stéatopathie, en particulier distinguer stéatose et stéatohépatite.

Nous avons sélectionné 4 candidats protéiques (i.e BHMT1, ADH1B, ADH4 and CK18), par le biais de recherches bibliographiques exhaustives, de données "omiques", et d'investigations préalables de notre équipe. Les concentrations de chaque candidat ont été obtenues pour 53 plasmas issus de patients porteurs d'une NAFLD prouvée histologiquement. Deux sous-groupes ont été définis selon le score SAF. La combinaison de dosages par tests immunologiques et analyses protéomique ciblée (mode LC-MS/SRM) fait la force de ce travail.

Les résultats obtenus pour CK18 concordent avec ceux de la littérature, avec des taux plasmatiques plus élevés dans le groupe "maladie significativement active", comparativement au groupe "maladie modérément active", que ce soit pour la forme complète de CK18 (M65), que pour son fragment M30 (respectivement $p=0.0001$; $p=0.0004$). Ces deux formes de CK18 sont corrélées avec les paramètres histologiques de nécroinflammation, tout comme la stéatose et la fibrose, ce qui en fait un biomarqueur de choix pour évaluer la

sévérité globale des NAFLD. BHMT1 n'a en revanche pas pu être quantifié par test ELISA. Aucune différence n'a été observée entre les deux sous-groupes pour ADH1B et ADH4. Les analyses protéomiques sont en cours.

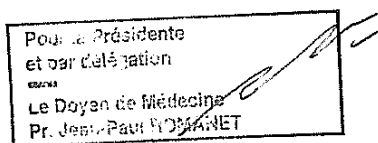
CK18 reste une protéine très intéressante pour l'appréciation de la sévérité globale des stéatopathies non alcooliques, et a définitivement sa place au sein d'un score composite diagnostique et idéalement pronostique. Concernant BHMT1, ADH1B et ADH4, les résultats d'analyses en protéomique ciblée manquent incontestablement pour se prononcer. Des études longitudinales et à plus large échelle sont aussi indispensables pour conforter ces résultats préliminaires.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 28 Septembre 2016,

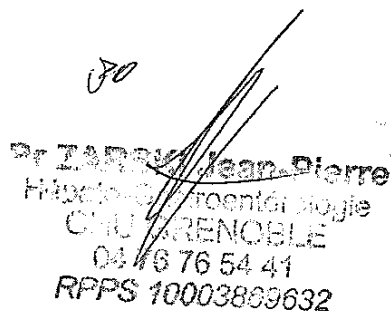
LE DOYEN

J.P. ROMANET

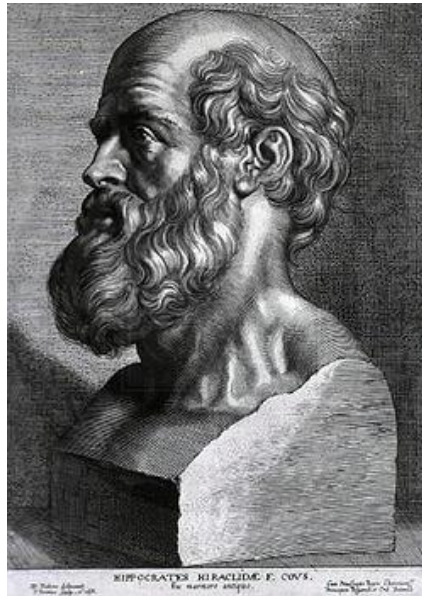


LE PRESIDENT DE LA THESE

PROFESSEUR J.P. ZARSKI



Serment d'Hippocrate



SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'HIPPOCRATE,

Je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerais mes soins gratuitement à l'indigent et n'exigerais jamais un salaire au dessus de mon travail. Je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.

Admis dans l'intimité des maisons, mes yeux n'y verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je garderai le respect absolu de la vie humaine.

Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.