

Metabolomics: un outil prometteur dans la compréhension et le diagnostic des Maladies du Foie Non Alcoolique

Davide Degli Esposti, PhD
Doctorat : UFR Pharmacie UP11 Chatenay– INSERM UMR1004, Villejuif
Post-doctorat : Centre International pour la Recherche sur le Cancer, OMS, Lyon



Bonjour,

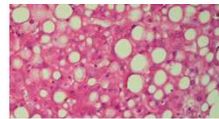
Ma présentation vise sur l'exploitation de données –omics pour une meilleur compréhension biologique et prise en charge clinique des patients atteints des Maladies du Foies non Alcoolique

Maladies métaboliques et Non Alcoholic SteatoHepatitis (NASH)

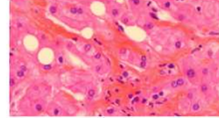
Obésité (>500M)
Diabète (285 - 347M)

Dysfonctions
métaboliques et immunitaires

Stéatose ≈ 20-40%
NASH ≈ 6-17%
1/3 NASH → cirrhose
→CHC



Stéatose: > 5% hépatocytes
NAFLD: Non alcoholic Fatty Liver Disease



NASH: stéatose + inflammation
Non alcoholic Steato-Hepatitis

Dans les dernières décennies, les maladies métaboliques tels que le diabète et des conditions favorisant leur développement telles que l'obésité ont atteint un niveau épidémique, et pas seulement dans les pays occidentaux. En effet la prévalence globale de l'obésité a dépassé le 500 million de personnes, alors que la prévalence du diabète est estimée entre 285 et 350 million de personnes. Ces conditions sont caractérisées par des dysfonctions métaboliques et immunitaires systémiques. Au niveau hépatique, la première expression des maladies métaboliques est la stéatose, condition qui consiste en l'accumulation de vacuoles lipidiques dans au moins 5% des hépatocytes. Sa **prévalence** dans la population générale est estimée **20-40%** et il s'agit **d'une condition réversible**.

Si à l'accumulation de lipide s'accompagne la présence d'infiltrats inflammatoires on parle de stéatohépatite.

Sa **prévalence** dans la population générale est estimée entre **6-17%**.

Cette condition n'est pas réversible et il s'agit d'une pathologie importante, notamment car elle peut évoluer dans un tiers de cas vers une cirrhose.

Evolution :

26% de SH progressent vers une cirrhose Carcinome hépatocellulaire (CHC)

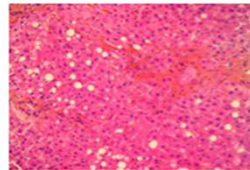
33% de CHC dans NASH surviennent en absence de cirrhose

Le diagnostic de NASH

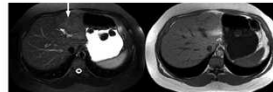
Absence d'autre maladie hépatique



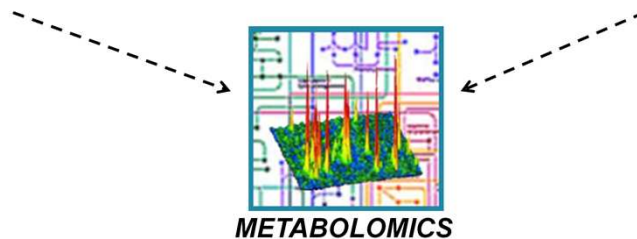
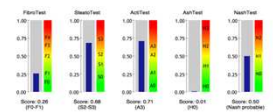
Bilan hépatique
Echographie
Elastographie
Biopsie hépatique



MRI
MR-spectroscopie



Steatotest
CK18 sérique
Leptine, adiponéctine, résistine



Le diagnostic de NASH se fait essentiellement par négation, car il est nécessaire d'exclure la présence d'autre maladie hépatique (origine virale, alcoolique, auto-immune, toxique ou génétique).

Bilan hépatique se présente altéré: ASAT, GGT

L'échographie (positive si stéatose dans plus des 20% des hépatocytes) ou l'élastographie (FibroScan) peuvent donner des indications ultérieures, mais la biopsie hépatique, avec un tableau histologique de stéatose et d'hépatite ± fibrose, reste le gold standard, malgré les risques de la manœuvre.

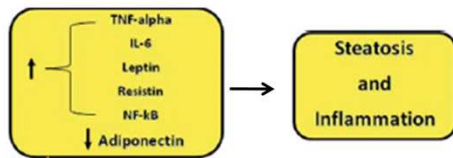
Dans les dernières années, des technologies d'imagerie plus sophistiquées permettent d'avoir une majeure précision du diagnostic, mais dans la pratique clinique leur utilisation reste assez limitée.

D'un point de vue biochimique, un panel de marqueurs associé à un algorithme (Steatotest) est utilisé avec une bonne corrélation avec le diagnostic histologique chez des patients à haut risque (HCV chronique, obèses morbides).

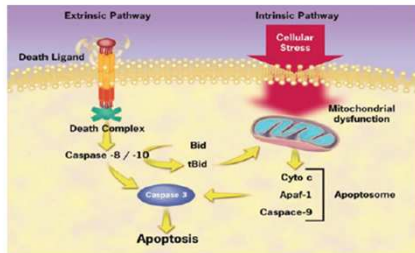
D'autres marqueurs sont aussi utilisés en association avec ces tests, mais leur utilisation est encore assez anecdotique.

Dans ce cadre, l'analyse globale des métabolites circulants dans les liquides biologiques du patient (plasma et urine le plus souvent) pourrait s'avérer un outil important dans la découverte et la mise au point de marqueurs qui puissent améliorer la spécificité, la sensibilité et la valeur pronostic dans la prise en charge de la NASH.

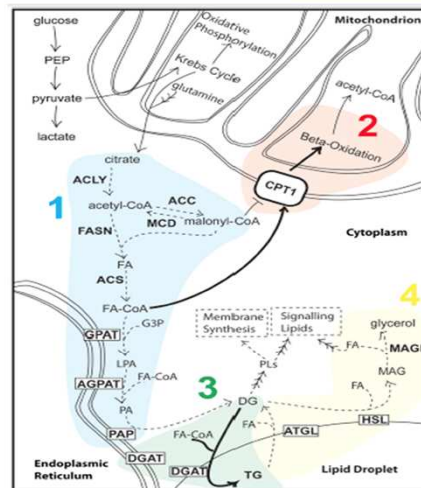
NASH: au delà de l'accumulation de lipides



Une maladie inflammatoire: TNF α ; IL6



Une maladie de l'apoptose: méga-mitochondrie



Une maladie multi-organelles: mito, ER, vésicules lipidiques et trafic intracellulaire des lipides.

METABOLOMICS

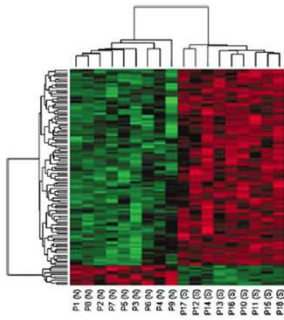
Les données disponibles montrent déjà que la NASH est une maladie multi-dimensionnelle à plusieurs niveaux:

- au niveau d'organe, à l'accumulation de lipide s'accompagne une inflammation, dont les cytokines principales identifiées sont le TNF α et l'IL6.

- au niveau cellulaire, on observe une majeure fragilité des hépatocytes, qui meurent par apoptose et/ou nécrose, notamment à cause d'anomalies mitochondriales, dont le méga mitochondrie sont un des premiers signes découverts

- Au niveau sub cellulaire, avec le mitochondrie d'autres organelles, notamment le reticulum endoplasmique, mais aussi les vacuoles lipidiques sont impliqués. En effet le vacuole lipidiques participe activement dans le trafic intra-extracellulaire de lipides. L'alteration de l'homéostasie de l'ensemble de ces organelle conduit à la production dérégulé de ROS, NOS et et la libération d'autres molécules, comme AAs ou espèces particulières des lipides. Cet aspect multidimensionnelle indique que un approche multi-parametrique comme celui de la metabolomique pourrait offrir des pistes pour un meilleur diagnostic et pronostic.

Stéatose et NASH: transcriptomics



Augmentation de la transcription des gènes impliqués dans les fonctions mito (UQCRC1, NDUFA5) et les voies inflammatoires (IL1R, TGFb).

Chiappini et al Lab Invest 2006

Dans un contexte chirurgical, une manœuvre (IP) visant la diminution des lésions I/R induit l'expression des gènes anti-inflammatoires (IL1Ra) et active l'autophagie

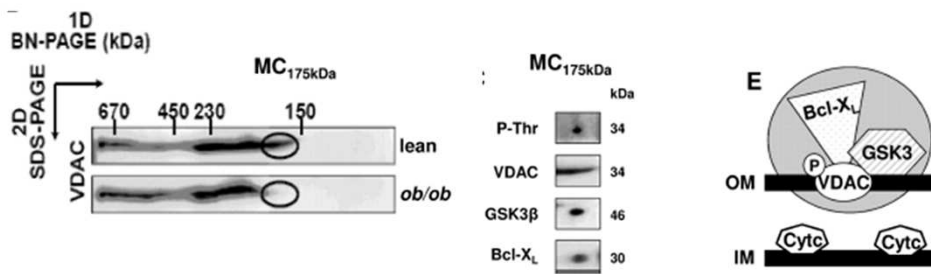
Barrier, Faseb J, 2005

Etude	Cibles identifiées	Référence
6 NASH vs 6 foies sain	Dimin. gènes antiox mito Augm. insulín resistance genes	Sreekumar et al Hepatology 2003
Cohorte de 98 patients ayant foies sain, stéatose ou NASH	Dimin. gènes antiox (dès stéatose) Augm. gènes fibrogenèse	Younossi et al Hepatology 2005
25 NASH vs 25 foies sains	Dimin. 23 miRs: métab lipides , inflammation, apoptose	Cheung et al Hepatology 2008
90 NAFLD patients	Augm. Inflammation , fibrogènes Corr méthylation ADN-gene expression	Murphy et al Gastroenterology <i>in press</i>

Je vais maintenant montrer des résultats de notre équipe et de la littérature utilisant d'autres technologies omiques. Dans notre laboratoire, il a été montré grâce à des approches transcriptomiques que dans les foies stéatosiques il y a une augmentation de la transcription des gènes impliqués dans les fonctions mito (UQCRC1, NDUFA5) et les voies inflammatoires (IL1R, TGFb). Ce même approche a été utilisé dans un contexte chirurgical, et il a permis de montrer que une manoeuvre (IP) visant la diminution des lésions I/R induit l'expression des gènes anti-inflammatoires (IL1Ra) et active l'autophagie.

Les données de la littérature montrent globalement que au cours de la progression de la stéatose vers une NASH, il y a un diminution de la réponse antioxydant, une altération du métabolisme lipidique, et une augmentation de l'expression des ène impliqué dans l'inflammation, l'apoptose et la fibrogènes. Notamment, certains mécanismes épigénétique comme la méthylation de l'ADN ou une dérégulation des petits ARN peuvent être à la base des ces altération cellulaires et tissulaires

Stéatose et NASH: proteomics



Martel, Allouche, Degli Esposti et al, Hepatology 2013

Étude	Cibles identifiées	Référence
Cohorte de 98 patients ayant foies sain, stéatose ou NASH	Augm. protéines associées à l' apoptose et adipocytokines	Younossi et al Hepatology 2005
Cohorte de 167 patients ayant NAFLDs	Augm. P-GSK3 et PKA	Younossi et al J Proteom Res 2010
Cohorte de 69 patients ayant foies sain, stéatose ou NASH	Serum protéome: augm. protéines associées à inflammation , coagulation, extracell matrix.	Bell et al Hepatology 2010

Notre équipe a aussi montré à l'aide d'approches protéomique que l'augmentation de perméabilité de la membrane externe de la mitochondrie dans la stéatose est corrélée à une diminution de la phosphorylation de la protéine mitochondriale VDAC (voltage-dépendent anion channel et une NADH oxydase), et ce changement est médié par la glycogène synthase kinase 3 (GSK3) qui forme un complexe protéique avec VDAC et d'autre protéine au niveau de la membrane externe de la mitochondrie. Ce résultats suggèrent que VDAC agisse comme un senseur mitochondriale de la toxicité de lipidique par le biais de son état de phosphorylation qui est médié par GSK3.

D'autres études ont montré que au cours du développement de la NASH, on observe une augmentation de l'expression de protéines impliqués dans l'apoptose et la réponse inflammatoire et une augmentation de la P de GSK3, donc son inactivation, ce qui renforce en effet nos résultats.

Stéatose et NASH: lipidomics

Etude	Cibles identifiées	Référence
5 foies stéatosiques; 2 foies non-stéatosiques. ToF-SIMS	Déplétion Vit E, localisation lipides et cholestérol	Débois et al Anal Chem 2009
3 foies stéatosiques; 3 foies non-stéatosiques. FTIR +ToF-SIMS	DAGs spécifiques (C30-C36) concentrés dans les vésicules	Le Naour F et al Plos One 2009

Etude	Cibles identifiées	Référence
9 Contrôles, 9 NAFLD et 9 NASH biopsies hépatiques	Augm. TAG/DAG et cholestérol libre	Puri et al Hepatology 2007
50 contrôles, 25 NAFLD, 50 NASH plasma	Augm. lipides pro-inflammatoires et diminution catabolisme peroxisomes dans NASH	Puri et al Hepatology 2009

Une maladie multi-lipides

Dans notre unité, des approches métabolomiques ciblées à l'étude des lipides (lipidomique) sont développées. Ces techniques ont permis de montrer une déplétion de la vitamine E dans les vacuoles lipidiques des hépatocytes et une sous-localisation précise de différentes espèces lipidiques.

Des approches similaires ont montré une augmentation du ratio TAG/DAG et du cholestérol libre au niveau hépatique au cours de la NASH. Ce changement au niveau tissulaire entraîne une sorte de signature détectable dans le plasma des patients atteints de NASH où on retrouve une augmentation des espèces lipidiques pro-inflammatoires.

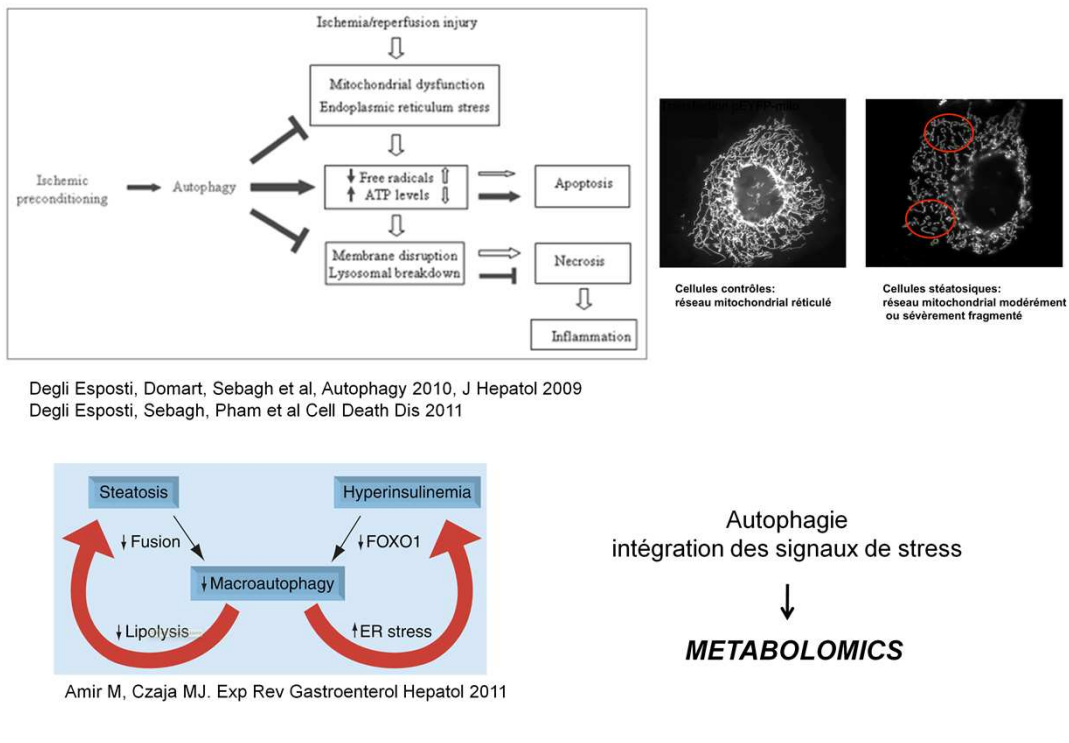
Stéatose et NASH: metabolomics

Etude	Cibles identifiées	Référence
Modèle animal + validation sérum patients (28 contrôle, 15 stéatose, 17 NASH). H-MR	Augm. glucose, Glu/Gln, taurine de stéatose simple vers NASH	Li H et al, J Proteome Res 2011
25 contrôles, 11 stéatose, 24 NASH plasma	Augm. sels biliaires NAFLD Augm. carnitine, dim LCFA in NASH	Kalhan et al, Metabolism 2011
17 contrôles, 4 stéatose, 37 NASH biopsies hépatiques	Augm. taurine et dim. choline dans NASH	Lake et al Toxicol Appl Pharmacol 2013

Les approches metabolomique n'ont pas été encore très exploité pour étudier la NASH.

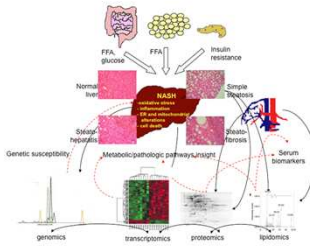
Les résultats disponibles montrent qu'il est possible, comme dans le cas de l'utilisation des autres techniques -omiques que je viens de montrer, d'identifier des profils chimiques particuliers dans la NASH et que ces profils changent avec l'évolution de la maladie du foie non alcoolique. Notamment, un changement des fonctions biliaires est retrouvé dans différentes cohortes de patients.

Stéatose et NASH: autophagie: omics-physiopathologie-omics



Une autre piste suggestive pour l'application des techniques metabolomiques peut venir des études plus physiopathologiques. Notre laboratoire a récemment montré que l'autophagie, un processus catabolique impliqué aussi dans la survie cellulaire en régulant l'apoptose et la nécrose, est altérée dans le foie stéatosique. Il est aussi possible que dans ce contexte l'autophagie contrôle aussi la viabilité des mitochondries à travers une autophagie ciblée aux mitochondries endommagées (mitophagie). D'ailleurs, une diminution de l'autophagie est impliquée dans l'augmentation de la stéatose et de l'hypéinsulinémie. Donc l'autophagie semble être un processus d'intégration des différents systèmes cellulaires et des applications metabolomiques ciblées à l'investigation des altérations des métabolites au cours d'une dysfonction autophagique semblent prometteuses.

Conclusions

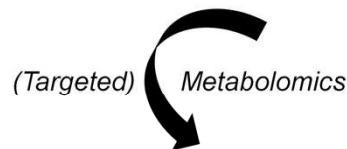


Dysfonctions énergétiques et structurales des mitochondries

Activation des voies inflammatoires

Lipotoxicité

Apoptose, Autophagie et Nécrose



Etudes cliniques perspectives pour la validation d'un nombre (raisonnable) de cibles:

- identifiant les patients à risque d'évolution d'une NAFLD vers une NASH
- aisément mesurables dans la pratique clinique /en ville
- analysables par des algorithmes bioinformatiques open-source pour accélérer la transition vers la clinique

En conclusion, la NASH est une pathologie caractérisée par un large spectre d'anomalies systémiques, impliquant à la fois divers types cellulaires et différents tissus, ayant comme résultat des dysfonctions énergétique et structurales des mitochondries, une activation des voies inflammatoires

et d'une toxicité médiée par des espèces lipidiques spécifique, ce qui porte à une altération de l'homéostasie tissulaire hépatique, avec notamment une dérégulation de l' Apoptose, l' Autophagie et la Nécrose.

Ce différents aspects peuvent être étudiée par des approche de metabolomics ciblée et il est essentielle l'application de cette technologie dans le contexte d'études perspectives qui puissent identifier les patients à risque d'évolution d'une NAFLD vers une NASH avec un nombre raisonnable de cibles, simple à mesurer et à analyser dans la pratique clinique.