



HAL
open science

Effets de l'inflammation viscérale dans deux modèles de stéatohépatite non alcoolique (NASH) induite par la programmation foetale ou la carence en donneurs de méthyles

Zeinab Atieh Harb

► **To cite this version:**

Zeinab Atieh Harb. Effets de l'inflammation viscérale dans deux modèles de stéatohépatite non alcoolique (NASH) induite par la programmation foetale ou la carence en donneurs de méthyles. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2019. Français. NNT : 2019LORR0027 . tel-02136918

HAL Id: tel-02136918

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02136918v1>

Submitted on 22 May 2019

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 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 : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.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/V2/leg/leg_droi.php

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

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : "Sciences de la Vie et de la Santé"

Par

Zeinab HARB

**Effets de l'inflammation viscérale dans deux modèles de
stéatohépatite non alcoolique (NASH) induite par la
programmation fœtale ou la carence en donneurs de
méthyles.**

Le 02 Avril 2019

Membres du jury

Rapporteurs :

Isabelle GROSS

Chargé de recherches, INSERM U1113,
Université de Strasbourg, Strasbourg, France.

Sébastien BLAISE

Maitre de Conférence-HDR, CNRS UMR/URCA 7369,
MEDyC (Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire),
Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France.

Examineurs :

Zoubida KARIM

Directrice de recherches, Université Paris Diderot Paris 7,
UFR de Médecine site Bichat , Paris, France.

David MOULIN

Chargé de recherches-HDR, IMoPA, Université de
Lorraine, Nancy, France.

Jean-Pierre BRONOWICKI

Professeur des Universités, Université de Lorraine,
Nancy, France, co-directeur de thèse.

Jean-Louis GUÉANT

Professeur des Universités, Université de Lorraine,
Nancy, France, directeur de thèse.

**UMR 1256 INSERM, Laboratoire de Nutrition, Génétique et Exposition aux Risques Environnementaux
(NGERE), 9 avenue de la Forêt de Haye-Faculté de Médecine 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy.**

Remerciements

Je tiens à exprimer mes plus sincères remerciements au Pr. Jean-Louis GUÉANT, Directeur du laboratoire NGERE U1256 et Directeur de mon projet de thèse, pour tous les efforts et le temps qu'il m'a consacrés au cours de ces trois années de travail. J'ai eu la chance de bénéficier de son expertise scientifique, de son intelligence, de sa patience et de ses pensées positives. Un grand merci pour son soutien lors de toutes mes questions et tous mes dilemmes, pour le courage et la motivation, pour la confiance et la responsabilité qu'il m'a confiées face au stress et à tous les problèmes expérimentaux que j'ai rencontrés.

Je voudrais remercier le Pr. Jean-Pierre BRONOWICKI, Co-Directeur de mon projet de thèse. J'ai eu la chance de bénéficier de sa vaste expérience dans l'interprétation des données expérimentales et de la confronter avec la pratique clinique en hépatogastroentérologie.

Pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'avoir accepté d'être les membres de jury, je tiens à remercier le Dr Isabelle GROSS et le Dr Sébastien BLAISE. Je les remercie d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et je remercie également le Pr Zoubida KARIM et le Dr David MOULIN d'avoir accepté d'examiner mes travaux.

Un grand merci à Jean-Marc ALBERTO pour tous les conseils et les idées précieuses, pour sa disponibilité, sa gentillesse et son travail acharné. Je voudrais également remercier Remy UMORET pour son aide essentielle dans la manipulation du protocole animal et pour sa disponibilité. Mes remerciements particuliers vont également à Jérémie RASO pour le "coup de main" qu'il m'a accordé pour mener à bien ce projet.

Mes collègues du bureau, Jeremy, Lynda, Pauline et Remy, merci pour l'ambiance de bureau calme qui était à la fois sérieuse et marrante. Des belles pauses et des bons moments !

Je remercie tout particulièrement Natacha pour ses précieux conseils et son intelligence. Un grand merci au Pr. Brigitte LEININGER pour m'avoir

permis de construire une expérience d'enseignement à la Faculté de Pharmacie en parallèle de mon travail de thèse .

Merci à tous les membres du laboratoire NGERE de m'avoir aidée à réaliser ce projet : David, Shyue-Fang, Carine, Rosa-Maria, Céline, Franck, Abderrahim, Racha, Tunay, Dominique, Catherine, Frédérique, Aline, Feresteh, Philippe, Thierry, Pierre, Aurélie, Amélia, , Viola, Darlène, Rashka, Djésia, Ramia, Ziad et Sébastien.

Je voudrais remercier également nos collaborateurs, le Pr. Laurent LAGROST, le Dr. Valérie DECKERT et le Dr. Aude MARCHAL. J'ai envie d'adresser mes sincères appréciations pour vos efforts en nous fournissant des données précieuses pour réaliser ce travail.

Enfin et surtout, mes remerciements et mon amour tout particuliers vont à mon mari qui me soutient. Tu as toujours été à mes côtés et j'ai beaucoup apprécié cela. Mes enfants, Ilyah et Joud, merci d'être de bons enfants qui aident maman à chercher un avenir fructueux en dehors de la maternité. Mon amour le plus profond va à ma famille, particulièrement à mon papa et à ma maman qui m'ont toujours soutenue de loin. J'ai essayé de répondre à vos attentes en vous rendant fiers.

Liste des communications et publications

Publications

Zeinab Harb, Valérie Deckert, Aude Marchal Bressenot, Rosa-Maria Guéant-Rodriguez, Jérémie Raso, Jean Marc Alberto, Jean-Paul Pais de Barros, Remy Umoret, Laurent Peyrin Biroulet, Laurent Lagrost, Jean-Pierre Bronowicki, Jean-Louis Guéant. **The dextran sodium sulfate-induced colitis of rats subjected to methyl donor deficient diet triggers non-alcoholic steatohepatitis through increased monocyte chemoattractant protein 1 and interleukin-1beta.** Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease. 2019 (In revision).

Communications affichées

Zeinab Harb, Jean-Pierre Bronowicki, Jean-Louis Guéant. **Effets synergiques de la programmation fœtale par la carence en donneurs de méthyle (CDM), du régime riche en graisse et de l'inflammation intestinale dans la stéatohépatite non-alcoolique (NASH).** Journée de rentrée de l'ED BIOSE, Nancy, France, Novembre 2016.

Zeinab Harb, Valérie Deckert, Aude Marchal Bressenot, Rosa-Maria Guéant-Rodriguez, Jérémie Raso, Jean Marc Alberto, Jean-Paul Pais de Barros, Remy Umoret, Laurent Peyrin Biroulet, Laurent Lagrost, Jean-Pierre Bronowicki, Jean-Louis Guéant. **L'inflammation intestinale de rats carencés en folate et vitamine B12 et exposés au DSS produit une stéatohépatite non-alcoolique (NASH) liée à l'augmentation de MCP-1 et IL-1beta.** Journée francophone de nutrition (JFN), Nice, France. 28 – 30 Novembre 2018.

Table des matières

Remerciements	1
Liste des communications et publications	3
Liste des figures	7
Liste des tableaux	9
Liste des abréviations	10
Introduction	16
1. La maladie non-alcoolique de foie (NAFLD) et la stéatohépatite non -alcoolique (NASH)	17
1.1. Définition	17
1.2. Epidémiologie de la NASH.....	20
1.3. Les facteurs impliqués dans la pathogénie de la NAFLD/NASH.....	22
1.3.1. La stéatose.....	22
1.3.2. La résistance à l'insuline	22
1.3.3. L'autophagie.....	22
1.3.4. Le tissu adipeux.....	23
1.3.5. Les dysfonctionnements mitochondriaux	23
1.3.6. Le stress oxydant	23
1.3.7. Les facteurs alimentaires	24
1.3.8. Les déterminants génétiques	24
1.3.9. Les facteurs épigénomiques	25
1.3.10. Microbiote intestinal altéré.....	26
1.4. La dysbiose intestinale.....	28
1.5. L'endotoxémie métabolique	29
1.6. Co-absorption de LPS avec les lipides alimentaires	30
2. Les Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)	33
2.1. Définition	33
2.2. Epidémiologie	33
2.3. Les facteurs impliqués dans la pathogénie de MICI.....	33
2.4. L'homocystéine et les médiateurs pro-inflammatoires.....	35
3. Les MICI et la NASH	35
Les données épidémiologiques.....	35
4. Les différents modèles expérimentaux de la NASH	36
5. Les donneurs de méthyle alimentaires : Les monocarbones	38
5.1. Définitions et rôles.....	38

5.2.	Les apports nutritionnels	38
5.3.	La prévalence de la carence en vitamine B9 et vitamine B12 et leurs conséquences cliniques	39
5.4.	Les conséquences métaboliques de la carence en donneurs de méthyle sur les cycles des monocarbones	40
5.5.	Les donneurs de méthyles, la programmation fœtale et les mécanismes moléculaires épigénétiques.....	41
5.6.	Implication de la carence en donneurs de méthyle dans les pathogénies de la NASH et des MICI	43
5.6.1.	La NASH	43
5.7.	Les MICI.....	45
Objectif global de l'étude.....		46
<i>Influence de colite inflammatoire induite par DSS dans le développement de la NASH chez de rats adultes carencés en donneurs de méthyles (Article en soumission)</i>		49
1.	Introduction.....	50
2.	Matériels et Méthodes.....	52
2.1.	Traitements des animaux.....	52
2.2.	Induction de colite, indice d'activité de la maladie (DAI) et endoscopie.....	52
2.3.	Prises de sang et prelevement de tissus du côlon et de tissus hépatiques.....	53
2.4.	Analyses biochimiques.....	53
2.5.	Analyses histologiques et immunohistochimiques (IHC) dans le foie	54
2.6.	Dosage du LPS	54
2.7.	Extraction de protéines et Western Blotting.....	55
2.8.	Analyses statistiques.....	56
3.	Résultats.....	56
3.1.	Efficacité du régime déficient en donneurs de méthyles (MDD).....	56
3.2.	La concentration plasmatique de la protéine chimiotactique monocyttaire 1 (MCP-1, également appelée CCL2, ligand de la chimiokine c-c de type 2) et du VEGF augmentent considérablement chez les rats traités avec le MDD/DSS	57
3.3.	La colite déclenche une inflammation du foie.....	59
3.4.	La colite de rats déficients exposés au DSS active la voie NFκB dans le foie.....	62
3.5.	Augmentation des médiateurs pro-inflammatoires dans le foie et le côlon de rats déficients traités avec le DSS.....	64
3.6.	La voie LPS/TLR4 n'est pas activée et ne joue aucun rôle dans la stéatohépatite des rats MDD/DSS.....	67
4.	Discussion.....	69
<i>Influence de régime hyperénergétiques (HE) associé à un traitement chronique inflammatoire par le LPS sur des rats adultes nés de mères soumises à un régime déficient en donneurs de méthyles.</i>		72

1. Introduction	73
2. Matériels et Méthodes	73
2.1.Modèle animale	73
Figure 15 : Représentation schématique du protocole animal.....	74
2.2.Prélèvement des échantillons tissulaires et sanguins	75
2.3.Analyses biochimiques.....	75
2.4.Analyses Western blot	76
2.5.Analyses statistiques.....	76
3. Résultats	76
3.1.Influence du traitement LPS sur la prise de poids des animaux soumis à un régime riche en graisses.....	76
3.2.Efficacité du régime MDD	78
3.3.Les paramètres biochimiques montrent une augmentation dramatique des enzymes hépatiques ASAT et ALAT chez les rats carencés exposés au régime HE avec ou sans LPS.....	79
3.4.Aspect macroscopiques gras de foies de rats iMDD exposés au régime HE avec ou sans LPS (iMDD/HE) et (iMDD/HE/LPS)	81
3.5.Augmentation des marqueurs inflammatoires hépatiques chez les rats nourris avec un régime riche en graisses et nés de mères carencées en donneurs de méthyle, traités ou non avec du LPS, en comparaison avec les groupes contrôles.....	82
3.6.Augmentation de l'expression des protéines impliquées dans la voie de l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes (CMA) chez les rats carencés exposés au HE et/ou LPS.....	85
3.7.La voie TLR4 n'est pas activée et ne joue aucun rôle dans la stéatohépatite des rats iMDD/HE /LPS	87
4. Discussion et Perspectives	88
Discussion générale	93
Références bibliographiques	98
Annexes.....	123
Résumé	143

Liste des figures

- Figure 1** Principale différence entre la maladie de foie adipeux non alcoolique (NAFLD) et la stéatohépatite non alcoolique (NASH).....18
- Figure 2** Prévalence de NAFLD dans la population générale.....19
- Figure 3** La prévalence de la NAFLD dans la population mondiale.....21
- Figure 4** Hypothèses complexes pour le développement de NAFLD.....27
- Figure 5** Les moyens de transport de LPS bactériens du microbiote intestinale.....31
- Figure 6** Les cycles des métabolisme de monocarbone.....40
- Figure 7** Les mécanismes moléculaires expliquant le lien entre les modifications épigénétiques et le métabolisme énergétique dans le foie.....42
- Figure 8** Taux plasmatiques d'endotoxines lipopolysaccharidiques (LPS), de cytokines et de chimiokines chez des rats âgés de 8 mois séparés en 4 groupes différents.....57
- Figure 9** La carence en donneurs de méthyles aggrave la colite induite par le dextran sulfate de sodium (DSS).....59
- Figure 10** La carence en donneurs de méthyles (MDD) induit une inflammation et une stéatose microvésiculaire dans une colite induite par le dextran sulfate de sodium (DSS).....60
- Figure 11** La colite induite chez des rats déficients exposés au dextran sulfate de sodium (DSS) active la voie NFκB dans le foie.....61
- Figure 12** Augmentation de l'expression des médiateurs pro-inflammatoires dans le foie de rats déficients en donneurs de méthyles traités avec DSS (MDD/DSS).....62
- Figure 13** Augmentation de la chimiokine pro-inflammatoire (MCP-1) dans le foie et le côlon de rats déficients en donneurs de méthyles traités

	avec dextran sulfate de sodium (MDD/DSS).....	64
Figure 14	La stéatohépatite n'est pas liée à l'activation de la voie TLR4 par son ligand (lipopolysaccharide, LPS).....	66
Figure 15	Représentation schématique du protocole animal.....	72
Figure 16	Evolution de la masse corporelle entre huit groupes de rats de J60 à J185.....	75
Figure 17	Marqueurs biologiques et biochimiques dans le plasma de rats âgés de 185 jours (8 groupes d'étude).....	78
Figure 18	Illustrations macroscopiques de foies de rats initialement carencés en donneurs de méthyles (iMDD).....	80
Figure 19	Les médiateurs pro-inflammatoires et pro-fibrotiques.....	82
Figure 20	L'autophagie et l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes (CMA).....	84
Figure 21	La voie TLR4 n'est pas activée dans ce modèle de rats.....	85

Liste des tableaux

- Tableau 1 :** Paramètres biochimiques de rats âgés de 8 mois séparés en 4 groupes différents.....**56**
- Tableau 2 :** Paramètres biochimiques dans le plasma de rats âgés de 21 jours issus de mères carencés (iMDD) et de mères témoins (C).....**76**

Liste des abréviations

ADN :	Acide désoxyribonucléique.
ADNmt :	Acide désoxyribonucléique mitochondrial.
AdoCbl :	Adénosylcobalamine
AGL :	Acide gras libre.
ALAT ou ALT :	Alanine aminotransferase.
AMPK :	AMP-activated protein kinase.
ARN :	Acide ribonucléique.
ASAT ou AST :	Aspartate aminotransferase.
ATG16L1 :	Autophagy related 16-like protein 1.
α SMA :	Alpha smooth muscle actin.
A04 :	Régime standard distribué par la société SAFE [®] .
BCA :	Acide bicinchoninique.
BSA :	Bovine serum albumin.
Cbl :	Cobalamine.
CCL2 :	Chemokine ligand 2.
CCR2 :	C-c chemokine receptor type 2.
CDM :	Carence en donneur de méthyle.
CD :	Choline deficient.
CDHF :	Choline deficient high fat.
CD14 :	Cluster of differentiation 14.
CH :	Cholestérol.

CHC :	Carcinome hépatocellulaire.
COL1A1 :	Collagen type I, alpha 1.
CVD :	Cardiovascular disease.
DAI :	Disease activity index.
DSS :	Dextran sodium sulfate.
DT2 :	Diabète de type 2.
DNL :	<i>De novo</i> lipogenesis.
dTMP :	Désoxythymidine monophosphate.
dUMP :	Désoxyuridilate monophosphate.
ECL :	Electrochemiluminescence (chimiluminescence amplifiée).
ER :	Endoplasmic reticulum.
ER α :	Estrogen Receptor alpha.
ERR α :	Estrogen related receptor alpha.
FA :	Fatty acid.
FFA :	Free fatty acid.
g :	Gramme.
GLs :	Gouttelettes lipidiques.
GN :	Gram negative.
HCC :	Hepatocellular carcinoma.
Hcys ou Hcy :	Homocystéine.
HDL :	High density lipoprotein.
HES :	Hématoxyline-Eosine-Safran.
HFD :	High fat diet.

HNF4-α :	Hepatocyte Nuclear Factor 4- α .
HPLC/MS :	High-performance liquid chromatography/Mass spectrometry.
HPLC :	High-performance liquid chromatography.
HSF 1 :	Heat shock factor 1.
HSF A08 :	Heat shock factor A08.
IBD :	Inflammatory bowel disease.
ICAM-1 :	Intercellular adhesion molecule -1.
IC :	Intervalle de confiance.
IHC :	Immunohistochemistry.
IKK :	Inhibitory kappa B kinases.
iMDD :	Carence précoce en donneurs de méthyles.
IL :	Interleukin.
IL-1β :	Interleukin 1-beta.
IL-6 :	Interleukin 6.
IRAK 4 :	interleukin 1 associated kinase 4.
IRF 3 :	Interferon regulatory factor 3.
IR :	Insulin resistance.
IRGM :	Immunity-related GTPase family, M.
IκB :	Inhibitory kappa B alpha .
J :	Jour.
LBP :	Lipid binding protein.
LDL :	Low density lipoprotein.
LDN :	Lipogènese <i>de novo</i> .

LLRK2 :	Leucine-rich repeat kinase 2.
LPS :	Lipopolysaccharide.
MC :	Maladie de Crohn.
MCD :	Methionine choline deficient.
MCP-1 :	Monocyte chemoattractant protein 1.
MDD :	Methyl donor deficient.
MD2 :	Myeloid differentiation factor 2.
MeCbl :	Méthylcobalamine.
Met :	Méthionine.
MICI :	Maladie inflammatoire chronique de l'intestin.
MMP2 :	Matrix metalloproteinase 2.
MTR :	Méthionine synthetase.
Myd88 :	Myeloid differentiation primary response 88.
NAFL :	Non-alcoholic fatty liver.
NAFLD :	Non- alcoholic fatty liver disease.
NASH :	Non-alcoholic steatohepatitis.
NFκB :	Nuclear factor kappa B.
NOD2 :	Nucleotide- binding oligomerization domain protein 2.
N5,10 MTHF :	N5,10 méthylène tétrahydrofolate.
N5 MTHF :	N5 méthyl tétrahydrofolate.
PAMP :	Pathogen associated molecular pattern.
PAI -1 :	Plasminogen activator inhibitor – 1.
PGC- 1α :	Peroxisome proliferator-activated receptor-γ co-activateur-1 α.

pIKK α/β :	Phospho inhibitory kappa B kinases alpha/beta.
pIκB α :	Phospho inhibitory kappa B alpha .
PPAR-α :	Peroxisome proliferator-activated receptor- α .
RCH :	Rectocolite hémorragique.
RE :	Réticulum endoplasmique.
RI :	Résistance à l'insuline.
RIPA :	Radioimmunoprecipitation assay (buffer).
RNA :	Ribonucleic acid.
ROS :	Reactive oxygen species.
RON :	Reactive nitrogen species.
SAM :	S- adénosyl méthionine.
SAH :	S- adénosyl homocystéine.
SDS – PAGE :	Electrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécysulfate de sodium.
SIRT 1 :	Silent information regulator 1.
STAT3 :	Signal transducer and activator of transcription 3.
TG :	Triglycéride.
TGF β :	Transforming growth factor beta.
THF :	Tetrahydrofolate.
TLR4 :	Toll-like receptor 4.
TNF-α:	Tumor necrosis factor alpha.
TRAF 6 :	Tnf receptor associated factor.
UPR :	Unfolded protein response.
US :	Ultrasound.

µg : microgramme.

VCAM -1 : Vascular cell adhesion molecule – 1.

VEGF : Vascular endothelial growth factor.

VLDL : Very low density lipoprotein.

1-CM : One carbon metabolism.

Introduction

1. La maladie non-alcoolique de foie adipeux (NAFLD) et la stéatohépatite non -alcoolique (NASH)

1.1.Définition

La maladie non-alcoolique de foie adipeux (NAFLD) est définie par un spectre d'anomalies histologiques dans le foie, allant de la stéatose isolée sans activité inflammatoire avec aucune preuve de dommages cellulaires (dénommé NAFL ou non-NASH) à la stéatohépatite non alcoolique (NASH), cette dernière étant caractérisée par une stéatose, une inflammation et une lésion hépatocellulaire avec ballonnements et avec différents degrés de fibrose (Brunt et al. 2015 ; Bedossa 2017 ; Leoni et al. 2018) (Figure 1). La plupart des patients avec NAFLD restent asymptomatiques, seuls 20 % des patients sous NASH ont une mortalité accrue (Caldwell et al. 1999 ; Shimada et al. 2002 ; Propst et al. 1995). La stéatose est définie comme la présence d'excès de graisse dans le parenchyme hépatique dans plus de 5 % d'hépatocytes en l'absence d'une consommation excessive d'alcool (20 g/jour pour les hommes et 10 g/j pour les femmes), d'infection virale ou de toute étiologie spécifique de maladie hépatique chez l'homme (Jia et Rajani 2018 ; Neuschwander-Tetri et Caldwell 2003). Les caractéristiques pathologiques de la NASH incluent la stéatose, des lésions hépatocytaires, une inflammation et divers degrés de fibrose (W. Liu et al. 2016). La stéatose reflète un métabolisme désordonné des lipides associé à une lipotoxicité et à des stress cellulaires entraînant des lésions hépatocytaires. Cela déclenche des signaux pro-inflammatoires tels que la libération de diverses cytokines et chimiokines par les hépatocytes et l'activation des cellules de Kupffer conduisant à une inflammation et une fibrose, sachant que la plupart des patients présentent une stéatose simple.

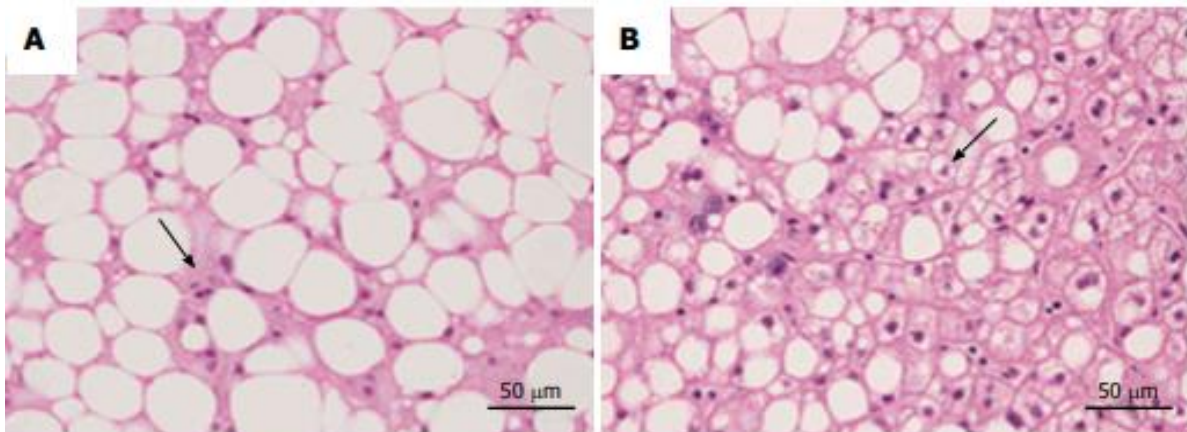


Figure 1 Principale différence entre le foie adipeux non alcoolique (NAFL) et la stéatohépatite non alcoolique (NASH). **A:** foie gras non alcoolisé ; **B:** stéatohépatite non alcoolique. Le NAFL se caractérise par un infiltrat inflammatoire minimal sans gonflement des hépatocytes (flèche). La NASH est associée à un infiltrat inflammatoire lobulaire et à une dégénérescence des hépatocytes (flèche). **Leoni et al, 2018.**

La NAFLD est actuellement la cause la plus fréquente de maladie chronique du foie chez les enfants et les adultes dans le monde entier, avec une prévalence mondiale estimée à 25,2 % (Z. M. Younossi et al. 2016a). Des études sur l'histoire naturelle de la NAFLD ont montré que certains patients atteints de stéatose isolée (90 – 95 %) ou de foie gras non-NASH semblent avoir une évolution clinique non progressive (Marengo, Jouness, et Bugianesi 2016). En revanche, jusqu'à un tiers des patients atteints de NASH (5 – 10 %) pourraient évoluer vers une fibrose avancée ou une cirrhose, ce qui se traduirait par une augmentation de la mortalité hépatique liée aux complications de la cirrhose, notamment le carcinome hépatocellulaire (CHC) (Marengo, Jouness, et Bugianesi 2016 ; Goh et McCullough 2016 ; Buzzetti, Pinzani, et Tsochatzis 2016) (Figure 2).

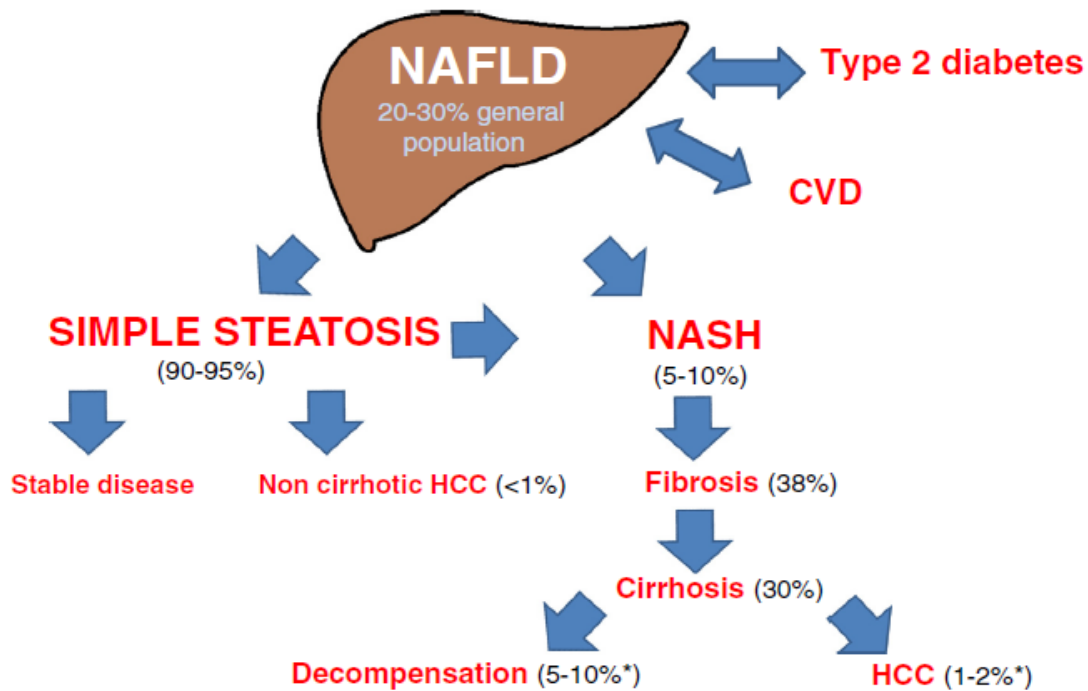


Figure 2 Prévalence de NAFLD dans la population générale. Une prévalence élevée de NAFLD dans la population générale (20 – 30 %) où la grande majorité des patients ont une stéatose simple. Seulement 5 à 10 % des patients NAFLD diagnostiqués développeront une NASH et 30 % d'entre eux développeront une cirrhose. Abréviations : NAFLD: Non-alcoholic fatty liver disease, CVD: Cardiovascular disease, NASH: Non-alcoholic steatohepatitis, HCC: Hepatocellular carcinoma. **Elena Buzzetti et al, 2016.**

La NAFLD est un trouble métabolique chronique décrit comme la manifestation hépatique du syndrome métabolique (Marchesini et al. 2003). Elle a un impact significatif sur la mortalité globale (Söderberg et al. 2010). Le mécanisme sous-jacent du développement et de la progression de la NAFLD est complexe et multifactoriel. Différents facteurs tels que la résistance à l'insuline, les hormones sécrétées par le tissu adipeux, les facteurs nutritionnels, le microbiote intestinal, le stress oxydant et les facteurs génétiques et épigénétiques doivent être pris en considération chez les sujets génétiquement prédisposés afin de mieux comprendre la pathogénie de la NAFLD (Buzzetti, Pinzani, et Tsochatzis 2016; Schuster et al. 2018; Than et Newsome 2015; W. Liu et al. 2016).

1.2.Epidémiologie de la NASH

En 2018, on estime qu'environ 25 % de la population mondiale est atteinte d'un syndrome NAFLD (Z. M. Younossi et al. 2016a). L'incidence de la NAFLD est estimée entre 43 et 60 % chez les diabétiques, \approx 90 % chez les patients hyperlipidémiques et 91 % chez les patients souffrant d'obésité morbide (Than et Newsome 2015 ; Jia et Rajani 2018). Les facteurs de risque associés au développement de la NAFLD incluent le sexe masculin, l'âge, l'obésité, l'insulinorésistance, le diabète et l'hyperlipidémie (Attar BM, Van Thiel DH, Sci World J, 2013:481893, 2013, Gaggini M, Morelli M, Buzzigoli E, DeFronzo RA, Bugianesi E, Gastaldelli A, Forum Nutr, 5:1544-1460, 2013). Une étude systématique récente portant sur 88 978 personnes atteintes de diabète et provenant de 28 pays a révélé que la prévalence globale de la NAFLD chez les personnes atteintes de diabète était de 57,80 % (Golabi P, 2017). Parmi ces patients, 65,26 % avaient une NASH comme le montrent les biopsies. La prévalence de la NAFLD en Amérique variait selon les régions, non seulement en fonction de facteurs tels que l'obésité et le DT2, mais également en fonction de facteurs génétiques. La prévalence de la NASH dans la population américaine est estimée entre 1,5 % et 6,45 % (Z. M. Younossi et al. 2016b). En Amérique du Sud, la prévalence de la NAFLD est de 29%, dont 35 % sont obèses (Z. M. Younossi et al. 2016a). Après contrôle de l'âge, du sexe, de l'indice de masse corporelle (IMC), du tour de taille, de l'hypertension, du taux sérique de lipoprotéines de haute densité, du taux de triglycérides, de la protéine C réactive et de la résistance à l'insuline, les facteurs génétiques semblaient jouer un rôle central. Les Mexicains ont une prévalence de NAFLD plus élevée que les populations des Caraïbes dominicaines et portoricaines (33 % contre 16 % respectivement, $p < 0,01$).

En Asie, la prévalence varie de 15 à 40 %. La NASH est déjà considérée parmi les principales étiologies du cancer hépatocellulaire (CHC) et des indications de transplantation hépatique aux États-Unis. (Z. Younossi et al. 2018 ; Z. M. Younossi et al. 2015). En dépit de sa prévalence, les NAFLD représentent un réel défi en termes de prévention et de traitement.

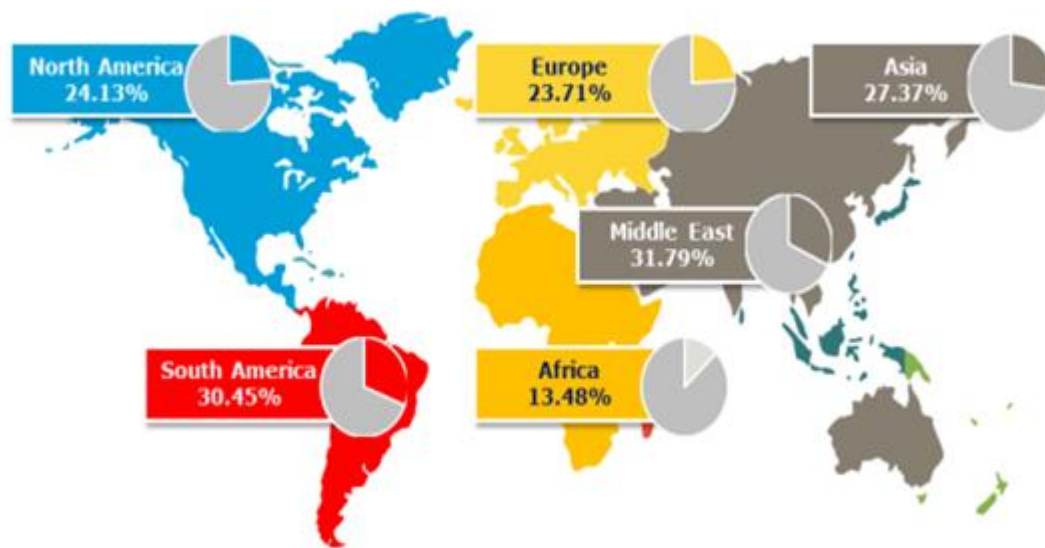


Figure 3 La prévalence de la NAFLD dans la population mondiale ; en Europe 23,71 %, en Asie 27,37 %, en Afrique 13,48 %, au moyen-orient 31,79 %, en Amérique du sud 30,45 %, en Amérique du nord 24,13 %.

Zobair Younossi et al, 2018.

1.3. Les facteurs impliqués dans la pathogénie de la NAFLD/NASH

Les composantes du syndrome métabolique, le diabète, l'hypertension et la dyslipidémie favorisent la NASH dans un continuum de pathogenèse métabolique (Farrell, Haczeyni, et Chitturi 2018). Ainsi, les mécanismes sous-jacents au développement et à la progression de la NAFLD sont complexes et multiples (Figure 3).

1.3.1. La stéatose

Elle est l'une des caractéristiques histopathologiques de la NASH. Au sein des hépatocytes, la graisse s'accumule dans le cytoplasme sous forme de gouttelettes lipidiques (GLs) conduisant à la stéatose hépatique. Lorsque l'apport en lipides excède les capacités digestives des lipides utilisés dans les hépatocytes, il se produit une rupture de l'homéostasie du stockage des lipides. La forme principale des lipides stockés dans les GLs est le triglycéride (TG), composé de trois acides gras et d'un glycérol. Les graisses alimentaires, les acides gras libres (AGL) circulants issus de la lipolyse du tissu adipeux et la lipogenèse *de novo* (LDN) constituent trois sources de lipides pour les hépatocytes contribuant respectivement pour 15, 59 et 26 % des lipides hépatiques chez les patients NAFLD (Donnelly et al. 2005).

1.3.2. La résistance à l'insuline

C'est l'un des facteurs clés dans le développement de la stéatose/NASH. Il en résulte une lipogénie *de novo* accrue et une inhibition réduite de la lipolyse du tissu adipeux (E. Bugianesi et al. 2010). Cela favorise également le dysfonctionnement du tissu adipeux en modifiant la production et la sécrétion d'adipokines et de cytokines inflammatoires (Guilherme et al. 2008). La graisse s'accumule dans le foie des patients atteints de NAFLD sous forme de triglycérides, d'où lipotoxicité, dysfonctionnement mitochondrial avec stress oxydatif du réticulum endoplasmique (Cusi, Kenneth. 2009) .

1.3.3. L'autophagie

C'est un processus de dégradation dépendant du lysosome qui permet de recycler les constituants cellulaires et de maintenir l'homéostasie énergétique cellulaire régulant le métabolisme des lipides et par conséquent permet la régression de la stéatose hépatique. La dégradation des gouttelettes lipidiques induite par l'autophagie est appelée lipophagie. Des études ont montré que l'inhibition de l'autophagie dans les hépatocytes de souris provoquait

l'accumulation de triglycérides sous forme de gouttelettes lipidiques, suggérant que la lipophagie pouvait prévenir la stéatose (R. Singh, Kaushik, et al. 2009).

1.3.4. Le tissu adipeux

Il est le principal organe de stockage des lipides, et contribue à la pathogenèse de la NASH de différentes manières. L'excès de stockage lipidique dans le tissu adipeux entraîne une hypertrophie des adipocytes. Le tissu adipeux sécrète alors des adipokines parmi lesquelles l'adiponectine et la leptine sont directement impliquées dans le développement de la stéatose hépatique.

1.3.5. Les dysfonctionnements mitochondriaux

Des preuves s'accumulent quant au rôle d'un dysfonctionnement mitochondrial, notamment une déficience de la chaîne respiratoire, dans la physiopathologie de la NASH (Begrache et al. 2006 ; Rector et Ibdah 2010). Des études portant sur des patients obèses, diabétiques ou atteints de NASH ont montré des anomalies fonctionnelles et structurelles des mitochondries hépatiques (Spahr et al. 2003 ; Sanyal et al. 2001). L'augmentation de l'oxydation et de la lipotoxicité des acides gras est l'un des principaux facteurs de la détérioration mitochondriale dans la NASH (Fujii et Kawada 2012). Un flux constant d'acides gras à travers les mitochondries et l'élévation du cycle de Krebs génèrent des espèces d'oxygène réactif (ROS pour "reactive oxygen species"), qui peuvent à leur tour endommager les complexes protéiques de la chaîne respiratoire mitochondriale et l'ADN mitochondrial (mtDNA). Les mutations de l'ADNmt peuvent produire des altérations des protéines de la chaîne respiratoire, causant une détérioration du transfert des électrons en augmentant encore plus la production des ROS mitochondriaux, générant ainsi un cercle vicieux.

1.3.6. Le stress oxydant

Il constitue une condition de déséquilibre de la balance entre les espèces réactives de l'oxygène ("reactive oxygen species", ROS) et de l'azote ("reactive nitrogen species", RNS) et les défenses antioxydantes de la cellule, en faveur des espèces oxydantes (W. Liu et al. 2016). Ce stress oxydant se produit en cas de stéatose ; il est considéré comme une cause principale dans la pathogenèse de la NASH et dans sa progression vers la fibrose et la cirrhose (Araya et al. 2004 ; Nakatani et al. 2002). Les ROS ont des effets délétères qui sont connus depuis des décennies : la peroxydation lipidique, qui rend les membranes cellulaires instables et fragiles ; l'oxydation des protéines qui altère leur fonction et peut causer la formation

d'agrégats cytotoxiques ; et l'oxydation des acides nucléiques avec un risque accru de mutations génétiques. Il a été montré que les ROS peuvent avoir différentes fonctions dans la signalisation cellulaire, en stimulant la prolifération ou la différenciation, ou encore en déclenchant des réponses adaptatives en fonction de l'intensité oxydative (due à la fois à la concentration en ROS et à la durée de leur production intracellulaire) (Hamanaka et Chandel 2010).

Les ROS jouent un rôle crucial dans différentes voies de signalisation impliquées dans la pathogenèse de la NAFLD : la réponse cellulaire à l'hypoxie (Chandel et al. 1998 ; Bell et Chandel 2007), la régulation de l'activité des phosphatases (Kwon et al. 2004) et la mort cellulaire induite par le TNF α (Kamata et al. 2005).

1.3.7. Les facteurs alimentaires

Le régime alimentaire joue un rôle dans la pathogenèse de la NAFLD et certains nutriments sont directement associés à l'inflammation du foie. Le fructose alimentaire a été proposé comme un facteur de risque important pour la NAFLD, l'obésité et le DT2 (W. Liu et al. 2016). Le fructose est un facteur pro-inflammatoire censé favoriser la NASH par plusieurs mécanismes, notamment la régulation des gènes inflammatoires hépatiques (Yang et al. 2012; J. Liu et al. 2014) et la réduction de la bêta-oxydation mitochondriale hépatique et des taux d'ATP (Crescenzo et al. 2013 ; Rebollo et al. 2014). Près d'un tiers des patients atteints de NAFLD subissent des perturbations de l'homéostasie des métaux (fer et cuivre) (Aigner, Weiss, et Datz 2015 ; Aigner et al. 2008). La surcharge en fer hépatique conduit à la formation de ROS, induisant ainsi un stress oxydatif et favorisant l'activation des cellules immunitaires et des lésions hépatocellulaires (Ceccarelli et al. 1995 ; Galaris et Pantopoulos 2008 ; Dixon et Stockwell 2014). L'augmentation de l'apport alimentaire en acides gras saturés induit la lipogenèse *de novo* et le cholestérol alimentaire conduit à l'apoptose et au stress cellulaire (Al-Rasadi et al. 2015 ; Min et al. 2012). Des études ont montré qu'un rapport élevé d'acide gras polyinsaturé n-6: n-3 dans les hépatocytes et dans la circulation est associé à la sévérité de la NAFLD (Araya et al. 2004).

1.3.8. Les déterminants génétiques

Grâce à l'étude de gènes candidats et l'étude d'association portant sur l'ensemble du génome, une longue liste de gènes potentiellement impliqués dans l'apparition et la progression de la NAFLD a été documentée . Un polymorphisme mononucléotidique (SNP)

dans le gène (*PNPLA3*), codant pour des protéines membranaires localisées dans le réticulum endoplasmique et à la surface de GLs des hépatocytes, des cellules stellaires hépatiques et des adipocytes (Bettermann, Hohensee, et Haybaeck 2014 ; Musso, Gambino, et Cassader 2010), est un facteur génétique prédisposant de la stéatose. Ce SNP a pour résultat une mutation faux sens sur le codon 148 du gène *PNPLA3* substituant la méthionine à l'isoleucine (I148M). Le variant du gène *PNPLA3* I148M a été identifié dans des études d'association indépendantes menées à l'échelle du génome (Speliotes et al. 2011 ; Krawczyk, Bonfrate, et Portincasa 2010). Les différences de survenue de NAFLD chez différentes populations peuvent être expliquées par la prévalence de la mutation de *PNPLA3* I148M chez les différentes ethnies (Hassan et al. 2014 ; Birkenfeld et Shulman 2014 ; Williams et al. 2013 ; Matherly et Puri 2012 ; Romeo et al. 2008).

La protéine *PNPLA3* purifiée possède une activité phospholipase, TG lipase et acylglycérol transacylase (G. Musso, Gambino, et Cassader 2010). Ses fonctions sont impliquées dans le remodelage des gouttelettes lipidiques et la sécrétion de VLDL. Les variants de *PNPLA3* I148M et TM6SF2 E167K (SNP rs58542926) sont associés au risque de NAFLD, de fibrose et de NASH (Dongiovanni, Romeo, et Valenti 2015 ; Anstee et Day 2013).

1.3.9. Les facteurs épigénétiques

Les modifications épigénétiques, telles que la méthylation de l'ADN, les modifications des histones (par exemple acétylation) et l'activité des microARN (miARN), sont des altérations qui ne modifient pas les séquences de l'ADN et contribuent à l'homéostasie cellulaire (Zeybel, Mann, et Mann 2013). La méthylation de l'ADN est considérée comme l'un des processus importants menant au développement de la stéatose simple à la NASH et est principalement affectée par les carences alimentaires des donneurs méthyles fondamentaux tels que la bétaine, le folate et la choline (Jaenisch et Bird 2003). Le folate influence l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des acides gras libres et son déficit induit une accumulation de triglycérides dans le foie (Pooya et al. 2012). Dans une étude sur des modèles murins de NASH induite par un régime alimentaire déficient en méthionine, choline et folate, une association entre la diminution de méthylation des cytosines (en particulier au niveau des séquences répétées) et le développement de NASH a été observée (Pogribny et al. 2009). L'alimentation des souris avec un régime déficient en méthionine et en choline produit une NASH par l'épuisement de la S-adénosyl-L-méthionine mitochondriale et du glutathion (Caballero et al. 2010). Un régime déficient en donneurs de méthyle n'est pas forcément

associé à une hypométhylation de l'ADN . En effet, la méthylation du promoteur du gène mitochondrial codant pour la NADH déshydrogénase 6 (*MTND6*) est plus élevée chez les patients atteints de NASH que chez les patients présentant une stéatose simple. Elle est directement associée à une expression plus faible de *MTND6* et à un score plus élevé de NAFLD (Pirola et al. 2013).. Les modifications épigénétiques permettent ainsi une régulation flexible de l'expression des gènes, qui peut être modifiée par le régime alimentaire, l'activité physique et les facteurs environnementaux.

1.3.10. Microbiote intestinal altéré

La NAFLD est associée à une modification de la composition du microbiote intestinal qui est une source de ligands (LPS) des récepteurs de type Toll-like (TLR). Leur changement de composition peut augmenter la quantité de LPS transloqué dans le foie (Miura 2014). Le rôle de la dysbiose intestinale et de l'endotoxémie métabolique est présenté dans le chapitre suivant.

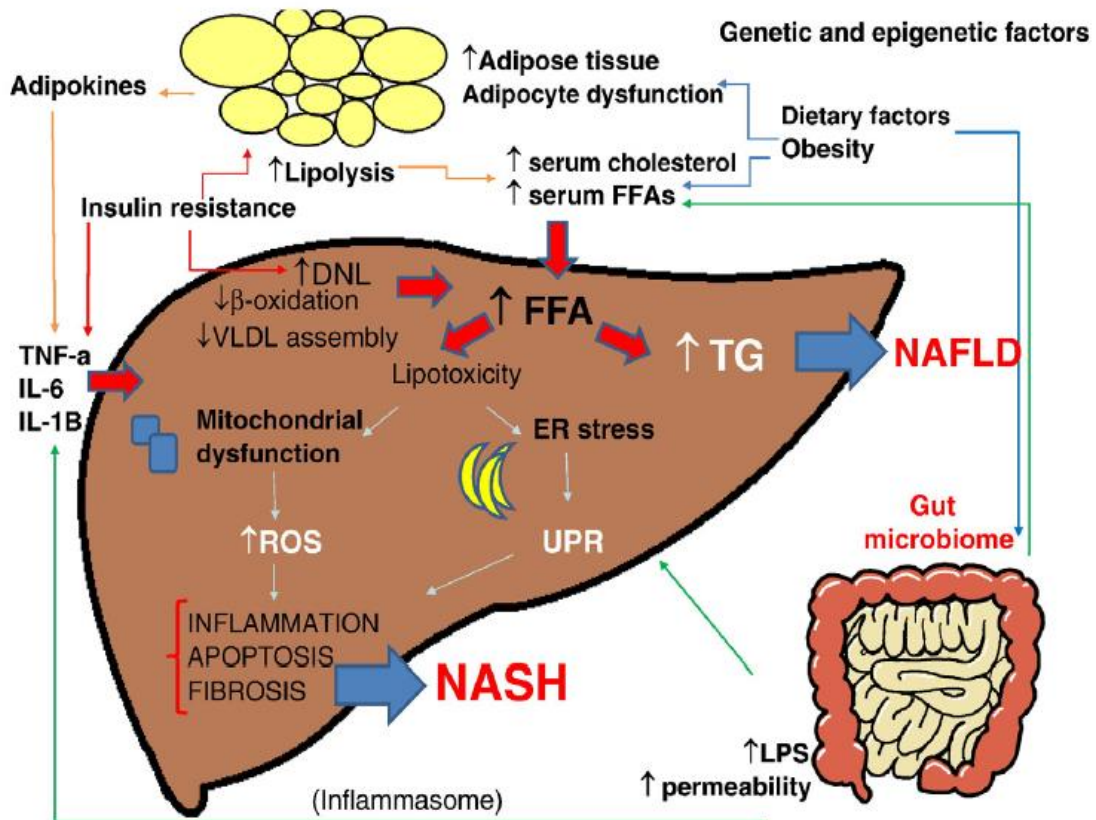


Figure 4 Hypothèses complexes pour le développement de NAFLD. Des facteurs alimentaires et environnementaux, associés à l'obésité, entraînent une augmentation des taux sériques d'acides gras libres (FFA) et de cholestérol (CH), un développement de la résistance à l'insuline, une prolifération et un dysfonctionnement des adipocytes et des modifications du microbiome intestinal. La résistance à l'insuline agit sur l'aggravation du dysfonctionnement des adipocytes, induit une lipolyse et la libération d'adipokines et de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α et IL-6, qui contribuent également au maintien de l'état de résistance à l'insuline. Dans le foie, la résistance à l'insuline amplifie la lipogénèse *de novo* (DNL). L'augmentation du flux de FFA hépatiques, qui découle des processus susmentionnés et d'une activité modifiée du microbiome intestinal, conduit à deux situations différentes: la synthèse et l'accumulation de triglycérides (TG) et les taux «toxiques» d'acides gras, de cholestérol libre et d'autres métabolites lipidiques qui provoquent un dysfonctionnement mitochondrial avec la production de ROS et un stress du réticulum endoplasmique (RE) par l'activation de l'UPR, le tout conduisant à une inflammation hépatique. En outre, la perméabilité de l'intestin grêle peut être augmentée avec des molécules en circulation qui contribue à l'activation de l'inflammasome et du stress du RE, tels

que le LPS, et à la libération de cytokines pro-inflammatoires. Les facteurs génétiques ou les modifications épigénétiques affectent la teneur en graisses des hépatocytes, les processus enzymatiques et l'environnement inflammatoire du foie, influençant ainsi le risque de progression vers l'inflammation et la fibrose (NASH) ou la persistance à un stade stable de la maladie (NAFLD).

Abréviations : 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.

Elena Buzzetti et al, 2016.

1.4.La dysbiose intestinale

Des données récentes ont montré une association étroite entre les changements de composition du microbiote intestinal et le développement de la NAFLD mettant en jeu l'axe intestin-foie. Le microbiote intestinal joue un rôle important chez l'homme et chez le rongeur (Tremaroli et Bäckhed 2012). La modification du microbiote intestinal peut modifier l'absorption et le stockage nutritionnels. Bäckhed *et al.* ont clairement montré que les souris élevées de manière conventionnelle avaient une teneur en graisse corporelle et en triglycérides hépatiques supérieure de 42 % par rapport aux souris axéniques en dépit du fait que les souris élevées de manière conventionnelle consommaient moins de calories (Bäckhed et al. 2004).

Certaines bactéries intestinales sont capables de fermenter des glucides complexes, qui ne sont pas digérés par les enzymes de mammifères. La digestion de glucides produit des acides gras à chaîne courte, qui représentent 10 % de l'apport énergétique quotidien (Conterno et al. 2011) et ils stimulent la lipogenèse *de novo* (LDN) (Zambell, Fitch, et Fleming 2003). Ainsi, le microbiote intestinal contribue au développement de la NAFLD. Des modifications du mode de vie caractérisé par un apport calorique accru, des régimes riches en graisses et des habitudes sédentaires peuvent entraîner une modification de la composition de la flore intestinale appelée dysbiose, et qui aboutissent à un déséquilibre entre les médiateurs tolérogènes et les médiateurs inflammatoires du microbiote. La dysbiose intestinale qualitative et quantitative a été documentée au cours de la NAFLD, tant chez les patients atteints de stéatose hépatique simple que chez ceux atteints de stéatohépatite non alcoolique (NASH) (Raman et al. 2013; Mouzaki et al. 2013; Spencer et al. 2011; Wong et al. 2013; Miele et al. 2009; Wigg et al. 2001).

Le genre *Bacteroides* et le genre *Ruminococcus* ont été associés indépendamment à la NASH. Les échantillons de microbiote provenant de patients atteints de NASH ont une proportion plus faible de membres de la famille des *Ruminococcaceae* que ceux provenant de sujets en bonne santé (Raman et al. 2013). Le genre *Prevotella* se trouve en plus faible abondance chez les patients atteints de NASH (Boursier et al. 2016) tandis que *Clostridium coccoïdes* montre un pourcentage significativement plus élevé chez les patients NASH que chez ceux atteints de stéatose simple (Mouzaki et al. 2013) .

Ainsi, l'analyse du microbiote intestinal ajoute des informations aux facteurs prédictifs classiques de la sévérité de la NAFLD et suggère de nouvelles cibles métaboliques pour les traitements pré ou probiotiques pour lesquels l'équilibre entre absorption nutritionnelle, stockage et dépense d'énergie est compromis.

1.5.L'endotoxémie métabolique

Plusieurs mécanismes suggèrent que le microbiote intestinal contribue au dépôt de graisse dans le foie, à l'inflammation et à la fibrose. Le microbiote permet l'absorption et le stockage de l'énergie, par contre il est une source de ligands LPS des TLR qui est un composant glycolipidique majeur de la paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif (GN) qui, s'il est absorbé dans la circulation, active la libération de médiateurs inflammatoires dérivés de l'hôte pour induire une réponse inflammatoire systémique. Premièrement, les produits bactériens hépatotoxiques, c'est-à-dire les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) et les motifs moléculaires associés aux dommages (DAMP), atteignant le foie *via* la circulation portale, peuvent activer des TLR sur différentes cellules hépatiques. Dans ce contexte, le composant le plus reconnu parmi les constituants bactériens est le LPS, qui peut activer le TLR4 sur les cellules de Kupffer et les hépatocytes, mais également sur les cholangiocytes et sur les cellules progénitrices hépatiques (Vespasiani-Gentilucci et al. 2012, 2015), déclenchant ainsi la cascade de signalisation et la sécrétion de plusieurs cytokines inflammatoires. Récemment, chez des patients atteints de NAFLD, l'expression de TLR4 sur les voies biliaires et les cellules progénitrices hépatiques était associée de manière significative à l'inflammation, à l'activation des cellules fibrogènes et à la fibrose, indiquant la clairance biliaire de l'excès de LPS en tant que déclencheur possible de l'inflammation (Vespasiani-Gentilucci et al. 2015 ; Carotti et al. 2015). De manière constante, la protéine de liaison au LPS (LBP), un marqueur sensible de l'activité du LPS, s'est avérée être élevée chez les patients atteints de NAFLD et en corrélation avec le stade de fibrose (Vespasiani-

Gentilucci et al. 2015). De plus, le LPS n'est pas le seul moteur de l'inflammation systémique, d'autres produits bactériens dérivés du microbiote intestinal peuvent réguler la sensibilité à l'insuline et produire une inflammation également en réduisant les médiateurs anti-inflammatoires (Moschen, Kaser, et Tilg 2013).

Ainsi, l'axe intestin-foie présente un intérêt majeur dans la pathogenèse de la NAFLD/NASH. De nombreuses études récentes ont montré que la progression de la NAFLD est associée à des altérations intestinales (Cani et al. 2007, 2008 ; Farhadi et al. 2008 ; Miele et al. 2009). L'altération de la fonction de la barrière intestinale causée par l'exposition aux facteurs de stress (médicaments, dysbiose, régime riche en graisses, régime déficient en donneurs de méthyle) est un facteur qui contribue à l'endotoxémie métabolique, qui peut à son tour entraîner un afflux excessif de LPS dans le foie (Henaoui-Mejia et al. 2012 ; Cani et al. 2007, 2008). Les TLR jouent un rôle majeur dans la physiopathologie de la NAFLD en raison de l'exposition du foie à des quantités relativement importantes de PAMP dérivées de l'intestin et délivrées *via* la circulation portale (Seki et al. 2007 ; Rivera et al. 2007 ; Miura et al. 2010). Plusieurs modèles animaux ont montré le rôle de la translocation du LPS et de l'activation subséquente de la voie du TLR4 dans les pathomécanismes de la NASH. Des souris nourries avec un régime déficient en choline et méthionine (MCD) développent une stéatohépatite par endotoxémie portale et par une expression accrue du récepteur TLR4 (Rivera et al. 2007). Les souris nourries avec un régime riche en graisses (HF) et traitées avec le DSS ont une augmentation du taux de LPS portal et des niveaux d'ARNm de TLR4 et TLR9 (Gäbele et al. 2011). Une augmentation du LPS portal est associée à une fibrose chez des souris nourries avec un régime déficient en choline et riche en graisses (CDHF) et traitées avec le DSS (Achiwa et al. 2016). De plus, il a été démontré chez la souris TLR4 sauvage en comparaison de la souris TLR4 mutante que la fibrose et l'inflammation hépatiques sont augmentées *via* les voies du TGF- β et du MYD88-NF κ B (Seki et al. 2007).

1.6. Co-absorption de LPS avec les lipides alimentaires

Comme mentionné précédemment, les endotoxines sont des composants de la paroi cellulaire des bactéries à GN. Comme de nombreuses bactéries à GN sont présentes dans la microflore intestinale, il a été suggéré que plus de 1 g. de LPS était présent dans la microflore intestinale, cela pourrait être une source potentielle pour ces LPS circulants, éventuellement par translocation (Berg 1996). La proportion de bactéries à GN dans la microflore est plus élevée chez les sujets obèses que chez les sujets maigres (Ley et al. 2006). En outre, le

réservoir de LPS pro-inflammatoire dans l'intestin peut être altéré lorsque le régime alimentaire est déséquilibré (Ley et al. 2006) .

Des études récentes ont montré le lien entre un régime alimentaire riche en graisses (HF) et l'endotoxémie. Plusieurs études ont montré qu'un repas HF entraîne une augmentation de l'endotoxémie postprandiale (Erridge et al. 2007 ; Laugerette et al. 2011). Il a été rapporté qu'un régime riche en graisses de 4 semaines chez des souris de type sauvage augmentait les taux d'endotoxines plasmatiques et l'inflammation par rapport à un régime témoin (Cani et al. 2007). Huit sujets en bonne santé ont été soumis à un régime alimentaire de type occidental (teneur élevée en graisse et faible en glucides et fibres) pendant 1 mois, entraînant une augmentation de 71 % de l'activité plasmatique de l'endotoxine (endotoxémie), alors qu'un régime alimentaire prudent, pauvre en graisses et riche en glucide et fibres contenant 11% de plus de oméga-3 «nutriments anti-inflammatoires», de vitamine C et de vitamine E, a réduit les taux de 31 % (Pendyala, Walker, et Holt 2012). Le régime alimentaire de type occidental pourrait contribuer à l'endotoxémie en modifiant la fonction de la barrière gastro-intestinale ou la composition du microbiote (Pendyala, Walker, et Holt 2012). Les taux plasmatiques de LPS sont modulés en fonction de la teneur en aliments : plus la teneur en matières grasses est élevée, plus la concentration en LPS plasmatique est élevée (Amar et al. 2008). De petites quantités de LPS sont absorbées par l'intestin chez des animaux en bonne santé (Ravin et al. 1960), et il existe des preuves que les chylomicrons transportent probablement aussi des quantités significatives de LPS absorbées dans l'intestin (Laugerette et al. 2011 ; Ghoshal et al. 2009 ; Vreugdenhil et al. 2003 ; Hersoug, Møller, et Loft 2016).

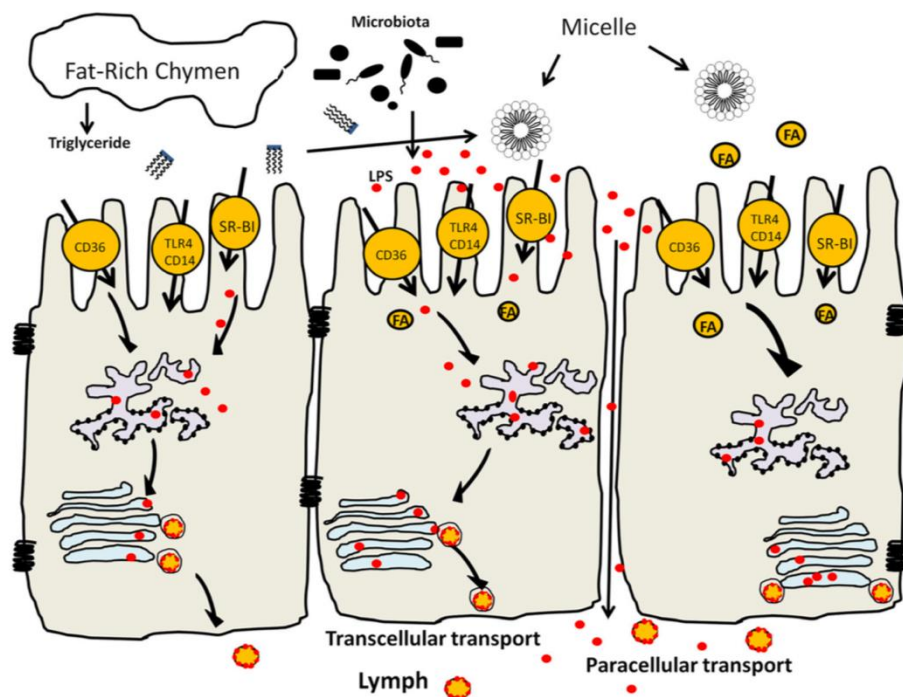


Figure 5 Les moyens de transport du LPS issu du microbiote intestinal. Les transports transcellulaires et paracellulaires représentent des voies distinctes pour les mouvements du lipopolysaccharide (LPS) à partir de la lumière entérique dans la lymphe et plus loin dans la circulation. Dans la voie trans-cellulaire, l'absorption des lipides sert de véhicule au LPS, qui est activement transporté dans la cellule proportionnellement à la teneur en graisse du chyme. Les acides gras absorbés (AG) et le cholestérol sont transportés dans le réticulum endoplasmique lisse (RE). Dans les RE, les triglycérides et les esters de cholestérol sont incorporés dans les pré-chylomicrons (CM) avec l'apo B48. Ces lipoprotéines sont ensuite transportées dans des vésicules pré-CM vers l'appareil de Golgi où l'apo A-I est liée à des lipides supplémentaires pour former des CM matures, qui sont exportés dans la lymphe par des vésicules de transport.

Abréviations : LPS : Lipopolysaccharide, AG : Acide gras, RE : Réticulum endoplasmique, CM : Chylomicrons.

Hersoug et al ; 2016 .

De plus, il a été démontré que le LPS est impliqué dans le développement de l'obésité en tant que molécule de ciblage direct pour la libération et le stockage des lipides dans le tissu

adipeux, où les lipoprotéines riches en LPS sont absorbées principalement par des adipocytes de grande taille à activité métabolique élevée (Hersoug, Møller, et Loft 2016).

2. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)

2.1.Définition

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont un groupe d'affections idiopathiques incluant la rectocolite hémorragique (RCH) et la maladie de Crohn (MC). Ce sont des affections inflammatoires chroniques, invalidantes et incurables du tractus gastro-intestinal. La maladie de Crohn atteint n'importe quel segment du tube digestif de la bouche à l'anus. L'inflammation s'étend de façon transmurale et est caractérisée par la diminution des villosités et des déformations des cryptes. La RCH est caractérisée par l'atteinte du rectum et du côlon. Ni l'anus ni l'intestin grêle ne sont concernés. Elle est caractérisée par la présence de lésions continues et superficielles. Les patients souffrant de MICI présentent des diarrhées, du sang dans les selles, des douleurs abdominales, une perte de poids, une asthénie et de l'anémie. Des manifestations articulaires, cutanées et oculaires sont les principales conséquences systémiques des MICI. Les complications se manifestent par une sténose, l'apparition de fistules, des occlusions et des abcès.

2.2.Epidémiologie

Les MICI représentent un véritable problème de santé publique compte tenu de leur fréquence (3 millions en Europe et 200,000 en France) (Kappelman et al. 2007), leur coût de prise en charge (Nguyen et al. 2007 ; Sonnenberg et Chang 2008), leur pronostic à court et à long terme (Faubion et al. 2001 ; Bernstein et Nabalamba 2006), leur retentissement sur la qualité de vie, et du handicap fonctionnel qu'elles engendrent (Peyrin-Biroulet et al. 2012). Les MICI sont moins fréquentes dans les pays asiatiques que dans les pays développés. Les MICI touchent aussi bien les hommes que les femmes. Cependant, la prévalence de la MC montre une discrète prépondérance chez la femme alors qu'aucune différence n'est observée suivant le sexe dans le développement d'une RCH .

2.3.Les facteurs impliqués dans la pathogénie de MICI

La pathogénie des MICI reste encore mal connue. Les concepts actuels de la pathogénie des MICI suggèrent une interaction complexe entre des facteurs génétiques, nutritionnels et

environnementaux, et le microbiote intestinal qui pourrait être modulé en fonction des déterminants nutritionnels et génétiques.

Des études d'association ont identifié de nombreux variants génétiques impliqués dans la prédisposition aux maladies inflammatoires de l'intestin. Les modifications dans les gènes du système immunitaire inné, comme *NOD2* (nucleotide-binding oligomerization domain protein 2), *ATG16L1* (autophagy related 16-like protein 1), *IRGM* (immunity-related GTPase family, M) et *LLRK2* (leucine-rich repeat kinase 2) sont spécifiques de la maladie de Crohn et ne sont pas associés à la RCH. En revanche, plusieurs gènes impliqués dans la voie de l'IL-23, y compris *IL23R*, *IL-12B* et *STAT3* (Signal transducer and activator of transcription 3) ont été associés à la fois à la maladie de Crohn et à la RCH.

La protéine *NOD2* est un récepteur intracellulaire pour un composé de la paroi bactérienne, le muramyl-dipeptide. Elle est exprimée par les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules de Paneth (Lesage et al. 2002 ; Rosenstiel et al. 2003). Les mécanismes qui sous-tendent la relation entre *NOD2* et la maladie de Crohn restent mal connus. Une diminution significative de l'expression des α -défensines a été observée chez les patients atteints de la maladie de Crohn qui sont porteurs du variant de *NOD2* (Wehkamp et al. 2005). Dans le gène *ATG16L1*, un SNP (Ala281Thr) est très significativement associé à la maladie de Crohn (Naser et al. 2012).

L'absence de concordance totale chez les jumeaux monozygotes (Halfvarson et al. 2003) et l'agrégation familiale dans les MICI (Hugot et al. 2003) sont autant d'éléments en faveur de l'intervention de facteurs environnementaux comme le microbiote dans la genèse des MICI (Baumgart et al. 2007). Deux facteurs d'environnement ont un rôle établi : le tabac et l'appendicectomie. La perte de poids a été significativement plus fréquente chez les patients fumeurs atteints de la MC par rapport aux fumeurs atteints de RCH ($p < 0,02$), et la diarrhée était plus fréquente chez les patients fumeurs atteints de la maladie de Crohn par rapport aux non-fumeurs ($p < 0,01$) (Russel et al. 1998). Plusieurs études concordantes ont démontré qu'un antécédent d'appendicectomie avait un effet "protecteur" vis-à-vis de la RCH en réduisant le risque d'environ 70 %. De nombreux autres facteurs d'environnement font l'objet de recherches actives. Il s'agit d'agents infectieux, alimentaires, du stress et de facteurs socio-économiques.

2.4. L'homocystéine et les médiateurs pro-inflammatoires

Il a été montré *in vitro* que l'homocystéine pouvait stimuler la production de plusieurs facteurs pro-inflammatoires tels que MCP-1 (monocyte chemo-attractant protein-1), une chimiokine pour les monocytes, et interleukine IL-8, une chimiokine pour des lymphocytes T et neutrophiles, ceci via l'activation de Necrosis Factor kappa B (NFκB). Par ailleurs, l'homocystéine est capable de moduler la réponse inflammatoire en stimulant l'expressions de molécules d'adhésion comme VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), ICAM-1 (intercellular adhesion molecule- 1) et PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) (G. Wang et al. 2002), l'expression de ces 3 molécules étant augmentée chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) (Jones et al. 1995).

L'homocystéine pourrait également provoquer des lésions de la muqueuse intestinale par un effet cytotoxique médié par le Tumor necrosis factor-alpha (TNF-α). L'accumulation de l'homocystéine est associée à de perturbation du potentiel membranaire mitochondrial induite par le TNF-α (Ratter et al. 1999). L'homocystéine induit ainsi une inflammation sur l'endothélium microvasculaire d'intestin humain en stimulant l'expression de VCAM-1, MCP 1 et la phosphorylation de p38 (Danese et al. 2005) .

Au total, l'homocystéine via une augmentation de molécules d'adhésion, de cytokines et de chimiokines pourraient participer au maintien d'une inflammation chronique de la muqueuse intestinale chez les patients atteints de MICI.

3. Les MICI et la NASH

Les données épidémiologiques

Des études épidémiologiques ont montré une association entre la maladie intestinale inflammatoire (MICI) et un risque accru de développement de stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) (Lapumnuaypol et al. 2018). Il existe actuellement 29 articles scientifiques décrivant la NAFLD chez les patients atteints de MICI.

La NASH s'avère plus fréquente chez les patients atteints de MICI que dans la population générale (McGowan et al. 2012). La NASH est plus fréquente chez les patients atteints de MICI à un plus jeune âge (Principi et al. 2018) et les facteurs métaboliques tels que le diabète et la circonférence abdominale font partie des facteurs liés aux pathogènes de MICI et de NAFLD (Principi et al. 2018) .

Chez 928 patients, qui présentaient une MICI, 8.2 % étaient atteints d'une NAFLD par imagerie (Sourianarayanan et al. 2013a). Dans une étude rétrospective, il a été démontré que la NAFLD avait une prévalence de 33 % chez les patients atteints de MICI (Bessissow et al. 2016). Dans une étude de cohorte de 384 patients parmi lesquels 64,6 % étaient atteints de la maladie de Crohn, la prévalence de la NAFLD était de 12,2 % (Saroli Palumbo et al. 2018). Une autre cohorte de 465 patients atteints de MICI et 189 non-MICI, la prévalence de NAFLD était de 28 % et 20,1 % respectivement (Principi et al. 2018). Une méta-analyse de sept études observationnelles portant sur un total de 1610 patients montre qu'il n'existe pas d'association entre l'utilisation de médicaments tels que les glucocorticoïdes, les immunomodulateurs et les inhibiteurs du TNF et l'incidence de la NAFLD (Lapumnuaypol et al. 2018). Ceci suggère que l'inflammation intestinale systémique pourrait augmenter le risque de NAFLD/NASH indépendamment du traitement grâce à des mécanismes qui doivent être disséqués.

4. Les différents modèles expérimentaux de la NASH

Un certain nombre de modèles animaux ont été développés pour l'étude de la NAFLD ou de la NASH. Différents régimes ont été utilisés pour établir des modèles expérimentaux NASH chez les rongeurs, notamment des régimes carencés en méthionine/choline (MCD), en choline (CD), riches en lipides (HF) ou carencés en donneurs de méthyle (MDD) (Lau, Zhang, et Yu 2017a) et le modèle DIAMOND (modèle animal induit par le régime alimentaire de la stéatose hépatique non alcoolique) caractérisé par l'alimentation de souris isogéniques à régime riche en graisses, avec consommation *ad libitum* de glucose et de fructose à des concentrations physiologiquement pertinentes. L'avantage de ce modèle est qu'il récapitule les principaux changements physiologiques, métaboliques, histologiques, transcriptomiques et de signalisation cellulaire observés chez les humains atteints de NASH progressive (Asgharpour et al. 2016). Le modèle de régime classique à haute teneur en graisses (HF) utilise des rats nourris avec un régime composé de 71 % de matières grasses, 11 % de glucides et 18 % de protéines pendant 3 semaines ou des souris nourries au même régime pendant 16 semaines. La stéatose hépatique est produite par ce modèle avec augmentation du taux de triglycérides hépatiques, ballonnisation des hépatocytes, corps de Mallory, taux de glucose sérique plus élevés à jeun et résistance à l'insuline (IR). Ce modèle imite à la fois l'histopathologie et la pathogenèse de la NAFLD humaine à mesure qu'elle développe les caractéristiques distinctives, à savoir l'obésité et l'IR.

Le régime alimentaire déficient en méthionine et en choline est un modèle nutritionnel reproductible de la NASH fréquemment utilisé. Le régime consiste généralement en une quantité considérable de saccharose (40 % d'énergie) et n'est que modérément enrichi en graisse (10 %), mais est déficient en méthionine et en choline. Les animaux privés de choline seule ont une diminution de la sécrétion hépatique de lipoprotéines de très basse densité (VLDL) et une hépatostéatose, avec stress oxydatif, mort des cellules hépatiques et modification de l'expression des cytokines proinflammatoire et des adipocytokines, mais ne provoque pas d'inflammation hépatique, ni de fibrose. Cependant, le fait de priver les rats de choline et de méthionine entraîne une inflammation et une fibrose hépatiques étendues (Corbin et Zeisel 2012).

Les souris *db/db* sont homozygotes pour le gène diabétique autosomique récessif (*db*). Ce gène code pour une mutation ponctuelle du récepteur de la leptine (*Ob-Rb*), ce qui conduit à une signalisation défectueuse de la leptine (Trak-Smayra et al. 2011). Par conséquent, les souris *db/db* ont des taux de leptine normaux ou élevés, mais résistent à ses effets. Les souris *ob/ob* portent une mutation autosomique récessive dans le gène de la leptine. Contrairement aux souris *db/db*, les souris *ob/ob* possèdent des récepteurs de leptine fonctionnels, mais une leptine non fonctionnelle. Ces souris présentent un surpoids important, sont hyperphagiques, hyperinsulinémiques, hyperglycémiques et résistantes à l'insuline, et développent une stéatose hépatique spontanée (NAFLD) mais pas une stéatohépatite (NASH). Ces souris doivent être exposées à des agressions ultérieures telle qu'un régime MCD, HF, de petites doses d'endotoxine lipopolysaccharidique (LPS) (Yang SQ et al. 1997), d'éthanol ou une provocation par ischémie-reperfusion hépatique (Anstee QM et al. 2006) pour déclencher une stéatohépatite. L'avantage de ce modèle réside dans le fait qu'il présente les caractéristiques du syndrome métabolique humain. Toutefois, le déficit congénital en leptine et la résistance à la leptine provoqués par la mutation de gènes chez l'homme obèse sont extrêmement rares (Paz-Filho et al. 2010). Les modèles de souris *db/db* et *ob/ob* sont donc limités dans leur capacité à refléter l'étiologie de l'obésité humaine, de la RI et de la stéatose hépatique. D'autres modèles existent également pour l'étude de la pathogenèse de la NASH. Ces modèles comprennent un régime alimentaire riche en cholestérol, des souris *foz/foz* (régime alimentaire riche en graisses déficient en choline), un régime alimentaire déficient en acides aminés L-déficients en choline, un régime alimentaire déficient en acides aminés L-déficients en choline et du tétrachlorure de carbone, un régime alimentaire riche en graisses chez des souris déficientes en PTEN spécifique de l'hépatocyte streptozotocine et souris *db/db* + DEN.

Le modèle MDD est caractérisé par la carence en donneurs de méthyle alimentaires tels que les folates (vitamine B9) et la cobalamine (vitamine B12). La description du modèle de NASH produit par le régime MDD et le rationel d'implication dans la NASH et les MICI seront développés dans le chapitre suivant.

5. Les donneurs de méthyle alimentaires : Les monocarbones

Les folates (vitamine B9) et la cobalamine (vitamine B12) .

5.1. Définitions et rôles

L'acide folique (vitamine B9), nommé aussi acide ptéroylmonoglutamique, est une vitamine hydrosoluble. Le terme "folique" tire sa racine du mot feuillage, à cause de l'abondance de la vitamine B9 dans les végétaux foliacés. Les folates facilitent le transfert des unités mono-carbonées à partir de multiples biomolécules vers des nombreuses réactions biosynthétiques telles que la synthèse de purine et de pyrimidine, la synthèse de la méthionine à partir de l'homocystéine (Hcy) (Bottiglieri 2005).

La vitamine B12, également appelée cobalamine (Cbl), est une vitamine hydrosoluble qui doit son nom à l'atome de Cobalt qu'elle contient. Cette vitamine est indispensable pour le maintien des fonctions hématologiques et neurologiques. La vitamine B12 est un nutriment essentiel jouant le rôle de coenzyme dans deux processus métaboliques : la conversion du méthylmalonyl-CoA en succinyl-CoA par la méthylmalonyl-CoA mutase (MCM) au niveau de la mitochondrie et la reméthylation de l'homocystéine en méthionine par la méthionine synthétase (MTR) au niveau du cytoplasme des cellules (Rafnsson et al. 2011 ; Rosenberg 2008).

5.2. Les apports nutritionnels

Notre organisme étant incapable de synthétiser les folates et la vitamine B12, leur apport est donc exclusivement alimentaire. Les aliments constituant une source importante de folates sont le foie, les légumes à feuilles vertes, les haricots, les germes de blé, les levures, le jaune d'oeuf, le lait, les produits laitiers, les betteraves, le jus d'orange et le pain complet (Iyer et Tomar 2009). La vitamine B12 est exclusivement présente dans les aliments d'origine animale comme les abats (foie, rognons), la viande, les œufs, les poissons, les crustacés et les laitages. Les besoins en vitamine B12 sont variables en fonction des périodes de la vie, mais les apports conseillés restent toujours très faibles (environ 2 µg par jour chez l'adulte).

5.3. La prévalence de la carence en vitamine B9 et vitamine B12 et leurs conséquences cliniques

La carence en vitamine B9 ou en vitamine B12 est répandue dans de nombreuses régions du monde que ce soit dans les pays industrialisés ou non industrialisés. La prévalence mondiale de la carence en folate dans la population est inconnue en raison du manque de données provenant de nombreuses régions du monde (McLean, de Benoist, et Allen 2008). De nombreux pays, notamment dans les pays à faible revenu, n'évaluent pas systématiquement le statut en folate de la population (Ramakrishnan 2002). Dans les pays qui disposent de données sur le statut en folate, les données déclarées sur les carences en folate varient en raison de l'utilisation de méthodes de test différentes, de plages de variation et d'hétérogénéité par race, groupe ethnique ou région géographique (de Benoist 2008).

La carence d'apport alimentaire en vitamine B9 reste la principale cause de carence. Elle résulte de la malnutrition, des régimes amaigrissants, de la cuisson excessive des aliments ou de l'inadéquation entre les apports et les besoins (accrus au cours de la grossesse, de la lactation et en cas de cancer). La carence en folates peut entraîner de nombreux troubles comme des malformations congénitales, des troubles neurologiques, des *spina bifida* (Scott 2001 ; Van Der Put et Blom 2000) et des maladies cardiovasculaires (Gerhard et Duell 1999 ; Ueland et al. 2000). Cette carence conduit à une accumulation d'homocystéine, celle-ci étant toxique pour notre organisme. La reméthylation de l'homocystéine étant bloquée, cette dernière s'accumule et provoque une hyperhomocystéinémie (Masalha et al. 2002).

Les carences d'apport en vitamine B12 sont assez rares chez l'adulte dans les pays industrialisés, en bonne santé et ayant une alimentation variée, mais plus fréquentes chez les sujets végétaliens. Différentes maladies digestives et une malabsorption de la vitamine B12 peuvent être à l'origine d'une carence. Les gastrectomies totales ou partielles, la pullulation bactérienne de l'intestin grêle (ou syndrome de l'anse borgne), des maladies provoquées par des parasites intestinaux (la bothriocéphalose par exemple), des maladies chroniques intestinales (maladie de Crohn, colite ulcéreuse, maladie coeliaque) (Akbulut et al. 2010 ; Ward et al. 2015 ; Murray 1999), la pancréatite chronique, les lymphomes, la tuberculose intestinale et l'anémie pernicieuse de Biermer en sont des exemples (Guéant et al. 2013). Les déficits congénitaux du métabolisme de la vitamine B12 sont liés à un déficit en transcobalamine II ou en récepteurs de la facteur intrinsèque (maladie d'Imerslund-Gräsbeck) (Tanner et al. 2004). Plusieurs perturbations du métabolisme intracellulaire de la vitamine B12 peuvent avoir lieu également, à différentes étapes, suite à des mutations de gènes jouant un rôle dans le transport ou le métabolisme de la vitamine B12 : CblA, CblB, CblC, CblD,

CblE, CblF, CblG, CblH et méthylmalonyl-CoA mutase. Selon le gène touché, il y aura soit défaut de synthèse d'adénylcobalamine (AdoCbl), coenzyme de la méthylmalonyl-CoA mutase au niveau de la mitochondrie, soit de méthylcobalamine (MeCbl), coenzyme de la méthionine synthase au niveau du cytoplasme, ou alors des deux simultanément (Coelho et al. 2008). Ces troubles entraînent une acidurie méthylmalonique combinée ou non à une homocystéinurie (Coelho et al, 2008 ; Watkins et Rosenblatt 1989 ; Watkins et Rosenblatt, 2011).

Parmi les conséquences cliniques de la carence en vitamine B12, on retrouve des pathologies neurologiques (polynévrites sensitives, ataxie, sclérose combinée de la moelle), hématologiques (macrocytose, anémie mégalo-blastique) et digestives (glossite de Hunter). Il est important de noter que la plupart de ces pathologies peuvent être associées à des carences en folates combinées ou non avec une carence en vitamine B12 .

5.4. Les conséquences métaboliques de la carence en donneurs de méthyle sur les cycles des monocarbones

Une carence en vitamine B12 ne perturbera pas seulement le cycle de la méthionine mais aussi le cycle des folates. La carence en vitamine B12 provoque une diminution de la méthionine et donc de la S-adenosylméthionine (SAM). Sachant que la SAM est un effecteur allostérique de la méthylène-tétrahydrofolate réductase (MTHFR), la diminution de la SAM induira une baisse de l'inactivation de la MTHFR. Le N⁵,10-méthylène tétrahydrofolate (N⁵,10 MTHF) sera alors converti en N⁵- méthyle tétrahydrofolate (N⁵-MeTHF) en abondance. Il y aura donc une accumulation de N⁵-MeTHF et une diminution de N⁵,10-MTHF ce qui inhibe la conversion de dUMP en dTMP et rend ainsi l'ADN plus instable. La carence en vitamine B12 empêche également la réaction de régénération des folates qui se trouvent alors piégés sous la forme de N⁵-MeTHF. En effet, au cours du cycle des folates, le N⁵- MeTHF doit être régénéré en N⁵,10-MTHF actif, par un transfert du groupement méthyle vers la cobalamine lors de la synthèse de méthylcobalamine (MeCbl), catalysée par la méthionine synthase (MS) (Figure 6).

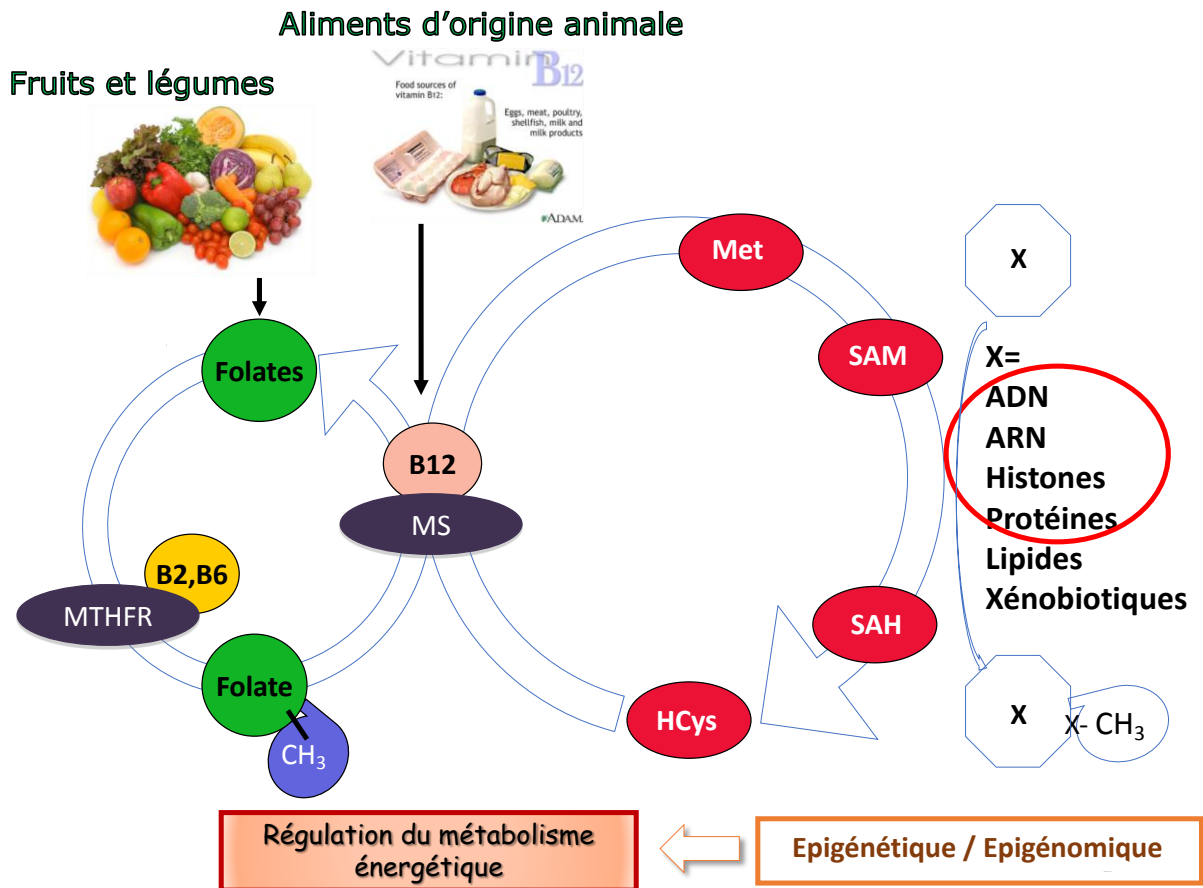


Figure 6 Le cycle des monocarbone, à droite le cycle de la méthionine (ou de l'homocystéine), à gauche le cycle des folates.

Abréviations : Met : méthionine, SAM : S-adenosyl méthionine, SAH : S-adenosyl homocystéine, MS : méthionine synthase, THF : tétrahydrofolate, HCys : homocystéine, ADN : Acide désoxyribonucléique, ARN : acide ribonucléique, MTHFR : Méthylènetétrahydrofolate réductase.

5.5. Les donneurs de méthyles, la programmation foetale et les mécanismes moléculaires épigénétiques

En 1986, Barker a observé que les individus nés avec un faible poids avaient un taux de mortalité cardiovasculaire plus élevé une fois l'âge adulte atteint (théorie de Barker). Cette théorie postule que des facteurs nutritionnels pourraient agir durant les phases précoces de la vie et entraîner le risque de souffrir de maladies cardiovasculaires ou d'un syndrome métabolique à l'âge adulte (Barker et Osmond 1986b, 1986a).

Les donneurs de méthyles jouent un rôle clé dans les interactions entre la nutrition, la programmation foetale et l'épigénome (Guéant et al. 2013, 2014). Différentes

expérimentations et études de populations ont montré qu'une carence en donneurs de méthyles pourrait avoir un impact sur les mécanismes épigénétiques et épigénomiques, notamment la programmation fœtale, ainsi que sur le retard de croissance intra-utérin (Forges et al. 2007 ; Stover 2011).

En effet, les donneurs de méthyles sont indispensables pour le bon développement du fœtus (Antony 2007 ; Kim, Friso, et Choi 2009 ; Smith, Kim, et Refsum 2008). Le statut maternel en vitamines B9 et B12 influence la méthylation de l'ADN et de l'ARN des embryons ainsi que l'expression des gènes soumis à empreinte chez les jeunes rongeurs (Guéant et al. 2013).

Il a été montré dans notre laboratoire que des jeunes rats issus d'une mère carencée en folates et vitamine B12, présentent plusieurs perturbations de leur métabolisme. En effet, cette carence induit chez les jeunes rongeurs des cas de stéatose cardiaque et hépatique, des hypertrophies myocardiques, des hépatocarcinomes, des troubles neurodégénératifs (Garcia et al. 2011 ; Pooya et al. 2012 ; Guéant et al. 2013, 2014 ; Ghemrawi et al. 2013 ; Blaise et al. 2007), des malformations congénitales du tube neural ainsi que des cardiopathies congénitales (Blom et Smulders 2011 ; Guéant et al. 2003 ; Weingärtner et al. 2007). D'après l'analyse bio-informatique des données protéomiques, le peroxisome proliferators-activated receptor gamma coactivator-1 α (PGC1- α), le peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR- α) et le estrogen related receptor α (ERR- α) étaient les facteurs les plus déterminants des changements produits par le régime alimentaire carencé en donneurs de méthyles (Garcia et al, 2011). L'acétylation de PGC-1 α diminue son activité et est régulée par l'histone désacétylase SIRT1 (Silent information regulator 1) (Holness et al, 2010 ; Teyssier et al, 2005 ; Jenjina et al, 2010). Une acétylation accrue et une diminution de la méthylation de PGC-1 α ont été mises en évidence dans le myocarde des animaux carencés (Garcia et al, 2011). Un régime MDD induit un stress du RE *via* une diminution de l'expression et de l'activité de SIRT1 provoquant une hyperacétylation du facteur de transcription HSF1 (Heat Shock Factor Protein 1) et une diminution de l'expression des molécules chaperonnes dans le cœur et le cerveau. La carence en donneurs de méthyles est également associée à une N-homocystéinylation des protéines structurales de l'estomac, une inflammation ainsi qu'à une apoptose des cellules gastriques (Bossenmeyer-Pourié et al. 2013). Cette même programmation fœtale entraîne également des troubles au niveau du cerveau. En effet, une carence maternelle en folates et vitamine B12 affecte les cellules neuronales des rats

(prolifération, migration, différenciation, survie, transport vésiculaire et plasticité synaptique). Ces modifications apparaissent suite à des variations épigénomiques et épigénétiques ainsi qu'une importante augmentation de la N-homocystéinylation des protéines neuronales (Akchiche et al. 2012 ; Blaise et al. 2009 ; Zhang et al. 2009). Elle engendre des difficultés d'apprentissage et une faible coordination locomotrice (Blaise et al. 2007 ; Daval, Blaise, et Guéant 2009 ; Guéant et al. 2013). La carence en folates et en vitamine B12 est également liée à l'apparition de maladies neurodégénératives (Guéant et al. 2013) (Figure 7) .

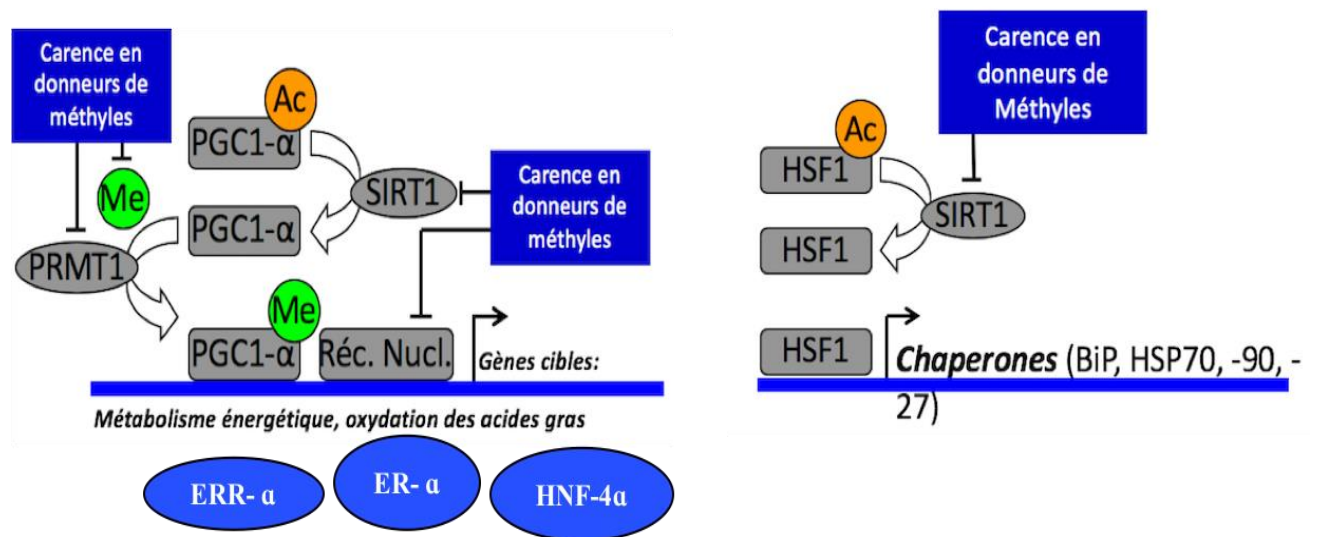


Figure 7 Les mécanismes moléculaires expliquant le lien entre les modifications épigénétiques et le métabolisme énergétique dans le foie.

Abréviations : Ac : Acétyl, ER- α : Estrogen receptor alpha, ERR- α : Estrogen related receptor alpha, HNF-4 α : Hepatocyte nuclear factor 4 alpha, Me : Méthyl, PGC-1 α : Peroxisome proliferator activated receptor gamma co-activator- 1 alpha, PRMT1 : Protein arginine methyl transferase 1, SIRT1 : Silent information regulator 1, HSF1: Heat shock factor 1, HSP : Heat shock protein, BiP : Binding immunoglobulin protein.

Guéant et al ; 2013.

5.6.Implication de la carence en donneurs de méthyle dans les pathogénies de la NASH et des MICI

5.6.1. La NASH

Les animaux soumis à un régime MDD ont un petit poids de naissance et une expression modifiée des principaux régulateurs du métabolisme et des maladies liées à

l'obésité, tels que SIRT1, PGC1- α et Mir-124 (Guéant et al. 2013 ; Akchiche et al. 2012 ; Cantó et Auwerx 2012 ; Kerek et al. 2013). Les donneurs de méthyle jouent un rôle essentiel dans les mécanismes épigénétiques et épigénomiques (méthylation, acétylation) qui influencent l'expression des gènes et la signalisation cellulaire. Dans notre laboratoire, le régime MDD a été utilisé dans différents modèles expérimentaux dans lesquels l'acide folique (vitamine B9) et la cobalamine (vitamine B12) étaient déficients. Les rats nés de mères ayant subi un régime MDD pendant la gestation et la lactation développent une stéatose microvésiculaire, avec augmentation des triglycérides, diminution de l'activité de la méthionine synthase (MS), de la S-adénosylméthionine (SAM) et du rapport SAM/SAH (S-adénosylhomocystéine). Aucune modification de l'apoptose et des marqueurs oxydants de réticulum et de l'activité de la carnityl-palmitoyl transférase 1 n'est observée. Cependant, les modifications prédominantes sont une altération de la bêta-oxydation des acides gras, une diminution de la carnitine libre et totale avec une augmentation du rapport d'acylcarnitine et une diminution du taux d'oxydation de la palmitoyl-CoA déshydrogénase. Ces changements sont liés à une diminution de l'expression protéique de ER- α , ERR- α et HNF-4 α . L'hypométhylation du récepteur activateurs des proliférateurs et des peroxysomes, le co-activateur gamma 1 alpha (PGC-1 α) a diminué sa liaison à ces récepteurs en raison de l'oxydation des acides gras (Pooya et al. 2012). Les mécanismes moléculaires sous-jacents de ces changements sont liés à la diminution de la méthylation de PGC-1 α dans le régime alimentaire des MDD .

Dans un autre modèle expérimental, l'ajout d'un régime riche en graisses (HE) à l'âge adulte aux descendants soumis au régime MDD pendant la vie fœtale et pendant l'allaitement a révélé une fibrose et une inflammation du foie (Bison et al. 2016). Un régime HE engendre une stéatose hépatique et une NAFLD par le biais de mécanismes complexes déclenchés par la résistance à l'insuline, notamment le déséquilibre entre l'absorption et la lipogenèse *de novo* (LDN) d'acides gras non estérifiés, l'élimination par oxydation des acides gras et la sécrétion de lipoprotéines riches en triglycérides (Kawano et Cohen 2013). Des rats âgés de deux jours de mères nourries avec un régime HE présentent une inhibition du cycle cellulaire hépatique en relation avec des modifications de la méthylation de l'ADN et de l'expression génique de l'inhibiteur de la kinase dépendant de la cycline 1A, altération pouvant contribuer à la NAFLD (Dudley et al. 2011). L'alimentation HE produit une hyperacétylation de PGC-1 α et une expression régulée à la baisse des gènes dépendants de PGC-1 α en augmentant l'expression des deux acétylases SRC-3 et GCN5 et en diminuant l'expression et l'activité de

SIRT1 (Cantó et Auwerx 2009 ; Coste et al. 2008). Les régimes HE et la suralimentation altèrent la phosphorylation de PGC-1 α dépendante de l'AMPK.

5.6.2. Les MICI

Un dérèglement au niveau nutritionnel, métabolique ou génétique du métabolisme des monocarbones peut influencer la gravité de la pathogénie des MICI (Peyrin-Biroulet et al. 2007). Des travaux antérieurs réalisés dans notre laboratoire ont montré qu'un régime MDD aggrave les lésions gastriques et l'inflammation intestinale et conduit à des altérations de la barrière intestinale chez le rat (Bossenmeyer-Pourié et al. 2010 ; Blaise et al. 2009 ; Bressenot et al. 2013 ; Chen et al. 2011 ; Peyrin-Biroulet et al. 2012) .

Il a été documenté que le stress du RE joue un rôle important dans la pathogénie des MICI (Bogaert et al. 2011 ; Kaser et al. 2011). Certaines études mettent en évidence l'implication de régime MDD dans la mise en place d'un stress du RE. Dans notre laboratoire, il a été montré que le régime MDD déclenche des voies pro-inflammatoires, notamment le facteur de nécrose (TNF) - α , la phospholipase cytosolique A2 et la cyclooxygénase 2, et produit de stress cellulaire par diminution de l'expression de SIRT1 (Chen et al. 2011 ; Melhem et al. 2016). D'autres études ont montré l'implication de SIRT1 dans l'homéostasie intestinale (Cui et al. 2010 ; U. P. Singh et al. 2010) .

Par conséquent, une dysrégulation dans l'un des composants régulateurs (nutritionnels, métaboliques ou génétiques) du métabolisme des monocarbones (1CM) ou des effets environnementaux peuvent modifier l'axe de l'épigénome du 1CM et peut influencer la pathogénèse de la NASH et des MICI.

Objectif global de l'étude

La NASH est plus fréquente chez les patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin (MICI) que dans la population générale. Il est généralement admis que l'augmentation de la perméabilité intestinale et de la translocation des endotoxines bactériennes (LPS) sont des mécanismes majeurs de ces manifestations systémiques.

Le premier objectif de ma thèse est d'étudier si l'inflammation intestinale favorise l'inflammation hépatique et la fibrogenèse par le biais de mécanismes pathogènes systémiques. Pour ce faire, nous avons étudié des rats adultes soumis à un régime MDD et exposés au DSS. Notre laboratoire a montré qu'un régime MDD a un effet proinflammatoire sur la muqueuse digestive et fragilise la barrière intestinale chez le rat. Le régime MDD produit une colite expérimentale sévère chez les animaux exposés au DSS. D'autres travaux du laboratoire montrent que le régime MDD pendant la gestation et la lactation produit une NASH chez les animaux soumis à un régime riche en graisses et en énergie (régime hyper énergétique ; HE) pendant l'âge adulte. Notre modèle expérimental est donc adapté pour disséquer les mécanismes pathogènes systémiques qui favorisent l'inflammation hépatique et la fibrogenèse chez des animaux ayant une colite inflammatoire sévère liée à la carence en donneurs de méthyle. Cette situation expérimentale correspond à un substratum clinique, dans la mesure où les formes sévères de maladie de Crohn étendues produisent des malabsorptions en vitamine B12 et folates. Nous avons focalisé notre intérêt sur l'inflammation du foie déclenchée par les cytokines/chemokines et par l'activation de TLR4 liée à la translocation du LPS.

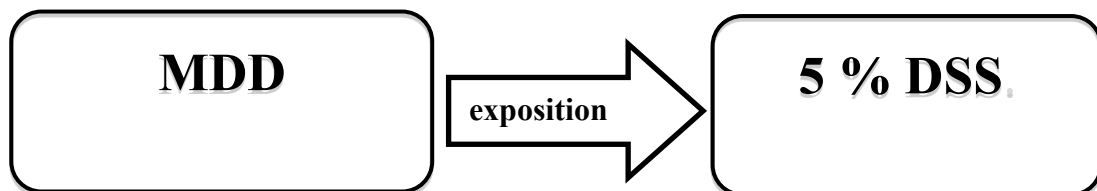
Nous avons précédemment montré que la programmation fœtale par le régime MDD augmente le risque de NASH chez des rats exposés à un régime HE à l'âge adulte. Notre deuxième hypothèse est donc que la programmation fœtale par le régime MDD, le régime HE, les LPS du microbiote et l'immunité innée peuvent faire partie d'un même scénario conduisant à la NASH. Nous avons donc étudié l'effet du LPS injecté directement au niveau péritonéal chez des animaux soumis à un régime enrichi en énergie et lipides (HE) et nés de mères soumises ou non à un régime MDD.

Plus spécifiquement, les deux approches expérimentales nous permettent de répondre aux questions suivantes :

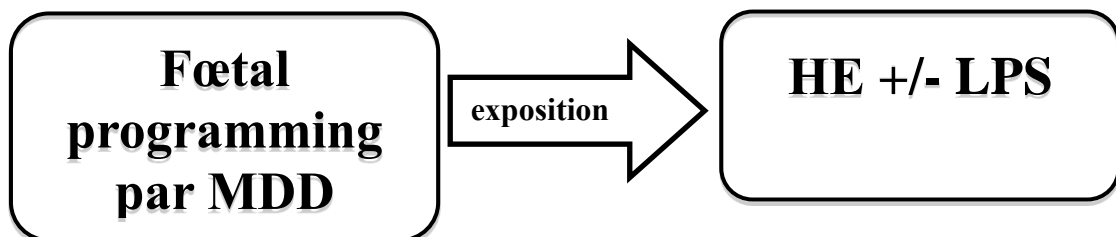
- 1) Une inflammation périphérique est-elle contributrice à la NASH ?
Quels sont les rôles spécifiques et/ou combinés de l'activation de TLR4 par le LPS, ou des médiateurs cytokines /chimiokines?
- 2) Quel est l'effet modulateur d'un régime riche en graisse (HE)? Le régime HE aggrave-il les effets du LPS ?
- 3) Quel est l'effet modulateur de la carence en donneurs de méthyles MDD ?
- 4) Quel est l'effet modulateur de la programmation fœtale par la carence en donneurs de méthyles?

Pour répondre à ces questions nous avons utilisé deux approches expérimentales:

PROTOCOLE 1 : MDD - DSS.



PROTOCOLE 2 : MDD – HE +/- LPS.



Partie 1

Influence de la colite inflammatoire induite par le DSS dans le développement de la NASH chez des rats adultes carencés en donneurs de méthyles.

(Article en soumission)

La colite induite par le dextran sulfate de sodium chez des rats soumis à un régime alimentaire carencé en donneurs de méthyles déclenche une stéato-hépatite non alcoolique par augmentation de la protéine chimioattractante des monocytes 1 et de l'interleukine-1beta.

1. Introduction

Un certain nombre de modèles animaux ont été développés pour l'étude de la NASH. Différents régimes ont été utilisés pour établir des modèles expérimentaux NASH chez les rongeurs, notamment les régimes déficients en méthionine/choline (MCD), déficients en donneur de méthyle (MDD), déficients en choline (CD) et des régimes riche en graisse (HF) (Lau, Zhang, et Yu 2017b). Nous avons montré que les rats MDD développaient la NAFLD par altération de la bêta-oxydation des acides gras (Pooya et al. 2012a). De plus, l'addition d'un régime riche en graisses à l'âge adulte a révélé une fibrose et une inflammation du foie chez les rats soumis au régime MDD pendant la vie fœtale et pendant l'allaitement (Bison et al. 2016a). Le régime MDD à l'âge adulte aggrave la gravité des MICI chez les rats exposés au sulfate de dextran de sodium (DSS). Le régime MDD déclenche des voies pro-inflammatoires, notamment le facteur de nécrose (TNF)- α , la phospholipase A2 cytosolique et la cyclooxygénase 2, ainsi que le stress réticulum endoplasmique (RE) provoqué par une diminution de l'expression de SIRT1 (Chen et al. 2011; Melhem et al. 2016).

L'augmentation de la perméabilité intestinale du "syndrome de l'intestin qui fuit" est l'un des mécanismes de la maladie inflammatoire de l'intestin qui produit des manifestations systémiques, y compris des maladies du foie. Une barrière intestinale altérée entraîne un afflux excessif d'endotoxines d'origine intestinale dans le foie (Matsushita et al. 2016). L'induction d'une inflammation intestinale favorise la translocation des LPS, l'inflammation hépatique et la fibrogenèse, soulignant le rôle physiopathologique de l'axe intestin-foie (Achiwa et al. 2016; Gäbele et al. 2011). Les lipopolysaccharides (LPS) sont des ligands du récepteur de toll-like 4 (TLR4) qui influent sur l'immunité innée par l'activation de la voie de signalisation TLR4/NF κ B et la libération ultérieure de cytokines pro-inflammatoires (Miura 2014). Un rôle direct de la voie LPS/TLR4 a été établi dans la NASH (Bressenot et al. 2013; Bossenmeyer-Pourié et al. 2010b, 2013), l'obésité et la résistance à l'insuline chez les rongeurs (Delzenne 2009).

Le régime MDD affaiblit la barrière intestinale chez les rats exposés au DSS (Bressenot et al. 2013). Par conséquent, on peut supposer que le MDD favorise la translocation des toxines microbiennes dans la circulation systémique. Dans cette étude, nous avons examiné si la colite induite par le DSS chez le rat soumis à un régime MDD augmentait le risque de NASH et nous avons disséqué les mécanismes sous-jacents.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Traitements des animaux

Les manipulations *in vivo* ont été effectuées sur des rats Wistar mâles adultes âgés de deux mois (Laboratoires JanvierLabs, Le Genest-St-Isle, France). Les animaux ont été maintenus à une température ambiante de 22 à 23 °C, un cycle lumière/obscurité de 12 h, avec un libre accès à la nourriture et à l'eau. L'accord éthique relatif à l'expérimentation animale a été obtenu auprès du Ministère français de l'Enseignement supérieur et de la Recherche (enregistrement auprès de l'APAFIS n ° 1521-2015082611014308). Les rats ont été divisés en deux groupes distincts: un groupe témoin recevant un régime alimentaire normal (régime d'entretien A04, Scientific Animal Food and Engineering, France) et un groupe recevant un régime carencé en donneurs de méthyle, vitamine B12, folate et choline (Special Diet Service, Argenteuil, France) selon Blaise et al (S. Blaise et al. 2005). La choline a été éliminée du régime car elle pourrait constituer un autre donneur du groupe méthyle par le biais de son métabolite, la bêtaïne. La concentration des autres composés était similaire dans les deux régimes. Ces régimes ont été maintenus pendant 6 mois.

2.2. Induction de colite, indice d'activité de la maladie (DAI) et endoscopie

La colite a été provoquée par l'administration de DSS à 5 % (poids moléculaire 36 000–50 000 Da, MP Biomedical, Strasbourg, France) dissous dans de l'eau pendant 7 jours. Six mois après le début de la déficience, les rats mâles ont été séparés en quatre groupes: (1) rats nourris avec un régime alimentaire standard, non traités avec du DSS et utilisés comme témoins (noté C, n = 6) ; (2) rats nourris avec un régime alimentaire déficient et non traités avec DSS (noté MDD, n = 6) ; (3) rats nourris avec un régime alimentaire standard, traités avec DSS et utilisés comme témoins (notés C/DSS, n = 6) et (4) rats nourris avec un régime alimentaire déficient traités avec DSS (notés MDD/DSS, n = 6). Le poids quotidien, l'état physique, la consistance des selles, la consommation d'eau/de nourriture et la présence de sang grossier et occulte dans les excréments et à l'anus ont été déterminés. Le score d'indice d'activité de la maladie (DAI) a également été calculé à l'aide des paramètres suivants: perte de poids, consistance des selles et présence ou non du sang dans les selles (Murthy et al. 1993). Le score varie de 0 à 4 (score total), ce qui représente la somme des scores de perte de poids, de consistance des selles et de saignements rectaux divisée par trois. Avant la

procédure endoscopique, les souris ont été anesthésiées par inhalation d'isoflurane (Forene®, Abbvie, France). Les 3 cm distaux du côlon et du rectum ont été examinés à l'aide d'un miniendoscope Storz Hopkins II rigide (longueur 30 cm, diamètre 2 mm ; Storz, Tuttlingen, Allemagne) couplé à un système de base Coloview (avec une source de lumière au xénon 175 et un endovision SLB Telecam ; Storz). L'air était insufflé *via* une pompe à air de calibre 9 français et une pompe basse pression personnalisée à régulation manuelle du débit (Rena Air 200 ; Rena, Meythet, France). Toutes les images ont été affichées sur un écran d'ordinateur et enregistrées avec un logiciel de capture vidéo (Studio Movie Board Plus de Pinnacle, Menlo Park, Californie, États-Unis). Le score endoscopique a été calculé par un gastro-entérologue en aveugle comme décrit précédemment (Becker et al. 2005).

2.3. Prises de sang et prélèvement de tissus du côlon et de tissus hépatiques

Les rats ont été sacrifiés par décapitation six jours après le début du traitement par DSS. Le sang a été recueilli au moment du sacrifice dans un tube contenant de l'héparine. Le plasma a été recueilli et stocké à -80 ° C et le côlon et le foie ont été rapidement retirés et lavés doucement dans du PBS1X (2,7 mmol/L de KCl, 140 mmol/L de NaCl, 6,8 mmol/L de Na₂HPO₄ • 2H₂O, 1,5 mmol/L de KH₂PO₄ , pH 7,4), congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80 ° C jusqu'à l'analyse des protéines et de l'ARN. Les échantillons de tissus pour les études histologiques ont été récupérés par dissection et conservés dans des blocs FFPE (Fixin-Euffarine-Fixed-Enoline) fixés au formol.

2.4. Analyses biochimiques

Les concentrations plasmatiques de vitamine B12 et de folate ont été déterminées par dosage isotopique par radio-dilution (simulTRAC-SNB, MP Biomedicals, Eschwege, Allemagne). Les concentrations d'homocystéine, d'acide méthylmalonique, d'acide succinique, de SAM et de SAH ont été mesurées dans le plasma par chromatographie en phase liquide à haute performance (Waters, Saint-Quentin, France) couplées à la spectrométrie de masse (Api 4000 Qtrap Applied Biosystems, Courtaboeuf, France), comme décrit précédemment (Battaglia-Hsu et al. 2009; Kleiner et al. 2005). Les lipides, la glycémie, l'ASAT, l'ALAT et d'autres paramètres biochimiques de routine ont été déterminés dans le plasma comme décrit précédemment (Pooya et al. 2012a). Les concentrations plasmatiques de cytokines et de chimiokines ont été mesurées à l'aide d'un panneau à billes magnétiques de cytokines/chimiokines de rats Milliplex MAP (RECYTMAG-65k Merck Millipore).

2.5. Analyses histologiques et immunohistochimiques (IHC) dans le foie

Des coupes de foie ont été traitées de manière systématique et une coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (H & E), au Trichrome du Masson et au Rouge Sirius a été réalisée pour évaluer l'inflammation et la stéatose. Pour l'analyse histologique, un système de notation a été utilisé pour quantifier la stéatose (<5 % = 0 ; 5–33 % = 1 ; > 33–66 % = 2 ; > 66 % = 3), une fibrose (aucune = 0 ; périsinusoïdale ou périportale = 1, périsinusoïdale et portale/périportale = 2 ; fibrose de pontage = 3 ; cirrhose = 4) et inflammation (pas de foyer = 0 ; <2 foyers/champ = 1 ; 2–4 foyers/champ = 2 ; > 4 foyers/champ = 3) dans 10 champs par section selon Kleiner et al., par deux investigateurs en aveugle. Avec la coloration Rouge Sirius, les vésicules stéatosiques étaient colorées en vert et la ségmentation était faite avec le logiciel KS400 (Zeiss). La stéatose était quantifiée selon les paramètres suivants (% surface stéatose/surface champs microscopique, % macrostéatose/toute stéatose et la taille de macrovésicules). L'analyse immunohistochimique (IHC) pour tester la translocation nucléaire du facteur nucléaire kappa B (NFκB) a été réalisée comme décrit (Chen et al. 2011). Une analyse IHC a également été réalisée pour rechercher la chimiokine, la protéine chimioattractante des monocytes -1 (MCP-1), dans le foie et dans l'intestin.

2.6. Dosage du LPS

La concentration plasmatique en LPS a été déterminée par quantification directe de 3β-hydroxymyristate, un composant majeur du fragment Lipid A, comme décrit précédemment (Pais de Barros et al. 2015). En bref, un étalon interne (3β-hydroxytridécanoate) a été ajouté aux échantillons avant l'hydrolyse avec HCl pendant 4 h à 90 ° C. Les acides gras libres résultants ont été extraits avec une solution d'hexane/acétate d'éthyle et redissous dans de l'éthanol absolu après évaporation sous vide. Les acides gras ont été séparés par HPLC en utilisant une colonne Poroshell 120 SB-C18 et un système LC 1260 Infinity (Agilent Technologies), et quantifiés avec un spectromètre de masse 6490 Triple Quadrupole (Agilent Technologies).

2.7.Extraction de protéines et Western Blotting

L'extraction des protéines totales du foie a été effectuée par la lyse de tissu homogénéisé dans un tampon RIPA (phosphate de sodium anhydre dibasique, phosphate de potassium dihydrogène, NaCl 150 mM, 1 % de IGEPAL® CA-630, 0,5 % de désoxycholate de sodium, 0,1 % de sodium dodécyl sulfate et Cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) après deux lavages avec du PBS froid 1X, puis quantifiées à l'aide de la méthode de dosage de l'acide bicinchoninique (BCA) (Thermo-Fisher Scientific, Illkirch, France). Un total de 30 µg de protéines a été mélangé avec un volume égal de 2x tampon de Laemmli, dénaturé par chauffage pendant 5 min à 100 ° C, puis séparées par SDS-PAGE à 6-15%. Afin de maintenir la structure et l'intégrité des protéines phosphorylées, un tampon GERDY (Tris-HCl 50 mM PH 6,8, EDTA 20 mM, SDS à 5%) a été utilisé. Après séparation électrophorétique, les protéines ont été transférées sur une membrane (polyfluorure de vinylidène (PVDF) ou nitrocellulose) comme décrit précédemment (26). Après avoir été bloquées dans du lait en poudre écrémé à 5 % ou de la sérum albumine bovine (BSA) en Tris-solution saline tamponnée (Tris 20 mM et NaCl 150 mM, pH 7,4) et 0,1 % de Tween 20 pendant 1 heure, les membranes ont été incubées avec divers anticorps primaires à 4 ° C pendant une nuit: anti-NFκB (1: 1000 ; Cell Signaling), anti-pNFκB (1: 1000 ; Cell Signaling), anti-IκB α (1: 1000 ; Cell Signaling), anti-pIκB (1: 1000 ; Cell Signaling), anti-IKK α (1: 1000 ; Cell Signaling), anti-IKK β (1: 1000 ; Cell Signaling), anti-pIKK α/β (1: 500 ; Cell Signaling), anti-IL-1β (1: 500 ; Abcam), anti -IL-1R1 (1: 500 ; bioss), anti-caspase 1 (1: 1000 ; Abcam), anti-MMP2 (1: 1000 ; Abcam), anti-α SMA (1: 500 ; Abcam), anti-Col1A1 (1: 500 ; Santa Cruz), anti-MCP-1 (1: 1000 ; Abcam), anti-TNF-α (1: 500 ; Abcam), anti-TNFR1 (1: 1000 ; Abcam), anti-IL-6 (1: 1000 ; Acam), anti-IL6Ra (1: 200 ; bs), anti-IL-17 (1: 700 ; Abcam), anti-IL-10 (1: 1000 ; Abcam), anti-TLR4 (1: 500 ; Abcam), anti-CD14 (1: 1000 ; Abcam), anti-MD2 (1: 2000 ; Cell Signaling), anti-Myd88 (1: 1000 ; Cell Signaling), anti-IRAK 1 (1: 500 ; Abcam), anti-IRAK 4 (1: 500 ; Abcam), anti-TRAF6 (1: 700 ; Cell Signaling), anti-TRIF (1: 1000 ; Abcam), anti-IRF 3 (1: 1000 ; Cell Signaling). Des IgG anti-lapin d'âne marquées par HRP (1: 10000 ; Santa Cruz Biotechnology) ou des IgG anti-souris d'âne marquées par HRP (1: 10000 ; Santa Cruz Biotechnology) ont été utilisées en tant qu'anticorps secondaires. L'immunoréactivité a été détectée à l'aide d'un kit de chimioluminescence (Amersham™ ECL Select™ de GE Healthcare) et d'un détecteur de chimioluminescence (Fusion FX7, Thermo Fisher Scientific). Pour normaliser la quantité totale de protéines par voie, les membranes ont été décapées et incubées avec un anticorps

monoclonal de lapin dirigé contre l'alpha tubuline (1/7000). L'analyse par densitométrie de l'intensité des bandes a été réalisée à l'aide du logiciel Image J 5.1 (Freeware ; nih.gov).

2.8. Analyses statistiques

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel Statview V.5 pour Windows (SAS Institute, Berkley, Californie, États-Unis). Les analyses de densitométrie ont été rapportées sous forme de moyenne \pm SEM. Les données brutes ont été comparées à l'aide de l'analyse de variance unidirectionnelle (ANOVA) et du test de Fisher. Le test Z a été utilisé pour étudier la corrélation entre les variables. Le niveau de signification a été fixé à une valeur $p < 0,05$. Les résultats sont indiqués par des astérisques en chiffres (* valeur $p < 0,05$; ** valeur $p < 0,01$ et *** valeur $p < 0,001$).

3. Résultats

3.1. Efficacité du régime déficient en donneurs de méthyles (MDD)

Le régime MDD a diminué les concentrations plasmatiques de vitamine B12 (357 ± 52 vs. 66 ± 40 pmol/l, $P < 0,001$) et folate (67 ± 13 vs. 15 ± 10 nmol/l, $P < 0,001$). Ce déficit en B12/folate a été reflété par une augmentation de la concentration plasmatique d'homocystéine chez les rats MDD comparés aux témoins ($7 \pm 1,8$ vs. $34 \pm 8,2$ μ mol/l, $P < 0,005$). Le traitement des rats avec le DSS n'a pas influencé les concentrations plasmatiques de folate, de vitamine B12 et d'homocystéine (Tableau 1).

Paramètres	C	C/DSS	MDD	MDD/DSS	p value C/DSS vs.MDD/DSS
Vitamine B12 (pmol/l)	357±52	334±24	66±40	53±2	0,0013 **
Folate (nmol/l)	67±13	95 ±20	15±10	13,5±5	<0,0001***
Homocystéine (µmol/l)	7±1,8	6,5±1,4	34±8,2	31±1,3	0,0001***
SAM (nmol/l)	228±48	182±51	187±74	210±28	0,54
SAH (nmol/l)	56±22	34±14	99±59	147±36	0,006**
SAM/SAH ratio	4,41±1,5	5,6±0,95	2,4±1,5	1,45±0,15	0,0032**

Tableau 1 : Paramètres biochimiques de rats âgés de 8 mois séparés en 4 groupes différents. Le régime MDD a diminué les concentrations plasmatiques de vitamine B12 (357 ± 52 vs. 66 ± 40 pmol/l, P< 0,001) et folate (67 ± 13 vs. 15 ± 10 nmol/l, P< 0,001) avec une augmentation de la concentration plasmatique d'homocystéine (7 ± 1,8 vs. 34 ± 8,2 µmol/l, P < 0,005) comparés aux témoins (C).

Abréviations : régime contrôle (C), régime contrôle et traitement DSS (C/DSS), régime carencé en donneurs de méthyles (MDD) et régime carencé en donneurs de méthyles et traitement DSS (MDD/DSS), SAM :S-adénosyl méthionine, SAH : S-adénosyl homocystéine.

†Moyenne ± écart type. Différence statistiquement significatives *p <0.05, **p<0.01 (n=6).

3.2.La concentration plasmatique de la protéine chimiotactique monocyttaire 1 (MCP-1, également appelée CCL2, ligand chimiokine c-c de type 2) et du VEGF augmente considérablement chez les rats traités avec le MDD/DSS

La concentration du LPS plasmatique a diminué dans C/DSS, MDD et n'a pas été différente dans le groupe MDD/DSS, par rapport aux animaux témoins C (Figure 8A).

Le traitement par DSS a entraîné une augmentation du taux plasmatique d'IL-1 β chez les rats soumis à des régimes contrôle et à des régimes MDD. Nous avons observé une augmentation marquée des taux plasmatiques de MCP-1 et de VEGF chez les rats traités au MDD/DSS, par rapport aux 3 autres groupes (Figure 8B). Inversement, les taux plasmatiques d'IL-10 et IL 4 étaient diminués chez les rats traités avec le MDD et traité avec le MDD/DSS (Figure 8B). Nous avons observé une corrélation significative entre MCP-1 et IL-1 β ($r = 0,611$; IC (0,165 - 0,849) ; valeur p 0,0105), MCP-1 et VEGF ($r = 0,525$; IC (0,039 - 0,810) ; valeur p 0,0355).

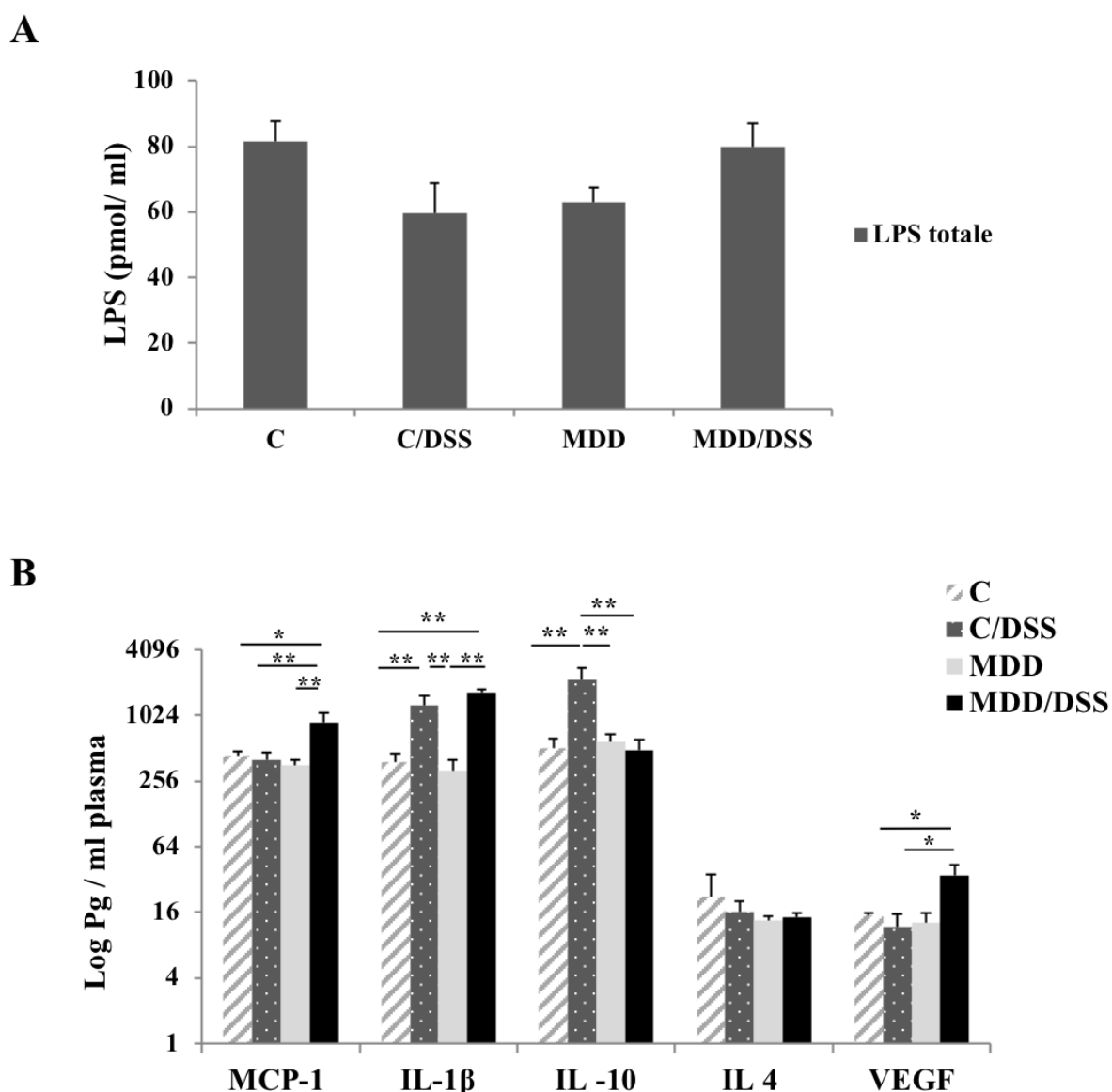
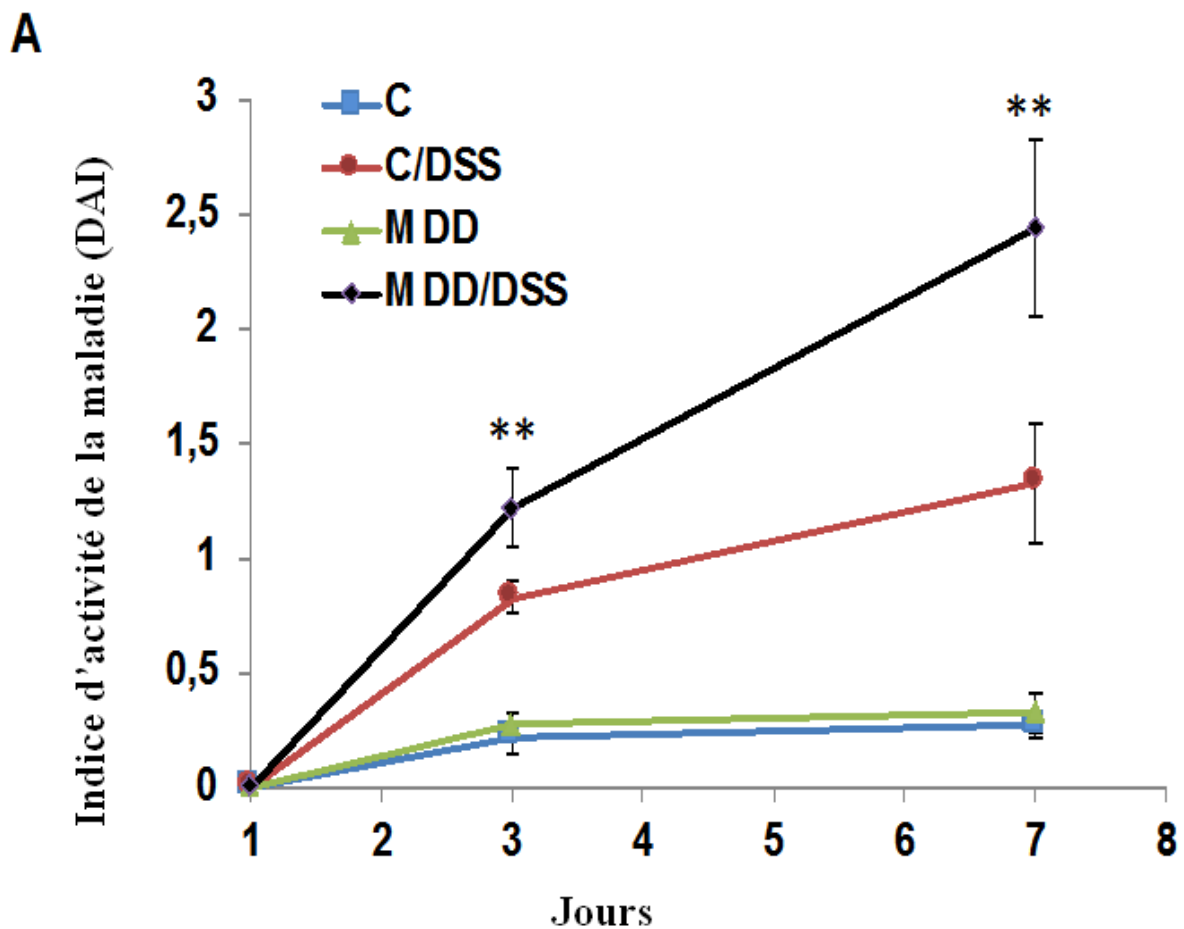


Figure 8 : Taux plasmatiques d'endotoxines lipopolysaccharidiques (LPS), de cytokines et de chimiokines chez des rats âgés de 8 mois séparés en 4 groupes différents, régime contrôle (C), régime contrôle et traitement DSS (C/DSS), régime carencé en donneurs de méthyles (MDD) et régime carencé en donneurs

de méthyles et traitement DSS (MDD/DSS) . **(A)** Ni l'administration de DSS, ni le régime pauvre en méthyle (MDD) n'ont produit de modifications du niveau de LPS plasmatique. **(B)** La chimiokine (MCP-1) a montré une augmentation spectaculaire chez les rats traités au MDD/DSS par rapport aux autres groupes. Parmi les cytokines, IL-1 β présentait une augmentation significative chez les rats traités avec du DSS et chez les rats nourris avec un régime MDD et traités avec du DSS. Les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM (n = 6 dans chaque groupe), * p <0,05, ** p <0,01.

3.3.La colite déclenche une inflammation du foie

L'administration de DSS dans l'eau de boisson a provoqué une colite plus grave chez les rats soumis au régime MDD que chez les témoins, comme décrit précédemment (Chen et al. 2011; Melhem et al. 2016; Melgar, Karlsson, et Michaëlsson 2005; Rivera et al. 2007). Le score DAI et le score endoscopique étaient plus élevés dans le groupe MDD/DSS que dans le groupe C/DSS (* p <0,05) (Figure 9A et B).



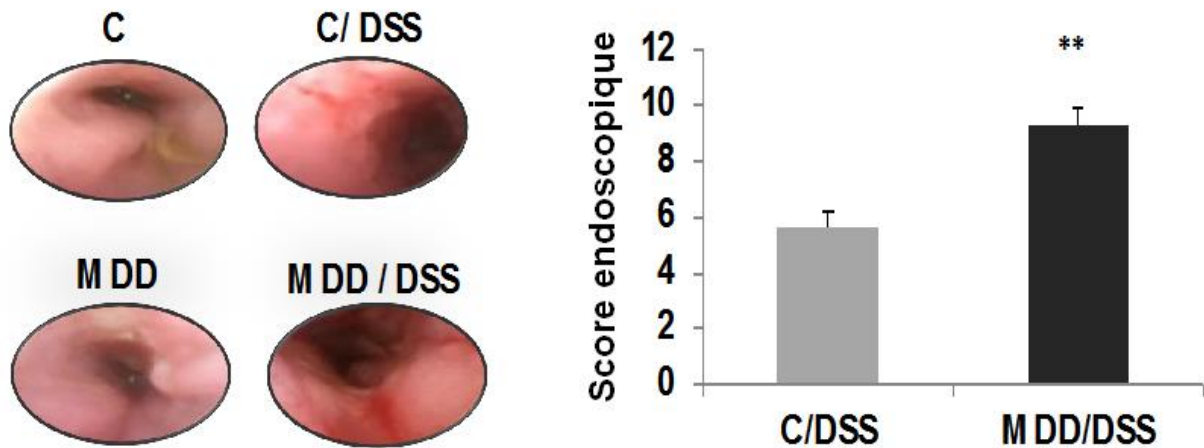
B

Figure 9 : La carence en donneurs de méthyles aggrave la colite induite par le dextrane sulfate de sodium (DSS). (A) Indice d'activité de la maladie (DAI): animaux déficients traités avec DSS (MDD/DSS) par rapport aux animaux témoins traités avec DSS (C/DSS) ** $P < 0,01$. (B) L'examen endoscopique du côlon des groupes C, C/DSS, MDD, MDD/DSS montre une colite plus grave chez les rats nourris avec un régime MDD et traités avec du DSS (MDD/DSS) que dans le groupe C/DSS, ** $p < 0,01$. Les données sont rapportées sous forme de moyenne \pm SEM ($n = 6$ dans chaque groupe), ** $p < 0,01$. Abréviations : régime contrôle (C), régime contrôle et traitement DSS (C/DSS), régime carencé en donneurs de méthyles (MDD) et régime carencé en donneurs de méthyles et traitement DSS (MDD/DSS).

L'examen histologique du foie chez des rats déficients traités par DSS a révélé une inflammation et une stéatose microvésiculaire (Figure 10). En revanche, nous n'avons pas observé de fibrose dans la coloration au trichrome du tissu hépatique chez ces rats.

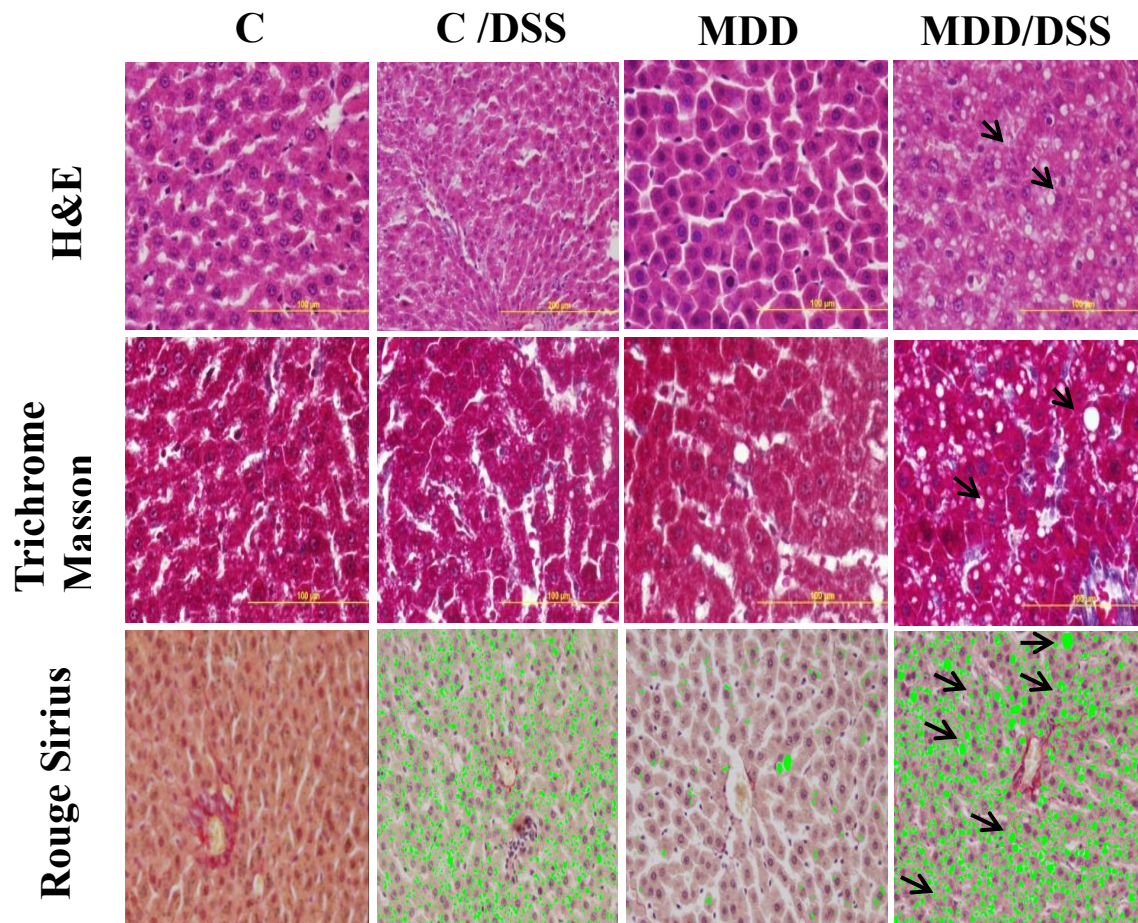


Figure 10 : La carence en donneurs de méthyles (MDD) induit une inflammation et une stéatose microvésiculaire dans une colite induite par le dextran sulfate de sodium (DSS). Analyse histologique de coupes de foies avec la coloration Hématoxyline et Eosine (H & E), le Trichrome de Masson et le Rouge Sirius. La coloration au Rouge Sirius montre les vésicules stéatosiques segmentées colorées en vert (image x 200 centrées par une veine centrolubulaire) surtout chez des rats déficients en donneurs de méthyles et traités avec du DSS (MDD/DSS). La coloration au trichrome ne présentait aucune fibrose chez ces rats. Abréviations : régime contrôle (C), régime contrôle et traitement DSS (C/DSS), régime carencé en donneurs de méthyles (MDD) et régime carencé en donneurs de méthyles et traitement DSS (MDD/DSS).

3.4. La colite de rats déficients exposés au DSS active la voie NFκB dans le foie

Nous avons observé une translocation nucléaire accrue de NFκB p65 uniquement dans les tissus hépatiques de rats déficients exposés au DSS (Figure 11A). Cela concordait avec une expression et/ou une phosphorylation plus élevées des protéines impliquées dans la voie d'activation de NFκB, dans l'analyse par Western blot (Figure 11B). L'expression protéique de NFκB p65 et sa forme phosphorylée ont été nettement augmentées dans le groupe MDD/DSS. De manière constante, nous avons observé une expression accrue de pIKKα/β, une expression diminuée d' IκB α et une phosphorylation accrue de pIκB α.

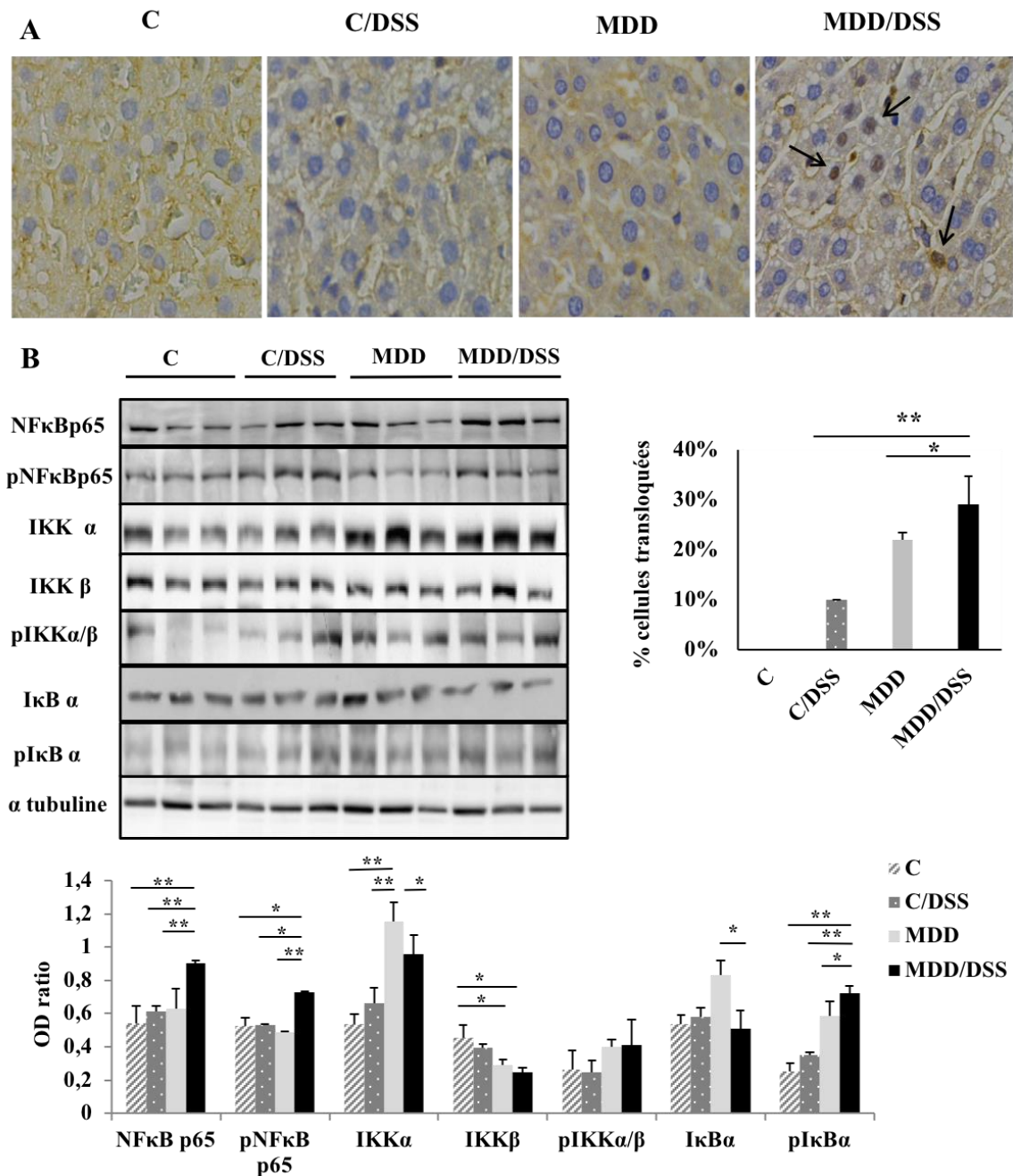
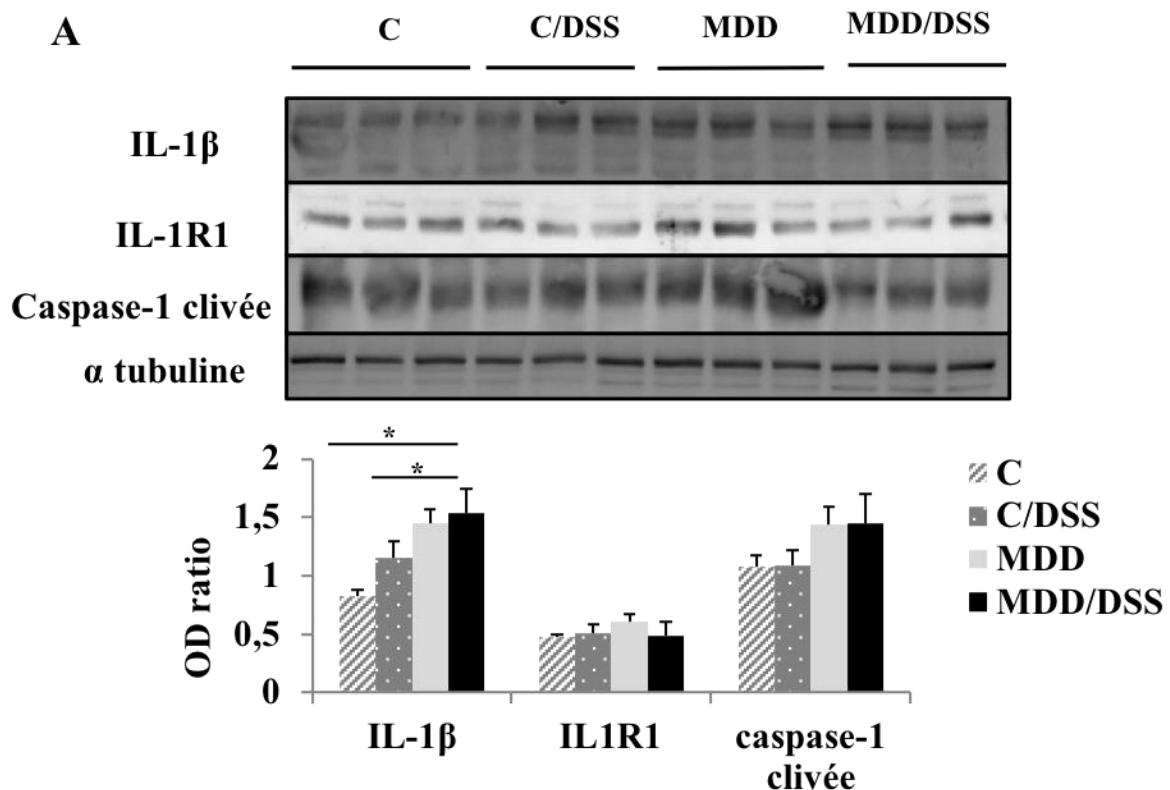


Figure 11 : La colite induite chez des rats déficients exposés au dextrane sulfate de sodium (DSS) active la voie NFκB dans le foie. (A) L'analyse immunohistochimique a montré une translocation significative de NFκB p65 dans le noyau de rats déficients traités avec DSS (MDD/DSS) par rapport aux autres groupes: régime contrôle (C) sans translocation, régime contrôle et traitement DSS (C/DSS) 10 % des cellules transférées, régime carencé en donneurs de méthyles (MDD) 22 % des cellules transférées et régime carencé en donneurs de méthyles et traitement DSS (MDD/DSS) 29 % des cellules transférées. **(B)** La protéine NFκB et ses différents modulateurs sont activés

comme indiqué par Western blot dans le foie de rats traités par MDD/DSS en comparaison aux autres groupes. Les bandes de protéines ont été quantifiées par densitométrie, normalisées avec la tubuline α . Les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM (n = 3 dans chaque groupe), * p <0,05, ** p <0,01. OD: densité optique.

3.5. Augmentation des médiateurs pro-inflammatoires dans le foie et le côlon de rats déficients traités avec le DSS

Nous avons observé une augmentation de l'expression de IL-1 β , de caspase-1 clivée (Figure 12A) et de MCP-1 (Figure 13A), mais aucune augmentation de TNF α , IL17 et IL6 dans le foie du groupe MDD/DSS, par rapport aux 3 autres groupes (Figure 12A). Nous n'avons pas observé d'augmentation des marqueurs de la fibrose hépatique, à l'exception de MMP2, dans le groupe MDD/DSS (Figure 12B).



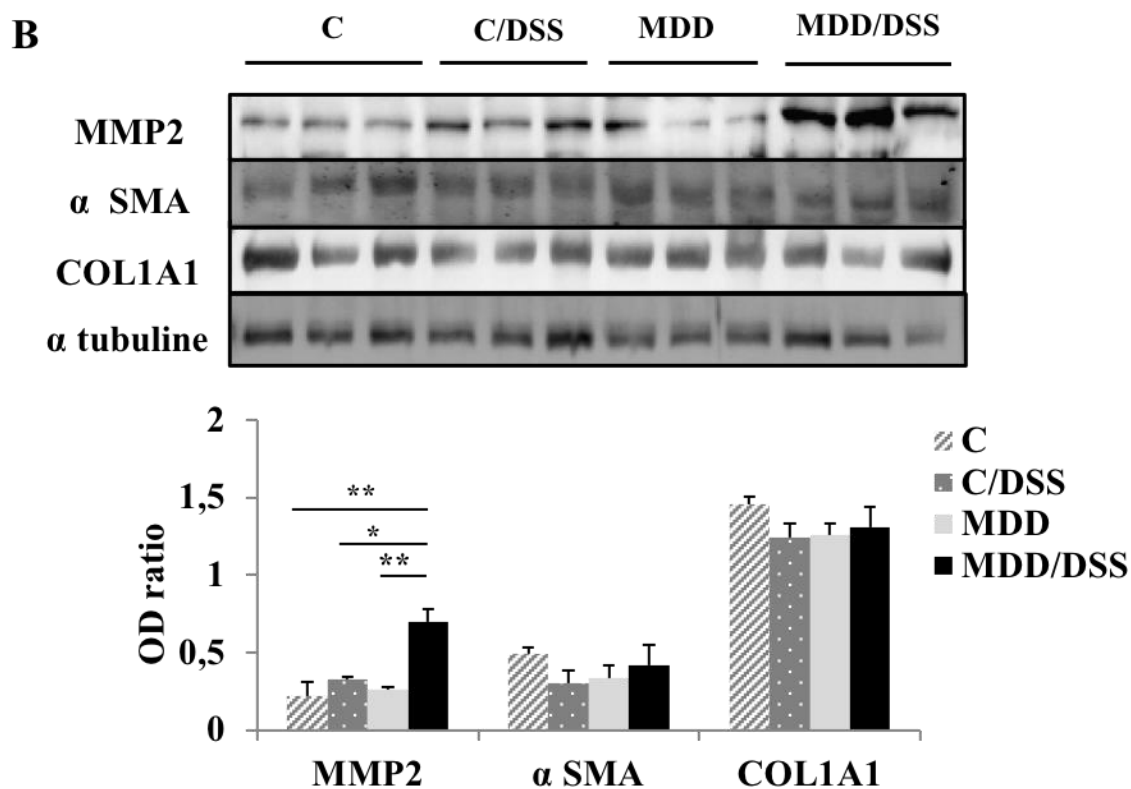


Figure 12 : Augmentation de l'expression des médiateurs pro-inflammatoires et du marqueur MMP2 fibrotique dans le foie de rats déficients en donneurs de méthyles traités avec DSS (MDD/DSS). (A) On observe une augmentation progressive de l'expression de IL-1 β entre les groupes contrôle (C), traités avec DSS (C/DSS), déficients en donneurs de méthyles (MDD) et déficients en donneurs de méthyles traités avec DSS (MDD/DSS), respectivement. La caspase-1 clivée a montré une expression accrue dans les groupes déficients (MDD et MDD/DSS) par rapport aux groupes témoins (C et C/DSS). (B) Une expression protéique plus élevée du marqueur fibrotique MMP2 a été rapportée chez les rats traités au MDD/DSS, alors que d'autres marqueurs fibrotiques (α SMA et COL1A1) n'ont montré aucun changement d'expression entre les différents groupes. Les bandes de protéines ont été quantifiées par densitométrie, normalisées avec de la tubuline α . Les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM (n = 3 dans chaque groupe), * p < 0,05, ** p < 0,01. OD: optique.

La protéine MCP-1 est augmentée dans le côlon des rats C/DSS et MDD/DSS tandis que IL-1 β est augmentée dans les groupes C/DSS, MDD et MDD/DSS, par rapport au groupe

témoin (C) (Figure 13B). En revanche, le médiateur anti-inflammatoire IL-10 a montré une diminution dans les 3 groupes, comparés aux témoins (Figure 6B). L'expression accrue de MCP-1 a été confirmée par un examen histologique des tissus du foie et de l'intestin. Cette surexpression est plus prononcée au niveau du foie des rats traités par MDD/DSS (Figure 13C).

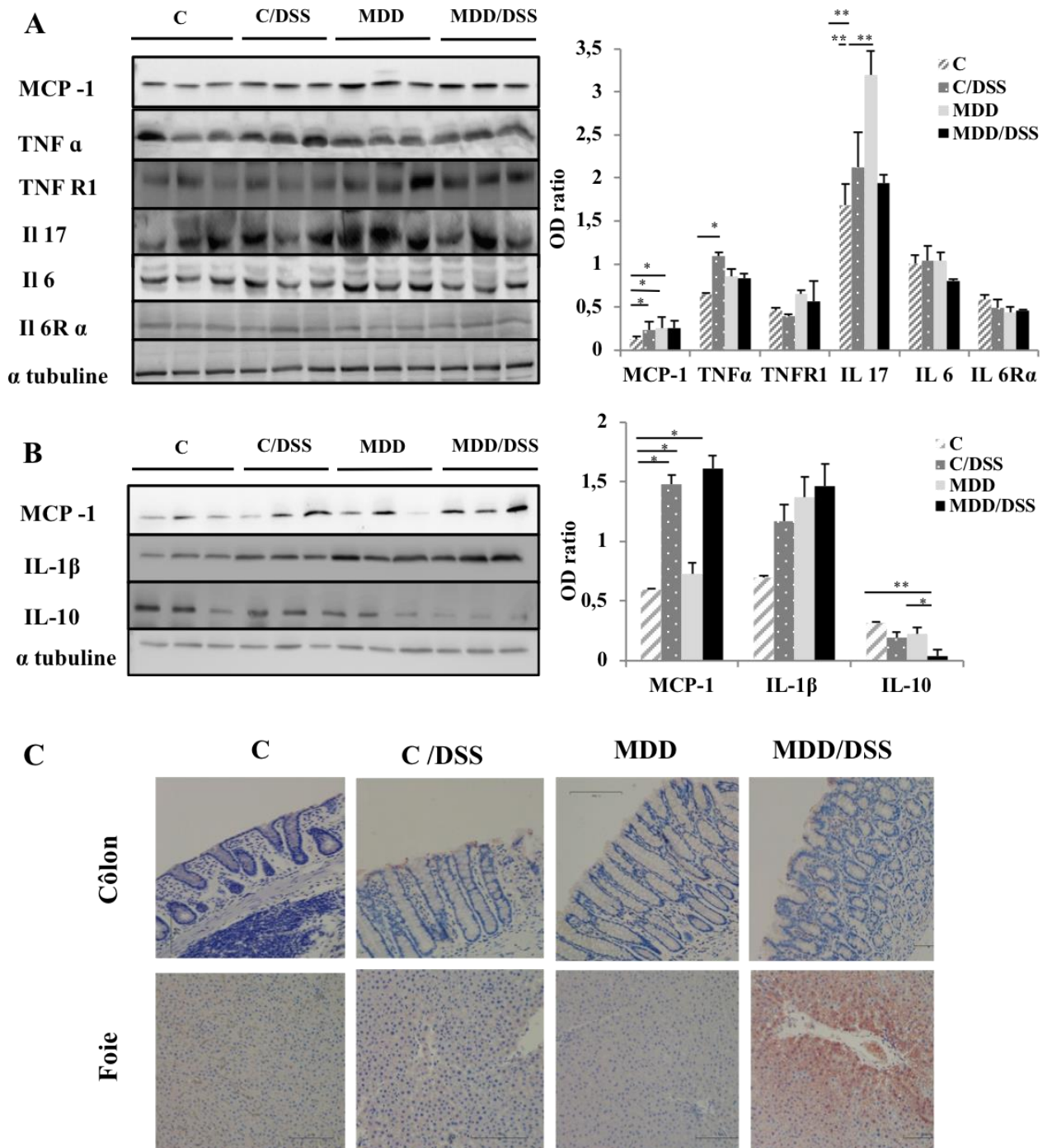


Figure 13 : Augmentation de la chimiokine pro-inflammatoire (MCP-1) dans le foie et le côlon de rats déficients en donneurs de méthyles traités avec dextran sulfate de sodium (MDD/DSS). (A) MCP-1 a montré une augmentation progressive dans le foie des rats témoins traités avec du DSS (C/DSS), des rats déficients en donneurs de méthyles (MDD) et des rats déficients en donneurs de méthyles traités avec du DSS (MDD/DSS) respectivement par rapport aux rats témoins (C). Aucun changement d'expression n'a été observé pour les cytokines $TNF\alpha$, IL-6, IL-17 et leurs récepteurs dans les différents groupes d'étude. (B) L'expression de MCP 1 était également augmentée dans le côlon de rats témoins traités avec DSS (C/DSS) et dans le côlon de rats déficients traités avec DSS (MDD/DSS). La protéine IL-1 β a augmenté dans le côlon des groupes C/DSS, MDD et MDD/DSS par rapport aux témoins, alors que l'IL-10 a diminué progressivement dans ces groupes par rapport aux témoins. (C) L'examen histologique du côlon et du foie a confirmé l'augmentation de l'expression de MCP-1 chez les rats traités par MDD/DSS, avec une augmentation plus prononcée au niveau hépatique. Les bandes de protéines ont été quantifiées par densitométrie, normalisées avec de la tubuline α . Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM (n = 3 dans chaque groupe), * p <0,05, ** p <0,01, OD: densité optique.

3.6.La voie LPS/TLR4 n'est pas activée et ne joue aucun rôle dans la stéatohépatite des rats MDD/DSS

Nous n'avons observé aucune différence significative de concentration de LPS plasmatique entre les groupes, avec des concentrations de 81 ± 14 , 59 ± 11 , 62 ± 20 et 79 ± 17 pmol/ml dans les groupes témoins C, C/DSS, MDD et MDD/DSS, respectivement. Cette observation était cohérente avec l'absence d'activation de la voie TLR4, malgré une expression accrue de CD14, le partenaire de TLR4 nécessaire à la liaison du LPS. Nous n'avons observé aucune augmentation de l'expression des protéines TLR4 phosphorylées et non phosphorylées et des protéines en aval, y compris les protéines IRF 3, TRIF, TRAF 6, IRAK 4 et MYD 88 (Figure 14).

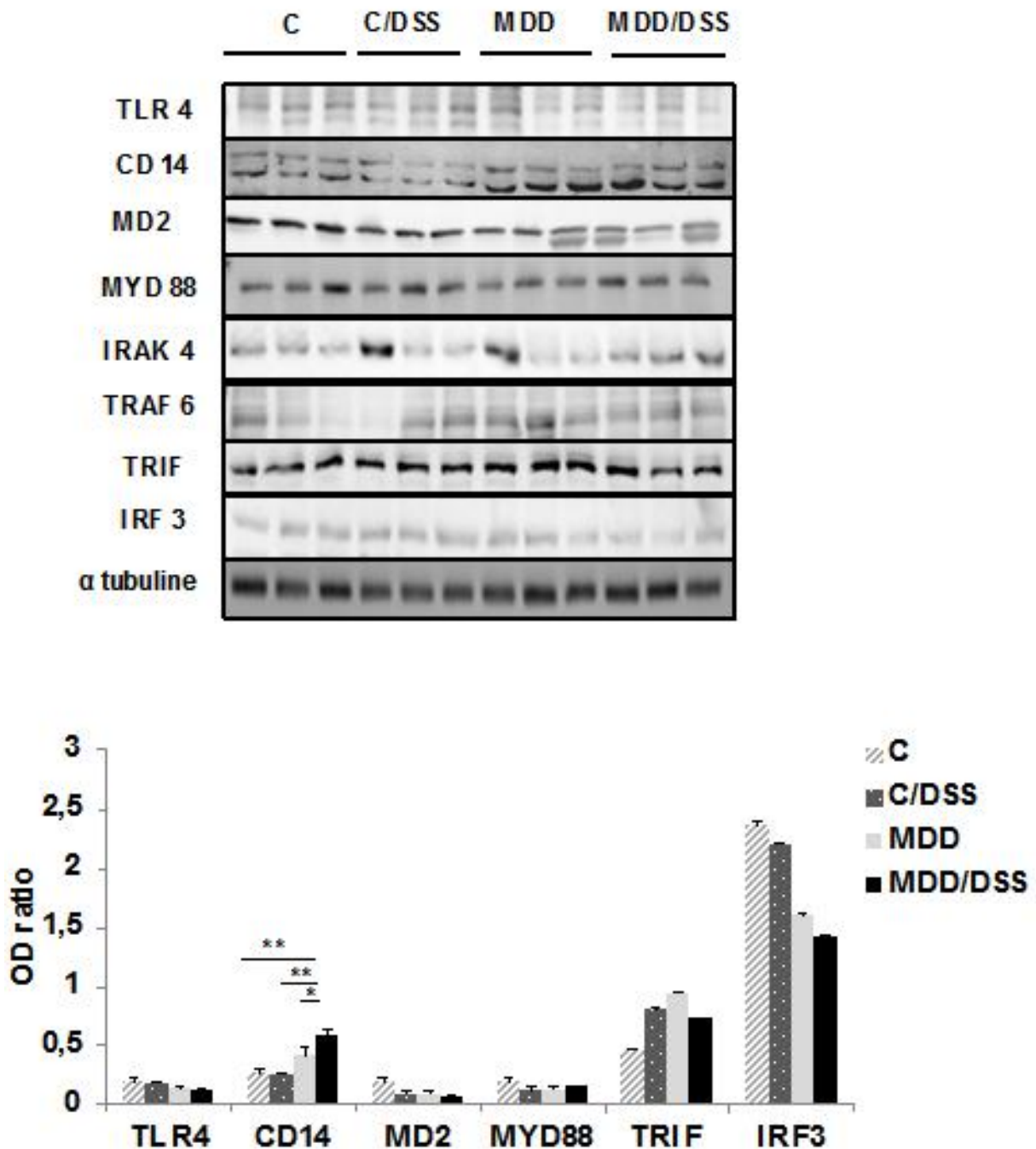


Figure 14 : La stéatohépatite n'est pas liée à l'activation de la voie du TLR4 par son ligand (lipopolysaccharide, LPS). La voie TLR4 et ses médiateurs en aval ne présentent aucune variation d'expression significative entre les différents groupes, à l'exception de CD14. Les bandes de protéines ont été quantifiées par densitométrie, normalisées avec la tubuline α . Les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM (n = 3 dans chaque groupe), * p < 0,05, ** p < 0,01. OD: densité optique.

4. Discussion

Différents régimes ont été utilisés pour étudier la NASH expérimentale chez les rongeurs. Ces régimes comprennent les régimes HF, CD, CDHF, MCD et MDD. Ce dernier produit également une colite sévère avec une perméabilité intestinale accrue chez les rats adultes traités par DSS dans l'eau de boisson (Melhem et al. 2016; Bressenot et al. 2013). Ce modèle est donc adapté pour comprendre si les MICI influencent le développement de la NASH par le biais de deux types de mécanismes, l'exposition du foie aux endotoxines dérivées de l'intestin (LPS) de la circulation systémique et les effets systémiques des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires. Notre modèle de rat soumis à un régime MDD a montré une inflammation du foie chez des animaux atteints de colite provoquée par le DSS. Il produisait également une stéatose hépatique et activation du marqueur profibrotique MMP2, mais pas de fibrose, comme l'illustre l'absence de modifications histologiques et le niveau d'expression de α SMA et de collagène 1A1. Ceci est cohérent avec nos données précédentes montrant que le MDD pendant la gestation et la lactation des femelles de rat produit une forme bénigne de NASH, avec une stéatose microvésiculaire chez des rats âgés de 21 jours et une inflammation et une fibrose limitée chez les rats soumis ultérieurement à un régime riche en graisses au jour 50 (Pooya et al. 2012a; Bison et al. 2016a). En comparaison, le régime MCD produit une NASH plus sévère avec inflammation et fibrose marquées et des effets généraux comprenant une réduction de la survie à long terme et une perte de poids (Rivera et al. 2007). Ces effets généraux pourraient constituer une limitation à l'utilisation du régime MCD en association avec le DSS comme modèle des effets systémiques de la colite.

Plusieurs modèles animaux ont montré le rôle de la translocation du LPS et de l'activation subséquente de la voie du TLR4 dans les pathomécanismes de la NASH. Des souris nourries au régime MCD développent une stéatohépatite par endotoxémie portale et une expression accrue du récepteur TLR4 (Rivera et al. 2007). Les souris nourries avec un régime HF et traitées avec le DSS ont une augmentation du taux de LPS portal et une augmentation des taux d'ARNm de TLR4 et TLR9 (Gäbele et al. 2011). Une augmentation des taux de LPS portal est associée à une fibrose chez des souris nourries de CDHF traitées par DSS (Achiwa et al. 2016). De plus, il a été démontré chez la souris TLR4 sauvage en comparaison de la souris TLR4 mutante que la fibrose et l'inflammation hépatiques sont augmentées *via* les voies du TGF- β et du MYD88-NF κ B (Seki et al. 2007). Contrairement à ces données, nous n'avons trouvé aucune activation de la voie TLR4 et aucune augmentation du taux sérique de

LPS dans le groupe MDD/DSS. En accord avec nos données, il est connu que de nombreux patients atteints de NASH présentent des taux sériques normaux d'endotoxines, ce qui indique que la pathogénie de la NASH peut également résulter d'autres mécanismes (Volynets et al. 2012; Thuy et al. 2008; Harte et al. 2010; Alisi et al. 2010; U. P. Singh et al. 2016).

Nous avons montré un niveau plasmatique accru de MCP-1 et de IL-1 β , ce qui était corrélé à leurs expressions accrues dans les tissus hépatiques et intestinaux dans le modèle MDD/DSS (Figure 13). Ces chimiokines/cytokines sont également élevées chez les patients atteints de MICI (Singh et al. 2016). L'homocystéine accrue est associée à une augmentation de MCP-1 et IL-1 β chez les patients atteints de MICI (Danese et al. 2005; Poddar et al. 2001). Dans notre modèle MDD, l'inflammation du foie des rats MDD/DSS a été mise en évidence par l'activation de la voie NF κ B et la translocation du phospho-p65 ; la forme active de NF κ B, dans le noyau (Figure 11). Nous avons observé une augmentation de pIKK α/β , une augmentation de la phosphorylation (phospho- I κ B α) et une diminution de l'expression de I κ B α . Cela concorde avec l'activation de la voie classique NF κ B. En effet, le complexe IKK conduit à la phosphorylation de I κ B α et NF κ B p65 et la dégradation de I κ B α par l'ubiquitination libre NF κ B, conduisant à la translocation de son unité p65 dans le noyau (Viatour et al. 2005). L'activation de la voie classique NF κ B est généralement déclenchée par des cytokines pro-inflammatoires, l'IL-1 β et TNF- α . L'augmentation du niveau de MCP-1 peut être une conséquence de l'activation de NF κ B par IL-1 β observée dans les astrocytes de rat (Thompson et Van Eldik 2009). Nous avons déjà observé une augmentation des taux d'ARNm de TNF- α chez des rats déficients en donneurs de méthyle et traités avec du DSS (Chen et al. 2011). Cependant, il est peu probable que la production accrue de TNF- α dans le côlon joue un rôle dans l'activation de NF κ B dans le foie des rats MDD/ DSS, car nous n'avons observé aucune variation significative de sa concentration sérique dans les quatre groupes de rats.

L'augmentation de MCP-1 et de VEGF chez les rats MDD/DSS et les corrélations de MCP-1 avec IL-1 β et avec VEGF concordent avec le rôle de ces cytokines/chimiokines dans la NASH. La MCP-1 est produite par les hépatocytes et les cellules étoilées hépatiques après induction de l'inflammation par le stress oxydatif et les cytokines proinflammatoires, y compris l'IL-1 β (Yoshimura et al. 1989). La voie MCP-1-CCR2 joue un rôle critique dans le recrutement hépatique de macrophages pro-inflammatoires qui libèrent TNF- α , IL-1 β et IL-6 (Ju et Tacke 2016; Miura et al. 2012; Deshmene et al. 2009). CCR2 et MCP-1 recrutent des

sous-ensembles de monocytes dans le foie. Les macrophages dérivés de ces monocytes libèrent des cytokines proinflammatoires et peuvent directement activer les myofibroblasts profibrogènes hépatiques (Bocca et al. 2015). Des études expérimentales ont également montré que MCP-1 contribuait de manière systémique à la pathogénie de la NASH. L'inhibition pharmacologique de la MCP-1 diminue l'infiltration de macrophages dans le foie et la stéatohépatite dans les maladies hépatiques chroniques produites par le régime MCD (Baeck et al. 2012). Dans une autre étude, l'inhibition du récepteur de l'MCP-1 a entraîné une atténuation de la résistance à l'insuline induite par l'alimentation, de l'inflammation du tissu adipeux et de la NASH (Mulder, van den Hoek, et Klemann 2017).

En conclusion, nous avons trouvé que l'inflammation du foie déclenchée par la colite induite par le DSS chez le rat MDD est médiée par MCP-1/IL-1 β , mais pas par l'activation de TLR4 par translocation de LPS, au moins dans nos conditions expérimentales. Cela confirme le rôle important joué par MCP-1 et IL-1 β dans la production de NASH dans notre modèle. Ces données suggèrent que les patients atteints de MICI présentant une augmentation systémique du médiateur pro-inflammatoire MCP-1 sont plus à risque de développer la NASH et l'inhibition de la MCP-1 pourrait être une cible thérapeutique.

Partie 2

Influence du régime hyperénergétique (HE) associé à un traitement chronique inflammatoire par le LPS sur des rats adultes nés de mères soumises à un régime carencé en donneurs de méthyles.

1. Introduction

Dans le modèle présenté ci-dessous, nous voulions vérifier si l'effet de la programmation foetale induit par le régime MDD pendant la gestation et l'allaitement chez le rat Wistar, le régime HE moyennement riche en graisses introduit à l'âge adulte ainsi que l'inflammation viscérale créée par les injections répétitives du LPS par voie intrapéritonéale pour reproduire une endotoxémie métabolique, peuvent jouer un rôle dans les mécanismes pathologiques de la NASH.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Modèle animal

Les expérimentations ont été réalisées avec des rats Wistar (JanvierLabs, France). Les animaux ont été maintenus dans une animalerie à une température ambiante de 22-23°C. Un cycle lumière/obscurité de 12 h, avec un libre accès à la nourriture et à l'eau. Les expérimentations ont été réalisées selon l'autorisation du Ministère de la recherche et enregistrées sous le numéro #6623-2016090515161817.

Des rates Wistar ont initialement été séparées en deux groupes, un groupe de rates "contrôles" recevant de la nourriture standard (A04) ainsi qu'un groupe de rates "carencées" recevant de la nourriture carencée en folates et vitamine B12 ; ces régimes étant reçus avant les accouplements, pendant la gestation et jusqu'au sevrage des petits (J21).

Puis les ratons des deux groupes ont tous reçu le même régime, à savoir le régime standard, de 21 jours à 50 jours. A ce stade J50, deux groupes sont toujours identifiables : le groupe de ratons "contrôle" nés de mères contrôles et le groupe de ratons "iMDD" nés de mères initialement carencées en donneurs de méthyles. A J50, un régime hyper-énergétique (HE) était introduit et l'injection de l'endotoxine LPS à 50µg/kg en voie intrapéritonéale était appliquée une fois par semaine à partir du J60 jusqu'à la fin du protocole au jour 185 pour certains rats (Figure 15).

A ce stade ultime J185 huit groupes existent :

- le groupe de rats "C", nés de mères contrôles et recevant un régime contrôle (n=4).
- le groupe de rats "C/LPS", nés de mères contrôles et recevant un régime contrôle et injectés avec le LPS (n=5).
- le groupe de rats "C/HE", nés de mères contrôles et recevant un régime HE (n=5).

- le groupe de rats "C/HE/LPS", nés de mères contrôles et recevant un régime HE et injectés avec le LPS (n=6).
- le groupe de rats "iMDD", nés de mères carencées et recevant un régime contrôle (n=10).
- le groupe de rats "iMDD/LPS", nés de mères carencées et recevant un régime contrôle et injectés avec le LPS (n=9).
- le groupe de rats "iMDD/HE", nés de mères carencées et recevant un régime HE (n=10).
- le groupe de rats "iMDD/HE /LPS", nés de mères carencées et recevant un régime HE et injectés avec le LPS (n=10).

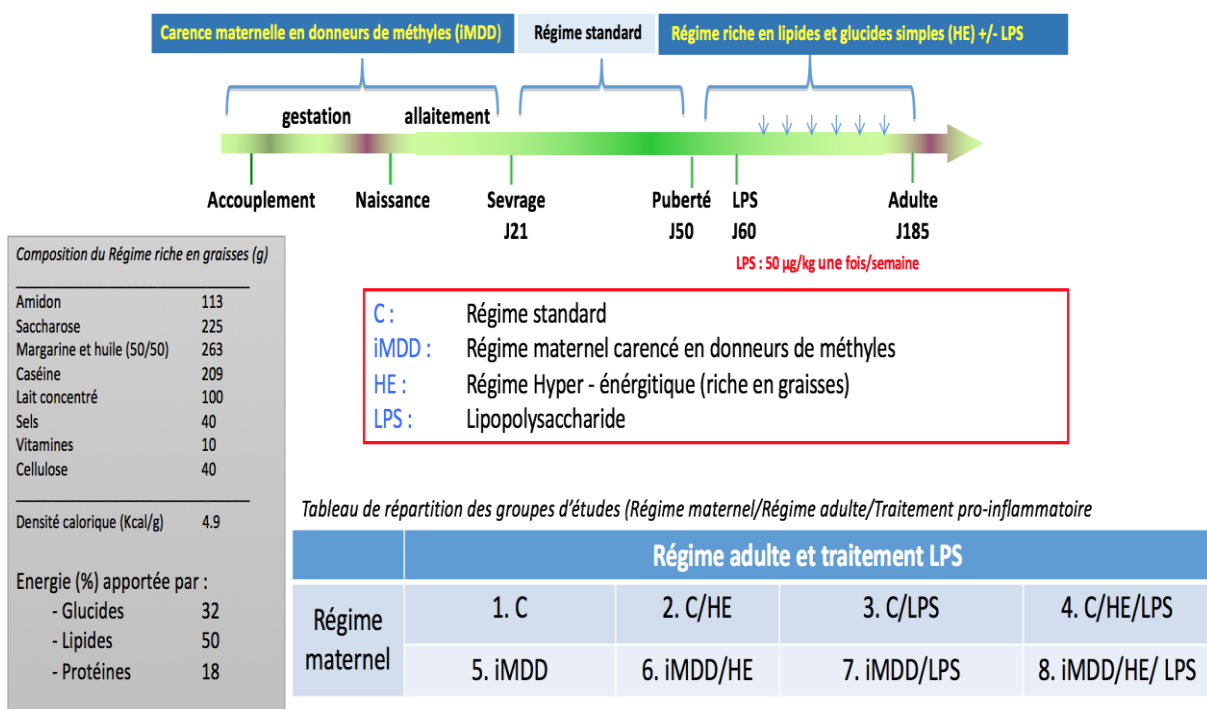


Figure 15 : Représentation schématique du protocole animal.

Les rats sont soumis à un régime déficient en donneurs de méthyles (iMDD) pendant la grossesse et l'allaitement (J21). Un régime alimentaire normal est introduit à partir du jour 21 (J21) jusqu'au jour 50 (J50). À J50, un régime hyperénergétique (HE) est introduit et une injection intra-péritonéale chronique de lipopolysaccharides (LPS) commence du J60 jusqu'à fin de protocole (J185). A J185, les rats sont divisés en 8 groupes.

LPS : 50 ug/kg une fois /semaine.

Abbréviation : le groupe de rats "C", nés de mères contrôles et recevant un

régime contrôle (n=4), le groupe de rats "C/LPS", nés de mères contrôles et recevant un régime contrôle et injectés avec le LPS (n=5), le groupe de rats "C/HE", nés de mères contrôles et recevant un régime HE (n=5), le groupe de rats "C/HE/LPS", nés de mères contrôles et recevant un régime HE et injectés avec le LPS (n=6), le groupe de rats "iMDD", nés de mères carencées et recevant un régime contrôle (n=10), le groupe de rats "iMDD/LPS", nés de mères carencées et recevant un régime contrôle et injectés avec le LPS (n=9), le groupe de rats "iMDD/HE", nés de mères carencées et recevant un régime HE (n=10), le groupe de rats "iMDD/HE /LPS", nés de mères carencées et recevant un régime HE et injectés avec le LPS (n=10).

2.2.Prélèvement des échantillons tissulaires et sanguins

Au jour 185, les rats ont été sacrifiés par décapitation. Le sang est recueilli au moment du sacrifice dans un tube contenant de l'héparine. Le sérum est récupéré après centrifugation du sang total. Le foie a été rapidement retiré, ouvert longitudinalement et doucement lavé dans du PBS 1X (2,7 mmol/L de KCl, 140 mmol/L de NaCl, 6,8 mmol/L de Na₂HPO₄.2H₂O, 1,5 mmol/L de KH₂PO₄, pH 7,4). Les tissus ont été récupéré après dissection et conservé dans du paraformaldéhyde à 4 % afin d'être inclus dans la paraffine pour les études histologiques. Ceux destinés aux extractions d'ARN et de protéines ont été congelés dans de l'azote liquide et stockés à -80 ° C.

2.3.Analyses biochimiques

Les concentrations plasmatiques de vitamine B12 et de folate ont été déterminées par dosage isotopique et radio-dilution (simulTRAC-SNB, ICN, Costa Mesa, USA). Les concentrations d'homocystéine, d'acide méthylmalonique, d'acide succinique, de SAM et de SAH ont été mesurées dans le plasma par chromatographie en phase liquide à haute performance (Waters, St Quentin, France) couplée à la spectrométrie de masse (Api 4000 Qtrap Applied Biosystems, Courtaboeuf, France), comme décrit précédemment (Pooya et al.2012). L'insuline a été dosée par dosage radioimmunologique (MP, Biomedicals, Solon, OH, USA). Les lipides, la glycémie, l'ASAT, l'ALAT et d'autres paramètres biochimiques de routine ont été déterminés dans le plasma.

2.4. Analyses Western blot

L'extraction des protéines totales du foie a été réalisée par la lyse de tissu homogénéisé dans un tampon RIPA (phosphate de sodium anhydre dibasique, phosphate de potassium dihydrogène, 150 Mm NaCl, 1 % de Igepal, 0,5 % de désoxycholate de sodium, de sodium dodécylsulfate et des inhibiteurs de protéases (Roche, Boulogne-Billancourt, France) après avoir lavé deux fois avec du PBS 1X glacé puis dosé à l'aide de la méthode de dosage de l'acide bicinchoninique. Un total de 30 µg de protéines a été mélangé avec un volume égal de 2x tampon de Laemmli, dénaturé en chauffant le mélange pendant 5 min à 100°C, puis séparé par SDS-PAGE à 6 -15%. Après séparation électrophorétique, les protéines ont été transférées sur une membrane (polyfluorure de vinylidène (PVDF) ou nitrocellulose) comme décrit précédemment.

Les protéines ont été révélées à l'aide d'un kit de détection ECL (Amersham, Vélizy-Villacoublay, France) et les bandes ont été quantifiées par densitométrie à l'aide du programme Image J 5.1. La β actine a été utilisée comme contrôle de référence interne.

2.5. Analyses statistiques

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel Statview V.5 pour Windows (SAS Institute, Berkley, Californie, États-Unis). Les variables continues des analyses RT-qPCR et densitométrique des Western blot ont été rapportées sous forme de moyenne ± écart-type. Les données brutes ont été comparées à l'aide de l'analyse de variance unidirectionnelle (ANOVA) avec le test de Fisher. Le niveau de signification a été fixé à une valeur $p < 0,05$. Les résultats sont indiqués par des astérisques en chiffres (* valeur $p < 0,05$; ** valeur $p < 0,01$ et *** valeur $p < 0,001$).

3. Résultats

3.1. Influence du traitement LPS sur la prise de poids des animaux soumis à un régime riche en graisses

Le poids initial (J60 ; semaine 1) et le gain de poids corporel après l'exposition au régime HE avec ou sans LPS était moins prononcé dans les quatre groupes de rats iMDD en comparaison avec les groupes contrôles (**p < 0,001). A la fin de protocole (J185 ; semaine 19), nous observons une augmentation du poids chez les animaux soumis à un régime HE et traités avec le LPS (iMDD vs. iMDD/HE/LPS **p < 0,01) (Figure 16).

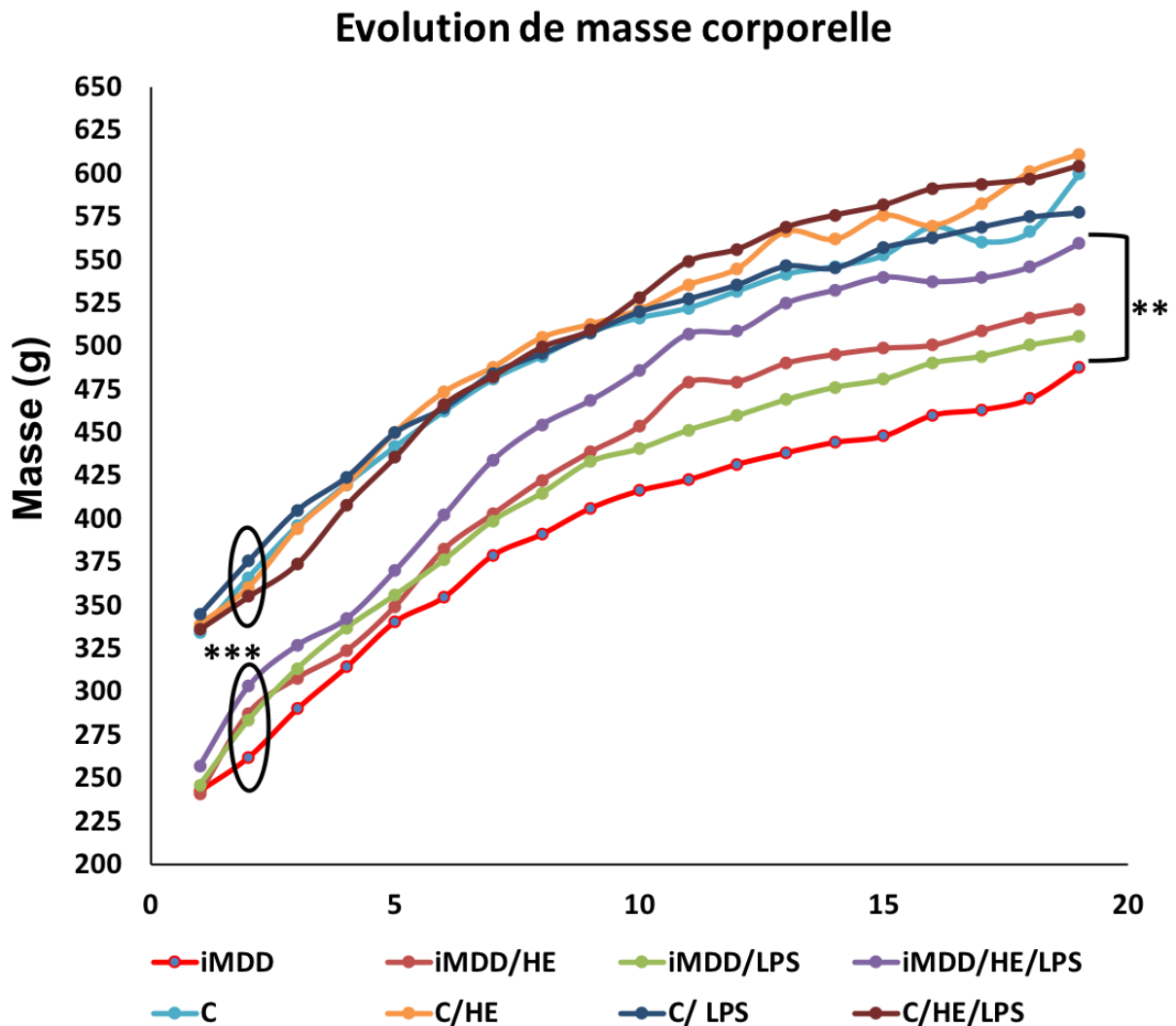


Figure 16 : Evolution de la masse corporelle entre les huit groupes de rats de J60 au J185.

Le poids initial (J60 ; semaine 1) et la teneur en poids corporel après exposition au régime HE avec ou sans LPS étaient moins prononcés dans les quatre groupes de rats iMDD en comparaison avec les quatre groupes contrôles (**p < 0,001). Tout au long de protocole, le gain de poids était prononcé à l'ajout du régime HE

et plus prononcé par l'exposition au LPS jusqu'à fin du protocole (iMDD vs. iMDD/HE /LPS** $p < 0,01$). Abréviations : J60 : 60 jours, C : nés de mères contrôles et recevant un régime contrôle (n=4), C/LPS : nés de mères contrôles et recevant un régime contrôle et injectés avec le LPS (n=5), C/HE : nés de mères contrôles et recevant un régime HE (n=5), C/HE/LPS : nés de mères contrôles et recevant un régime HE et injectés avec le LPS (n=6), iMDD : nés de mères carencées et recevant un régime contrôle (n=10), iMDD/LPS : nés de mères carencées et recevant un régime contrôle et injectés avec le LPS (n=9), iMDD/HE : nés de mères carencées et recevant un régime HE (n=10), iMDD/HE /LPS : nés de mères carencées et recevant un régime HE et injectés avec le LPS (n=10).

Les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

3.2. Efficacité du régime MDD

Les niveaux plasmatiques de Hcy, Met, SAM et SAH ont été mesurés pour évaluer l'efficacité du régime alimentaire MDD pendant la gestation et l'allaitement sur ces paramètres. Dans les groupes recevant un régime iMDD, les concentrations en Hcy ($16,4 \pm 2,75$ vs. $6,12 \pm 0,54$, ** p value = 0,0015) et SAH ($193 \pm 52,4$ vs. $97,63 \pm 15,6$) ont été significativement augmentées et le ratio SAM/SAH a été significativement diminué en comparaison aux témoins ($3,34 \pm 0,36$ vs. $5,3 \pm 0,76$, * p value = 0,014) (Tableau 2).

Paramètres †	C	iMDD	<i>p</i> value
Homocystéine (Hcy) μM	$6,12 \pm 0,54$	$16,4 \pm 2,75$	0,0015 **
Méthionine (Met) μM	$21,83 \pm 1,75$	$12,93 \pm 0,91$	0,0019**
SAM (nM)	$404 \pm 19,9$	$523 \pm 94,5$	0,15
SAH (nM)	$97,63 \pm 15,6$	$269 \pm 86,8$	0,033*
SAM/SAH ratio	$5,3 \pm 0,76$	$2,71 \pm 0,53$	0,0458 *

Tableau 2 : Marqueurs biochimiques dans le plasma de rats âgés de 21 jours issus de mères carencées (iMDD) et de mères témoins (C). L'homocystéine (Hcy) était significativement augmentée dans le plasma des rats déficients en donneurs de méthyl (iMDD) en comparaison aux témoins ($16,4 \pm 2,75$ vs. $6,12 \pm 0,54$, ** p-value = 0,0015), accompagnée d'une augmentation de la concentration de S-adénosyl homocystéine (SAH) ($193 \pm 52,4$ vs. $97,63 \pm 15,6$) et par conséquent une diminution significative du rapport SAM / SAH ($3,34 \pm 0,36$ vs. $5,3 \pm 0,76$, * valeur p = 0,014).

Abréviations : Hcy : Homocystéine, Met : Méthionine, SAM : S-adénosyl-méthionine, SAH : S-adénosyl-homocystéine.

†Moyenne \pm erreur type. Différences statistiquement significatives *p <0.05, **p<0,01 (n= 7)

3.3. Les paramètres biochimiques montrent une augmentation dramatique des enzymes hépatiques ASAT et ALAT chez les rats carencés exposés au régime HE avec ou sans LPS

L'activité ASAT est plus élevée chez les rats iMDD/HE/LPS et les rats iMDD/HE (iMDD/HE/LPS vs. C/HE/LPS, iMDD/HE vs. iMDD et iMDD/HE vs. C/HE *p < 0,05). L'activité ALAT est plus élevée aussi chez les rats iMDD/HE/LPS et les rats iMDD/HE. Les acides gras libres (AGL) sont plus élevés chez les animaux soumis à la programmation foetale; les rats des groupes iMDD et iMDD/LPS (iMDD vs. iMDD/HE **p < 0,01 et iMDD vs. iMDD/HE/LPS *p < 0,05). Les autres paramètres biochimiques tels que la glycémie, les triglycérides, le cholestérol, et l'acide urique ne montrent aucun changement significatif entre les différents groupes (Figure 17).

Paramètres	C (n=4)	C/HE (n=5)	C/LPS (n=5)	C/HE/LPS (n=6)	iMDD (n=10)	iMDD/HE (n=10)	iMDD/LPS (n=10)	iMDD /HE /LPS (n=10)
Glucide (mmol/l)	9,03± 0,8	9,13± 0,86	11± 2,6	8,46± 1,53	8,9± 1,6	8,9± 1,1	9,2± 1,16	8,6± 1,38
Cholestérol (mmol/l)	1,82± 0,1	2,18± 0,33	2,32± 0,4	2± 0,35	2,2± 0,66	1,96± 0,3	2,28± 0,3	2,3± 0,32
Triglycéries (mmol/l)	1,4± 0,7	1,16± 0,3	1,33± 0,2	1,01± 0,17	1,6± 0,47	1,54± 0,4	1,7± 0,8	1,6± 0,6
Acide Urrique (µmol/l)	62± 25	59± 10	95± 84	57± 29	53± 15	96± 77	54± 11	66± 14
ASAT (U/L)	149± 58	132± 17	151± 71	117± 42	164± 75	284± 147	158± 70	243± 163
ALAT (U/L)	56± 5,7	43± 1,5	68± 25	50± 15	78± 56	104± 87	63± 16	119± 131
HDL (mmol/l)	1,02± 0,1	1,25± 0,18	1,21± 0,24	1,15± 0,17	1,12± 0,3	1,08± 0,14	1,15± 0,2	1,23± 0,17
LDL (mmol/l)	0,17± 0,3	0,4± 0,2	0,5± 0,2	0,38± 0,15	0,35± 0,4	0,17± 0,21	0,36± 0,2	0,36± 0,3
AGL (µmol/l)	739± 225	623± 110	748± 165	640± 187	1273± 701	767± 161	1351± 638	726± 181

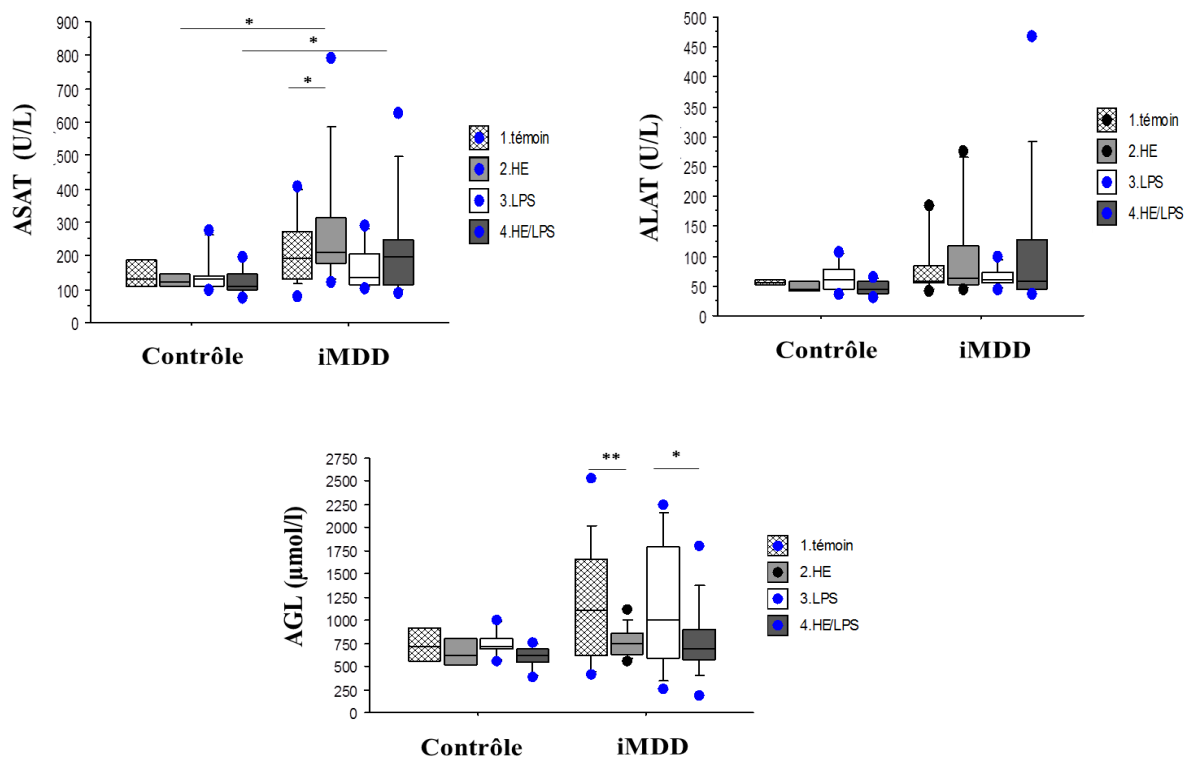


Figure 17 : Marqueurs biologiques et biochimiques dans le plasma de rats âgés de 185 jours séparés en 8 groupes différents. ASAT et ALAT sont augmentées chez les rats carencés par rapport aux rats de groupes contrôle. L'activité ASAT est

plus élevée chez les rats iMDD/HE/LPS et les rats iMDD/HE (iMDD/HE/LPS vs. C/HE/LPS, iMDD/HE vs. iMDD et iMDD/HE vs. C/HE *p < 0,05). L'activité ALAT est plus élevée chez les rats iMDD/HE/LPS et les rats iMDD/HE. Les acides gras libres (AGL) sont plus élevés chez les rats de groupes iMDD et iMDD/LPS (iMDD vs. iMDD/HE **p < 0,01 , et iMDD/LPS vs. iMDD/HE/LPS *p < 0,05). La glycémie, les triglycérides, le cholestérol, et l'acide urique ne montrent aucun changement significatif entre les différents groupes.

Abréviations : ASAT : Aspartate aminotransferase, ALAT : Alanine aminotransferase, AGL : acide gras libres, HDL : High density lipoprotein, LDL : Low density lipoprotein, C : nés de mères contrôles et recevant un régime contrôle (n=4), C/LPS : nés de mères contrôles et recevant un régime contrôle et injectés avec le LPS (n=5), C/HE : nés de mères contrôles et recevant un régime HE (n=5), C/HE/LPS : nés de mères contrôles et recevant un régime HE et injectés avec le LPS (n=6), iMDD : nés de mères carencées et recevant un régime contrôle (n=10), iMDD/LPS : nés de mères carencées et recevant un régime contrôle et injectés avec le LPS (n=9), iMDD/HE : nés de mères carencées et recevant un régime HE (n=10), iMDD/HE /LPS : nés de mères carencées et recevant un régime HE et injectés avec le LPS (n=10). Les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM * p <0,05, ** p <0,01 .

3.4. Aspect macroscopique adipeux de foies de rats iMDD exposés au régime HE avec ou sans LPS (iMDD/HE) et (iMDD/HE/LPS)

L'observation macroscopique de foie de rats carencés en donneurs de méthyle montre un aspect adipeux chez les rats traités avec un régime HE et ceux traités avec un régime HE et injectés avec le LPS (iMDD/HE) et (iMDD/ HE/ LPS) en comparaison avec les rats des groupes iMDD et iMDD/LPS (Figure 18).

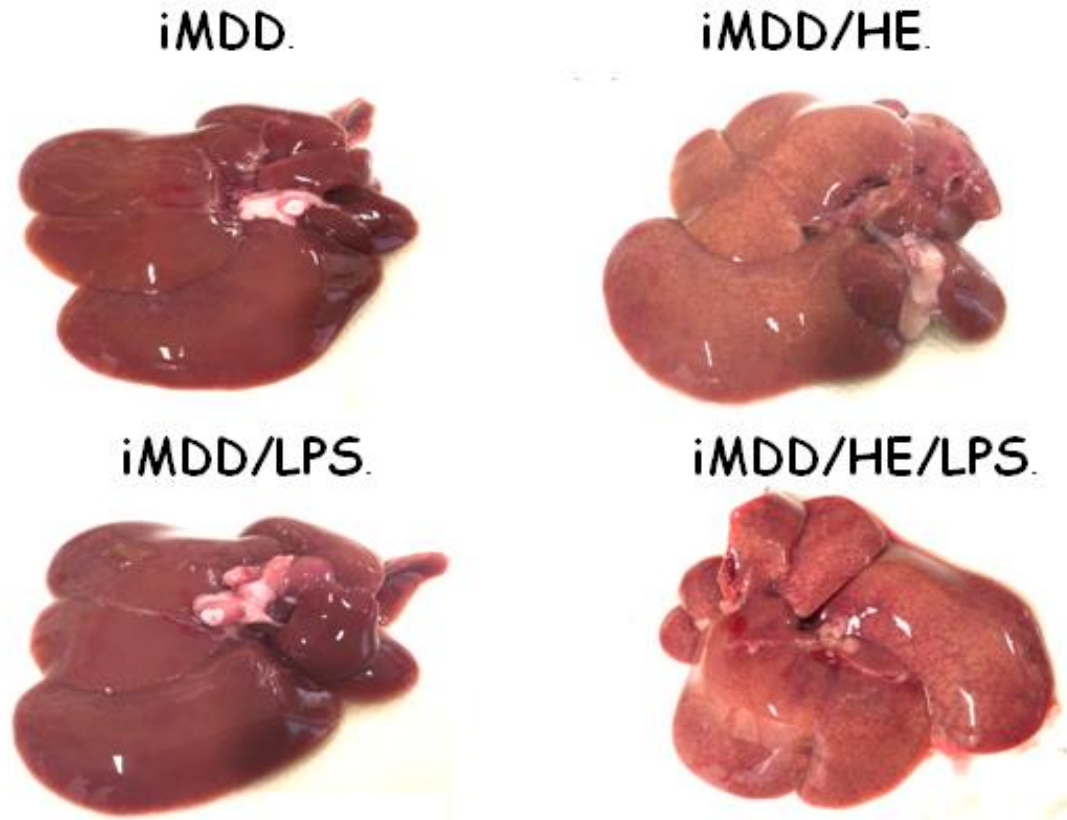


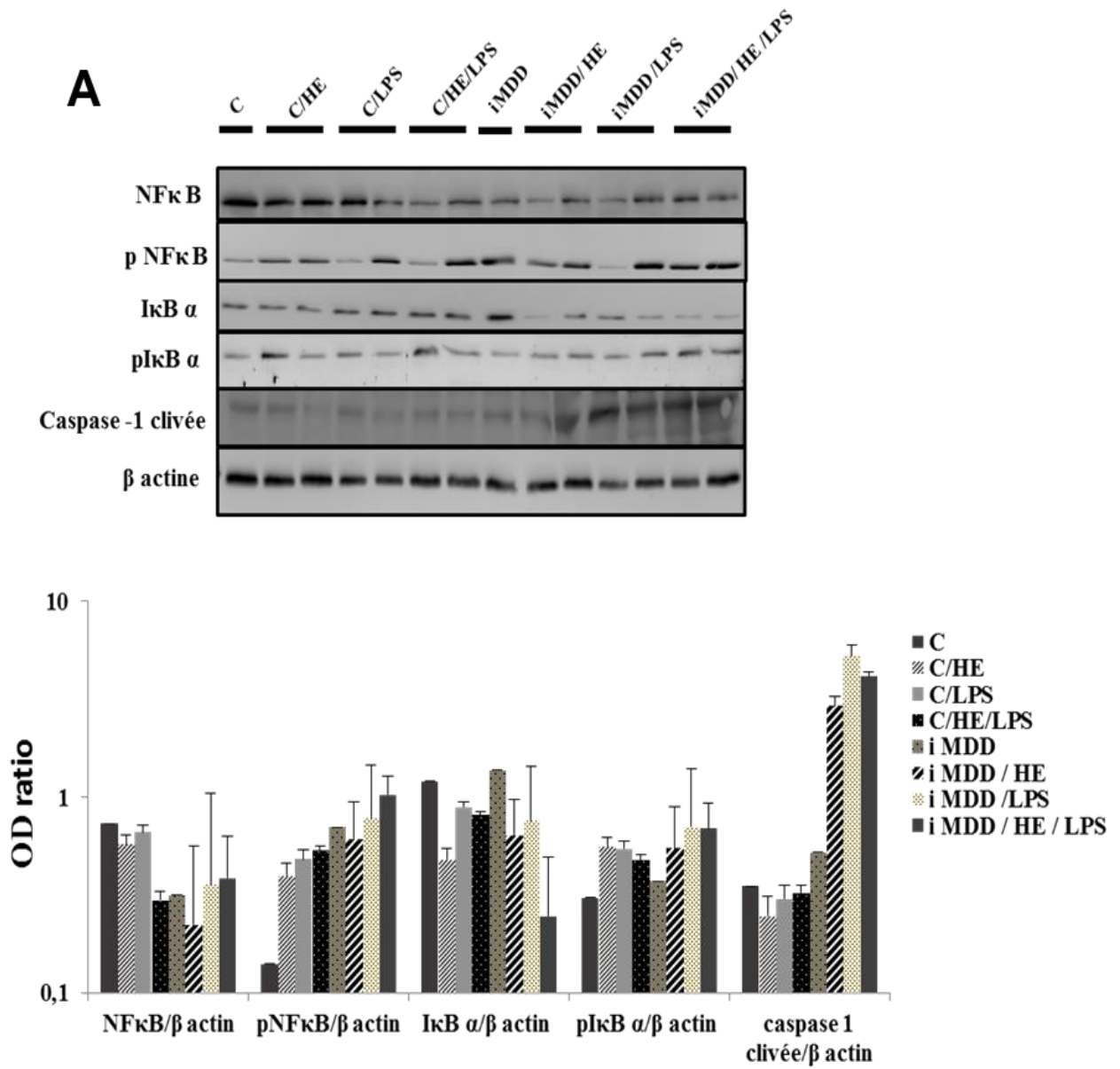
Figure 18 : Illustrations macroscopiques de foies de rats initialement carencés (iMDD). Aspects adipeux marqués de foie de rats initialement carencés en donneurs de méthyles et soumis au régime HE (iMDD/HE) et ceux initialement carencés en donneurs de méthyle traités avec un régime HE et injectés avec le LPS (iMDD/HE /LPS).

Abréviations : iMDD : rats nés de mères carencées et recevant un régime contrôle, iMDD/LPS : rats nés de mères carencées et recevant un régime contrôle et injectés avec le LPS, iMDD/HE : rats nés de mères carencées et recevant un régime HE, iMDD/HE /LPS : rats nés de mères carencées et recevant un régime HE et injectés avec le LPS.

3.5. Augmentation des marqueurs inflammatoires hépatiques chez les rats nourris avec un régime riche en graisses et nés de mères carencées en donneurs de méthyle, traités ou non avec du LPS, en comparaison avec les groupes contrôles

On observe une augmentation de la forme active pNFκB p65 ainsi qu'une augmentation de pIκB α. Par contre, on observe une diminution d'expression de son unité

inhibitrice IκB α dans les groupes iMDD/HE et iMDD/HE /LPS. La protéine caspase-1 clivée (forme active) est augmentée également chez ces rats. En revanche, on n'observe aucun changement d'expression des marqueurs fibrotiques, Col1A1 et MMP-2 (Figure 19).



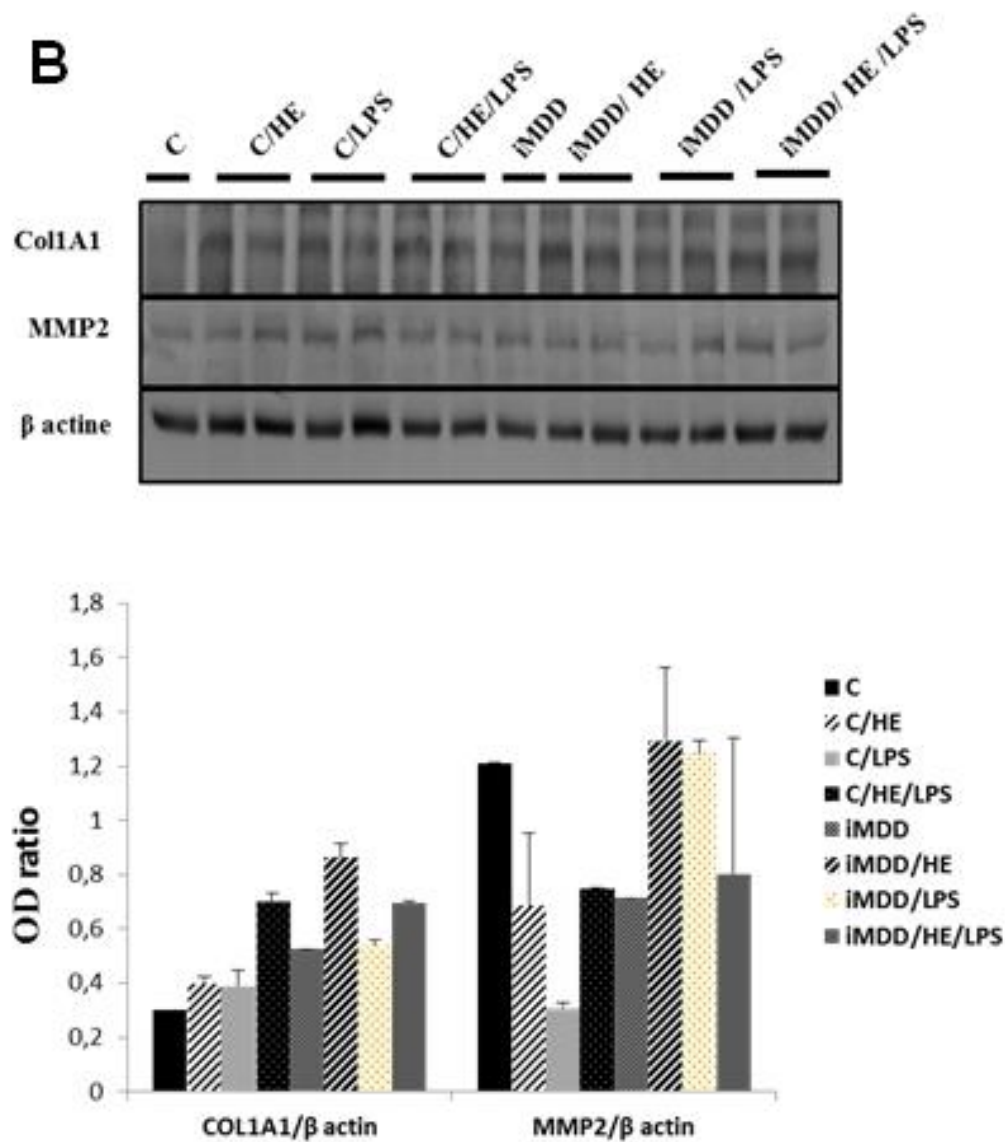


Figure 19 : Les médiateurs pro-inflammatoires et les marqueurs fibrotiques : (A) L'inflammasome : On observe une activation de la voie NF κ B manifestée par l'augmentation d'expression de pNF κ B p65, la forme active de NF κ B p65 accompagnée par une augmentation de pI κ b α et diminution de NF κ B p65 et I κ b α dans les groupes de rats initialement carencés en donneurs de méthyles et soumis au régime HE (iMDD/HE) et ceux initialement carencés en donneurs de méthyle traités avec un régime HE et injectés avec le LPS (iMDD/HE /LPS). La caspase-1 clivée est augmentée également chez ces même rats. (B) Les marqueurs fibrotiques : on n'observe aucune différence d'expression des protéines pro-fibrotiques (Col1A1 et MMP-2) parmi les 8 groupes de rats.

Abréviations : C : nés de mères contrôles et recevant un régime contrôle (n=4), C/LPS : nés de mères contrôles et recevant un régime contrôle et injectés avec le LPS (n=5), C/HE : nés de mères contrôles et recevant un régime HE (n=5), C/HE/LPS : nés de mères contrôles et recevant un régime HE et injectés avec le LPS (n=6), iMDD : nés de mères carencées et recevant un régime contrôle (n=10), iMDD/LPS : nés de mères carencées et recevant un régime contrôle et injectés avec le LPS (n=9), iMDD/HE : nés de mères carencées et recevant un régime HE (n=10), iMDD/HE /LPS : nés de mères carencées et recevant un régime HE et injectés avec le LPS (n=10). Les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM * p <0,05, ** p <0,01. OD: densité optique.

3.6. Augmentation de l'expression des protéines impliquées dans la voie de l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes (CMA) chez les rats carencés exposés au HE et/ou LPS

On observe une augmentation d'expression des protéines chaperonnes (HSP A8, HSP 90 et Mtor) chez les rats carencés exposés au traitement HE et/ou LPS. On n'observe pas de changements d'expression des protéines impliquées en macroautophagie (ATG 5 et ATG 16L1) (Figure 20).

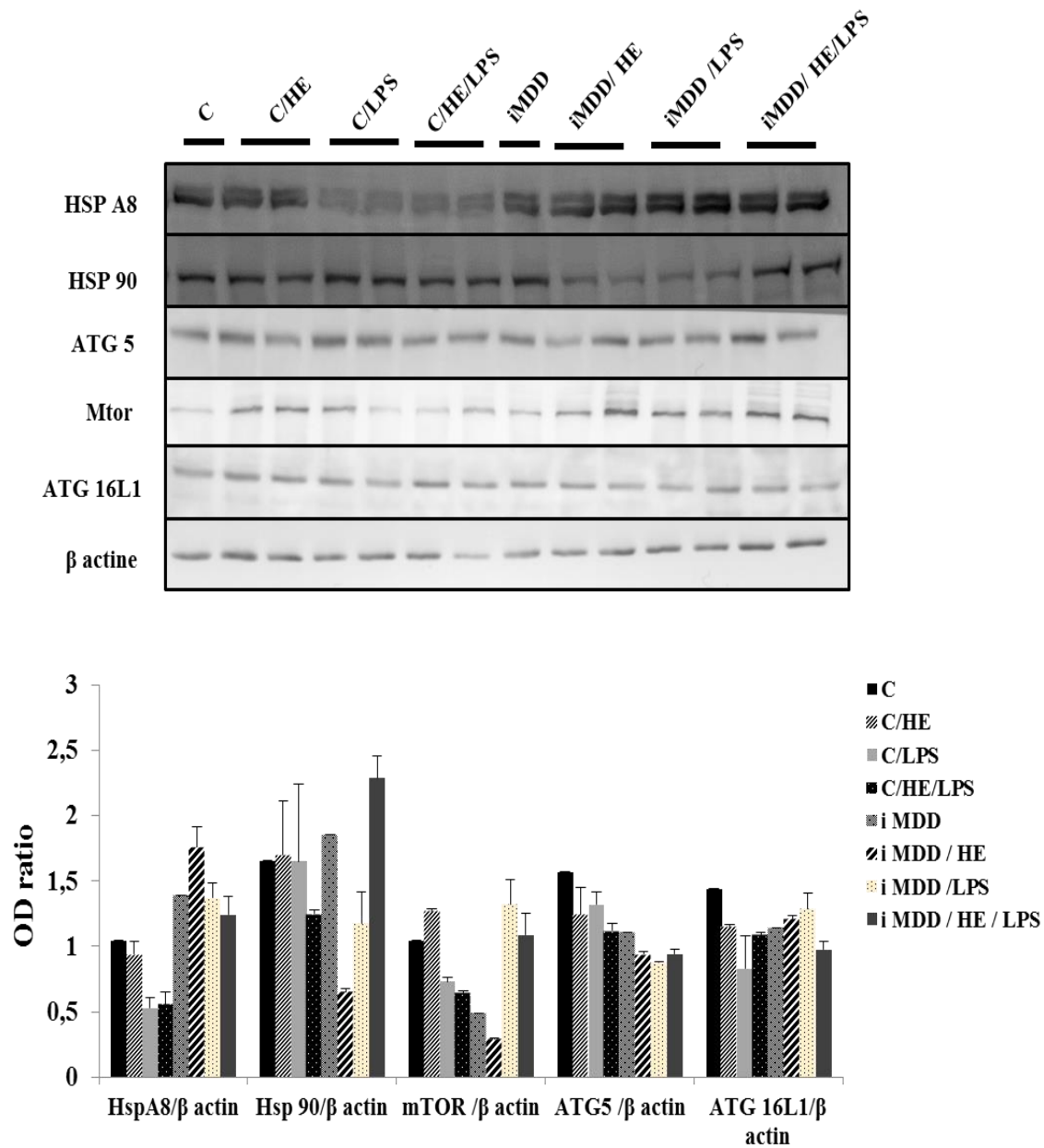


Figure 20 : Expressions des protéines impliquées dans la voie de la macroautophagie et l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes (CMA). On observe une augmentation d'expression des protéines chaperonnes (HSP A8, HSP 90 et Mtor) chez les rats carencés exposés au traitement HE et/ou LPS. Abréviations : C : nés de mères contrôles et recevant un régime contrôle (n=4), C/LPS : nés de mères contrôles et recevant un régime contrôle et injectés avec le LPS (n=5), C/HE : nés de mères contrôles et recevant un régime HE (n=5), C/HE/LPS : nés de mères contrôles et recevant un régime HE et injectés avec le LPS (n=6), iMDD : nés de mères carencées et recevant un régime contrôle (n=10), iMDD/LPS : nés de mères carencées et recevant un régime contrôle et injectés avec le LPS (n=9), iMDD/HE : nés de mères carencées et recevant un régime

HE (n=10), iMDD/HE /LPS : nés de mères carencées et recevant un régime HE et injectés avec le LPS (n=10). Les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM * p <0,05, ** p <0,01. OD: densité optique.

3.7. La voie TLR4 n'est pas activée et ne joue aucun rôle dans la stéatohépatite des rats iMDD/HE /LPS

On n'observe aucune activation de la voie TLR4 et une expression normale de CD14 et de MD2, les partenaires de TLR4 nécessaires à la liaison du LPS. Nous n'avons observé aucune augmentation de l'expression de la protéine TLR4, ni des protéines impliquées dans sa voie d'activation : MYD88 et IRAK 4 (Figure 21).

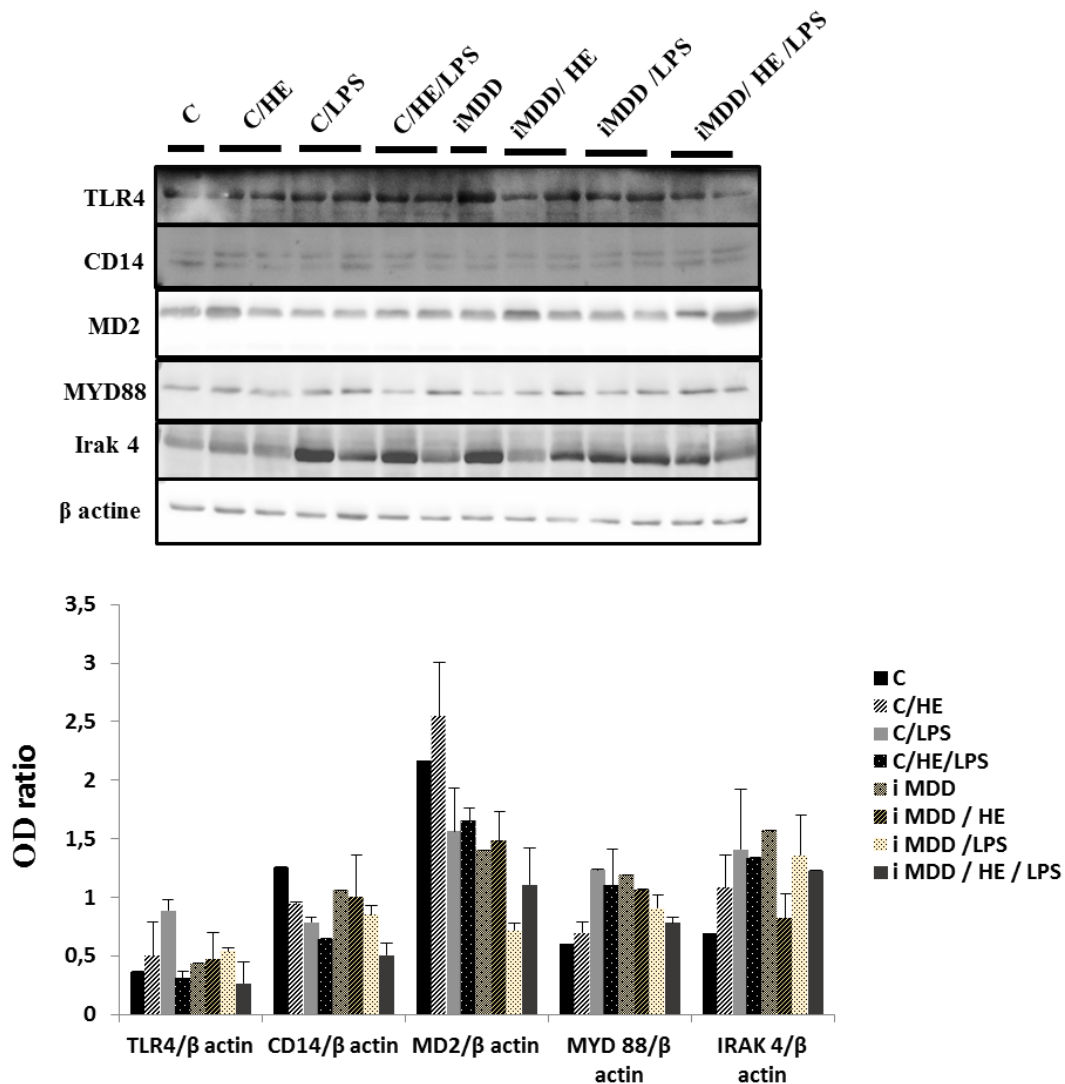


Figure 21 : La voie TLR4 n'est pas activée dans les groupes de rats nourris avec un régime déficient en donneurs de méthyl en comparaisons aux groupes

contrôles. Absence de différence significative d'expression des différentes protéines *downstream* la voie TLR4 entre les 8 groupes .

Abréviations : C : nés de mères contrôles et recevant un régime contrôle (n=4), C/LPS : nés de mères contrôles et recevant un régime contrôle et injectés avec le LPS (n=5), C/HE : nés de mères contrôles et recevant un régime HE (n=5), C/HE/LPS : nés de mères contrôles et recevant un régime HE et injectés avec le LPS (n=6), iMDD : nés de mères carencées et recevant un régime contrôle (n=10), iMDD/LPS : nés de mères carencées et recevant un régime contrôle et injectés avec le LPS (n=9), iMDD/HE : nés de mères carencées et recevant un régime HE (n=10), iMDD/HE /LPS : nés de mères carencées et recevant un régime HE et injectés avec le LPS (n=10). Les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM * p <0,05, ** p <0,01. OD: densité optique.

4. Discussion et Perspectives

Des données récentes suggèrent que la NASH est associée à une augmentation des niveaux d'endotoxines plasmatiques (Matsushita et al. 2016 ; Cani et al. 2008 ; Brun et al. 2007 ; Al-Attas et al. 2009), mais le rôle synergique de la programmation fœtale n'a jamais été étudié, à notre connaissance. La carence en donneurs de méthyles pendant la gestation et la lactation des femelles est un modèle de programmation fœtale. Elle produit une NASH modérée avec stéatose microvésiculaire chez des rats âgés de 21 jours (Pooya et al. 2012), puis une inflammation avec fibrose limitée chez les progénitures soumises ultérieurement à un régime HE au jour 185 (Bison et al. 2016). Au cours des dernières décennies, des études épidémiologiques et expérimentales ont clairement démontré une association entre les métabolites nutritionnels du 1-CM et la programmation fœtale (Guéant et al. 2013). Des études menées en Inde et au Népal ont montré qu'une carence en vitamine B12 au cours de la grossesse était un facteur prédictif significatif du petit poids à la naissance, de l'accumulation de la graisse abdominale et de la résistance à l'insuline chez les enfants âgés de 6 à 8 ans (Stewart et al. 2011; C. S. Yajnik et al. 2008; Chittaranjan Sakerlal Yajnik et Deshmukh 2012). Une étude transversale portant sur des étudiants indiens âgés de 11 à 15 ans retrouve une augmentation du risque de NASH par comparation avec la population d'Europe de l'Ouest, avec une prévalence de la NAFLD de 62% chez les enfants en surpoids et obèses.

Une échographie du foie a révélé la présence de stéatose hépatique chez 50% des étudiants, de remodelage du foie chez 23% et de cytolysse chez 30% (Pawar et al., 2016).

Le régime HE augmente les niveaux d'endotoxines plasmatiques deux à trois fois plus qu'un régime riche en glucides, ce qui suggère que l'absorption et la sécrétion de graisses intestinales pourraient jouer un rôle prédominant dans l'entrée du LPS dans le sang (Cani et al. 2007). La «surnutrition» peut altérer le microbiote intestinal en modifiant les sources de nutriments disponibles, tout en augmentant la perméabilité intestinale et en augmentant les niveaux systémiques d'endotoxines (Frazier et al. 2011 ; Brun et al. 2007). Le microbiome chez les souris ob/ob obèses contenait moins de bactéroïdes et plus de Firmicutes par rapport aux souris maigres, d'où le changement de composition du microbiome était associé à une augmentation de la concentration plasmatique de LPS (Ley et al. 2005).

Notre modèle de rat soumis au régime MDD pendant la vie fœtale et pendant l'allaitement, suivi par une exposition à un régime HE à l'âge adulte et soumis à des injections répétées du LPS, a montré un poids corporel significativement inférieur chez les rats iMDD par rapport aux rats témoins (Figure 16). Cette différence était la conséquence du régime de restriction (MDD) comme montré dans la littérature (Bison et al. 2016; Bressenot et al. 2013; Kojima et Kangawa 2005; Pooya et al. 2012; Chen et al. 2011; Bossenmeyer-Pourié et al. 2010). L'ajout de régime HE à l'âge adulte ne permet pas de restaurer le poids chez les rats iMDD. Toutefois, les rats traités au LPS et exposés au régime HE ont montré un poids corporel supérieur à celui soumis uniquement au régime HE parmi les groupes iMDD et les groupes témoins. En accord avec ces observations, des souris traitées au LPS présentaient une teneur inférieure en lipides dans **les gouttelettes lipidiques (GLs) hépatiques** avec une fraction molaire réduite en ester de cholestérol et un rapport diacylglycérol/triacylglycérol supérieur à celui des témoins. Ceci était concomitant à une augmentation de la capacité de biosynthèse des lipides neutres et des taux de triacylglycérol dans les lipoprotéines plasmatiques (Arisqueta et al. 2013). Le LPS favorise la sortie des lipides du foie dans des conditions de stress. Des souris axéniques sont protégées contre l'obésité et le transfert de microbes intestinaux d'animaux élevés conventionnellement vers des animaux axéniques entraîne une augmentation spectaculaire de la teneur en graisse corporelle et de la résistance à l'insuline par exposition systémique à des lipopolysaccharides bactériens (Krajmalnik-Brown et al. 2012; Bäckhed et al. 2004). Une étude réalisée sur des souris transplantées avec un microbiote dysbiotique a également montré que le passage d'un régime alimentaire végétal pauvre en graisse ou polysaccharide à un régime alimentaire occidental riche en graisses et riche en sucre altérait le microbiote et l'homéostasie métabolique en un jour (Turnbaugh et al. 2009).

Lorsque l'endotoxémie métabolique a été induite pendant 4 semaines chez la souris par perfusion sous-cutanée continue de LPS, la glycémie à jeun, l'insulinémie et le gain de poids du corps entier, du foie et des tissus adipeux ont été augmentés de manière similaire à celle des souris nourries à un régime riche en graisse (Cani et al. 2007). L'exposition des adipocytes de mammifères au LPS induit l'expressions de chimiokines et de TNF α , l'activation de NF κ B et une diminution de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme oxydatif des lipides (Skugor et al. 2010). Ces données suggèrent un rôle du LPS dans le stockage des lipides. Des travaux dans notre laboratoire montrent que le régime iMDD altère la beta-oxydation des acides gras conduisant ainsi à l'accumulation des AGLs et à l'activation des voies inflammatoires telles que la voie NF κ B (Pooya et al. 2012; Bison et al. 2016). Dans le présent modèle, une augmentation significative du taux plasmatique d'AGLs a été observée non seulement chez les rats iMDD, mais également chez les rats iMDD / LPS (Figure 17), suggérant probablement un rôle du LPS en modulant le métabolisme des lipides et l'accumulation d'acides gras et par conséquent l'activation de l'inflammasome. Nos données ont montré une activation de la voie NF κ B manifestée par l'augmentation d'expression de pNF κ Bp65, la forme active de NF κ B p65 accompagnée par une augmentation de pI κ b α et une diminution de I κ b α dans les groupes iMDD/HE et iMDD/HE /LPS. Une analyse IHC est nécessaire pour confirmer la translocation de NF κ B dans le noyau. L'activation de NF κ B a déjà été observée chez des patients obèses atteints de NASH (Videla et al. 2009), chez des souris obèses (ob / ob) (Velayudham et al. 2009) et dans un modèle de NASH de rongeurs nourris avec un régime MCD (dela Peña et al. 2005). La caspase-1 clivée est augmentée également chez ces même rats. La caspase-1 clivée joue également un rôle dans la NASH chez les rongeurs soumis à des régimes MCD (Csak et al. 2011) ou HF (L. J. Dixon et al. 2013).

Les enzymes hépatiques **ASAT et ALAT** sont augmentées chez les rats déficients traités avec un régime HE avec ou sans exposition à des injections LPS. Ceci coïncide avec les données de Pooya *et al* et Bison *et al*, qui montrent une augmentation significative de ASAT chez les iMDD en comparaison avec les contrôles et augmentation du ratio ASAT /ALAT chez les iMDD /HE en comparaison aux rats iMDD respectivement. L'injection chronique de LPS ne semble pas avoir un effet significatif sur les enzymes hépatiques ; on n'observe pas de différence significative en ASAT et ALAT entre les rats iMDD /HE et iMDD/HE /LPS. Ces résultats sont en lien avec la NAFLD (Shneider, González-Peralta, et Roberts 2006). Bien que la NAFLD soit la cause la plus fréquente de la cytolysé hépatique dans le monde occidental, les conséquences à long terme sont mal caractérisées (Söderberg et al. 2010). Dans deux

études réalisées au début des années 1980, il était constaté que 56% des sujets asymptomatiques ayant subi une biopsie du foie, présentent des taux sériques élevés d'enzymes hépatiques et une stéatose (Hultcrantz et al. 1986; Hultcrantz et Gabrielsson 1993), mais les données sur la NASH n'étaient pas documentées (E. M. Brunt et al. 1999; Bacon et al. 1994). Des données récentes montrent que certaines personnes atteintes de NAFLD développent une NASH, ce qui peut entraîner une cirrhose et un risque élevé de carcinome hépatocellulaire (HCC) (Elisabetta Bugianesi et al. 2002). Les illustrations macroscopiques du foie des rats traités avec les régimes iMDD/HE et iMDD/HE/ LPS évoquent une stéatose que nous confirmerons au niveau histologique (Figure 18). Cependant, il n'y a pas de fibrose mise en évidence par l'expression des marqueurs profibrotiques (MMP 2 et COL1A1).

Un mécanisme possible de la NASH est l'induction de l'autophagie (Masouminia et al. 2016; Farrell, Haczeyni, et Chitturi 2018b; X. Wang et al. 2018). Il a été démontré que les composants de la voie autophagique s'associent aux GLs et jouent un rôle important dans leur dégradation (R. Singh, Xiang, et al. 2009). Dans notre modèle, l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes (CMA) semble être activée chez les rats déficients traités avec un régime HE avec ou sans exposition au LPS.

Plusieurs modèles animaux ont montré un rôle primordial de la translocation du LPS et de l'activation subséquente de la voie du TLR4 dans les pathomécanismes de la NASH. Des souris nourries au régime MCD développent une stéatohépatite par endotoxémie portale et une expression accrue du récepteur TLR4 (Rivera et al. 2007). Dans une autre étude, il a été démontré que les souris atteintes de NAFLD présentaient une augmentation des lésions hépatiques et une induction de cytokines inflammatoires après une induction avec un ligand de TLR4 (LPS) mais pas avec un ligand de TLR2 (Szabo et al. 2005).

Contrairement à ces données, nous n'avons pas trouvé d'activation de la voie TLR4, malgré l'administration intrapéritonéale de LPS qui génère une augmentation du poids, de la stéatose macroscopique et une activation de NF κ B chez les rats iMDD soumis à un régime HE. Nos résultats suggèrent donc que la NASH peut être induite sans passer par l'activation de la voie TLR4 et que le LPS pourrait agir via une autre voie. Il nous faut cependant compléter l'étude des voies d'activation de TLR4 de manière exhaustive pour formuler de manière définitive cette hypothèse.

En conclusion, nous pouvons conclure que notre modèle de régime iMDD pendant la gestation et l'allaitement et l'exposition ultérieure au régime HE produit une NASH très modérée, avec inflammation et stéatose, mais pas de fibrose. L'injection du LPS n'a aucun effet sur la sévérité de la NASH. La voie TLR4 ne semble pas être impliquée malgré le fait

que le LPS, le ligand spécifique de TLR4, a été injecté de manière chronique par voie intrapéritonéale.

Discussion générale

Les mécanismes physiopathologiques de la NASH ne sont pas connus à ce jour. Plusieurs modèles basés sur un régime animal ont été utilisés pour étudier les pathomécanismes de la NASH, lesquels différaient par la composition du régime nutritionnel. Ceux-ci incluent l'utilisation de régimes HF, CD, CDHF et MCD (Lau, Zhang, et Yu 2017a). Dans notre laboratoire, un modèle nutritionnel physiologique caractérisé par un régime MDD a été utilisé et s'est avéré efficace pour développer la NASH chez le rat (Pooya et al. 2012a; Bison et al. 2016a).

De nombreuses hypothèses ont été étudiées dans la littérature pour tenter de comprendre les mécanismes pathologiques exacts de la NASH et de trouver les interventions thérapeutiques correspondantes. Dans l'hypothèse traditionnelle, la stéatose hépatique est la première étape qui augmente la susceptibilité hépatique à l'inflammation et à la fibrose. Ce point de vue a été remis en cause. Il est maintenant admis que différents événements pathogènes se produisent de manière contemporaine et non consécutive (Tilg et Diehl 2000; Buzzetti, Pinzani, et Tsochatzis 2016). La résistance à l'insuline, la lipotoxicité, le stress oxydatif, le stress RE, le dysfonctionnement mitochondrial, le dysfonctionnement du tissu adipeux, l'altération de l'immunité innée, la sécrétion de cytokines, l'augmentation de la perméabilité intestinale et la translocation d'endotoxines bactériennes *via* l'axe intestin-foie sont autant de facteurs impliqués dans la pathogénie de la NASH (McClain et al. 2004 ; Than et Newsome 2015 ; Schuster et al. 2018 ; W. Liu et al. 2016 ; Than et Newsome 2015).

La NASH est plus fréquente chez les patients atteints de MICI que dans la population générale (McGowan et al. 2012 ; Sourianarayanan et al. 2013). Nous avons étudié si les MICI avaient une influence sur le développement de la NASH dans un modèle de colite induite par le DSS de rats adultes nourris avec un régime MDD. Nous avons observé une inflammation du foie et une stéatose chez des animaux MDD avec colite produite par le DSS. L'activation du marqueur pro-fibrotique MMP2 ne s'accompagnait pas de fibrose comme illustré par l'absence de changements histologiques et du niveau d'expression de l'alpha-SMA et du Col1A1. Nos conditions expérimentales n'ont montré aucune activation de TLR4, qui concordait avec un taux plasmatique normal de LPS malgré le fait que la littérature montre un rôle important de la voie TLR4 dans le mécanisme pathologique de la NASH. Des souris nourries avec un régime HE et traitées avec le DSS montrent un taux élevé de LPS portal et une augmentation d'expression de TLR4 et TLR9 (Gäbele et al. 2011). Une augmentation des taux de LPS portal est associée à une fibrose chez des souris nourries à un régime CDHF et traitées par DSS (Achiwa et al. 2016). Cependant, une augmentation du taux plasmatique de

MCP-1, IL-1beta ont été observés. Ces chimiokines/cytokines sont également élevées chez les patients atteints de MICI (Singh et al. 2016). L'augmentation de l'homocystéine produite par notre modèle MDD est également associée à une augmentation de MCP-1 et d'IL-1 β chez les patients atteints de MICI (Danese et al. 2005; Poddar et al. 2001). L'activation de la voie classique NF κ B est généralement déclenchée par des cytokines pro-inflammatoires, IL-1 β et TNF α . L'augmentation du niveau de MCP-1 pourrait donc être une conséquence de l'activation de NF κ B par IL-1 β comme observée dans les astrocytes de rats (Thompson et Van Eldik 2009). Il existe une augmentation d'expression de TNF α dans notre modèle expérimental de MICI. Cependant, il est peu probable que la production accrue de TNF α dans le côlon joue un rôle dans l'activation de NF κ B dans le foie, car nous n'avons pas observé de changement significatif de sa concentration sérique dans les quatre groupes de rats. MCP-1 est produit par les hépatocytes et les cellules étoilées hépatiques après induction de l'inflammation par le stress oxydatif et les cytokines proinflammatoires, y compris l'IL-1 β (Yoshimura et al. 1989). La voie MCP1-CCR2 joue un rôle essentiel dans le recrutement hépatique de macrophages pro-inflammatoires qui libèrent des TNF α , IL-1 β et IL-6 (Ju et Tacke 2016; Miura et al. 2012; Deshmane et al. 2009). CCR2 et MCP1 recrutent des monocytes dans le foie. Par conséquent, les macrophages dérivés de ces monocytes activent des myofibroblastes hépatiques qui libèrent VEGF et des métalloprotéases matricielles (Bocca et al. 2015). Des études expérimentales ont également montré que MCP-1 contribuait de manière systémique à la pathogénie de la NASH. L'inhibition pharmacologique de MCP-1 diminue l'infiltration de macrophages dans le foie et la stéatohépatite produites par le régime MCD (Baek et al. 2012). Dans une autre étude, l'inhibition du récepteur MCP-1 a entraîné une atténuation de la résistance à l'insuline induite par l'alimentation, de l'inflammation du tissu adipeux et de la NASH (Mulder, van den Hoek, et Kleemann 2017).

Ainsi, dans notre modèle, l'inflammation colique pourrait favoriser le développement de la NASH *via* la libération de médiateurs pro-inflammatoires, dont IL-1 β sans activation de TLR4. Nos travaux montrent une augmentation de MCP-1, sans que nous puissions conclure qu'il s'agit d'une cause ou d'une conséquence. Les données de la littérature suggèrent cependant que MCP-1 pourrait être une cible thérapeutique et nos travaux suggèrent que cette cible pourrait présenter un intérêt particulier pour les patients atteints de MICI développant une NASH et qui ont un taux élevé de MCP-1.

Dans la deuxième partie de ce projet, nous voulions décrypter l'implication de la voie TLR4 dans le développement de la NASH liée à la programmation foetale et l'exposition à un

régime HE en injectant de manière directe et répétitive du LPS par voie intrapéritonéale. Un modèle de rats soumis à un effet programmation fœtale par le régime iMDD et exposés au régime HE à l'âge adulte et injectés au LPS est utilisé afin de vérifier s'il existe une synergie entre le régime MDD pendant la gestation et la lactation, le régime HE et l'inflammation viscérale créée par l'injection de LPS.

L'activité des enzymes **ASAT** et **ALAT** est augmentée chez les rats iMDD avec un régime HE avec ou sans exposition supplémentaire à des injections LPS. Ceci est concordant avec les données de Pooya *et al* et Bison *et al*, qui montrent une augmentation significative de ASAT chez les iMDD en comparaison aux témoins et une augmentation de ratio ASAT/ALAT chez les animaux déficients en donneurs de méthyle et soumis à un régime hyperénergétique en comparaison aux rats soumis à une carence initiale en donneurs de méthyle respectivement. L'injection chronique de LPS semble ne pas avoir un effet significatif sur les enzymes hépatiques ; on n'observe pas de différence significative en ASAT et ALAT entre les rats iMDD/HE et iMDD/HE/LPS.

L'inflammation du foie a été mise en évidence par l'activation de la voie NFκB, caractérisée par une expression accrue de sa forme active pNFκB p65 chez les iMDD/HE et les iMDD/HE/LPS. Une augmentation de l'expression d'autres marqueurs de l'inflammasome, telle que de la caspase-1 clivée, a également été observée dans les deux groupes. Au total nos résultats montrent que l'association de la programmation fœtale iMDD et du régime HE produit une inflammation hépatique qui n'est pas aggravée par le LPS et n'induit pas l'activation des principales voies de signalisation liées à TLR4 par MDD ou par programmation fœtale iMDD. Plusieurs travaux de la littérature montrent un rôle important de TLR4 dans la pathogénie de la NASH. Des souris soumises au régime MCD développent une stéatohépatite par endotoxémie portale et ont une expression augmentée du récepteur TLR4 (Rivera et al. 2007). Il a été démontré chez la souris TLR4 sauvage en comparaison de la souris TLR4 mutante que la fibrose et l'inflammation hépatiques sont augmentées *via* les voies du TGF-β et du MYD88-NFκB (Seki et al. 2007). Une autre étude montre que des souris atteintes de NAFLD présentaient une augmentation des lésions hépatiques et de cytokines inflammatoires après induction par le ligand LPS de TLR4 mais pas avec un ligand de TLR2 (Szabo et al. 2005). Sans remettre en cause ces résultats, nos résultats sur les deux modèles, MDD/DSS et iMDD/HE suggèrent cependant que l'activation de TLR4 par le LPS n'est pas une condition nécessaire à la NASH.

Il a été montré dans d'autres modèles de NASH que les AGLs activent la voie du NFκB et conduisent à la production de cytokines. Dans notre modèle, une augmentation

significative du taux plasmatique d'AGLs a été observée chez les groupes de rats iMDD, plus particulièrement chez les rats iMDD et iMDD/LPS (Figure 17), suggérant probablement un rôle modulateur du LPS sur le métabolisme des lipides et l'accumulation d'acides gras et par conséquent l'activation de l'inflammasome. Le rôle spécifique du régime MDD doit cependant être pris en compte. En effet, des travaux dans notre laboratoire montrent que le régime iMDD altère la bêta-oxydation des acides gras conduisant ainsi à l'accumulation des AGLs et à l'activation des voies inflammatoires telles que la voie NFκB (Pooya et al. 2012a; Bison et al. 2016a). Par contre, l'expression des marqueurs fibrotiques n'a montré aucun changement au niveau hépatique dans ce modèle.

En conclusion, nos résultats confèrent un rôle de premier plan à MCP-1 et IL-1β dans la production de la NASH liée à l'inflammation colique, tout au moins dans nos conditions expérimentales. Ces données suggèrent de rechercher plus avant si les patients atteints de MICI présentant une augmentation systémique de MCP-1 ont un risque plus élevé de développer une NASH et si l'inhibition de MCP-1 pourrait constituer une cible thérapeutique. Par ailleurs, nos résultats infirment l'hypothèse que le couple TLR4/LPS joue un rôle canonique dans la physiopathologie de la NASH.

Références bibliographiques

Achiwa, Koichi, Masatoshi Ishigami, Yoji Ishizu, Teiji Kuzuya, Takashi Honda, Kazuhiko Hayashi, Yoshiaki Hirooka, Yoshiaki Katano, et Hidemi Goto. 2016. « DSS Colitis Promotes Tumorigenesis and Fibrogenesis in a Choline-Deficient High-Fat Diet-Induced NASH Mouse Model ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 470 (1): 15- 21. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.12.012>.

Aigner, Elmar, Igor Theurl, Heike Haufe, Markus Seifert, Florian Hohla, Ludwig Scharinger, Felix Stickel, Frederic Mourlane, Günter Weiss, et Christian Datz. 2008. « Copper Availability Contributes to Iron Perturbations in Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease ». *Gastroenterology* 135 (2): 680- 88. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.04.007>.

Aigner, Elmar, Günter Weiss, et Christian Datz. 2015. « Dysregulation of Iron and Copper Homeostasis in Nonalcoholic Fatty Liver ». *World Journal of Hepatology* 7 (2): 177- 88. <https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i2.177>.

Akbulut, Sabiye, Emin Altiparmak, Firdevs Topal, Ersan Ozaslan, Metin Kucukazman, et Ozlem Yonem. 2010. « Increased Levels of Homocysteine in Patients with Ulcerative Colitis ». *World Journal of Gastroenterology* 16 (19): 2411- 16.

Akchiche, Nassila, Carine Bossenmeyer-Pourié, Racha Kerek, Nicolas Martin, Grégory Pourié, Violette Koziel, Déborah Helle, et al. 2012. « Homocysteinylation of Neuronal Proteins Contributes to Folate Deficiency-Associated Alterations of Differentiation, Vesicular Transport, and Plasticity in Hippocampal Neuronal Cells ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 26 (10): 3980- 92. <https://doi.org/10.1096/fj.12-205757>.

Al-Attas, Omar S, Nasser M Al-Daghri, Khalid Al-Rubeaan, Nancy F da Silva, Shaun L Sabico, Sudhesh Kumar, Philip G McTernan, et Alison L Harte. 2009. « Changes in endotoxin levels in T2DM subjects on anti-diabetic therapies ». *Cardiovascular Diabetology* 8 (avril): 20. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-8-20>.

Alisi, Anna, Melania Manco, Rita Devito, Fiorella Piemonte, et Valerio Nobili. 2010. « Endotoxin and Plasminogen Activator Inhibitor-1 Serum Levels Associated with Nonalcoholic Steatohepatitis in Children ». *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 50 (6): 645- 49. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181c7bdf1>.

Al-Rasadi, Khalid, Manfredi Rizzo, Giuseppe Montalto, et Gabriela Berg. 2015. « Nonalcoholic Fatty Liver Disease, Cardiovascular Risk, and Carotid Inflammation ». *Angiology* 66 (7): 601- 3. <https://doi.org/10.1177/0003319714557353>.

Amar, Jacques, Rémy Burcelin, Jean Bernard Ruidavets, Patrice D. Cani, Josette Fauvel, Marie Christine Alessi, Bernard Chamontin, et Jean Ferrières. 2008. « Energy Intake Is Associated with Endotoxemia in Apparently Healthy Men ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 87 (5): 1219- 23. <https://doi.org/10.1093/ajcn/87.5.1219>.

Anstee, Quentin M., et Christopher P. Day. 2013. « The Genetics of NAFLD ». *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 10 (11): 645- 55. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.182>.

Antony, Asok C. 2007. « In Utero Physiology: Role of Folic Acid in Nutrient Delivery and Fetal Development ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 85 (2): 598S-603S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/85.2.598S>.

Araya, Julia, Ramón Rodrigo, Luis A. Videla, Lilian Thielemann, Myriam Orellana, Paulina Pettinelli, et Jaime Poniachik. 2004. « Increase in Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid n - 6/n - 3 Ratio in Relation to Hepatic Steatosis in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease ». *Clinical Science (London, England: 1979)* 106 (6): 635- 43. <https://doi.org/10.1042/CS20030326>.

Arisqueta, Lino, Maitane Nuñez-Garcia, Jesus Ogando, Itsaso Garcia-Arcos, Begoña Ochoa, Patricia Aspichueta, Olatz Fresnedo, et Yuri Rueda. 2013. « Involvement of Lipid Droplets in Hepatic Responses to Lipopolysaccharide Treatment in Mice ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1831 (8): 1357- 67. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.04.015>.

Asgharpour, Amon, Sophie C. Cazanave, Tommy Pacana, Mulugeta Seneshaw, Robert Vincent, Bubu A. Banini, Divya Prasanna Kumar, et al. 2016. « A diet-induced animal model of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular cancer ». *Journal of hepatology* 65 (3): 579- 88. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.05.005>.

Bäckhed, Fredrik, Hao Ding, Ting Wang, Lora V. Hooper, Gou Young Koh, Andras Nagy, Clay F. Semenkovich, et Jeffrey I. Gordon. 2004. « The Gut Microbiota as an Environmental Factor That Regulates Fat Storage ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (44): 15718- 23. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407076101>.

Bacon, B. R., M. J. Farahvash, C. G. Janney, et B. A. Neuschwander-Tetri. 1994. « Nonalcoholic Steatohepatitis: An Expanded Clinical Entity ». *Gastroenterology* 107 (4): 1103- 9.

Baeck, Christer, Alexander Wehr, Karlin Raja Karlmark, Felix Heymann, Mihael Vucur, Nikolaus Gassler, Sebastian Huss, et al. 2012. « Pharmacological Inhibition of the Chemokine CCL2 (MCP-1) Diminishes Liver Macrophage Infiltration and Steatohepatitis in Chronic Hepatic Injury ». *Gut* 61 (3): 416- 26. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-300304>.

Barker, D J, et C Osmond. 1986a. « Diet and coronary heart disease in England and Wales during and after the second world war. » *Journal of Epidemiology and Community Health* 40 (1): 37- 44. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1052486/>.

Barker, D. J., et C. Osmond. 1986b. « Infant Mortality, Childhood Nutrition, and Ischaemic Heart Disease in England and Wales ». *Lancet (London, England)* 1 (8489): 1077- 81.

Barquera, Simon, Lucia Hernandez-Barrera, Maria Lizbeth Tolentino, Juan Espinosa, Shu Wen Ng, Juan A. Rivera, et Barry M. Popkin. 2008. « Energy Intake from Beverages Is Increasing among Mexican Adolescents and Adults ». *The Journal of Nutrition* 138 (12): 2454- 61. <https://doi.org/10.3945/jn.108.092163>.

Battaglia-Hsu, Shyue-fang, Nassila Akchiche, Nicole Noel, Jean-Marc Alberto, Elise Jeannesson, Carlos Enrique Orozco-Barrios, Daniel Martinez-Fong, Jean-Luc Daval, et Jean-Louis Guéant. 2009. « Vitamin B12 Deficiency Reduces Proliferation and Promotes Differentiation of Neuroblastoma Cells and Up-Regulates PP2A, ProNGF, and TACE ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (51): 21930- 35. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811794106>.

Baumgart, Martin, Belgin Dogan, Mark Rishniw, Gil Weitzman, Brian Bosworth, Rhonda Yantiss, Renato H. Orsi, et al. 2007. « Culture Independent Analysis of Ileal Mucosa Reveals a Selective Increase in Invasive Escherichia Coli of Novel Phylogeny Relative to Depletion of Clostridiales in Crohn's Disease Involving the Ileum ». *The ISME Journal* 1 (5): 403- 18. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.52>.

Becker, C., M. C. Fantini, S. Wirtz, A. Nikolaev, R. Kiesslich, H. A. Lehr, P. R. Galle, et M. F. Neurath. 2005. « In Vivo Imaging of Colitis and Colon Cancer Development in Mice Using High Resolution Chromoendoscopy ». *Gut* 54 (7): 950- 54. <https://doi.org/10.1136/gut.2004.061283>.

Bedossa, Pierre. 2017. « Pathology of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease ». *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver* 37 Suppl 1: 85- 89. <https://doi.org/10.1111/liv.13301>.

Begrache, Karima, Anissa Igoudjil, Dominique Pessayre, et Bernard Fromenty. 2006. « Mitochondrial Dysfunction in NASH: Causes, Consequences and Possible Means to Prevent It ». *Mitochondrion* 6 (1): 1- 28. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2005.10.004>.

Bell, Eric L., et Navdeep S. Chandel. 2007. « Genetics of Mitochondrial Electron Transport Chain in Regulating Oxygen Sensing ». *Methods in Enzymology* 435: 447- 61. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)35023-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)35023-4).

Benoist, Bruno de. 2008. « Conclusions of a WHO Technical Consultation on Folate and Vitamin B12 Deficiencies ». *Food and Nutrition Bulletin* 29 (2_suppl1): S238- 44. <https://doi.org/10.1177/15648265080292S129>.

Berg, Rodney D. 1996. « The indigenous gastrointestinal microflora ». *Trends in Microbiology* 4 (11): 430- 35. [https://doi.org/10.1016/0966-842X\(96\)10057-3](https://doi.org/10.1016/0966-842X(96)10057-3).

Bernstein, Charles N., et Alice Nabalamba. 2006. « Hospitalization, Surgery, and Readmission Rates of IBD in Canada: A Population-Based Study ». *The American Journal of Gastroenterology* 101 (1): 110- 18. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.00330.x>.

Bessissow, Talat, Ngoc Han Le, Kathleen Rollet, Waqqas Afif, Alain Bitton, et Giada Sebastiani. 2016. « Incidence and Predictors of Nonalcoholic Fatty Liver Disease by Serum Biomarkers in Patients with Inflammatory Bowel Disease ». *Inflammatory Bowel Diseases* 22 (8): 1937- 44. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000832>.

Bettermann, Kira, Tabea Hohensee, et Johannes Haybaeck. 2014. « Steatosis and Steatohepatitis: Complex Disorders ». *International Journal of Molecular Sciences* 15 (6): 9924- 44. <https://doi.org/10.3390/ijms15069924>.

Birkenfeld, Andreas L., et Gerald I. Shulman. 2014. « Nonalcoholic Fatty Liver Disease, Hepatic Insulin Resistance, and Type 2 Diabetes ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 59 (2): 713- 23. <https://doi.org/10.1002/hep.26672>.

Bison, Anaïs, Aude Marchal-Bressenot, Zhen Li, Ilef Elamouri, Eva Feigerlova, Lu Peng, Remi Houlgatte, et al. 2016a. « Foetal Programming by Methyl Donor Deficiency Produces Steato-Hepatitis in Rats Exposed to High Fat Diet ». *Scientific Reports* 6: 37207. <https://doi.org/10.1038/srep37207>.

Blaise, Sébastien A., Emmanuelle Nédélec, Jean-Marc Alberto, Henri Schroeder, Sandra Audonnet, Carine Bossenmeyer-Pourrié, Jean-Louis Guéant, et Jean-Luc Daval. 2009. « Short Hypoxia Could Attenuate the Adverse Effects of Hyperhomocysteinemia on the Developing Rat Brain by Inducing Neurogenesis ». *Experimental Neurology* 216 (1): 231- 38. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2008.11.020>.

Blaise, Sébastien A., Emmanuelle Nédélec, Henri Schroeder, Jean-Marc Alberto, Carine Bossenmeyer-Pourrié, Jean-Louis Guéant, et Jean-Luc Daval. 2007. « Gestational Vitamin B Deficiency Leads to Homocysteine-Associated Brain Apoptosis and Alters Neurobehavioral Development in Rats ». *The American Journal of Pathology* 170 (2): 667- 79. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060339>.

Blaise, Sébastien, Jean-Marc Alberto, Emmanuelle Nédélec, Ahmet Ayav, Grégory Pourrié, Jean-Pierre Bronowicki, Jean-Louis Guéant, et Jean-Luc Daval. 2005. « Mild Neonatal Hypoxia Exacerbates the Effects of Vitamin-Deficient Diet on Homocysteine Metabolism in Rats ». *Pediatric Research* 57 (6): 777- 82. <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000161406.19231.98>.

Blom, Henk J., et Yvo Smulders. 2011. « Overview of Homocysteine and Folate Metabolism. With Special References to Cardiovascular Disease and Neural Tube Defects ». *Journal of Inherited Metabolic Disease* 34 (1): 75- 81. <https://doi.org/10.1007/s10545-010-9177-4>.

Bocca, Claudia, Erica Novo, Antonella Miglietta, et Maurizio Parola. 2015. « Angiogenesis and Fibrogenesis in Chronic Liver Diseases ». *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 1 (5): 477- 88. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2015.06.011>.

Bogaert, Sara, Martine De Vos, Kim Olievier, Harald Peeters, Dirk Elewaut, Bart Lambrecht, Philippe Pouliot, et Debby Laukens. 2011. « Involvement of Endoplasmic Reticulum Stress in Inflammatory Bowel Disease: A Different Implication for Colonic and Ileal Disease? » *PloS One* 6 (10): e25589. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025589>.

Bossenmeyer-Pourrié, Carine, Sébastien Blaise, Grégory Pourrié, Catherine Tomasetto, Sandra Audonnet, Sandrine Ortiou, Violette Koziel, et al. 2010a. « Methyl Donor Deficiency Affects Fetal Programming of Gastric Ghrelin Cell Organization and Function in the Rat ». *The American Journal of Pathology* 176 (1): 270- 77. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090153>.

Bossenmeyer-Pourié, Carine, Grégory Pourié, Violette Koziel, Deborah Helle, Elise Jeannesson, Jean-Louis Guéant, et Bernard Beck. 2013. « Early Methyl Donor Deficiency Produces Severe Gastritis in Mothers and Offspring through N-Homocysteinylolation of Cytoskeleton Proteins, Cellular Stress, and Inflammation ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 27 (6): 2185- 97. <https://doi.org/10.1096/fj.12-224642>.

Bottiglieri, Teodoro. 2005. « Homocysteine and Folate Metabolism in Depression ». *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 29 (7): 1103- 12. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2005.06.021>.

Boursier, Jérôme, Olaf Mueller, Matthieu Barret, Mariana Machado, Lionel Fizanne, Felix Araujo-Perez, Cynthia D. Guy, et al. 2016. « The severity of NAFLD is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 63 (3): 764- 75. <https://doi.org/10.1002/hep.28356>.

Bray, George A., Samara Joy Nielsen, et Barry M. Popkin. 2004. « Consumption of High-Fructose Corn Syrup in Beverages May Play a Role in the Epidemic of Obesity ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 79 (4): 537- 43. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.4.537>.

Bressenot, Aude, Shabnam Pooya, Carine Bossenmeyer-Pourie, Guillaume Gauchotte, Adeline Germain, Jean-Baptiste Chevaux, Florence Coste, Jean-Michel Vignaud, Jean-Louis Guéant, et Laurent Peyrin-Biroulet. 2013. « Methyl Donor Deficiency Affects Small-Intestinal Differentiation and Barrier Function in Rats ». *British Journal of Nutrition* 109 (04): 667- 77. <https://doi.org/10.1017/S0007114512001869>.

Brun, Paola, Ignazio Castagliuolo, Vincenza Di Leo, Andrea Buda, Massimo Pinzani, Giorgio Palù, et Diego Martines. 2007. « Increased Intestinal Permeability in Obese Mice: New Evidence in the Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis ». *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 292 (2): G518- 25. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00024.2006>.

Brunt, E. M., C. G. Janney, A. M. Di Bisceglie, B. A. Neuschwander-Tetri, et B. R. Bacon. 1999. « Nonalcoholic Steatohepatitis: A Proposal for Grading and Staging the Histological Lesions ». *The American Journal of Gastroenterology* 94 (9): 2467- 74. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.1999.01377.x>.

Brunt, Elizabeth M., Vincent W.-S. Wong, Valerio Nobili, Christopher P. Day, Silvia Sookoian, Jacquelyn J. Maher, Elisabetta Bugianesi, Claude B. Sirlin, Brent A. Neuschwander-Tetri, et Mary E. Rinella. 2015. « Nonalcoholic Fatty Liver Disease ». *Nature Reviews Disease Primers*, décembre, 15080. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.80>.

Bugianesi, E., S. Moscatiello, M. F. Ciaravella, et G. Marchesini. 2010. « Insulin Resistance in Nonalcoholic Fatty Liver Disease ». *Current Pharmaceutical Design* 16 (17): 1941- 51.

Bugianesi, Elisabetta, Nicola Leone, Ester Vanni, Giulio Marchesini, Franco Brunello, Patrizia Carucci, Alessandro Musso, et al. 2002. « Expanding the Natural History of Nonalcoholic Steatohepatitis: From Cryptogenic Cirrhosis to Hepatocellular Carcinoma ». *Gastroenterology* 123 (1): 134- 40.

Buzzetti, Elena, Massimo Pinzani, et Emmanuel A. Tsochatzis. 2016. « The Multiple-Hit Pathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) ». *Metabolism* 65 (8): 1038- 48. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.12.012>.

Caballero, Francisco, Anna Fernández, Nuria Matías, Laura Martínez, Raquel Fucho, Montserrat Elena, Joan Caballeria, Albert Morales, José C. Fernández-Checa, et Carmen García-Ruiz. 2010. « Specific Contribution of Methionine and Choline in Nutritional Nonalcoholic Steatohepatitis: Impact on Mitochondrial S-Adenosyl-L-Methionine and Glutathione ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (24): 18528- 36. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.099333>.

Caldwell, S. H., D. H. Oelsner, J. C. Iezzoni, E. E. Hespenheide, E. H. Battle, et C. J. Driscoll. 1999. « Cryptogenic Cirrhosis: Clinical Characterization and Risk Factors for Underlying Disease ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 29 (3): 664- 69. <https://doi.org/10.1002/hep.510290347>.

Cani, Patrice D., Jacques Amar, Miguel Angel Iglesias, Marjorie Poggi, Claude Knauf, Delphine Bastelica, Audrey M. Neyrinck, et al. 2007. « Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance ». *Diabetes* 56 (7): 1761- 72. <https://doi.org/10.2337/db06-1491>.

Cani, Patrice D., Rodrigo Bibiloni, Claude Knauf, Aurélie Waget, Audrey M. Neyrinck, Nathalie M. Delzenne, et Rémy Burcelin. 2008. « Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice ». *Diabetes* 57 (6): 1470- 81. <https://doi.org/10.2337/db07-1403>.

Cantó, Carles, et Johan Auwerx. 2009. « PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an Energy Sensing Network That Controls Energy Expenditure ». *Current Opinion in Lipidology* 20 (2): 98- 105. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e328328d0a4>.

Cantó C, Auwerx J. 2012. « Targeting Sirtuin 1 to Improve Metabolism: All You Need Is NAD(+)? » *Pharmacological Reviews* 64 (1): 166- 87. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003905>.

Carotti, Simone, Umberto Vespasiani-Gentilucci, Giuseppe Perrone, Antonio Picardi, et Sergio Morini. 2015. « Portal Inflammation during NAFLD Is Frequent and Associated with the Early Phases of Putative Hepatic Progenitor Cell Activation ». *Journal of Clinical Pathology* 68 (11): 883- 90. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2014-202717>.

Ceccarelli, D., D. Gallesi, F. Giovannini, M. Ferrali, et A. Masini. 1995. « Relationship between Free Iron Level and Rat Liver Mitochondrial Dysfunction in Experimental Dietary Iron Overload ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 209 (1): 53- 59. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1469>.

Chandel, N. S., E. Maltepe, E. Goldwasser, C. E. Mathieu, M. C. Simon, et P. T. Schumacker. 1998. « Mitochondrial Reactive Oxygen Species Trigger Hypoxia-Induced Transcription ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (20): 11715- 20.

Chen, Min, Laurent Peyrin-Biroulet, Amandine George, Florence Coste, Aude Bressenot, Carine Bossenmeyer-Pourie, Jean-Marc Alberto, Bing Xia, Bernard Namour, et Jean-Louis Guéant. 2011. « Methyl Deficient Diet Aggravates Experimental Colitis in Rats ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 15 (11): 2486- 97. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01252.x>.

Coelho, D., Suormala, T., Stucki, M., Lerner-Ellis, J. P., Rosenblatt, D. S., Newbold, R. F., Baumgartner, M. R., and Fowler, B. (2008) Gene Identification for the cblD Defect of Vitamin B₁₂ Metabolism. *N. Engl. J. Med.* **358**, 1454–1464

Conterno, Lorenza, Francesca Fava, Roberto Viola, et Kieran M. Tuohy. 2011. « Obesity and the Gut Microbiota: Does up-Regulating Colonic Fermentation Protect against Obesity and Metabolic Disease? » *Genes & Nutrition* 6 (3): 241- 60. <https://doi.org/10.1007/s12263-011-0230-1>.

Corbin, Karen D., et Steven H. Zeisel. 2012. « Choline Metabolism Provides Novel Insights into Non-alcoholic Fatty Liver Disease and its Progression ». *Current opinion in gastroenterology* 28 (2): 159- 65. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e32834e7b4b>.

Coste, Agnès, Jean-Francois Louet, Marie Lagouge, Carles Lerin, Maria Cristina Antal, Hamid Meziane, Kristina Schoonjans, Pere Puigserver, Bert W. O'Malley, et Johan Auwerx. 2008. « The Genetic Ablation of SRC-3 Protects against Obesity and Improves Insulin Sensitivity by Reducing the Acetylation of PGC-1{alpha} ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (44): 17187- 92. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808207105>.

Crescenzo, Raffaella, Francesca Bianco, Italia Falcone, Paola Coppola, Giovanna Liverini, et Susanna Iossa. 2013. « Increased Hepatic de Novo Lipogenesis and Mitochondrial Efficiency in a Model of Obesity Induced by Diets Rich in Fructose ». *European Journal of Nutrition* 52 (2): 537- 45. <https://doi.org/10.1007/s00394-012-0356-y>.

Csak, Timea, Michal Ganz, Justin Pespisa, Karen Kodys, Angela Dolganiuc, et Gyongyi Szabo. 2011. « Fatty Acid and Endotoxin Activate Inflammasomes in Mouse Hepatocytes that Release Danger Signals to Stimulate Immune Cells ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 54 (1): 133- 44. <https://doi.org/10.1002/hep.24341>.

Cui, Xiangli, Yu Jin, Anne B. Hofseth, Edsel Pena, Joshua Habiger, Alexander Chumanevich, Deepak Poudyal, et al. 2010. « Resveratrol Suppresses Colitis and Colon Cancer Associated with Colitis ». *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)* 3 (4): 549- 59. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-09-0117>.

Danese, Silvio, Alessandro Sgambato, Alfredo Papa, Franco Scaldaferrri, Roberto Pola, Miquel Sans, Maria Lovecchio, Giovanni Gasbarrini, Achille Cittadini, et Antonio Gasbarrini. 2005. « Homocysteine Triggers Mucosal Microvascular Activation in Inflammatory Bowel Disease ». *The American Journal of Gastroenterology* 100 (4): 886- 95. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2005.41469.x>.

Daval, Jean-Luc, Sébastien Blaise, et Jean-Louis Guéant. 2009. « Vitamin B Deficiency Causes Neural Cell Loss and Cognitive Impairment in the Developing Rat ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (1): E1; author reply E2. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809217106>.

Delzenne, Patrice D. Cani and Nathalie M. 2009. « The Role of the Gut Microbiota in Energy Metabolism and Metabolic Disease ». *Current Pharmaceutical Design*. 1 mai 2009. <http://www.eurekaselect.com/69216/article>.

Deshmane, Satish L., Sergey Kremlev, Shohreh Amini, et Bassel E. Sawaya. 2009. « Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview ». *Journal of Interferon & Cytokine Research* 29 (6): 313- 26. <https://doi.org/10.1089/jir.2008.0027>.

Dixon, Laura J., Chris A. Flask, Bettina G. Papouchado, Ariel E. Feldstein, et Laura E. Nagy. 2013. « Caspase-1 as a Central Regulator of High Fat Diet-Induced Non-Alcoholic Steatohepatitis ». *PLoS ONE* 8 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056100>.

Dixon, Scott J., et Brent R. Stockwell. 2014. « The Role of Iron and Reactive Oxygen Species in Cell Death ». *Nature Chemical Biology* 10 (1): 9- 17. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1416>.

Dongiovanni, Paola, Stefano Romeo, et Luca Valenti. 2015. « Genetic Factors in the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver and Steatohepatitis ». *BioMed Research International* 2015: 460190. <https://doi.org/10.1155/2015/460190>.

Donnelly, Kerry L., Coleman I. Smith, Sarah J. Schwarzenberg, Jose Jessurun, Mark D. Boldt, et Elizabeth J. Parks. 2005. « Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease ». *Journal of Clinical Investigation* 115 (5): 1343- 51. <https://doi.org/10.1172/JCI200523621>.

Dudley, Kevin J., Deborah M. Sloboda, Kristin L. Connor, Jacques Beltrand, et Mark H. Vickers. 2011. « Offspring of Mothers Fed a High Fat Diet Display Hepatic Cell Cycle Inhibition and Associated Changes in Gene Expression and DNA Methylation ». *PloS One* 6 (7): e21662. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021662>.

Duffey, Kiyah J., et Barry M. Popkin. 2007. « Shifts in Patterns and Consumption of Beverages between 1965 and 2002 ». *Obesity (Silver Spring, Md.)* 15 (11): 2739- 47. <https://doi.org/10.1038/oby.2007.326>.

Erridge, Clett, Teresa Attina, Corinne M. Spickett, et David J. Webb. 2007. « A High-Fat Meal Induces Low-Grade Endotoxemia: Evidence of a Novel Mechanism of Postprandial Inflammation ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 86 (5): 1286- 92. <https://doi.org/10.1093/ajcn/86.5.1286>.

Farhadi, Ashkan, Sushama Gundlapalli, Maliha Shaikh, Constantine Frantzides, Laura Harrell, Mary M. Kwasny, et Ali Keshavarzian. 2008. « Susceptibility to Gut Leakiness: A Possible Mechanism for Endotoxaemia in Non-Alcoholic Steatohepatitis ». *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver* 28 (7): 1026- 33. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2008.01723.x>.

Farrell, Geoffrey C., Fahrettin Haczeyni, et Shivakumar Chitturi. 2018a. « Pathogenesis of NASH: How Metabolic Complications of Overnutrition Favour Lipotoxicity and Pro-Inflammatory Fatty Liver Disease ». In *Obesity, Fatty Liver and Liver Cancer*, 19- 44. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8684-7_3.

Faubion, W. A., E. V. Loftus, W. J. Sandborn, D. K. Freese, et J. Perrault. 2001. « Pediatric “PSC-IBD”: A Descriptive Report of Associated Inflammatory Bowel Disease among Pediatric Patients with Psc ». *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 33 (3): 296- 300.

Forges, Thierry, P. Monnier-Barbarino, J. M. Alberto, R. M. Guéant-Rodriguez, J. L. Daval, et J. L. Guéant. 2007. « Impact of Folate and Homocysteine Metabolism on Human Reproductive Health ». *Human Reproduction Update* 13 (3): 225- 38. <https://doi.org/10.1093/humupd/dml063>.

Frazier, Thomas H., Abigail M. Stocker, Nicole A. Kershner, Luis S. Marsano, et Craig J. McClain. 2011. « Treatment of alcoholic liver disease ». *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 4 (1): 63- 81. <https://doi.org/10.1177/1756283X10378925>.

Fujii, Hideki, et Norifumi Kawada. 2012. « Inflammation and Fibrogenesis in Steatohepatitis ». *Journal of Gastroenterology* 47 (3): 215- 25. <https://doi.org/10.1007/s00535-012-0527-x>.

Gäbele, Erwin, Karin Dostert, Claudia Hofmann, Reiner Wiest, Jürgen Schölmerich, Claus Hellerbrand, et Florian Obermeier. 2011. « DSS Induced Colitis Increases Portal LPS Levels and Enhances Hepatic Inflammation and Fibrogenesis in Experimental NASH ». *Journal of Hepatology* 55 (6): 1391- 99. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.02.035>.

Galaris, Dimitrios, et Kostas Pantopoulos. 2008. « Oxidative Stress and Iron Homeostasis: Mechanistic and Health Aspects ». *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 45 (1): 1- 23. <https://doi.org/10.1080/10408360701713104>.

Garcia, Maira Moreno, Rosa-Maria Guéant-Rodriguez, Shabnam Pooya, Patrick Brachet, Jean-Marc Alberto, Elise Jeannesson, Fathia Maskali, et al. 2011. « Methyl Donor Deficiency Induces Cardiomyopathy through Altered Methylation/Acetylation of PGC-1 α by PRMT1 and SIRT1 ». *The Journal of Pathology* 225 (3): 324- 35. <https://doi.org/10.1002/path.2881>.

Gerhard, G. T., et P. B. Duell. 1999. « Homocysteine and Atherosclerosis ». *Current Opinion in Lipidology* 10 (5): 417- 28.

Ghemrawi, R., S. Pooya, S. Lorentz, G. Gauchotte, C. Arnold, J.-L. Gueant, et S.-F. Battaglia-Hsu. 2013. « Decreased Vitamin B12 Availability Induces ER Stress through Impaired SIRT1-Deacetylation of HSF1 ». *Cell Death & Disease* 4 (mars): e553. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.69>.

Ghoshal, Sarbani, Jassir Witta, Jian Zhong, Willem de Villiers, et Erik Eckhardt. 2009. « Chylomicrons Promote Intestinal Absorption of Lipopolysaccharides ». *Journal of Lipid Research* 50 (1): 90- 97. <https://doi.org/10.1194/jlr.M800156-JLR200>.

Goh, George Boon-Bee, et Arthur J. McCullough. 2016. « Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease ». *Digestive Diseases and Sciences* 61 (5): 1226- 33. <https://doi.org/10.1007/s10620-016-4095-4>.

Guéant, Jean-Louis, Rania Elakoum, Olivier Ziegler, David Coelho, Eva Feigerlova, Jean-Luc Daval, et Rosa-Maria Guéant-Rodriguez. 2014. « Nutritional Models of Foetal Programming and Nutrigenomic and Epigenomic Dysregulations of Fatty Acid Metabolism in the Liver and Heart ». *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* 466 (5): 833- 50. <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1339-4>.

Guéant, Jean-Louis, Rosa-Maria Guéant-Rodriguez, Guido Anello, Paolo Bosco, Laurent Brunaud, Corrado Romano, Rafaele Ferri, Antonino Romano, Mirande Candito, et Bernard Namour. 2003. « Genetic Determinants of Folate and Vitamin B12 Metabolism: A Common Pathway in Neural Tube Defect and Down Syndrome? » *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 41 (11): 1473- 77. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2003.226>.

Guéant, Jean-Louis, Fares Namour, Rosa-Maria Guéant-Rodriguez, et Jean-Luc Daval. 2013. « Folate and Fetal Programming: A Play in Epigenomics? » *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 24 (6): 279- 89. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.01.010>.

Guilherme, Adilson, Joseph V. Virbasius, Vishwajeet Puri, et Michael P. Czech. 2008. « Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes ». *Nature reviews. Molecular cell biology* 9 (5): 367- 77. <https://doi.org/10.1038/nrm2391>.

Halfvarson, Jonas, Lennart Bodin, Curt Tysk, Eva Lindberg, et Gunnar Järnerot. 2003. « Inflammatory Bowel Disease in a Swedish Twin Cohort: A Long-Term Follow-up of Concordance and Clinical Characteristics ». *Gastroenterology* 124 (7): 1767- 73. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(03\)00385-8](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(03)00385-8).

Hamanaka, Robert B., et Navdeep S. Chandel. 2010. « Mitochondrial Reactive Oxygen Species Regulate Cellular Signaling and Dictate Biological Outcomes ». *Trends in Biochemical Sciences* 35 (9): 505- 13. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.04.002>.

Harte, Alison L., Nancy F. da Silva, Steven J. Creely, Kirsty C. McGee, Thomas Billyard, Elham M. Youssef-Elabd, Gyanendra Tripathi, et al. 2010. « Elevated Endotoxin Levels in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease ». *Journal of Inflammation (London, England)* 7 (mars): 15. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-7-15>.

Hassan, Kareem, Varun Bhalla, Mohammed Ezz El Regal, et H. Hesham A-Kader. 2014. « Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Comprehensive Review of a Growing Epidemic ». *World Journal of Gastroenterology* 20 (34): 12082- 101. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i34.12082>.

Henao-Mejia, Jorge, Eran Elinav, Chengcheng Jin, Liming Hao, Wajahat Z. Mehal, Till Strowig, Christoph A. Thaiss, et al. 2012. « Inflammasome-Mediated Dysbiosis Regulates Progression of NAFLD and Obesity ». *Nature* 482 (7384): 179- 85. <https://doi.org/10.1038/nature10809>.

Hersoug, L.-G., P. Møller, et S. Loft. 2016. « Gut Microbiota-Derived Lipopolysaccharide Uptake and Trafficking to Adipose Tissue: Implications for Inflammation and Obesity ». *Obesity Reviews* 17 (4): 297- 312. <https://doi.org/10.1111/obr.12370>.

Holness, M. J., Caton, P. W., and Sugden, M. C. (2010) Acute and long-term nutrient-led modifications of gene expression: potential role of SIRT1 as a central co-ordinator of short and longer-term programming of tissue function. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* **26**, 491–501.

Hugot, Jean-Pierre, Corinne Alberti, Dominique Berrebi, Edouard Bingen, et Jean-Pierre Cézard. 2003. « Crohn's Disease: The Cold Chain Hypothesis ». *The Lancet* 362 (9400): 2012- 15. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)15024-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)15024-6).

Hultcrantz, R., et N. Gabrielsson. 1993. « Patients with Persistent Elevation of Aminotransferases: Investigation with Ultrasonography, Radionuclide Imaging and Liver Biopsy ». *Journal of Internal Medicine* 233 (1): 7- 12.

Hultcrantz, R., H. Glaumann, G. Lindberg, et L. H. Nilsson. 1986. « Liver Investigation in 149 Asymptomatic Patients with Moderately Elevated Activities of Serum Aminotransferases ». *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 21 (1): 109- 13.

Iyer, Ramya, et S. K. Tomar. 2009. « Folate: A Functional Food Constituent ». *Journal of Food Science* 74 (9): R114-122. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01359.x>.

Jaenisch, Rudolf, et Adrian Bird. 2003. « Epigenetic Regulation of Gene Expression: How the Genome Integrates Intrinsic and Environmental Signals ». *Nature Genetics* 33 Suppl (mars): 245- 54. <https://doi.org/10.1038/ng1089>.

Jia, Wei, et Cynthia Rajani. 2018. « The Influence of Gut Microbial Metabolism on the Development and Progression of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1061: 95- 110. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8684-7_8.

Jeninga, E. H., Schoonjans, K., and Auwerx, J. (2010) Reversible acetylation of PGC-1: connecting energy sensors and effectors to guarantee metabolic flexibility. *Oncogene* **29**, 4617–4624.

Jones, S. C., R. E. Banks, A. Haidar, A. J. Gearing, I. K. Hemingway, S. H. Ibbotson, M. F. Dixon, et A. T. Axon. 1995. « Adhesion Molecules in Inflammatory Bowel Disease ». *Gut* 36 (5): 724- 30.

Ju, Cynthia, et Frank Tacke. 2016. « Hepatic Macrophages in Homeostasis and Liver Diseases: From Pathogenesis to Novel Therapeutic Strategies ». *Cellular & Molecular Immunology* 13 (3): 316- 27. <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.104>.

Kamata, Hideaki, Shi-Ichi Honda, Shin Maeda, Lufen Chang, Hajime Hirata, et Michael Karin. 2005. « Reactive Oxygen Species Promote TNF α -Induced Death and Sustained JNK Activation by Inhibiting MAP Kinase Phosphatases ». *Cell* 120 (5): 649- 61. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.041>.

Kappelman, Michael D., Sheryl L. Rifas-Shiman, Ken Kleinman, Dan Ollendorf, Athos Bousvaros, Richard J. Grand, et Jonathan A. Finkelstein. 2007. « The Prevalence and Geographic Distribution of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis in the United States ». *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association* 5 (12): 1424- 29. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2007.07.012>.

Kaser, Arthur, Magdalena B. Flak, Michal F. Tomczak, et Richard S. Blumberg. 2011. « The Unfolded Protein Response and Its Role in Intestinal Homeostasis and Inflammation ». *Experimental Cell Research* 317 (19): 2772- 79. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.07.008>.

Kawano, Yuki, et David E. Cohen. 2013. « Mechanisms of Hepatic Triglyceride Accumulation in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease ». *Journal of Gastroenterology* 48 (4): 434- 41. <https://doi.org/10.1007/s00535-013-0758-5>.

Kerek, R., A. Geoffroy, A. Bison, N. Martin, N. Akchiche, G. Pourié, D. Helle, J.-L. Guéant, C. Bossenmeyer-Pourié, et J.-L. Daval. 2013. « Early Methyl Donor Deficiency May Induce Persistent Brain Defects by Reducing Stat3 Signaling Targeted by MiR-124 ». *Cell Death & Disease* 4 (août): e755. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.278>.

Kim, Kyong-chol, Simonetta Friso, et Sang-Woon Choi. 2009. « DNA Methylation, an Epigenetic Mechanism Connecting Folate to Healthy Embryonic Development and Aging ». *The Journal of Nutritional Biochemistry* 20 (12): 917- 26. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.06.008>.

Kleiner, David E., Elizabeth M. Brunt, Mark Van Natta, Cynthia Behling, Melissa J. Contos, Oscar W. Cummings, Linda D. Ferrell, et al. 2005. « Design and Validation of a Histological Scoring System for Nonalcoholic Fatty Liver Disease ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 41 (6): 1313- 21. <https://doi.org/10.1002/hep.20701>.

Kojima, Masayasu, et Kenji Kangawa. 2005. « Ghrelin: Structure and Function ». *Physiological Reviews* 85 (2): 495- 522. <https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2004>.

Krajmalnik-Brown, Rosa, Zehra-Esra Ilhan, Dae-Wook Kang, et John K. DiBaise. 2012. « Effects of Gut Microbes on Nutrient Absorption and Energy Regulation ». *Nutrition in clinical practice: official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition* 27 (2): 201- 14. <https://doi.org/10.1177/0884533611436116>.

Krawczyk, Marcin, Leonilde Bonfrate, et Piero Portincasa. 2010. « Nonalcoholic Fatty Liver Disease ». *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology* 24 (5): 695- 708. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2010.08.005>.

Kwon, Jaeyul, Seung-Rock Lee, Kap-Seok Yang, Younghee Ahn, Yeun Ju Kim, Earl R. Stadtman, et Sue Goo Rhee. 2004. « Reversible Oxidation and Inactivation of the Tumor Suppressor PTEN in Cells Stimulated with Peptide Growth Factors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (47): 16419- 24. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407396101>.

Lapumnuaypol, Kamolyut, Napatt Kanjanahattakij, David Pisarcik, Charat Thongprayoon, Karn Wijarnpreecha, et Wisit Cheungpasitporn. 2018. « Effects of Inflammatory Bowel Disease Treatment on the Risk of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Meta-Analysis ». *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 30 (8): 854- 60. <https://doi.org/10.1097/MEG.0000000000001144>.

Lau, Jennie Ka Ching, Xiang Zhang, et Jun Yu. 2017a. « Animal models of non- alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances ». *The Journal of Pathology* 241 (1): 36- 44. <https://doi.org/10.1002/path.4829>.

Laugerette, Fabienne, Cécile Vors, Alain Géoën, Marie-Agnès Chauvin, Christophe Soulage, Stéphanie Lambert-Porcheron, Noël Peretti, et al. 2011. « Emulsified Lipids Increase Endotoxemia: Possible Role in Early Postprandial Low-Grade Inflammation ». *The Journal of Nutritional Biochemistry* 22 (1): 53- 59. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.11.011>.

Leoni, Simona, Francesco Tovoli, Lucia Napoli, Ilaria Serio, Silvia Ferri, et Luigi Bolondi. 2018. « Current Guidelines for the Management of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review with Comparative Analysis ». *World Journal of Gastroenterology* 24 (30): 3361. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i30.3361>.

Lesage, Suzanne, Habib Zouali, Jean-Pierre Cézard, Jean-Frédéric Colombel, Jacques Belaiche, Sven Almer, Curt Tysk, et al. 2002. « CARD15/NOD2 Mutational Analysis and Genotype-Phenotype Correlation in 612 Patients with Inflammatory Bowel Disease ». *American Journal of Human Genetics* 70 (4): 845- 57. <https://doi.org/10.1086/339432>.

Ley, Ruth E., Fredrik Bäckhed, Peter Turnbaugh, Catherine A. Lozupone, Robin D. Knight, et Jeffrey I. Gordon. 2005. « Obesity Alters Gut Microbial Ecology ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (31): 11070- 75. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504978102>.

Ley, Ruth E., Peter J. Turnbaugh, Samuel Klein, et Jeffrey I. Gordon. 2006. « Microbial Ecology: Human Gut Microbes Associated with Obesity ». *Nature* 444 (7122): 1022- 23. <https://doi.org/10.1038/4441022a>.

Liu, Jing, Zhen-Jie Zhuang, Dong-Xue Bian, Xiao-Jie Ma, Yun-Hao Xun, Wen-Jun Yang, Yan Luo, et al. 2014. « Toll-like Receptor-4 Signalling in the Progression of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Induced by High-Fat and High-Fructose Diet in Mice ». *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 41 (7): 482- 88. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12241>.

Liu, Wensheng, Robert D. Baker, Tavleen Bhatia, Lixin Zhu, et Susan S. Baker. 2016. « Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 73 (10): 1969- 87. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2161-x>.

Marchesini, Giulio, Elisabetta Bugianesi, Gabriele Forlani, Fernanda Cerrelli, Marco Lenzi, Rita Manini, Stefania Natale, et al. 2003. « Nonalcoholic Fatty Liver, Steatohepatitis, and the Metabolic Syndrome ». *Hepatology* 37 (4): 917- 23. <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50161>.

Marengo, Andrea, Ramy Ibrahim Kamal Jouness, et Elisabetta Bugianesi. 2016. « Progression and Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Adults ». *Clinics in Liver Disease, Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*, 20 (2): 313- 24. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2015.10.010>.

Masalha, Rafik, Inna Rudoy, Ilia Volkov, Nasri Yusuf, Itzhak Wirguin, et Yuval O. Herishanu. 2002. « Symptomatic Dietary Vitamin B12 Deficiency in a Nonvegetarian Population ». *The American Journal of Medicine* 112 (5): 413- 16. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(02\)01031-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(02)01031-8).

Masouminia, M., S. Samadzadeh, A.S. Mendoza, B.A. French, B. Tillman, et S.W. French. 2016. « Upregulation of Autophagy Components in Alcoholic Hepatitis and Nonalcoholic Steatohepatitis ». *Experimental and Molecular Pathology* 101 (1): 81- 88. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2016.07.002>.

Matherly, Scott C., et Puneet Puri. 2012. « Mechanisms of Simple Hepatic Steatosis: Not so Simple after All ». *Clinics in Liver Disease* 16 (3): 505- 24. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2012.05.005>.

Matsushita, N., T. Osaka, I. Haruta, H. Ueshiba, N. Yanagisawa, M. Omori-Miyake, E. Hashimoto, et al. 2016. « Effect of Lipopolysaccharide on the Progression of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in High Caloric Diet-Fed Mice ». *Scandinavian Journal of Immunology* 83 (2): 109- 18. <https://doi.org/10.1111/sji.12397>.

McClain, Craig J., Sri Prakash L. Mokshagundam, Shirish S. Barve, Zhenyuan Song, Daniell B. Hill, Theresa Chen, et Ion Deaciuc. 2004. « Mechanisms of Non-Alcoholic Steatohepatitis ». *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)* 34 (1): 67- 79. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2004.07.007>.

McGowan, Christopher E., Patricia Jones, Millie D. Long, et Sidney A. Barritt. 2012. « Changing Shape of Disease: Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Crohn's Disease—A Case Series and Review of the Literature ». *Inflammatory Bowel Diseases* 18 (1): 49- 54. <https://doi.org/10.1002/ibd.21669>.

McLean, Erin, Bruno de Benoist, et Lindsay H. Allen. 2008. « Review of the Magnitude of Folate and Vitamin B12 Deficiencies Worldwide ». *Food and Nutrition Bulletin* 29 (2 Suppl): S38-51. <https://doi.org/10.1177/15648265080292S107>.

Melgar, Silvia, Agneta Karlsson, et Erik Michaëlsson. 2005. « Acute Colitis Induced by Dextran Sulfate Sodium Progresses to Chronicity in C57BL/6 but Not in BALB/c Mice: Correlation between Symptoms and Inflammation ». *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 288 (6): G1328-1338. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00467.2004>.

Melhem, Hassan, Franck Hansmannel, Aude Bressenot, Syue-Fang Battaglia-Hsu, Vincent Billioud, Jean Marc Alberto, Jean Louis Gueant, et Laurent Peyrin-Biroulet. 2016. « Methyl-Deficient Diet Promotes Colitis and SIRT1-Mediated Endoplasmic Reticulum Stress ». *Gut* 65 (4): 595- 606. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307030>.

Miele, Luca, Venanzio Valenza, Giuseppe La Torre, Massimo Montalto, Giovanni Cammarota, Riccardo Ricci, Roberta Mascianà, et al. 2009. « Increased Intestinal Permeability and Tight Junction Alterations in Nonalcoholic Fatty Liver Disease ». *Hepatology* 49 (6): 1877- 87. <https://doi.org/10.1002/hep.22848>.

Min, Hae-Ki, Ashwani Kapoor, Michael Fuchs, Faridoddin Mirshahi, Huiping Zhou, James Maher, John Kellum, Russell Warnick, Melissa J. Contos, et Arun J. Sanyal. 2012. « Increased Hepatic Synthesis and Dysregulation of Cholesterol Metabolism Is Associated with the Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease ». *Cell Metabolism* 15 (5): 665- 74. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.04.004>.

Miura, Kouichi. 2014. « Role of Gut Microbiota and Toll-like Receptors in Nonalcoholic Fatty Liver Disease ». *World Journal of Gastroenterology* 20 (23): 7381. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i23.7381>.

Miura, Kouichi, Yuzo Kodama, Sayaka Inokuchi, Bernd Schnabl, Tomonori Aoyama, Hirohide Ohnishi, Jerrold M. Olefsky, David A. Brenner, et Ekihiro Seki. 2010. « Toll-like Receptor 9 Promotes Steatohepatitis by Induction of Interleukin-1beta in Mice ». *Gastroenterology* 139 (1): 323-334.e7. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.03.052>.

Miura, Kouichi, Ling Yang, Nico van Rooijen, Hirohide Ohnishi, et Ekihiro Seki. 2012. « Hepatic recruitment of macrophages promotes nonalcoholic steatohepatitis through CCR2 ». *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 302 (11): G1310- 21. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00365.2011>.

Moschen, Alexander R., Susanne Kaser, et Herbert Tilg. 2013. « Non-Alcoholic Steatohepatitis: A Microbiota-Driven Disease ». *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 24 (11): 537- 45. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.05.009>.

Mouzaki, Marialena, Elena M. Comelli, Bianca M. Arendt, Julia Bonengel, Scott K. Fung, Sandra E. Fischer, Ian D. McGilvray, et Johane P. Allard. 2013. « Intestinal Microbiota in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 58 (1): 120- 27. <https://doi.org/10.1002/hep.26319>.

Mulder, Petra, Anita M. van den Hoek, et Robert Kleemann. 2017. « The CCR2 Inhibitor Propagermanium Attenuates Diet-Induced Insulin Resistance, Adipose Tissue Inflammation and Non-Alcoholic Steatohepatitis ». *PloS One* 12 (1): e0169740. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169740>.

Murray, J. A. 1999. « The Widening Spectrum of Celiac Disease ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 69 (3): 354- 65. <https://doi.org/10.1093/ajcn/69.3.354>.

Murthy, S. N., H. S. Cooper, H. Shim, R. S. Shah, S. A. Ibrahim, et D. J. Sedergran. 1993. « Treatment of Dextran Sulfate Sodium-Induced Murine Colitis by Intracolonic Cyclosporin ». *Digestive Diseases and Sciences* 38 (9): 1722- 34.

Musso, G., R. Gambino, et M. Cassader. 2010. « Non-Alcoholic Fatty Liver Disease from Pathogenesis to Management: An Update ». *Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity* 11 (6): 430- 45.

<https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2009.00657.x>.

Nakatani, Kazuki, Shuichi Seki, Norifumi Kawada, Takuya Kitada, Takao Yamada, Hiroki Sakaguchi, Hirokazu Kadoya, Kazuo Ikeda, et Kenji Kaneda. 2002. « Expression of SPARC by Activated Hepatic Stellate Cells and Its Correlation with the Stages of Fibrogenesis in Human Chronic Hepatitis ». *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology* 441 (5): 466- 74. <https://doi.org/10.1007/s00428-002-0631-z>.

Naser, Saleh A., Melissa Arce, Anam Khaja, Marlene Fernandez, Najih Naser, Sammer Elwasila, et Saisathya Thanigachalam. 2012. « Role of ATG16L, NOD2 and IL23R in Crohn's Disease Pathogenesis ». *World Journal of Gastroenterology* 18 (5): 412- 24. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i5.412>.

Neuschwander- Tetri, Brent A., et Stephen H. Caldwell. 2003. « Nonalcoholic Steatohepatitis: Summary of an AASLD Single Topic Conference ». *Hepatology* 37 (5): 1202- 19. <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50193>.

Nguyen, Geoffrey C., Anne Tuskey, Themistocles Dassopoulos, Mary L. Harris, et Steven R. Brant. 2007. « Rising Hospitalization Rates for Inflammatory Bowel Disease in the United States between 1998 and 2004 ». *Inflammatory Bowel Diseases* 13 (12): 1529- 35. <https://doi.org/10.1002/ibd.20250>.

Pais de Barros, Jean-Paul, Thomas Gautier, Wahib Sali, Christophe Adrie, Hélène Choubley, Emilie Charron, Caroline Lalande, et al. 2015. « Quantitative lipopolysaccharide analysis using HPLC/MS/MS and its combination with the limulus amoebocyte lysate assay ». *Journal of Lipid Research* 56 (7): 1363- 69. <https://doi.org/10.1194/jlr.D059725>.

Pawar, Sunil V, Vinay G Zanwar, Ajay S Choksey, Ashok R Mohite, Samit S Jain, Ravindra G Surude, Qais Q Contractor, Pravin M Rathi, Ravi U Verma, et Premlata K Varthakavi. 2016. « Most Overweight and Obese Indian Children Have Nonalcoholic Fatty Liver Disease ». *Ann Hepatol* 15 (9): 853-861.

Paz-Filho, Gilberto, Claudio Mastronardi, Tuncay Delibasi, Ma-Li Wong, et Julio Licinio. 2010. « Congenital leptin deficiency: diagnosis and effects of leptin replacement therapy ». *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia* 54 (8): 690- 97. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4286252/>.

Peña, Aileen dela, Isabelle Leclercq, Jacqueline Field, Jacob George, Brett Jones, et Geoffrey Farrell. 2005. « NF-KB Activation, Rather Than TNF, Mediates Hepatic Inflammation in a Murine Dietary Model of Steatohepatitis ». *Gastroenterology* 129 (5): 1663- 74. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.09.004>.

Pendyala, Swaroop, Jeanne M. Walker, et Peter R. Holt. 2012. « A High-Fat Diet Is Associated With Endotoxemia That Originates From the Gut ». *Gastroenterology* 142 (5): 1100-1101.e2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.01.034>.

Peyrin-Biroulet, Laurent, Alarcos Cieza, William J. Sandborn, Michaela Coenen, Yehuda Chowers, Toshifumi Hibi, Nenad Kostanjsek, Gerold Stucki, Jean-Frédéric Colombel, et International Programme to Develop New Indexes for Crohn's Disease (IPNIC) group. 2012. « Development of the First Disability Index for Inflammatory Bowel Disease Based on the International Classification of Functioning, Disability and Health ». *Gut* 61 (2): 241- 47.

<https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-300049>.

Peyrin-Biroulet, Laurent, Rosa-Maria Rodriguez-Guéant, Mathias Chamailard, Pierre Desreumaux, Bing Xia, Jean-Pierre Bronowicki, Marc-André Bigard, et Jean-Louis Guéant. 2007. « Vascular and Cellular Stress in Inflammatory Bowel Disease: Revisiting the Role of Homocysteine ». *The American Journal of Gastroenterology* 102 (5): 1108- 15. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2007.01170.x>.

Pirola, Carlos Jose, Tomas Fernández Gianotti, Adriana Laura Burgueño, Manuel Rey-Funes, Cesar Fabian Loidl, Pablo Mallardi, Julio San Martino, Gustavo Osvaldo Castaño, et S. Sookoian. 2013. « Epigenetic Modification of Liver Mitochondrial DNA Is Associated with Histological Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease ». *Gut* 62 (9): 1356- 63. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302962>.

Poddar, R., N. Sivasubramanian, P. M. DiBello, K. Robinson, et D. W. Jacobsen. 2001. « Homocysteine Induces Expression and Secretion of Monocyte Chemoattractant Protein-1 and Interleukin-8 in Human Aortic Endothelial Cells: Implications for Vascular Disease ». *Circulation* 103 (22): 2717- 23.

Pogribny, Igor P., Volodymyr P. Tryndyak, Tetyana V. Bagnyukova, Stepan Melnyk, Beverly Montgomery, Sharon A. Ross, John R. Latendresse, Ivan Rusyn, et Frederick A. Beland. 2009. « Hepatic Epigenetic Phenotype Predetermines Individual Susceptibility to Hepatic Steatosis in Mice Fed a Lipogenic Methyl-Deficient Diet ». *Journal of Hepatology* 51 (1): 176- 86. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.03.021>.

Pooya, Shabnam, Sébastien Blaise, Maira Moreno Garcia, Jean Giudicelli, Jean-Marc Alberto, Rosa-Maria Guéant-Rodriguez, Elise Jeannesson, et al. 2012a. « Methyl Donor Deficiency Impairs Fatty Acid Oxidation through PGC-1 α Hypomethylation and Decreased ER- α , ERR- α , and HNF-4 α in the Rat Liver ». *Journal of Hepatology* 57 (2): 344- 51. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.03.028>.

Principi, Mariabeatrice, Andrea Iannone, Giuseppe Losurdo, Michela Mangia, Endrit Shahini, Francesca Albano, Salvatore Fabio Rizzi, et al. 2018. « Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Inflammatory Bowel Disease: Prevalence and Risk Factors ». *Inflammatory Bowel Diseases* 24 (7): 1589- 96. <https://doi.org/10.1093/ibd/izy051>.

Propst, A., T. Propst, G. Judmaier, et W. Vogel. 1995. « Prognosis in Nonalcoholic Steatohepatitis ». *Gastroenterology* 108 (5): 1607.

Put, N. M. van der, et H. J. Blom. 2000. « Neural Tube Defects and a Disturbed Folate Dependent Homocysteine Metabolism ». *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology* 92 (1): 57- 61.

Rafnsson, Snorri B., Ponnusamy Saravanan, Raj S. Bhopal, et Chittaranjan S. Yajnik. 2011. « Is a Low Blood Level of Vitamin B12 a Cardiovascular and Diabetes Risk Factor? A Systematic Review of Cohort Studies ». *European Journal of Nutrition* 50 (2): 97- 106. <https://doi.org/10.1007/s00394-010-0119-6>.

Ramakrishnan, Usha. 2002. « Prevalence of Micronutrient Malnutrition Worldwide ». *Nutrition Reviews* 60 (5 Pt 2): S46-52.

Raman, Maitreyi, Iftikhar Ahmed, Patrick M. Gillevet, Chris S. Probert, Norman M. Ratcliffe, Steve Smith, Rosemary Greenwood, et al. 2013. « Fecal Microbiome and Volatile Organic Compound Metabolome in Obese Humans With Nonalcoholic Fatty Liver Disease ». *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 11 (7): 868-875.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2013.02.015>.

Ratter, F., C. Gassner, V. Shatrov, et V. Lehmann. 1999. « Modulation of Tumor Necrosis Factor-Alpha-Mediated Cytotoxicity by Changes of the Cellular Methylation State: Mechanism and in Vivo Relevance ». *International Immunology* 11 (4): 519- 27.

Ravin, H. A., D. Rowley, C. Jenkins, et J. Fine. 1960. « On the Absorption of Bacterial Endotoxin from the Gastro-Intestinal Tract of the Normal and Shocked Animal ». *Journal of Experimental Medicine* 112 (5): 783- 92. <https://doi.org/10.1084/jem.112.5.783>.

Rebollo, Alba, Núria Roglans, Miguel Baena, Rosa M. Sánchez, Manel Merlos, Marta Alegret, et Juan C. Laguna. 2014. « Liquid Fructose Downregulates Sirt1 Expression and Activity and Impairs the Oxidation of Fatty Acids in Rat and Human Liver Cells ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1841 (4): 514- 24. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2014.01.002>.

Rector, R. Scott, et Jamal A. Ibdah. 2010. « Fatty Acid Oxidation Disorders: Maternal Health and Neonatal Outcomes ». *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 15 (3): 122- 28. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2009.10.006>.

Rivera, Chantal A., Patrick Adegboyega, Nico van Rooijen, Arlene Tagalicud, Monique Allman, et Matthew Wallace. 2007. « Toll-like Receptor-4 Signaling and Kupffer Cells Play Pivotal Roles in the Pathogenesis of Non-Alcoholic Steatohepatitis ». *Journal of Hepatology* 47 (4): 571- 79. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.04.019>.

Cusi, Kenneth. « Role of Insulin Resistance and Lipotoxicity in Non-Alcoholic Steatohepatitis ». 2009. *Clinics in Liver Disease* 13 (4): 545- 63. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2009.07.009>.

Romeo, Stefano, Julia Kozlitina, Chao Xing, Alexander Pertsemlidis, David Cox, Len A. Pennacchio, Eric Boerwinkle, Jonathan C. Cohen, et Helen H. Hobbs. 2008. « Genetic Variation in PNPLA3 Confers Susceptibility to Nonalcoholic Fatty Liver Disease ». *Nature Genetics* 40 (12): 1461- 65. <https://doi.org/10.1038/ng.257>.

Rosenberg, Irwin H. 2008. « Effects of Folate and Vitamin B12 on Cognitive Function in Adults and the Elderly ». *Food and Nutrition Bulletin* 29 (2 Suppl): S132-142. <https://doi.org/10.1177/15648265080292S118>.

Rosenstiel, Philip, Massimo Fantini, Karen Bräutigam, Tanja Kühbacher, Georg H. Waetzig, Dirk Seeger, et Stefan Schreiber. 2003. « TNF-Alpha and IFN-Gamma Regulate the Expression of the NOD2 (CARD15) Gene in Human Intestinal Epithelial Cells ». *Gastroenterology* 124 (4): 1001- 9. <https://doi.org/10.1053/gast.2003.50157>.

Russel, Maurice G. V. M., Alexander Volovics, Eric J. Schoon, Erik H. J. van Wijlick, Richard F. Logan, Shiva Shivananda, et Reinhold W. Stockbrügger. 1998. « Inflammatory Bowel Disease: Is There Any Relation between Smoking Status and Disease Presentation? » *Inflammatory Bowel Diseases* 4 (3): 182- 86. <https://doi.org/10.1002/ibd.3780040303>.

Sanyal, A. J., C. Campbell-Sargent, F. Mirshahi, W. B. Rizzo, M. J. Contos, R. K. Sterling, V. A. Luketic, M. L. Shiffman, et J. N. Clore. 2001. « Nonalcoholic Steatohepatitis: Association of Insulin Resistance and Mitochondrial Abnormalities ». *Gastroenterology* 120 (5): 1183- 92. <https://doi.org/10.1053/gast.2001.23256>.

Saroli Palumbo, Chiara, Sophie Restellini, Che-Yung Chao, Achuthan Aruljothy, Carolyne Lemieux, Gary Wild, Waqqas Afif, et al. 2018. « Screening for Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Inflammatory Bowel Diseases: A Cohort Study Using Transient Elastography ». *Inflammatory Bowel Diseases*, juin. <https://doi.org/10.1093/ibd/izy200>.

Schuster, Susanne, Daniel Cabrera, Marco Arrese, et Ariel E. Feldstein. 2018. « Triggering and Resolution of Inflammation in NASH ». *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 15 (6): 349- 64. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0009-6>.

Scott, J. M. 2001. « Evidence of Folic Acid and Folate in the Prevention of Neural Tube Defects ». *Bibliotheca Nutritio Et Dieta*, n° 55: 192- 95.

Seki, Ekihiro, Samuele De Minicis, Christoph H. Osterreicher, Johannes Kluwe, Yosuke Osawa, David A. Brenner, et Robert F. Schwabe. 2007a. « TLR4 Enhances TGF-Beta Signaling and Hepatic Fibrosis ». *Nature Medicine* 13 (11): 1324- 32. <https://doi.org/10.1038/nm1663>.

Shimada, Masahiko, Etsuko Hashimoto, Makiko Taniai, Kiyoshi Hasegawa, Hiroaki Okuda, Naoaki Hayashi, Ken Takasaki, et Jurgen Ludwig. 2002. « Hepatocellular Carcinoma in Patients with Non-Alcoholic Steatohepatitis ». *Journal of Hepatology* 37 (1): 154- 60.

Shneider, Benjamin L., Regino González-Peralta, et Eve A. Roberts. 2006. « Controversies in the Management of Pediatric Liver Disease: Hepatitis B, C and NAFLD: Summary of a Single Topic Conference ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 44 (5): 1344- 54. <https://doi.org/10.1002/hep.21373>.

Singh, Rajat, Susmita Kaushik, Yongjun Wang, Youqing Xiang, Inna Novak, Masaaki Komatsu, Keiji Tanaka, Ana Maria Cuervo, et Mark J. Czaja. 2009. « Autophagy Regulates Lipid Metabolism ». *Nature* 458 (7242): 1131- 35. <https://doi.org/10.1038/nature07976>.

Singh, Rajat, Youqing Xiang, Yongjun Wang, Kiran Baikati, Ana Maria Cuervo, Yen K. Luu, Yan Tang, Jeffrey E. Pessin, Gary J. Schwartz, et Mark J. Czaja. 2009. « Autophagy Regulates Adipose Mass and Differentiation in Mice ». *The Journal of Clinical Investigation* 119 (11): 3329- 39. <https://doi.org/10.1172/JCI39228>.

Singh, Udai P., Narendra P. Singh, E. Angela Murphy, Robert L. Price, Raja Fayad, Mitzi Nagarkatti, et Prakash S. Nagarkatti. 2016. « Chemokine and cytokine levels in inflammatory bowel disease patients ». *Cytokine* 77 (janvier): 44- 49. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.10.008>.

Singh, Udai P., Narendra P. Singh, Balwan Singh, Lorne J. Hofseth, Robert L. Price, Mitzi Nagarkatti, et Prakash S. Nagarkatti. 2010. « Resveratrol (Trans-3,5,4'-Trihydroxystilbene) Induces Silent Mating Type Information Regulation-1 and down-Regulates Nuclear Transcription Factor-KappaB Activation to Abrogate Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis ». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 332 (3): 829- 39. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.160838>.

Skugor, Stanko, Adrijana Skugor, Marijana Todorčević, Jacob Torgersen, Bente Ruyter, et Aleksei Krasnov. 2010. « Exposure to Lipopolysaccharide Induces Immune Genes in Cultured Preadipocytes of Atlantic Salmon ». *Fish & Shellfish Immunology* 29 (5): 817- 24. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.07.026>.

Smith, A. David, Young-In Kim, et Helga Refsum. 2008. « Is Folic Acid Good for Everyone? » *The American Journal of Clinical Nutrition* 87 (3): 517- 33. <https://doi.org/10.1093/ajcn/87.3.517>.

Söderberg, Cecilia, Per Stål, Johan Askling, Hans Glaumann, Greger Lindberg, Joel Marmur, et Rolf Hultcrantz. 2010. « Decreased Survival of Subjects with Elevated Liver Function Tests during a 28- year Follow- up ». *Hepatology* 51 (2): 595- 602. <https://doi.org/10.1002/hep.23314>.

Sonnenberg, Amnon, et Joanne Chang. 2008. « Time Trends of Physician Visits for Crohn's Disease and Ulcerative Colitis in the United States, 1960-2006 ». *Inflammatory Bowel Diseases* 14 (2): 249- 52. <https://doi.org/10.1002/ibd.20273>.

Sourianarayanan, Achuthan, Gaurav Garg, Thomas H. Smith, Mujtaba I. Butt, Arthur J. McCullough, et Bo Shen. 2013. « Risk Factors of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Patients with Inflammatory Bowel Disease ». *Journal of Crohn's & Colitis* 7 (8): e279-285. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2012.10.015>.

Spahr, Laurent, Francesco Negro, Gioacchino Leandro, Oana Marinescu, Keith J. Goodman, Laura Rubbia-Brandt, Martha Jordan, et Antonine Hadengue. 2003. « Impaired Hepatic Mitochondrial Oxidation Using the 13C-Methionine Breath Test in Patients with Macrovesicular Steatosis and Patients with Cirrhosis ». *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 9 (1): CR6-11.

Speliotes, Elizabeth K., Laura M. Yerges-Armstrong, Jun Wu, Ruben Hernaez, Lauren J. Kim, Cameron D. Palmer, Vilmundur Gudnason, et al. 2011. « Genome-Wide Association Analysis Identifies Variants Associated with Nonalcoholic Fatty Liver Disease That Have Distinct Effects on Metabolic Traits ». *PLoS Genetics* 7 (3): e1001324. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001324>.

Spencer, Melanie D., Timothy J. Hamp, Robert W. Reid, Leslie M. Fischer, Steven H. Zeisel, et Anthony A. Fodor. 2011. « Association between composition of the human gastrointestinal microbiome and development of fatty liver with choline deficiency ». *Gastroenterology* 140 (3): 976- 86. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.11.049>.

Stewart, Christine P., Parul Christian, Kerry J. Schulze, Margia Arguello, Steven C. LeClerq, Subarna K. Khattry, et Keith P. West. 2011. « Low Maternal Vitamin B-12 Status Is Associated with Offspring Insulin Resistance Regardless of Antenatal Micronutrient Supplementation in Rural Nepal ». *The Journal of Nutrition* 141 (10): 1912- 17. <https://doi.org/10.3945/jn.111.144717>.

Stover, Patrick J. 2011. « Polymorphisms in 1-Carbon Metabolism, Epigenetics and Folate-Related Pathologies ». *Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics* 4 (5): 293- 305. <https://doi.org/10.1159/000334586>.

Szabo, Gyongyi, Arumugam Velayudham, Laszlo Romics, et Pranoti Mandrekar. 2005. « Modulation of Non-Alcoholic Steatohepatitis by Pattern Recognition Receptors in Mice: The Role of Toll-like Receptors 2 and 4 ». *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 29 (11 Suppl): 140S-145S.

Tanner, Stephan M., Zhongyuan Li, Ryan Bisson, Ceren Acar, Cihan Oner, Reyhan Oner, Mualla Cetin, et al. 2004. « Genetically Heterogeneous Selective Intestinal Malabsorption of Vitamin B12: Founder Effects, Consanguinity, and High Clinical Awareness Explain Aggregations in Scandinavia and the Middle East ». *Human Mutation* 23 (4): 327- 33. <https://doi.org/10.1002/humu.20014>.

Teysier, C., Ma, H., Emter, R., Kralli, A., and Stallcup, M. R. (2005) Activation of nuclear receptor coactivator PGC-1alpha by arginine methylation. *Genes Dev.* **19**, 1466–1473.

Than, Nwe Ni, et Philip N. Newsome. 2015. « A Concise Review of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease ». *Atherosclerosis* 239 (1): 192- 202. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.01.001>.

Thompson, Wendy L., et Linda J. Van Eldik. 2009. « Inflammatory Cytokines Stimulate the Chemokines CCL2/MCP-1 and CCL7/MCP-3 through NFkB and MAPK Dependent Pathways in Rat Astrocytes [Corrected] ». *Brain Research* 1287 (septembre): 47- 57. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.06.081>.

Thuy, Sabine, Ruth Ladurner, Valentina Volynets, Silvia Wagner, Stefan Strahl, Alfred Königsrainer, Klaus-Peter Maier, Stephan C. Bischoff, et Ina Bergheim. 2008. « Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Humans Is Associated with Increased Plasma Endotoxin and Plasminogen Activator Inhibitor 1 Concentrations and with Fructose Intake ». *The Journal of Nutrition* 138 (8): 1452- 55. <https://doi.org/10.1093/jn/138.8.1452>.

Tilg, Herbert, et Anna Mae Diehl. 2000. « Cytokines in Alcoholic and Nonalcoholic Steatohepatitis ». Édité par Franklin H. Epstein. *New England Journal of Medicine* 343 (20): 1467- 76. <https://doi.org/10.1056/NEJM200011163432007>.

Trak-Smayra, V., Paradis, V., Massart, J., Nasser, S., Jebara, V., and Fromenty, B. (2011) Pathology of the liver in obese and diabetic ob/ob and db/db mice fed a standard or high-calorie diet. *Int. J. Exp. Pathol.* **92**, 413J. E

Tremaroli, Valentina, et Fredrik Bäckhed. 2012. « Functional Interactions between the Gut Microbiota and Host Metabolism ». *Nature* 489 (7415): 242- 49.

<https://doi.org/10.1038/nature11552>.

Turnbaugh, Peter J., Vanessa K. Ridaura, Jeremiah J. Faith, Federico E. Rey, Rob Knight, et Jeffrey I. Gordon. 2009. «The Effect of Diet on the Human Gut Microbiome: A Metagenomic Analysis in Humanized Gnotobiotic Mice». *Science translational medicine* 1 (6): 6ra14. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000322>.

Ueland, Per M, Helga Refsum, Shirley AA Beresford, et Stein Emil Vollset. 2000. «The Controversy over Homocysteine and Cardiovascular Risk». *The American Journal of Clinical Nutrition* 72 (2): 324- 32. <https://doi.org/10.1093/ajcn/72.2.324>.

Velayudham, Arumugam, Angela Dolganiuc, Michael Ellis, Jan Petrasek, Karen Kodys, Pranoti Mandrekar, et Gyongyi Szabo. 2009. «VSL#3 Probiotic Treatment Attenuates Fibrosis without Changes in Steatohepatitis in a Diet-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis Model in Mice». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 49 (3): 989- 97. <https://doi.org/10.1002/hep.22711>.

Vespasiani-Gentilucci, Umberto, Simone Carotti, Andrea Onetti-Muda, Giuseppe Perrone, Stefano Ginanni-Corradini, Maria U. Latasa, Matias A. Avila, Guido Carpino, Antonio Picardi, et Sergio Morini. 2012. «Toll-like Receptor-4 Expression by Hepatic Progenitor Cells and Biliary Epithelial Cells in HCV-Related Chronic Liver Disease». *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 25 (4): 576- 89. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.197>.

Vespasiani-Gentilucci, Umberto, Simone Carotti, Giuseppe Perrone, Chiara Mazzarelli, Giovanni Galati, Andrea Onetti-Muda, Antonio Picardi, et Sergio Morini. 2015. «Hepatic Toll-like Receptor 4 Expression Is Associated with Portal Inflammation and Fibrosis in Patients with NAFLD». *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver* 35 (2): 569- 81. <https://doi.org/10.1111/liv.12531>.

Viatour, Patrick, Marie-Paule Merville, Vincent Bours, et Alain Chariot. 2005. «Phosphorylation of NF-KB and IκB Proteins: Implications in Cancer and Inflammation». *Trends in Biochemical Sciences* 30 (1): 43- 52. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.11.009>.

Videla, Luis A., Gladys Tapia, Ramón Rodrigo, Paulina Pettinelli, Daniela Haim, Catherine Santibañez, A. Verónica Araya, et al. 2009. «Liver NF-KappaB and AP-1 DNA Binding in Obese Patients». *Obesity (Silver Spring, Md.)* 17 (5): 973- 79. <https://doi.org/10.1038/oby.2008.601>.

Volynets, Valentina, Markus A. Küper, Stefan Strahl, Ina B. Maier, Astrid Spruss, Sabine Wagnerberger, Alfred Königsrainer, Stephan C. Bischoff, et Ina Bergheim. 2012. «Nutrition, Intestinal Permeability, and Blood Ethanol Levels Are Altered in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)». *Digestive Diseases and Sciences* 57 (7): 1932- 41. <https://doi.org/10.1007/s10620-012-2112-9>.

Vreugdenhil, Anita C. E., Corine H. Rousseau, Thomas Hartung, Jan Willem M. Greve, Cornelis van 't Veer, et Wim A. Buurman. 2003. «Lipopolysaccharide (LPS)-Binding Protein Mediates LPS Detoxification by Chylomicrons». *The Journal of Immunology* 170 (3): 1399- 1405. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.3.1399>.

Wehkamp, Jan, Michael Schmid, Klaus Fellermann, et Eduard F. Stange. 2005. « Defensin Deficiency, Intestinal Microbes, and the Clinical Phenotypes of Crohn's Disease ». *Journal of Leukocyte Biology* 77 (4): 460- 65. <https://doi.org/10.1189/jlb.0904543>.

Wang, Guoping, Connie W. H. Woo, Fion L. Sung, Yaw L. Siow, et Karmin O. 2002. « Increased Monocyte Adhesion to Aortic Endothelium in Rats with Hyperhomocysteinemia: Role of Chemokine and Adhesion Molecules ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 22 (11): 1777- 83.

Wang, Xiaojuan, Xiang Zhang, Eagle S. H. Chu, Xiaoting Chen, Wei Kang, Feng Wu, Ka-Fai To, et al. 2018. « Defective Lysosomal Clearance of Autophagosomes and Its Clinical Implications in Nonalcoholic Steatohepatitis ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 32 (1): 37- 51. <https://doi.org/10.1096/fj.201601393R>.

Ward, Mark G., Viraj C. Kariyawasam, Sathis B. Mogan, Kamal V. Patel, Maria Pantelidou, Agata Sobczyńska-Malefora, François Porté, et al. 2015. « Prevalence and Risk Factors for Functional Vitamin B12 Deficiency in Patients with Crohn's Disease ». *Inflammatory Bowel Diseases* 21 (12): 2839- 47. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000559>.

Watkins, D. and Rosenblatt, D. S. (1989) Functional methionine synthase deficiency (cblE and cblG): clinical and biochemical heterogeneity. *Am. J. Med. Genet.* **34**, 427–434

Watkins, D. and Rosenblatt, D. S. (2011) Inborn errors of cobalamin absorption and metabolism. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* **157C**, 33–44

Weingärtner, Jens, Kristina Lotz, Jochen Fanghänel, Thomas Gedrange, Volker Bienengraber, et Peter Proff. 2007. « Induction and Prevention of Cleft Lip, Alveolus and Palate and Neural Tube Defects with Special Consideration of B Vitamins and the Methylation Cycle ». *Journal of Orofacial Orthopedics = Fortschritte Der Kieferorthopädie: Organ/Official Journal Deutsche Gesellschaft Fur Kieferorthopädie* 68 (4): 266- 77. <https://doi.org/10.1007/s00056-007-0701-6>.

Wigg, A, I Roberts-Thomson, R Dymock, P McCarthy, R Grose, et A Cummins. 2001. « The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor α in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis ». *Gut* 48 (2): 206- 11. <https://doi.org/10.1136/gut.48.2.206>.

Williams, K. H., N. A. Shackel, M. D. Gorrell, S. V. McLennan, et S. M. Twigg. 2013. « Diabetes and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Pathogenic Duo ». *Endocrine Reviews* 34 (1): 84- 129. <https://doi.org/10.1210/er.2012-1009>.

Wong, Vincent Wai-Sun, Chi-Hang Tse, Tommy Tsan-Yuk Lam, Grace Lai-Hung Wong, Angel Mei-Ling Chim, Winnie Chiu-Wing Chu, David Ka-Wai Yeung, et al. 2013. « Molecular Characterization of the Fecal Microbiota in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis – A Longitudinal Study ». *PLoS ONE* 8 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062885>.

Yajnik, C. S., S. S. Deshpande, A. A. Jackson, H. Refsum, S. Rao, D. J. Fisher, D. S. Bhat, et al. 2008. « Vitamin B12 and folate concentrations during pregnancy and insulin resistance in the offspring: the Pune Maternal Nutrition Study ». *Diabetologia* 51 (1): 29- 38. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0793-y>.

Yajnik, Chittaranjan Sakerlal, et Urmila Shailesh Deshmukh. 2012. « Fetal Programming: Maternal Nutrition and Role of One-Carbon Metabolism ». *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 13 (2): 121- 27. <https://doi.org/10.1007/s11154-012-9214-8>.

Yang, Zhi-Hong, Hiroko Miyahara, Jiro Takeo, et Masashi Katayama. 2012. « Diet High in Fat and Sucrose Induces Rapid Onset of Obesity-Related Metabolic Syndrome Partly through Rapid Response of Genes Involved in Lipogenesis, Insulin Signalling and Inflammation in Mice ». *Diabetology & Metabolic Syndrome* 4 (1): 32. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-4-32>.

Yoshimura, T., N. Yuhki, S. K. Moore, E. Appella, M. I. Lerman, et E. J. Leonard. 1989. « Human Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1). Full-Length cDNA Cloning, Expression in Mitogen-Stimulated Blood Mononuclear Leukocytes, and Sequence Similarity to Mouse Competence Gene JE ». *FEBS Letters* 244 (2): 487- 93.

Younossi, Zobair, Quentin M. Anstee, Milena Marietti, Timothy Hardy, Linda Henry, Mohammed Eslam, Jacob George, et Elisabetta Bugianesi. 2018. « Global Burden of NAFLD and NASH: Trends, Predictions, Risk Factors and Prevention ». *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 15 (1): 11- 20. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.109>.

Younossi, Zobair M., Aaron B. Koenig, Dinan Abdelatif, Yousef Fazel, Linda Henry, et Mark Wymer. 2016a. « Global Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease-Meta-Analytic Assessment of Prevalence, Incidence, and Outcomes ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 64 (1): 73- 84. <https://doi.org/10.1002/hep.28431>.

Younossi, Zobair M., Munkhzul Otgonsuren, Linda Henry, Chapy Venkatesan, Alita Mishra, Madeline Erario, et Sharon Hunt. 2015. « Association of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) with Hepatocellular Carcinoma (HCC) in the United States from 2004 to 2009 ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 62 (6): 1723- 30. <https://doi.org/10.1002/hep.28123>.

Zambell, Kirsten L., Mark D. Fitch, et Sharon E. Fleming. 2003. « Acetate and Butyrate Are the Major Substrates for de Novo Lipogenesis in Rat Colonic Epithelial Cells ». *The Journal of Nutrition* 133 (11): 3509- 15. <https://doi.org/10.1093/jn/133.11.3509>.

Zeybel, Müjdat, Derek A. Mann, et Jelena Mann. 2013. « Epigenetic Modifications as New Targets for Liver Disease Therapies ». *Journal of Hepatology* 59 (6): 1349- 53. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.05.039>.

Zhang, Xu-Mei, Guo-Wei Huang, Zhi-Hong Tian, Da-Lin Ren, et John X. Wilson. 2009. « Folate Stimulates ERK1/2 Phosphorylation and Cell Proliferation in Fetal Neural Stem Cells ». *Nutritional Neuroscience* 12 (5): 226- 32. <https://doi.org/10.1179/147683009X423418>.

Annexes

Composition de régime standard (A04) distribué par la société SAFE[®]

Composition Nutritive /kg

ACIDES AMINÉS		TOTAL *
Arginine	mg	9 000
Cystine	mg	2 500
Lysine	mg	7 200
Méthionine	mg	2 800
Tryptophane	mg	1 900
Glycine	mg	8 100

ACIDES GRAS		TOTAL *
Acide palmitique	mg	5 900
Acide palmitoléique	mg	150
Acide stéarique	mg	600
Acide oléique	mg	4 800
Acide linoléique	mg	15 000
Acide linoléénique	mg	1 200

MINÉRAUX		TOTAL *
P	mg	5 500
Ca	mg	7 300
Na	mg	2 500
K	mg	6 000
Mg	mg	1 600
Mn	mg	70
Fe	mg	270
Cu	mg	16
Zn	mg	55
Cl	mg	4 000

VITAMINES		TOTAL *
Vitamine A	UI	7 500
Vitamine D3	UI	1 000
Vitamine B1	mg	7
Vitamine B2	mg	6,5
Vitamine B5	mg	16,5
Vitamine B6	mg	2,6
Vitamine B12	mg	0,02
Vitamine E	mg	30
Vitamine K3	mg	2,5
Niacine	mg	75
Ac.Folic	mg	0,5
Biotine	mg	0,04
Choline	mg	1 600

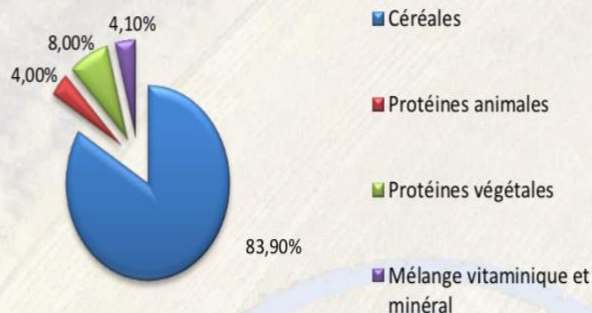
Technologie des Pellets

		Moyenne*
Diamètre	mm	16,43
Résistance à l'écrasement	kgf/cm ²	22,7
Résistance à l'abrasion	%	97,3
Masse spécifique	g/l	645
Poids	g	5,319
Longueur	mm	22,64

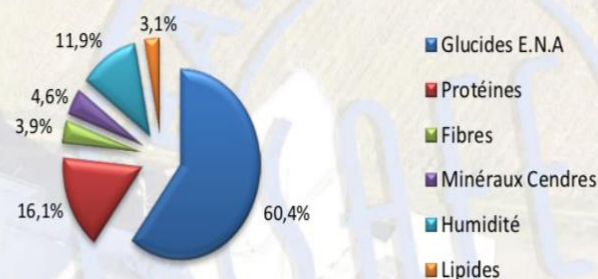
Composition

Orge, blé, maïs, tourteau d'extraction de soja, son de blé, protéine de poissons hydrolysée, phosphate bicalcique, prémélange de minéraux, carbonate de calcium, prémélange de vitamines.

Composition Centésimale en %



Composition Nutritive en %



Valeur Energétique**	Kcal/kg	Mj/kg	% Protéines	% Lipides	% Carbohydrates
Atwater	3 339	13,97	19,3	8,4	72,4
ME	3 145	13,17	-	-	-

** Information du calcul de l'Energie:

<http://www.safe-diets.com/fre/produits/informations/energy/aliments-et-energie.html>

Glucides E.N.A. dont

- Amidon	(en %)	43,5
- Sucres totaux	(en %)	3,2

* Les valeurs sont données à titre d'information, il s'agit de moyennes calculées sur valeurs brutes du produit. Elles sont indicatives et n'ont pas de valeur contractuelle. Elles sont soumises à des variations liées aux conditions de production, stockage et de méthodes analytiques. Une analyse peut être réalisée sur demande.

Glucides E.N.A. : Extrait non azoté, valeur calculée.

Dosage radio - immunologique des vitamines B9 et B12

Les dosages ont été effectués sur des extractions cytosoliques à partir de tissu cérébral à l'aide du kit SimulTRAC – SNB⁽¹⁾. Grâce à cette technique, les taux de vit B9 et B12 sont déterminés simultanément dans un seul tube.

Le protocole utilisé est celui décrit par le fabricant :

- Extraire la fraction cytosolique à partir de tissu cérébral (fiche précédente)
- Les courbes d'étalonnages sont réalisées sur 6 points :
 - Vitamine B12 (0, 74, 148, 296, 740 et 1480 pM)
 - Folates (0, 2.3, 4.5, 9.1, 23 et 45 nM)
- Déposer 200 µL de la fraction cytosolique dans un tube à hémolyse
- Ajouter 200 µL de solution active de marquage/DTT⁽²⁾ (dithiothreitol), agiter les tubes au vortex
- Incuber à température ambiante (18-25°C) pendant 15 min
- Ajouter 100 µL de réactif d'extraction, agiter les tubes au vortex
- Incuber à température ambiante pendant 15 min
- Bien agiter le flacon de réactif de liaison et ajouter 1mL de ce réactif dans les tubes, agiter les tubes au vortex
- Incuber les tubes à température ambiante pendant 1 h, à l'abri de la lumière
- Centrifuger à 1 000 g pendant 10 min de préférence à +4°C
- Jeter le surnageant
- Compter la radioactivité dans les culots à l'aide d'un compteur gamma⁽³⁾

(1) Kit SimulTRAC – MP Biomedicals

(2) DTT : Solution de Dithiothreitol SimulTRAC-SNB

(3) Compteur gamma : Fluostar Galaxy (BMG LabTechnologies, Champigny sur Mame, France)
Compteur COBRA-IIrTM autogamma (Packard) à double canal

Dosage des molécules adénylées (SAM / SAH) par *high performance liquid chromatography*

Les dosages ont été effectués sur des extractions cytosoliques à partir de tissu cérébral (fiche précédente).

Préparation de la gamme

- A partir de solutions stock de standard⁽¹⁾ (SAM ; SAH) à 25 mM, Préparer une solution ST1 SAM et ST1 SAH à 250 μ M (dilution 1/100, 5 μ L dans 495 μ L PBS⁽²⁾ 1X)
- Préparer une gamme de dilution à 5 μ M de la façon suivante :
 - A = 2 μ L de ST1 SAM + 2 μ L de ST1 SAH + 96 μ L PBS 1X. Vortex
 - B = 50 μ L de A + 50 μ L PBS 1X
 - C = 50 μ L de B + 50 μ L PBS 1X
 - D = 50 μ L de C + 50 μ L PBS 1X
 - E = 50 μ L de D + 50 μ L PBS 1X. Jeter 50 μ L de la solution E
 - F = 50 μ L PBS1X
- De ST1 préparer des solutions de standard ST2 SAM et ST2 SAH à 5 μ M (dilution 1/50, 2 μ L dans 98 μ L PBS 1X)

Déprotéinisation des échantillons

- Pour les 100 μ L des échantillons, des étalons et des standards (ST2 SAM, ST2 SAH), ajouter 5 μ L d' HClO_4 à 60% et vortexer
- Centrifuger à 20.000 g pendant 20 min à +4°C
- Récupérer le surnageant et centrifuger⁽³⁾ à 100 000 g pendant 30 min à +4°C
- Récupérer le surnageant pour doser les molécules adénylées

Procédure de séparation et d'analyse par HPLC

- Déposer 50 μ L des échantillons déprotéinisés, des étalons et des standards dans les inserts pour flacons d'échantillonneur automatisé AS100
- Le matériel utilisé au laboratoire est une pompe à haute pression P1000XR, 0.75mL / min (~135 bar), une four à colonne à 30°C, une colonne Lichrospher K5OD2 (250x4 mm, 5 μ), un détecteur ultraviolet UV 100 (Thermo Separation Product)
- Solution pour la phase mobile :
 - Tampon A: NaH_2PO_4 50mM; pH 3,2; Acide heptanesulfonique 10mM; Acétonitrile 10%
 - Tampon B: NaH_2PO_4 50mM; pH 3,2; Acide heptanesulfonique 10mM; Acétonitrile 50%

Dosage de l'homocystéine

La concentration plasmatique en HCY a été mesurée au Service de Biochimie du CHU de Nancy-Brabois par une technique de chromatographie liquide à ultra-haute performance (Acquity UPLC HSS T3 (1.8 μm ; 2.1 x 50 mm, Waters)) couplée à la détection par spectrométrie de masse (4000 QTrap Applied Biosystems / MDS Sciex).

Préparation des réactifs

- Préparation d'aliqots de solutions mères de standards non deutérés et deutérés à 1 mmol/L

	Homocystine ⁽¹⁾	Homocystine d8 ⁽²⁾ (98%)
Poudre (mg) *	13,27	13,8
HCl 0,1 N (<i>T° amb, hormones</i>)	50 mL	50 mL
	Vortexer, Soniquer	
NaOH 10 M (+ 4°C, hormones)	1 mL	1 mL
Dithiothréitol (DTT)	132,7 mg	132,7 mg
HCl 0,1 N	qsp 100 mL	
	Vortexer, Soniquer	
Concentration solution mère	1 mM d'HCY	1 mM d'HCY d4
Aliquoter par fraction de 0,7 mL Congeler à – 20°C.		

* NB : Vérifier les quantités à peser pour chaque nouveau flacon en fonction de la masse et de la pureté du produit

Préparation de la gamme d'étalonnage

- Diluer S8 au ½ jusque S1 dans le pool de plasma :

Concentration finale (μM)	S8	S7	S6	S5	S4	S3	S2	S1
Homocystéine	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.781

Préparer le mélange de standards internes

- 150 µL de **HCYd4** à 1 mmol/L
- 150 µL d'**ac succinique d6** à 1 mmol/L
- 10 µL de Ac. Méthylmalonique (**MMA**) **d3** à 2 mmol/L
- 4,5 mL de DTT 2200 mmol/L

Préparation des contrôles d'homocystéine

- Plasma Control Level I (n°0072) + II (n°0073) lyophilisé⁽³⁾
- Reconstituer chaque flacon avec 2 mL d'eau distillée HPLC grade, laisser reposer 10 à 15 min et agiter jusqu'à dissolution totale. Faire des aliquots de 200 µL à conserver à -20°C

Préparer une solution d'extraction de méthanol contenant 0,1% (v/v) d'acide formique⁽⁴⁾

Préparation des échantillons

- Décongeler les plasmas, les vortexer et les centrifuger (10 min, 2300 g à 4°C)
- Allumer la thermosoudeuse Waters (30 min de préchauffe)
- Dans un tube de 1,5 mL en polypropylène :

	Double blanc	Standards S0	Standards S1 à S8	Contrôles (pool, levels 1 et 2)	Plasma
Echantillon	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
	pool	Pool			
Standard interne	0	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
DTT 200 mM	50 µL	0	0	0	0
Vortexer ATTENDRE 15' à température ambiante					
meOH 0,1% ac. formique	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL

- Vortexer et incuber 30 min à 4°C
- Vortexer et centrifuger à 33000 g pendant 10 min à 4°C

- Reprendre 100 µL de surnageant dans un microtube de 1,5 mL (congeler éventuellement si nécessaire de faire ultérieurement l'étape LCMS/MS) par 400 µL d'eau 0,1% (v/v) ac formique (= dilution au 1/5ème)
- Vortexer et centrifuger à 33000 g pendant 10 min à 4°C
- Transférer sur microplaque Waters 350 µL ou 1 mL (ne pas remplir les puits à plus d'1/3)
- Sceller les plaques avec un film plastique à l'aide de la thermosoudeuse Waters (30 min de préchauffage)
- Passer sur LC/MSMS selon la technique ci-après

Méthodes

- Lancement de la méthode LCMSMS *via* Analyst⁽⁵⁾:
 - Méthode UPLC Acquity: &ISO_2.80_MIN_95-5_FL.method
 - Méthode d'acquisition : \&T3_HCY_MMA_AC_SUCC_ISO_FL_H6.dam
 - Méthode de quantification : HCY -AC_SUCC-MMA.qmf

-
- (1) DL Homocystine, acide succinique, Dithiotréitol (DTT) en poudre (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)
 - (2) Standards internes (SI) d8 Homocystine (DLM 3619, Cambridge isotopes)
 - (3) Homocystéine Plasma Control Level I (n°0072) & Level II (n°0073) lyophilisé (Chromsystems)
 - (4) Acide Formique 98% : (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)
 - (5) Colonne UPLC : Acquity UPLC HSS T3 (1,8µm ; 2,1 x 50 mm)
UPLC Acquity Waters, Boucle d'injection de 10 µl
Spectromètre de Masse 4000 QTrap Applied Biosystems / MDS Sciex

PROTOCOL IHC MCP 1

Après déparaffinisation des coupes (4 μ M d'épaisseur), elles ont été prétraitées dans un tampon citrate (pH 6) (Dako, Glostrup, Danemark). L'activité de la peroxydase endogène était bloquée. Les coupes ont ensuite été incubées à 4 ° C pendant une nuit avec un anticorps polyclonal de MCP-1 de lapin dilué à 1: 400 (Abcam, Cambridge, UK). La section a été incubée avec une IgG de chèvre anti-lapin biotinylée (H + L) (Kit Abcam, kit IHC de détection de HRP/DAB (ABC) spécifique du lapin, réf: ab64261 Abcam, Cambridge, UK) pendant 10 min, suivie de streptavidine-peroxydase (Kit Abcam Kit IHC de détection de HRP/DAB (ABC) spécifique de lapin (réf: ab64261 Abcam, Cambridge, Royaume-Uni) pendant 10 min. Les sections ont ensuite été incubées avec AEC (Leica Biosystems Ltd., Newcastle, Royaume-Uni), 200 μ l pendant 10 min, puis contre-colorées avec de l'hématoxyline.

Protocole translocation NFκB

- Déparaffiner et réhydrater les coupes de 3µm paraffinées
Réaliser un démasquage : 20 minutes à 97°C en tampon citrate pH : 6 au bain-marie. -Laver 5 minutes à l'eau

Utilisation du kit Abcam :

- Recouvrir les coupes de tampon « Hydrogen peroxide block », incuber 10 min à RT -Laver 3 fois PBS 5 min
- Ajouter la solution « Protein block » et incuber 10 min à RT
- Laver 3 fois PBS 5 min

Anticorps primaires :

- Anti- NFκB au 1/100 dans du tampon de dilution
- Incubation O/N (16H) à 4°C

J+1

- Laver 3 fois PBS 5 min

Anticorps secondaire :

- Biotinylated goat anti-rabbit IgG(H+L) 10 min à RT
- Laver 3 fois PBS 5 min
- Ajouter la solution « Streptavidin Peroxydase » 10 min à RT
- Laver 3 fois PBS 5 min
- Déposer le DAB+Chromogen (20µl DAB+1ml Chromogen mélangé. Stable 1H) 5min .

- Laver 2 fois 5 min au PBS

- Rincer 1 fois dans l'eau

- Contre coloration hématoxyline 5 min. -Remonter les alcools pour arriver au Xylène -Monter les lamelles à l'Eukitt .

Check list : .

- Chambre Humide -Eau stérile .
- Kit Abcam Rabbit specific HRP/DAB (ABC) detection IHC kit ref : ab64261 de chez Abcam .
- Tampon de démasquage : tampon citrate pH : 6 ref : S1699 de chez Dako
 - Tampon de lavage : PBS pH : 7.2 ref : 75511 de chez biomerieux
 - Tampon de dilution de l'anticorps : Emerald Diluent ref : 936B-08 de chez Cell Marque -Anticorps primaire : anti-NFκB Rabbit monoclonal ref : #4764 Cell Signaling -Hematoxyline : ref : RE7107 de chez Novocastra
- **Colle de montage** : Eukitt de chez Kinder Gmbtt ref : 05347505 .

	Mode opératoire simplifié Trichrome de MASSON	
Approbateur		

OBJET : Coloration morphologique avec notamment mise en évidence du collagène

PREPARATION HISTOLOGIQUE

- Tissus fixés au Formol à 10% (m%v) pH 7,4, au Formol acétique ou au liquide de Duboscq-Brasil et inclus dans de la paraffine.
- Coupes **5 µm** étalées à l'eau albumineuse sur lame porte-objet standard.
- **Témoin** : Pas utile, témoins internes

PREPARATION DES SOLUTIONS

Voir le classeur de préparation des solutions (salle B01.E1C004.)

MODE OPERATOIRE

COLORATION EN AUTOMATE

Déparaffinage des lames

- Déparaffinage et réhydratation sont inclus dans le programme n° 7 automate Gemini Porte B

Coloration

	<i>ref labo</i>	
- Hématoxyline de harris stabilisée	C 3	5 min
- Eau osmosée		3 min
- Rouge ponceau	Ro Po	17 min
- Eau osmosée		30 sec
- Acide phosphomolybdique à 1%	Ac Ph 1%	5 min
- Vert lumière à 1%	Ve Lu 1%	2 min 30
- Eau acétifiée à 1%	Ea Ac 1%	4 min

Déshydratation et montage

- Ethanol absolu	VIII 5	3 min
- Toluène	VIII 9	3 min
- Monter la lamelle (colleuse)	V 14	

RESULTATS

Collagène : bleu ou vert
 Noyaux et ARN : bleus
 Autres composants : rouges (cytoplasmes, grains de sécrétions, globules rouges)

COLORATION MANUELLE

Déparaffinage des lames


	<i>ref labo</i>	
▪ Ethanol 70°		5 min
▪ Ethanol 96°	VIII 4	5 min
▪ Ethanol absolu	VIII 5	5 min
▪ Eau osmosée		5 min

Coloration

▪ Hématoxyline de harris stabilisée	C 3	5 min
▪ Eau osmosée		3 sec
▪ Rouge ponceau	Ro Po	10 min
▪ Eau osmosée		3 sec
▪ Acide phosphomolybdique à 1%	Ac Ph 1%	5 min
▪ Vert lumière à 1%	Ve Lu 1%	2 min
▪ Eau acétifiée à 1%	Ea Ac 1%	5 min

Déshydratation et montage

▪ Ethanol absolu	VIII 5	5 min
▪ Toluène	VIII 9	3 min
▪ Monter la lamelle (colleuse)	V 14	

	Mode opératoire simplifié	
	Coloration au Rouge Sirius	
	Coloration au Rouge Sirius Hématoxyline	

OBJET : Colorer le collagène en rouge et si souhaité les cytoplasmes en jaune et les noyaux en bleu.

PREPARATION HISTOLOGIQUE

- Tissus fixés au Formol à 10% (m%v) pH 7,4 ou au Formol acétique ou au liquide de Duboscq-Brasil et inclus dans de la paraffine : Coupes 5 µm ou 10 µm à 15 µm (coloration topographique) étalées à l'eau albumineuse sur lames porte-objet standard
- **Témoin** : Coupes de même épaisseur d'un prélèvement de **foie**.

PREPARATION DES SOLUTIONS

Voir le classeur de préparation des solutions (salle B01.E1C004.)

MODE OPERATOIRE

Déparaffinage des lames

- Déparaffiner et réhydrater les coupes (automate Gemini programme n°6) **porte A**

Coloration

Ref Labo

Méthode pour la coloration topographique (Rouge Sirius)

1) Rouge Sirius à 0,1%	Ro Si 0,1%	1H 30
2) Eau acétifiée à 0,5%	Ea Ac 0,5%	3 sec
3) Eau acétifiée à 0,5%	Ea Ac 0,5%	3 sec
4) Eau osmosée		3 sec
5) Eau osmosée		3 sec
6) Sécher à l'air		
7) Monter la lamelle (colleuse)	V 14	

Méthode pour la mise en évidence d'une fibrose (Rouge Sirius Hématoxyline)


1) Rouge Sirius à 0,1%	Ro Si 0,1%	1H 30
2) Eau acétifiée à 0,5%	Ea Ac 0,5%	3 sec
3) Eau acétifiée à 0,5%	Ea Ac 0,5%	3 sec
4) Eau osmosée		3 sec
5) Eau osmosée		3 sec
6) Hématoxyline de Harris stabilisée	C3	4 min
7) Eau osmosée		3 sec
8) Eau osmosée		3 sec
9) Ethanol 70°		5 sec
10) Ethanol 96°	VIII 4	5 sec
11) Ethanol absolu	VIII 5	10 min
12) Toluène	VIII 9	
13) Monter la lamelle (colleuse)	V 14	

RESULTATS

Collagène : rouge

Noyaux : bleu (coloration pour la mise en évidence d'une fibrose)

Cytoplasme : jaune (coloration topographique)

	Mode opératoire simplifié	
	Coloration à l'Hématéine-Eosine-Safran	Version projet du 04/01/2013
		Applicable le :

OBJET : Analyse de l'aspect des cellules et de leur organisation architecturale dans les tissus

PREPARATION HISTOLOGIQUE

- Tissus fixés au Formol à 10% (m%v) pH 7,4 ou au Formol acétique et inclus dans de la paraffine.
- Coupes **3 µm (PBO et PBR) 5 µm (autres)** étalées à l'eau albumineuse sur lame porte-objet standard.
- **Témoin** : Coupes histologiques sandwich à chaque changement de bain
- Coupes de tissus congelés fixées à l'éthanol à 96°

PREPARATION DES SOLUTIONS

Voir le classeur de préparation des solutions (salle B01.E1C004.)

MODE OPERATOIRE

Sur coupes en paraffine COLORATION EN AUTOMATE

Déparaffinage des lames

- Déparaffinage et réhydratation sont inclus dans le programme n°1 automate Gemini **Porte A**

Coloration

	<i>Ref labo</i>	
• Hématoxyline de Harris stabilisée	<i>C 3</i>	4 min
• Eau osmosée		4 min
• Alcool chlorhydrique à 0,25%	<i>Al Ch 0,25%</i>	10 sec
• Eau osmosée		6 min
• Eosine à 1% acétifiée	<i>Eo 1% Ac</i>	3 min
<i>Réacétifier quotidiennement en ajoutant 5 µL d'acide acétique (I 1)</i>		
• Eau osmosée		3 min
• Ethanol 96°	<i>VIII 4</i>	3 min
• Ethanol absolu	<i>VIII 5</i>	3 min
• Safran	<i>Sa</i>	5 min

Déshydratation et montage

• Ethanol absolu	<i>VIII 5</i>	3 min
• Ethanol absolu	<i>VIII 5</i>	3 min
• Toluène	<i>VIII 9</i>	3 min
• Monter la lamelle (colleuse)	<i>V 14</i>	

**Sur coupes en paraffine
COLORATION MANUELLE**

Déparaffinage des lames	<i>Ref labo</i>	
▪ Ethanol 70°		5 min
▪ Ethanol 96°	<i>VIII 4</i>	5 min
▪ Ethanol absolu	<i>VIII 5</i>	5 min
- Eau osmosée		5 min
Coloration		
- Hématoxyline de Harris stabilisée	<i>C 3</i>	6 min
- Eau osmosée		4 min
- Alcool chlorhydrique à 0,25%	<i>Al Ch 0,25%</i>	3 sec
- Eau osmosée		3 min
- Eau osmosée		3 min
- Eosine à 1% acétifiée	<i>Eo 1% Ac</i>	5 min
<i>Réacétifier quotidiennement en ajoutant 5 µL d'acide acétique (11)</i>		
- Eau osmosée		3 min
- Ethanol 96°	<i>VIII 4</i>	3 min
- Ethanol absolu	<i>VIII 5</i>	3 min
- Safran	<i>Sa</i>	5 min
Déshydratation et montage		
- Ethanol absolu	<i>VIII 5</i>	5 min
- Ethanol absolu	<i>VIII 5</i>	3 min
- Toluène	<i>VIII 9</i>	3 min
- Monter la lamelle (colleuse)	<i>V 14</i>	

Sur coupes de tissus congelés

Coloration		
- Ethanol 96°	<i>VIII 4</i>	30 sec
- Eau osmosée		passage
- Hématoxyline de Harris stabilisée	<i>C 3</i>	1 min
- Eau osmosée		passage
- Alcool ammoniacal	<i>Al Am</i>	30 sec
- Eau osmosée		passage
- Eosine à 1% acétifiée	<i>Eo 1% Ac</i>	30 sec
- Eau osmosée		passage
- Ethanol 96°	<i>VIII 4</i>	3 sec
- Ethanol absolu	<i>VIII 5</i>	3 sec
- Safran	<i>Sa</i>	30 sec
Déshydratation et montage		
- Ethanol absolu	<i>VIII 5</i>	3 sec
- Toluène ou Clearify	<i>VIII 9 ou VIII 20</i>	1 min
- Monter la lamelle	<i>V 14</i>	

RESULTATS

Noyaux : bleus
Cytoplasme : rose
Fibres musculaires et hématies : rouge vif
Collagène: jaune or]

Western blot.

- Extraction des protéines:.

NB : L'extraction des protéines se fait en condition dénaturante à partir des microdissections de tissu

Extraction des protéines (travailler toujours sur de la glace)

- Préparer du tampon de lyse RIPA⁽¹⁾ (Radioimmunoprecipitation Assay)
- Mettre le volume correspondant de tampon RIPA froid selon la microstructure
- Incuber 10 minutes dans la glace
- Homogénéiser par 10 à 20 allers-retours avec une seringue de 1mL et l'aiguille de 0.60x25 mm BL /LB (23g x 1" IM BD Sterile Hypodermic Needle)
- Faire 3 cycles congélation-décongélation (azote liquide -196°C _ bain marie à 37°C)
- Centrifuger 30 minutes à 4°C, 12.000 g
- Récupérer le surnageant et Stocker par aliquots à -80°C.

Solutions stock

Tampon RIPA	NaCl	8 g/l	}	Dissous dans de l'eau ultrapure
	Na ₂ HPO ₄	1,44 g/l		
	KH ₂ PO ₄	0,24 g/l		
	NP40	1 %		
	DOC	0,5 %		
	SDS	0,1 %		
PMSF		10 mg/ml d'éthanol		
Na₃VO₄ à 100mM		18,39 mg/ml d'H ₂ O		

- **Tampon de lyse RIPA**

Tampon RIPA	
PMSF	10µl/ml RIPA
Na₃VO₄	10µl/ml RIPA
Cocktail antiprotéase	14µl/10ml RIPA

- **Dosage des protéines par le kit BCA :**

Principe : Les concentrations protéiques ont été mesurées par la méthode BCA⁽²⁾, ou BC Assay qui est un dosage colorimétrique basé sur l'acide bicinchoninique. Les protéines réduisent l'ion cuivrique Cu(II) en Cu(I) en milieu alcalin. L'acide bicinchoninique est un réactif colorigène hautement spécifique pour le Cu(I), qui forme un complexe pourpre ayant une absorption optique entre 540 et 590nm. L'absorbance est proportionnelle à la concentration de protéines

Préparation d'une gamme étalon de BSA (Bovine Serum Albumin)

- Préparer une gamme étalon (2 ; 1,6 ; 1,2 ; 0,8 ; 0,4 ; 0,2 ; 0,1 et 0 mg/ml, en doubles) à partir d'une solution stock de BSA⁽³⁾ de concentration 2mg/ml diluée dans la même solution que les échantillons à doser (tampon de lyse RIPA)

	<i>Sol. BSA</i> <i>2mg/ml</i>	<i>Tp lyse</i> <i>RIPA</i>	[Protéines] <i>µg/mL</i>
A	50 µl BSA	0 µl	2000
B	40 µl BSA	10 µl	1800
C	30 µl BSA	20 µl	1200
D	20 µl BSA	30 µl	800
E	10 µl BSA	40 µl	400
F	5 µl BSA	45 µl	200
G	2,5 µl de BSA	47,5 µl	100
H	0	50µl	0

Dosage en microplaque

- Dans une plaque 96 puits à fond plat, mettre 25µl de chaque standard ou échantillon dans les puits (2 prises d'essai).
- Ajouter 200 µL de réactif (kit BCA : 50 sol. A /1 sol. B) dans chaque puits.
- S'il faut diluer l'échantillon, utiliser le tampon de lyse RIPA pour la dilution
- Couvrir la plaque et l'incuber 30 min à 37°C.
- Lire l'absorbance à 570 nm sur le lecteur de microplaque Microplate Reader™ (Bio-rad) et calculer la concentration en protéines de chaque échantillon en tenant compte des facteurs de dilution.

Préparation des gels

- Nettoyer les plaques de verre à l'alcool
- Monter l'appareil d'électrophorèse⁽¹⁾: plaques de verre et espaceurs (en général D'épaisseur 1,5 mm)
- Préparer le gel de séparation à la concentration souhaitée⁽²⁾. Pour 2 gels prévoir 20ml de solution
- Couler les gels entre les deux plaques de verre
- Déposer environ 500 μ l d'isopropanol et laisser polymériser le gel environ 15 minutes (le temps de polymérisation est en fonction de la température ambiante)
- Rincer abondamment à l'eau distillée et éliminer toutes traces d'eau
- Préparer le gel de concentration à 5 %⁽³⁾ (pour 2 gels prévoir 8ml) et couler le au-dessus du gel de séparation (couler en excès)
- Positionner le peigne en Téflon en évitant la formation de bulles et laisser polymériser.
- Retirer le peigne et rincer les puits avec du tampon de migration⁽⁴⁾
- Monter l'appareil en assemblant les deux supports de gel sur le système central
- Remplir le réservoir central (cathode) jusqu'en haut ainsi que la cuve (à moitié) avec le tampon de migration

Préparation des échantillons

Pour un premier essai, prévoir un dépôt de 20 à 30 μ g de protéines par puits.

- Dans un tube, ajouter 1 volume de tampon de dépôt Laemmli 2X⁽⁵⁾ à 1 volume d'échantillon
- Chauffer 5 mn les échantillons à 100°C
- Charger les puits avec les échantillons et les marqueurs de poids moléculaire⁽⁶⁾

Migration sur un générateur à voltage constant

- Laisser migrer à 80V les échantillons dans le gel de concentration environ 15mn
- Une fois dans le gel de séparation, laisser migrer à 110V les échantillons environ 2 heures
- Arrêter la migration quand le front de migration arrive en bas des plaques

Vérification du transfert (non obligatoire)

- Colorer la membrane avec une solution de Rouge Ponceau S⁽¹³⁾ pendant 5mn puis décoloration à l'eau distillée.

NB : A ce stade on peut laisser sécher la membrane et la conserver au frigo pour une révélation ultérieure. Avant de réutiliser une membrane sèche, la repasser dans un bain de méthanol.

Blocage

- Mettre les membranes dans une solution de TBST⁽¹⁴⁾ /lait écrémé 5% sous agitation pendant 1 heure à température ambiante afin de bloquer les sites aspécifiques.

Nota : suivant les anticorps, la solution de blocage peut être faite soit avec de la BSA soit avec du lait écrémé (idem pour la dilution des anticorps)

Anticorps primaire⁽¹⁵⁾

- Découper une pochette plastique légèrement supérieure à la surface de la membrane
- Préparer la solution avec le premier anticorps dilué à la concentration souhaitée dans TBST/lait ou BSA 5 % (4 à 5ml au total)
- Placer la membrane dans la pochette plastique, mettre la solution d'anticorps, souder la pochette et incuber pendant 1 nuit à 4°C sous agitation lente

Lavage

- Sortir la membrane de sa pochette plastique
- Rincer la membrane avec du TBST 4X 10mn sous agitation rapide à température ambiante

Anticorps secondaire⁽¹⁶⁾

- Procéder de la même façon qu'avec le 1^{er} anticorps
- Incuber 1 heure sous agitation lente à température ambiante

Lavage

- Sortir la membrane de sa pochette plastique
- Rincer la membrane avec du TBST 4X 10mn sous agitation rapide à température ambiante

Révélation ECL

- Préparer la solution ECLTM ⁽¹⁷⁾ (pour une membrane prévoir 1ml au total)
- Sur un film SaranTM déposer l'ECLTM
- Sortir la membrane du tampon de lavage, la secouer pour éliminer l'excès de tampon, la poser sur l'ECLTM, protéines vers le bas en évitant la formation de bulles
- Incuber 1mn
- Bien sécher la membrane entre deux papiers absorbants et la mettre dans une cassette entre deux films SaranTM, protéines vers le haut
- Utiliser un détecteur FUSION-FX7⁽¹⁷⁾ pour révéler les membranes

Solution pour préparation des gels de concentration et de séparation pour SDS-PAGE

		10 mL	20 mL	30 mL	40 mL	50 mL
6%	H ₂ O MQ	5,3	10,6	15,9	21,1	26,5
	Acrylamide Mix 29:1	2	4	6	8	10
	Tris 1,5 M pH 8,8 ⁽⁷⁾	2,5	5	7,5	10	12,5
	SDS ⁽⁸⁾ 10%	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
	APS ⁽⁹⁾ 10%	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
	TEMED ⁽¹⁰⁾	0,008	0,016	0,024	0,032	0,04
8%	H ₂ O MQ	4,6	9,3	13,9	18,6	23,2
	Acrylamide Mix 29:1	2,7	5,3	8	10,7	13,4
	Tris 1,5 M pH 8,8	2,5	5	7,5	10	12,5
	SDS 10%	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,006	0,012	0,018	0,024	0,03
10%	H ₂ O MQ	4	7,9	11,9	15,8	20
	Acrylamide Mix 29:1	3,3	6,7	10	13,3	16,6
	Tris 1,5 M pH 8,8	2,5	5	7,5	10	12,5
	SDS 10%	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,004	0,008	0,012	0,016	0,02
12%	H ₂ O MQ	3,3	6,6	9,9	13,2	16,4
	Acrylamide Mix 29:1	4	8	12	14	20
	Tris 1,5 M pH 8,8	2,5	5	7,5	10	12,5
	SDS 10%	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,004	0,008	0,012	0,016	0,02
15%	H ₂ O MQ	2,3	4,6	6,9	9,2	11,4
	Acrylamide Mix 29:1	5	10	15	20	25
	Tris 1,5 M pH 8,8	2,5	5	7,5	10	12,5
	SDS 10%	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,004	0,008	0,012	0,016	0,02
		2 mL	4 mL	6 mL	8 mL	10 mL
Stacking	H ₂ O MQ	1,4	2,7	4,1	5,5	6,8
	Acrylamide Mix 29:1	0,33	0,67	1	1,3	1,7

	Tris 0,5 M pH 6,8 ⁽¹¹⁾	0,25	0,5	0,75	1	1,25
	SDS 10%	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1
	APS 10%	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1
	TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01

-
- (1) Acrylamide : bisacrylamide (29:1) (Bio-Rad Laboratories)
 - (2) Isopropanol VWR Prolabo
 - (3) Tampon de migration 10X (pour 1l) : 30 g de Tris ; 144 g de glycine ; 10 g de SDS 1% ; pH~8,3 (ne pas ajuster avec HCl ; conserver à +4°C), A utiliser 1X concentré à température ambiante : mélanger 100 mL de la solution 10X dans 900 mL d'eau distillée
 - (4) Tampon Laemmli 2X (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)
 - (5) Marqueurs de poids moléculaires : *Precision Plus Protein Dual Color Standards* (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France)
 - (6) Cuve d'électrophorèse : Mini-PROTEAN® II (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France)
 - (7) Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 : 18,165 g de Tris dans 100 mL d'eau distillée ; pH 8,8 ; conserver à +4°C, (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)
 - (8) SDS (sodium dodécylsulfate) 10%: 10 g de SDS dans 100 mL d'eau distillée, conserver à température ambiante, (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)
 - (9) APS (persulfate d'ammonium) 10%: 1 g d'APS dans 10 mL d'eau distillée, aliquoter par 400 µL, conserver à -20°C, (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)
 - (10) TEMED (Tetramethylethylenediamine) : Euromedex
 - (11) Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 : 6,055 g de Tris dans 100 mL d'eau distillée ; pH 6,8 ; conserver à +4°C, (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)

Résumé: La carence en donneurs de méthyle (acide folique et vitamine B12) (MDD) pendant la gestation et la lactation produit une stéato-hépatite non alcoolique (NASH) chez les animaux soumis au régime riche en graisses (HE) pendant l'âge adulte, en dépit d'une normalisation histologique et métabolique par un régime normal entre le sevrage (J21) et l'âge de puberté (J50). Le microbiote peut déclencher l'inflammation par les lipopolysaccharides (LPS) par inadéquation de l'activation de récepteur Toll-like 4 (TLR4). Notre hypothèse de base est que le régime MDD, le régime HE, les LPS du microbiote et l'inflammation intestinale (modèle Dextran Sodium Sulfate (DSS) comme déclencheurs et l'immunité innée en tant que modulateur font partie d'un même scénario conduisant à la NASH. Des rats carencés (MDD), soumis ou non au régime riche en graisse à l'âge adulte (HE) et exposés ou non à deux inducteurs de l'inflammation locale et systémique, le DSS (inflammation intestinale) et les LPS (effets systémiques de l'inflammation intestinale) ont été étudiés. Nous n'observons pas d'altération de l'immunité innée (TLR4) dans les groupes MDD/DSS, MDD/HE et MDD/HE/LPS. L'inflammation observée au niveau intestinal chez les rats MDD/DSS est également observée au niveau hépatique, avec de stéatose et activation de l'inflammasome et de la chimiokine MCP-1 et IL-1 β . De façon surprenante, cet effet systémique ne met pas en jeu la voie TLR4 et son ligand LPS même quand les rats étaient exposés au LPS directement au niveau péritonéal. Notre étude permet de conclure que la NASH favorisée par les effets systémiques de l'inflammation intestinale est médiée par MCP-1/IL-1 β , mais pas par l'activation de TLR4 par translocation de LPS. L'immunité innée n'étant pas impliquée même par l'injection directe du LPS, les effets respectifs et synergiques de régime MDD, du régime HE et du LPS restent à décrypter par la suite.

Mots clés: Foie, maladie intestinale inflammatoire, récepteur Toll-like 4, Lipopolysaccharides, inflammation.

Summary: Deficiency of methyl donors (folic acid and vitamin B12) (MDD) during pregnancy and lactation produces non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in animals fed high fat (HE) diet, despite histological and metabolic normalization by a normal diet between weaning (J21) and puberty (J50). The microbiota can trigger inflammation by lipopolysaccharides (LPS) by inadaptation of Toll-like receptor activation 4 (TLR4). Our basic assumption is that MDD, HE diet, microbiota LPS and intestinal inflammation (Dextran Sodium Sulfate (DSS) model) as triggers and innate immunity as a modulator are part of the same scenario leading to NASH. Deficient rats (MDD), whether or not exposed to the high-fat diet in adulthood (HE) and whether or not exposed to two inducers of local and systemic inflammation, DSS (intestinal inflammation) or LPS (systemic effects intestinal inflammation) were studied. We did not observe alterations in innate immunity (TLR4) in the MDD/DSS, MDD/HE and MDD/HE/LPS groups. Inflammation observed in the intestines in MDD/DSS rats is also observed in the liver, with steatosis and activation of the inflammasome and chemokine MCP-1 and IL-1 β . Surprisingly, this systemic effect does not involve the TLR4 pathway and its ligand LPS even when the rats were exposed to LPS directly at the peritoneal level. Our study conclude that NASH favored by the systemic effects of Intestinal inflammation is mediated by MCP-1/IL-1 β , but not by activation of TLR4 by translocation of LPS. Since innate immunity is not involved even by the direct injection of LPS, the respective and synergistic effects of MDD diet, HE diet and LPS remain to be described thereafter.

Key words: Liver, intestinal inflammation, Toll-like receptor 4, lipopolysaccharides, inflammation.