



Rôle des acides gras dans l'induction du cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) hépatique : implication dans la stéatohépatite non alcoolique (NASH) et dans l'hépatotoxicité du paracétamol

Clémence Penhoat

► To cite this version:

Clémence Penhoat. Rôle des acides gras dans l'induction du cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) hépatique : implication dans la stéatohépatite non alcoolique (NASH) et dans l'hépatotoxicité du paracétamol. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2023. Français. NNT : 2023URENB009 . tel-04191149

HAL Id: tel-04191149

<https://theses.hal.science/tel-04191149>

Submitted on 30 Aug 2023

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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES

ECOLE DOCTORALE N°637

Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : « Nutrition et Pathologies Métaboliques »

Par

Clémence PENHOAT

**Rôle des acides gras dans l'induction
du cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) hépatique :**
Implication dans la stéatohépatite non alcoolique (NASH) et
dans l'hépatotoxicité du paracétamol

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 02 mars 2023

Unité de recherche : INSERM U1241 – Institut NuMeCan – Nutrition, Métabolismes et Cancer

Rapporteurs avant soutenance :

Pr Isabelle LECLERCQ Professeure des universités – Université catholique de Louvain – Belgique

Dr Hervé GUILLOU Directeur de recherche – Université de Toulouse III – Toulouse

Composition du jury :

Présidente **Dr Béatrice MORIO** Directrice de recherche – Université Claude Bernard – Lyon

Examineurs : **Pr Bruno MEGARBANE** Professeur des universités – Université Paris-Diderot – Paris

Pr Isabelle LECLERCQ Professeure des universités – Université catholique de Louvain – Belgique

Dr Hervé GUILLOU Directeur de recherche – Université de Toulouse III – Toulouse

Directeur de thèse : **Pr Bernard FROMENTY** Directeur de recherche – Université de Rennes 1 – Rennes

Co-directrice de thèse : **Dr Karima BEGRICHE** Maître de conférences – Université de Rennes 1 – Rennes

REMERCIEMENTS

Après trois ans de travail, j'aimerais tout d'abord remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de ma thèse.

Je tiens tout d'abord à remercier mes directeurs de thèse **Dr Karima BEGRICHE** et **Dr Bernard FROMENTY**. Je vous remercie profondément de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce doctorat. Votre confiance, votre encadrement et votre investissement m'ont permis de mener à bien ce projet pendant ces trois années. Ces quelques lignes ne témoignent que faiblement la reconnaissance que j'ai envers vous.

Je remercie également **Pr Isabelle LECLERCQ** et **Dr Hervé GUILLOU** pour avoir accepté de me faire l'honneur d'être rapporteurs de mon travail de thèse. Merci également à **Dr Béatrice MORIO** et **Pr Bruno MEGARBANE** d'avoir accepté d'être examinateurs pour mon jury de thèse.

Je remercie également **Dr Odile SERGENT** et **Dr Khadija OUGUERRAM** pour m'avoir accompagné au cours de cette thèse en participant à mes deux comités de thèse. Vos questions et conseils pertinents m'ont permis d'évoluer et d'avancer dans le projet.

Mes remerciements s'adressent également aux membres de **l'animalerie Arche** et de la **plateforme H2P2** pour leur aide et leurs conseils en expérimentation *in vivo* et en histologie.

Je remercie chaleureusement l'ensemble des membres du laboratoire de NuMeCan, avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler. Merci à toi **Grégory** pour tes chocolats chauds, ta bienveillance et ton expertise précieuse en biologie moléculaire, et à toi **Catherine** pour ton aide et ton écoute au quotidien. Merci également à **Adina, Annaïg, Anne, Aude, Caro, Claudine, Gaëlle A., Gaëlle B., Isabelle, Julie B., Karen, Laurence, Michèle, Olivier, Orlando, Pascal, Patricia, Pénélope, Pierre-Jean** et **Thomas**. Je remercie aussi les stagiaires **Cassandra, Audrey** et **Marie** avec qui j'ai pu travailler. Enfin, je remercie tout particulièrement **Julie M.** Tu m'as beaucoup appris au laboratoire; encore félicitations pour ton poste.

J'adresse un remerciement particulier à l'ensemble du laboratoire de Biochimie et Nutrition Humaine de l'Institut Agro, bien que vous soyez désormais rattachés à NuMeCan. **Vincent, Daniel, Philippe**, votre expertise infaillible sur les lipides et sur leurs techniques d'analyses m'ont été d'une aide précieuse. Je n'oublie évidemment pas **Etienne**, qui a cru en moi dès le stage de Master 1.

Cette thèse m'a aussi permis de faire de très belles rencontres. Merci donc aux docteurs et futurs docteurs **Elise, Hala, Hanadi, Hugo, Julien, Kevin(s), Kilian, Lise, Matthis, Sarah B., Thomas(s), Yann, Yoann et Youenn** pour votre soutien, votre bonne humeur mais avant tout votre amitié. Passer ces trois années à vos côtés, au laboratoire comme en dehors, a été un réel plaisir !

Ambre, Lucille et Sarah ... que dire ! Je ne vous remercierai jamais assez pour votre soutien indéfectible et pour tous les bons moments passés ensemble qui ont su égayer ma fin de thèse. Vous avez été un pilier pour moi lors de cette aventure dans les bons moments comme dans les plus difficiles. Je vous porte très chaleureusement dans mon cœur et je vous souhaite à toutes les trois tous mes vœux de réussite.

Merci également à **Rebecca et Roxane** pour ces sorties Poitevines, Rennaises et Toulousaines, et pour votre soutien sans faille depuis le master.

Je tiens également à exprimer ma plus profonde gratitude à ma **famille**. Papa, maman, Quentin, Elisa : merci pour votre soutien sans faille, vos encouragements et pour votre fierté tout le long de mon parcours universitaire. Ma réussite pour l'obtention de ce diplôme est aussi la vôtre. Je n'oublie également pas ma désormais « **belle famille** » : Valérie, Tony, Améline, Norbert et même Rigby !

Enfin, merci à toi **Corentin**. Cette thèse a été l'occasion de te rencontrer. Ton encouragement constant et ta compréhension des moments difficiles de la thèse ont été essentiels pour moi au cours de cette aventure. Je tiens donc à te témoigner ici toute la gratitude et toute l'affection que je te porte.

LISTE DES ABREVIATIONS

4-HNE : 4-Hydroxynonéal	FAS : <i>Fatty Acid Synthase</i>
8-OH-dG : 8-Hydroxy-deoxyguanosine	FAT/CD36 : <i>Fatty Acid Translocase / Cluster of Differentiation</i>
ABC : <i>ATP-Binding Cassette</i>	FATP : <i>Fatty Acid Transporter Protein</i>
ACC : Acétyl-CoA Carboxylase	FDA : <i>Food and Drug Administration</i>
ACLY : ATP Citrate Lyase	FDX : Ferredoxine
ADH : Alcool Déshydrogénase	FDXR : Ferredoxine Reductase
AhR : Aryl Hydrocarbure	FGF21 : <i>Fibroblast Growth Factor 21</i>
AIF : <i>Apoptosis-Inducing Factor</i>	FLI : <i>Fatty Liver Index</i>
ALD : <i>Alcoholic Liver Disease</i>	FMN : Flavine Mononucléotide
ALDH : Aldéhyde déshydrogénase	FoxA2 : <i>Forkhead box A2</i>
AM404 : N-arachidonoylphénolamine	GLUT2 : <i>Glucose Transporter 2</i>
ARNm : Acide RiboNucléique messenger	GPAT : Glycerol-3-Phosphate
ASK1 : <i>Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1</i>	Acyltransférase
AFT4 : <i>Activating Transcription Factor 4</i>	GPx-1 : Glutathion Peroxydase-1
ATP : Adénosine TriPhosphate	GSH : Glutathion réduit
Bak : <i>Bcl-2-Associated protein-K</i>	GSK-3β : <i>Glycogen Synthase Kinase 3β</i>
Bax : <i>Bcl-2-Associated protein-X</i>	GST : Glutathion-S-transférase
Bcl2 : <i>B-cell lymphoma</i>	HE : Hématoxyline-Eosine
BCRP : <i>Breast Cancer Resistance Protein</i>	HETE : Acide Hydroeicosatétraénoïque
BSEP : <i>Bile Salt Export Pump</i>	HFD : <i>High Fat Diet</i>
CACT : Carnitine Acylcarnitine	HNF1α : <i>Hepatocyte Nuclear Factor 1α</i>
Translocase	HSI : <i>Hepatic Steatosis Index</i>
CAR : <i>Constitutive Androstane Receptor</i>	HSL : <i>Hormono-Sensitive Lipase</i>
CHC : Carcinome Hépatocellulaire	IL6 : Interleukine 6
ChREBP : <i>Carbohydrate Response Element Binding Protein</i>	IMC : Indice de Masse Corporelle
CK18 : Cytokeratine-18	iPSC : <i>Induced Pluripotent Stem Cells</i>
COX : Cytochrome c Oxydase	JNK : <i>c-jun-N-terminal kinase</i>
CPT : Carnitine Palmitoyltransférase	KLF15 : <i>Krüppel-Like Factor 15</i>
CREB : <i>cAMP-Response Element-Binding protein</i>	LDLR : <i>Low Density Lipoprotein Receptor</i>
CS : Citrate Synthase	LPS : Lipopolysaccharide
CYP : Cytochrome P450	LRP : <i>Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein</i>
CYP2E1 : Cytochrome P450 2E1	MAPK : <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
DGAT : Diglycéride Acyl Transférase	MC4R : <i>Melanocortin 4 receptor</i>
DHA : Acide Docosaénoïque	MCD : <i>Methionine and Choline Deficient diet</i>
DMSO : Diméthylsulfoxyde	Mcl1 : <i>Induced Myeloid Leukemia Cell Differentiation</i>
DPD : Dihydropyrimidine Déshydrogénase	MDA : Malondialdéhyde
EET : Acide Epoxyeicosatriénoïque	MDR3 : <i>Multidrug Resistance Gene Product 3</i>
ELOVL : <i>Elongation of Very Long chain fatty acid protein</i>	MEOS : <i>Microsomal Ethanol Oxidizing System</i>
EPA : Acide Eicosapentaénoïque	
ERO : Espèce Réactive de l'Oxygène	
FAD : Flavine Adénine Dinucléotide	
FADS : <i>Fatty Acid Desaturase</i>	

MGAT1 : Monoacétylglycerol O-Acyltransférase
miR : microARN
MLK3 : *Mixed-Lineage Kinase 3*
MnSOD : Manganèse Superoxyde Dismutase
MRP : *Multidrug Resistance-Associated Protein*
mtCYP2E1 : CYP2E1 mitochondrial
MTTP : *Microsomal Triglyceride Transfer Protein*
NAC : N-acétyl-cystéine
NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADP : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NAFL : *Non Alcoholic Fatty Liver*
NAFLD : *Non Alcoholic Fatty Liver Disease*
NAPQI : N-acétyl-para-benzoquinone-imine
NASH : *Non Alcoholic SteatoHepatitis*
NK-κB : *Nuclear Factor κB*
NQO : NAD(P)H Quinone Oxydoréductase
NTCP : *Na⁺-Taurocholate Cotransporting Polypeptide*
OAT : *Organic Anion Transporter*
OATP : *Organic Anion Transporting Polypeptide*
OCT : *Organic Cation Transporter*
PCB : Polychlorobiphényles
PCDD : *Polychlorinated Dibenzo-para-Dioxins*
PDH : Pyruvate Déshydrogénase
PGC1α/β : PPARγ Coactivateur-1α et 1β
PHH : *Primary Human Hepatocyte*
PLIN : Périlipine
PNPLA3 : *Patatin-like Phospholipase Domain Containing 3*
PP : Phosphatidate Phosphatase
PPAR : *Peroxisome Proliferator Activated*
PTPM : Pore de Transition de Perméabilité Mitochondriale
PXR : *Pregnane X Receptor*
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
SCD1 : Stearoyl-CoA Désaturase 1
Sab : *SH3 Domain-Binding Protein*
SHP1 : *Tyrosine Phosphatase Nonreceptor Type 6*

SLC : *Solute Carrier*
SMAC : *Second Mitochondrial Activator of Caspase*
Sp1 : *Specificity Protein 1*
SREBP1c : *Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c*
SULT : Sulfotransférases
TCDD : 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-para-dioxin
TGFβ : *Transforming Growth Factor β*
TM6SF2 : *Transmembrane 6 Superfamily 2*
TNFα : *Tumor Necrosis Factor α*
TonEBP : *Tonicity-responsive Enhancer Binding Protein*
TRPV1 : *Transient Receptor Potential Vanilloide 1*
TUNEL : *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated dUTP Nick-end Labeling*
Trx : Thiorédoxine
UGT : Uridine-diphosphate-Glucuronosyl Transférase
VLDL : *Very Low Density Lipoprotein*

AVANT-PROPOS

Dans un contexte dans lequel l'alimentation et la santé se trouvent au centre de nos préoccupations, l'étude des hépatopathies dysmétaboliques représente un défi majeur étant donné l'incidence mondiale de ces maladies aujourd'hui.

La stéatose (ou NAFL pour *Non Alcoholic Fatty Liver*) est une forme fréquente de maladie hépatique d'origine dysmétabolique qui peut s'aggraver vers une stéatohépatite non alcoolique (ou NASH pour *Non Alcoholic Steatohepatitis*) et qui est fortement corrélée à l'épidémie d'obésité. Ainsi, cette hépatopathie est devenue un véritable problème de santé publique dans de nombreux pays, y compris en France puisque plus de 60% de la population Française est en surpoids ou obèse selon les dernières estimations. Ces chiffres en constante augmentation sont corrélés à des conséquences importantes sur la santé des personnes (i.e. complications médicales comme la cirrhose voire le carcinome hépatocellulaire) et sur les coûts pour le système de santé. En effet, les hépatopathies dysmétaboliques sont aujourd'hui la première cause de maladie chronique du foie dans les pays développés et sont en passe de devenir la première cause de transplantation hépatique.

Les enjeux actuels portent donc sur la progression de la recherche sur la compréhension des mécanismes de mise en place et d'évolution de ces maladies. Des études ont souligné l'importance de l'induction du cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) parmi les nombreux facteurs impliqués dans l'aggravation de la NAFL vers la NASH. En effet, celui-ci a la particularité de produire des espèces réactives de l'oxygène (EROs) lorsqu'il est activé et des études cliniques et expérimentales ont suggéré que l'induction du CYP2E1 dans un contexte d'obésité pouvait être conséquente à différents facteurs dont l'action de certains acides gras. Outre son rôle potentiel dans l'aggravation de la NAFL en NASH, le CYP2E1 est impliqué dans la toxicité hépatique du paracétamol, observée généralement après un surdosage (>10 g par jour) intentionnel ou non, et plus rarement au cours de traitements à des doses pharmacologiques (3 g – 4 g par jour). Ainsi, le paracétamol pourrait être plus toxique dans un contexte de NAFL et d'obésité.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail a consisté à étudier le rôle de différents acides gras sur l'induction du CYP2E1 et sur la stéatose ainsi que d'en étudier les impacts dans le cadre de l'hépatotoxicité induite par le paracétamol.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	2
LISTE DES ABREVIATIONS	4
AVANT-PROPOS	8
TABLE DES MATIERES	10
TABLE DES ILLUSTRATIONS	14
Liste des figures	14
Liste des tableaux	15
INTRODUCTION.....	16
I. Introduction générale.....	18
1.1. Le foie.....	18
1.1.1. Anatomie	18
1.1.2. Cellules hépatiques.....	19
1.1.3. Fonctions	20
a) <i>Homéostasie glucido-lipidique</i>	20
b) <i>Métabolisme des xénobiotiques</i>	32
II. Les stéatopathies dysmétaboliques.....	37
2.1. Introduction	37
2.1.1. Diagnostic clinique.....	38
2.1.2. Caractérisation histologique de la NAFLD	39
2.1.3. Epidémiologie.....	41
2.1.4. Polymorphismes génétiques	43
2.2. Physiopathologie	43
2.2.1. Développement de la NAFL.....	44
2.2.2. Développement de la NASH	47
a) <i>Stress oxydant</i>	47
b) <i>Inflammation et fibrose</i>	49
c) <i>Autres facteurs influençant l'aggravation de la NAFL en NASH</i>	50
III. Les modèles expérimentaux de NAFLD.....	53
3.1. Modèles <i>in vivo</i>	53

3.1.1. Modèles génétiques	53
3.1.2. Modèles nutritionnels	54
3.2. Modèles <i>in vitro</i>	56
3.2.1. Hépatocytes primaires humains et lignées cellulaires	56
3.2.2. Co-cultures et organoïdes	58
IV. Le cytochrome P450 2E1.....	59
4.1. Généralités	59
4.1.1. Les cytochromes P450.....	59
a) <i>Structure et cycle catalytique</i>	59
b) <i>Classification</i>	60
c) <i>Activités et rôles biologiques</i>	61
4.2. Le cytochrome P450 2E1	62
4.2.1. Localisation du CYP2E1	63
4.2.2. Substrats du CYP2E1	63
a) <i>Substrats exogènes</i>	63
b) <i>Substrats endogènes</i>	65
4.2.3. Facteurs impliqués dans la régulation du CYP2E1	66
a) <i>Mécanismes de régulations du CYP2E1</i>	67
b) <i>Facteurs de régulation du CYP2E1</i>	68
4.3.4. Conséquences de l'induction du CYP2E1	73
V. Le paracétamol	74
5.1. Généralités	74
5.1.1. Pharmacologie	74
5.1.2. Posologie	75
5.1.3. Métabolisme	76
5.2. Hépatotoxicité du paracétamol	77
5.2.1. Mécanismes d'hépatotoxicité	79
a) <i>Phase d'initiation</i>	79
b) <i>Phase de propagation</i>	79
5.2.2. Prise en charge médicale	83
a) <i>Symptômes</i>	83
b) <i>Diagnostic clinique</i>	84
c) <i>Traitements</i>	84

5.3. Facteurs de susceptibilité à l'hépatotoxicité du paracétamol	85
5.3.1. Obésité et NAFLD.....	85
a) <i>Rôle de l'induction du CYP2E1</i>	86
b) <i>Diminution des taux de glutathion</i>	87
c) <i>Dysfonction mitochondriale</i>	88
d) <i>Inflammation lobulaire</i>	88
e) <i>Activation de JNK</i>	88
5.3.2. Alcool	89
5.3.3. Jeûne prolongé et dénutrition	89
OBJECTIFS DE L'ETUDE	92
RESULTATS	96
Principaux résultats obtenus.....	99
Article	102
DISCUSSION	154
I. Identification des acides gras inducteurs du CYP2E1 et des	
mécanismes impliqués dans cette induction	158
II. Evaluation de la stéatose et voies métaboliques impliquées dans	
l'homéostasie des lipides hépatiques	160
III. Impact des acides gras inducteurs de l'activité du CYP2E1 sur	
l'hépatotoxicité du paracétamol	164
CONCLUSION	168
PERSPECTIVES.....	172
REFERENCES.....	178
ANNEXES	228
Annexe n°1 : Tableaux de littérature.....	230
Annexe n°2 : Noms, formules et structures des acides gras utilisés.	237
Annexe n°3 : Revue de littérature	239
LISTE DES COMMUNICATIONS	240

TABLE DES ILLUSTRATIONS

*Certains schémas de ce manuscrit ont entièrement ou partiellement été réalisés
avec Biorender® et/ou Servier Medical Art®.*

Liste des figures

Figure 1 : Organisation du foie	18
Figure 2 : Voies métaboliques impliquées dans l'homéostasie du métabolisme glucido-lipidique et en fonction de l'état nutritionnel.	21
Figure 3 : Métabolisme glucido-lipidique en période post-prandiale.	23
Figure 4 : Métabolisme glucido-lipidique en période de jeûne.....	27
Figure 5 : Chaîne respiratoire mitochondriale.	31
Figure 6 : Métabolisme hépatique des xénobiotiques.	33
Figure 7 : Enzymes impliquées dans la phase I du métabolisme des xénobiotiques et leur proportion.	35
Figure 8 : Enzymes impliquées dans la phase II du métabolisme des xénobiotiques et leur proportion dans le foie.....	36
Figure 9 : Evolution et coupes histologiques de chaque stade de la NAFLD du foie sain au carcinome hépatocellulaire.....	38
Figure 10 : Coupes histologiques de foie de souris représentant une stéatose macrovacuolaire et une stéatose microvésiculaire	41
Figure 11 : Périlipines retrouvées autour des gouttelettes lipidiques en fonction de la taille de ces dernières.	41
Figure 12 : Prévalence de la NAFLD dans le monde.....	42
Figure 13 : Mécanismes impliqués dans le développement de la NAFL.....	45
Figure 14 : Facteurs d'aggravation de la NAFL vers la NASH.....	47
Figure 15 : Facteurs influençant l'aggravation de la NAFL vers la NASH.....	53
Figure 16 : Evolution morphologique des cellules HepaRG au cours de la prolifération et de la différenciation.	58
Figure 17 : Structure des cytochromes.....	60
Figure 18 : Nomenclature des cytochromes.....	60

Figure 19 : Partenaires redox des CYPs de classe I et de classe II	61
Figure 20 : Structure du paracétamol.	74
Figure 21 : Métabolisme du paracétamol.....	77
Figure 22 : Mécanismes d'hépatotoxicité du paracétamol observés lors d'un surdosage.....	78

Liste des tableaux

Tableau 1 : Recommandations pour la posologie du paracétamol, en France. Source : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM).....	75
--	----

INTRODUCTION

I. Introduction générale

1.1. Le foie

1.1.1. Anatomie

Le foie est l'organe le plus volumineux du corps humain, représentant 2% à 5% du poids du corps chez l'adulte. Il se situe dans la partie supérieure droite de l'abdomen et assure de nombreuses fonctions qui sont vitales à l'organisme.

D'un point de vue anatomique, le foie est divisé en quatre lobes de tailles inégales : les lobes droit et gauche et les lobes carré et caudé (**Figure 1A**). Les lobes hépatiques sont subdivisés en lobules, qui sont les entités fonctionnelles du foie (**Figure 1B**). Ces derniers ont une forme hexagonale et sont organisés autour d'une veine centrale ou veine centrolobulaire. Une triade est retrouvée à chaque coin de l'hexagone, composée d'une artère hépatique, d'une veine porte et d'un canal biliaire. Les cellules hépatiques ou hépatocytes sont les cellules majeures du lobule. En s'associant les uns aux autres, les hépatocytes forment des travées qui convergent vers la veine centrolobulaire. Les travées d'hépatocytes sont séparées par des capillaires sanguins ou sinusoides. Les sinusoides en reliant chaque triade à la veine centrolobulaire permettent les échanges entre le sang et les hépatocytes (**Figure 1C**).

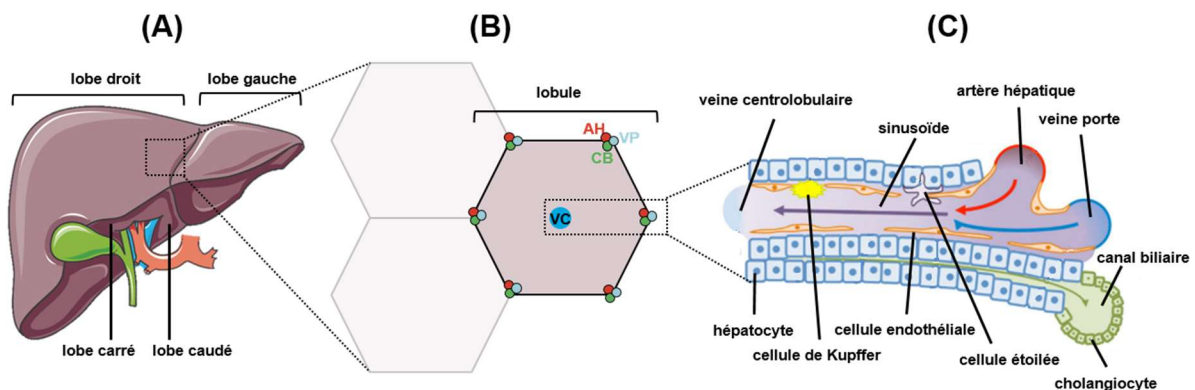


Figure 1 : Organisation du foie. Adapté de (Trefts et al., 2017).

(A) Lobes hépatiques droit, gauche, carré et caudé. (B) Représentation géométrique d'un lobule hépatique. Chaque lobule est une unité fonctionnelle organisée en hexagone autour d'une veine centrolobulaire (VC). A chaque angle est retrouvée une triade, composée d'une veine porte (VP), d'une artère hépatique (AH) et d'un canal biliaire (CB). (C) Cette triade est reliée à la veine centrolobulaire (VC) par des sinusoides.

1.1.2. Cellules hépatiques

Deux types principaux de populations cellulaires composent le foie : les cellules parenchymateuses et les cellules non parenchymateuses.

Les cellules parenchymateuses représentent 60% à 70% de la population cellulaire hépatique. Elles sont composées d'hépatocytes et assurent l'essentiel des fonctions métaboliques et de détoxification du foie (Musso et al., 2020; Trefts et al., 2017). Les hépatocytes sont des cellules polarisées avec trois domaines membranaires différents. Le pôle basal des hépatocytes est en contact avec les cellules endothéliales sinusoïdales. A ce niveau, de nombreux échanges bidirectionnels entre les hépatocytes et le sang ont lieu (e.g. absorption par les hépatocytes de certaines substances transportées dans le sang, sécrétion dans le sang de certaines protéines hépatiques comme l'albumine, la prothrombine) (Musso et al., 2020). Le pôle apical de plusieurs hépatocytes adjacents forme un canalicule biliaire qui draine la bile en direction des canaux biliaires bordés de cholangiocytes. Le pôle latéral permet la cohésion entre deux hépatocytes adjacents et les échanges inter-hépatocytaires grâce à trois types de jonctions : desmosomes, jonctions serrées et jonctions communicantes (Musso et al., 2020).

Les cellules non parenchymateuses comprennent plusieurs types cellulaires comme les cellules biliaires, les cellules endothéliales, les cellules de Kupffer et les cellules étoilées. Les cellules biliaires ou cholangiocytes composent l'épithélium des canaux biliaires. Ces cellules permettent de réguler le flux, la composition et le pH de la bile sécrétée par les hépatocytes. (Banales et al., 2019; Yoo et al., 2016). Les cellules endothéliales sont essentielles à la constitution de la paroi vasculaire des sinusoïdes (DeLeve & Maretti-Mira, 2017; Shetty et al., 2018). Les cellules de Kupffer sont les macrophages résidents du foie. Leur localisation dans les sinusoïdes permet la phagocytose de pathogènes issus de la circulation sanguine. Les cellules de Kupffer jouent également un rôle dans la réponse inflammatoire par la production de cytokines pro-inflammatoires et d'autres médiateurs impliqués dans la réparation tissulaire lors d'infections ou d'agressions toxiques (Dixon et al., 2013). Enfin, les cellules étoilées ou stellaires (anciennement désignées cellules de Ito) jouent un rôle majeur dans le stockage de la vitamine A. En cas d'agression infectieuse ou toxique, les cellules étoilées perdent leurs fonctions de stockage de la vitamine A et se transdifférencient en myofibroblastes, produisant alors des protéines de la matrice extracellulaire comme le collagène. Ces cellules participent donc à l'apparition d'une fibrose hépatique en cas d'agression répétée ou chronique (Kitto & Henderson, 2021; Luo et al., 2021).

1.1.3. Fonctions

Le foie joue un rôle majeur dans l'organisme étant donné ses fonctions endocrines et exocrines. En effet, le foie est le siège de la synthèse et de la sécrétion de la plupart des protéines plasmatiques dont l'albumine, la prothrombine, le fibrinogène et certains facteurs de coagulation. Il est également impliqué dans la production directe de nombreuses hépatokines (e.g. adiponine, FGF21 [*Fibroblast growth factor 21*], Fetuin A et B). Ces protéines agissent comme de véritables hormones en exerçant des effets métaboliques multiples à différents niveaux grâce à leurs effets autocrine, paracrine et endocrine (Pacheco & Postic, 2020; Rhyu & Yu, 2021). Cet organe joue aussi un rôle majeur dans le maintien des concentrations plasmatiques de glucose et de lipides. Le foie exerce également une fonction exocrine en favorisant la production et la sécrétion de la bile dans le tube digestif, participant ainsi à la digestion de certains lipides. Outre son rôle dans la digestion, la bile permet aussi l'élimination de molécules potentiellement toxiques d'origine endogène ou exogène (Marin et al., 2016).

Étant donné sa proximité avec le système digestif, le foie joue un rôle central dans l'homéostasie du métabolisme glucido-lipidique et dans la détoxification des xénobiotiques.

a) Homéostasie glucido-lipidique

En fonction de l'état nutritionnel, le métabolisme glucido-lipidique s'oriente soit vers une constitution des réserves en période post-prandiale après un repas, soit vers une consommation des réserves en période de jeûne. Différentes voies métaboliques entrent alors en jeu pour maintenir une glycémie à jeun d'environ 0.7 à 1.1 g/L (soit 3.8 à 6 mM) (**Figure 2**).

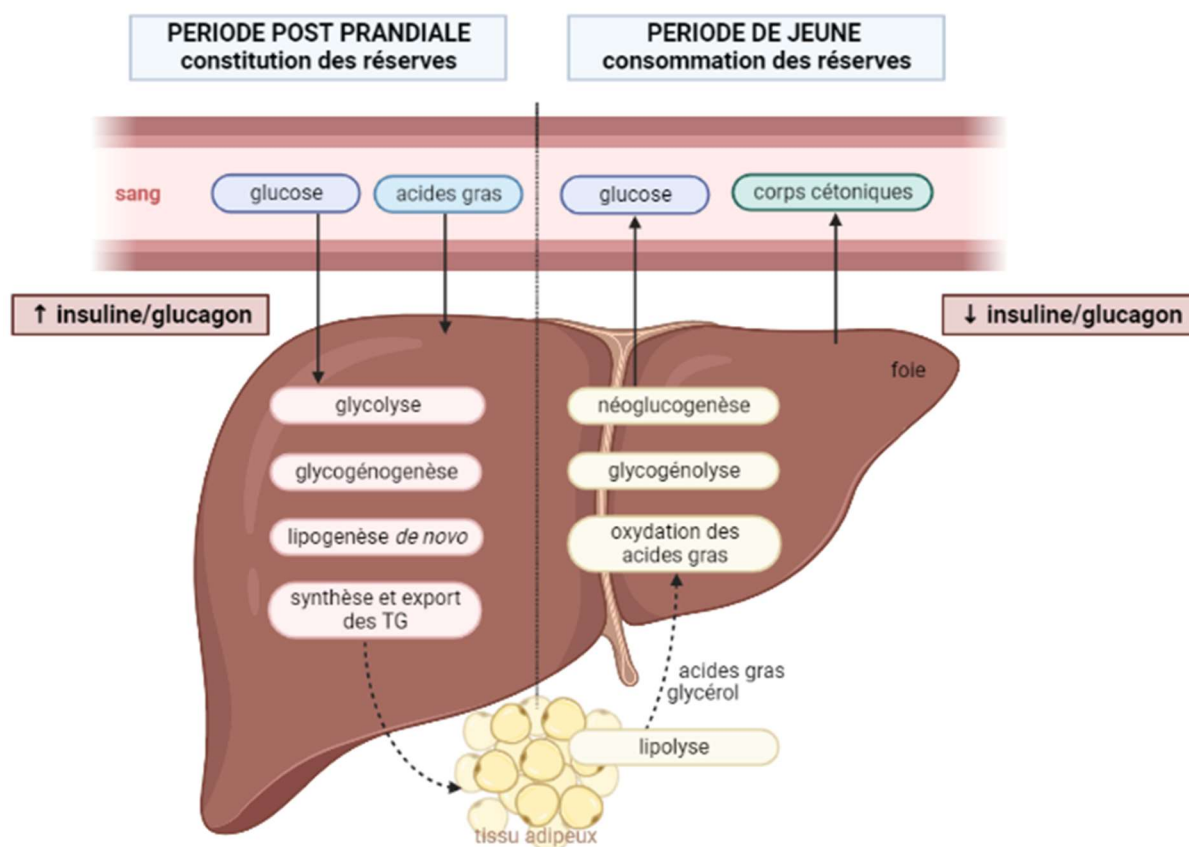


Figure 2 : Voies métaboliques impliquées dans l'homéostasie du métabolisme glucido-lipidique et en fonction de l'état nutritionnel.

En période post-prandiale, une augmentation du rapport insuline/glucagon oriente le métabolisme glucido-lipidique vers une constitution des réserves par l'organisme par les voies de la glycolyse, de la glycogénogenèse, de la lipogenèse *de novo* et la synthèse et export des triglycérides. En période de jeûne, la diminution du rapport insuline/glucagon oriente le métabolisme vers les voies de la lipolyse adipocytaire, de l'oxydation des acides gras dans le foie, de la glycogénolyse. Le foie est également capable de synthétiser du glucose *via* l'activation de la voie la néoglucogenèse. Le glucose nouvellement synthétisé et les corps cétoniques issus du catabolisme des acides gras seront libérés dans la circulation pour permettre le maintien d'une glycémie normale (glucose) et servent aussi de substrats énergétiques importants pour les autres tissus (glucose et corps cétoniques).

A) En période post-prandiale

Après digestion, les aliments ingérés parviennent dans la circulation essentiellement sous forme de glucose, d'acides aminés et de chylomicrons pour les lipides. L'absorption de glucose favorise l'élévation de la glycémie sanguine. Au niveau du pancréas, l'augmentation des concentrations circulantes de glucose déclenche la synthèse et la sécrétion d'insuline par les cellules β tandis que la sécrétion de glucagon par les cellules α est quant à elle diminuée. Ces variations hormonales conduisent à l'augmentation du rapport insuline/glucagon et à l'activation de voies métaboliques spécifiques permettant la mise en réserve de l'énergie sous forme de glycogène et de triglycérides (Petersen et al., 2017). En captant plus de 30% du glucose absorbé *via* la veine porte, le foie joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie glucido-lipidique. Le glucose entre dans les hépatocytes par diffusion facilitée grâce au *Glucose Transporter 2* (GLUT2) (Thorens, 2015).

Oxydation et stockage du glucose hépatique

Le glucose intrahépatique est rapidement phosphorylé en glucose-6-phosphate par la glucokinase. Une partie de ce glucose phosphorylé est oxydé en deux molécules de pyruvate *via* la voie de la glycolyse (**Figure 3A**). Cette voie métabolique cytosolique conduit également à la production de deux molécules d'*Adénosine Triphosphate* (ATP) et de 2 *Nicotinamide Adénine Dinucléotide* réduits (NADH). En condition aérobie, le pyruvate est transporté dans la mitochondrie pour y être métabolisé. Dans la mitochondrie, le pyruvate subit une décarboxylation oxydative par la *Pyruvate Déshydrogénase* (PDH) pour former de l'acétyl-CoA (Petersen et al., 2017; Rui, 2014). Ce métabolite constitue alors un substrat majeur pour le cycle de Krebs et peut également servir d'élément de base pour la synthèse des acides gras lors d'apport excessifs de glucides par exemple après un régime hyperglucidique (Parks, 2002; Parks et al., 2008). Ce point sera spécifiquement discuté dans le paragraphe suivant.

L'élévation du rapport insuline/glucagon conduit également à l'activation de la voie de la glycogénogenèse (**Figure 3B**). Cette voie métabolique permet le stockage du glucose sous la forme d'un polysaccharide de réserve : le glycogène. Il est à noter que la glycogène synthase, enzyme clé de la glycogénogenèse, joue un rôle majeur dans la synthèse du glycogène (Petersen et al., 2017). Lorsque les apports glucidiques sont trop importants, les réserves de glycogène hépatique peuvent être rapidement saturées (~70 g de glycogène stockés dans le foie).

L'excès de glucose non oxydé et non stocké est alors transformé en acide gras grâce à une synthèse *de novo* favorisée par l'activation de la voie de la lipogenèse (**Figure 3C**).

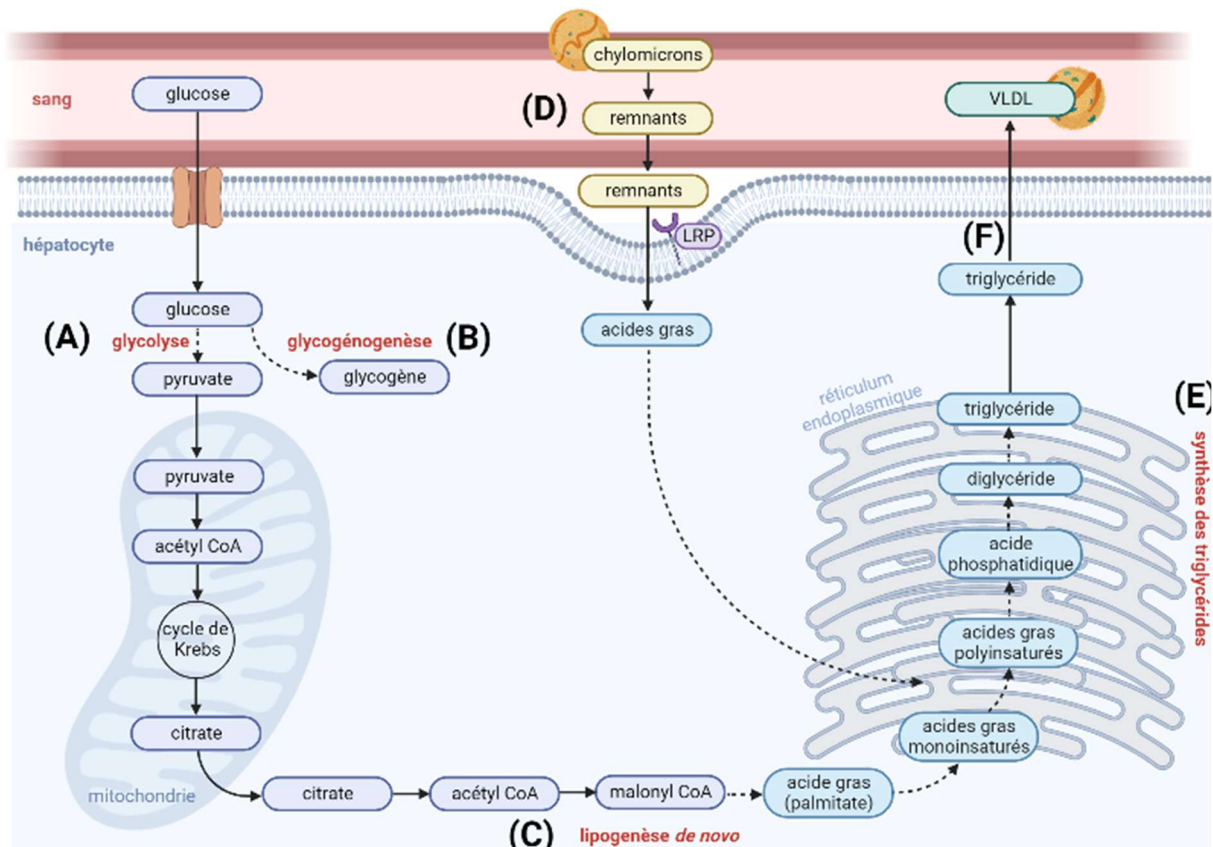


Figure 3: Métabolisme glucido-lipidique en période post-prandiale.

En période post-prandiale, l'augmentation du ratio insuline/glucagon aboutit à l'activation de voies métaboliques permettant la synthèse de glycogène et de triglycérides. Le glucose capté par le foie est oxydé en pyruvate via la glycolyse (A). Une partie du glucose est également stocké sous forme de glycogène par la voie de la glycogénogenèse (B). L'excès de glucose restant et non stocké est transformé en acides gras (i.e. palmitate) grâce à la lipogenèse *de novo* (C). Les acides gras nouvellement synthétisés peuvent ensuite être désaturés et/ou allongés puis estérifiés pour former des triglycérides (E). Chez les individus sains, l'essentiel du contenu en triglycérides est ensuite exporté vers le tissu adipeux sous forme de *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL) pour y être stocké au niveau de ce tissu (F).

Synthèse de novo des acides gras

Comme mentionné précédemment, l'augmentation du flux glycolytique lors d'une surcharge en hydrates de carbone conduit à une augmentation de la production de pyruvate puis d'acétyl-CoA dans la mitochondrie. Au niveau du cycle de Krebs, l'acétyl-CoA se condense à l'oxaloacétate sous l'action de la *Citrate Synthase* (CS) pour former du citrate. Une partie du citrate formé passe dans le cytosol grâce à un système de navette (Zara et al., 2022). Dans le cytosol, le citrate est clivé en acétyl-CoA et en oxaloacétate sous l'action de l'*ATP citrate lyase* (ACLY). L'acétyl-CoA est ensuite carboxylé en malonyl-CoA grâce à l'action de l'*Acétyl-CoA Carboxylase* (ACC). Le malonyl-CoA ainsi formé sert de structure de base pour la synthèse d'acides gras saturés à 4, 6, 8, 10, 12, 14 et 16 carbones. Cette synthèse est possible grâce à la *Fatty Acid Synthase* (FAS) qui permet l'ajout successif de malonyl-CoA jusqu'à la formation finale d'acide palmitique ou palmitate, un acide gras saturé à 16 carbones (C16:0) (Petersen et

al., 2017; Rui, 2014). En plus de son rôle dans la biosynthèse des acides gras, le malonyl-CoA régule également le catabolisme de ces derniers comme discuté dans le paragraphe B). D'autres substrats comme l'acétate peuvent également servir à la synthèse *de novo* des acides gras (Liu et al., 2018). Il est à noter que l'utilisation d'acétate radiomarké (2-¹⁴C-acétate ou ¹³C-acétate) est un moyen courant pour mesurer la lipogenèse *de novo* lors d'études *in vitro* ou cliniques (Donnelly et al., 2005).

La lipogenèse *de novo* peut être régulée à court terme ou à long terme. La régulation à court terme implique des mécanismes post-traductionnels et allostériques dans lesquels l'insuline, le glucose et certains acides gras jouent un rôle important. Le glucose et l'insuline participent à l'activation de la lipogenèse en modulant l'activité d'enzymes lipogéniques clés comme l'ACC. En particulier, le glucose favorise la synthèse *de novo* des acides gras en fournissant du citrate, un activateur allostérique et substrat de l'ACC. L'insuline participe également à l'activation de la lipogenèse en favorisant la déphosphorylation de l'ACC (Hillgartner et al., 1995; Rui, 2014). A l'inverse, l'augmentation des concentrations de certains acides gras favorise l'inhibition de la lipogenèse en diminuant l'activité de l'ACC (Gnoni & Giudetti, 2016).

La régulation à long terme est plus importante et met en jeu des mécanismes transcriptionnels. En effet, l'activation de la lipogenèse *de novo* résulte principalement de l'action des facteurs de transcription *Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c* (SREBP1c) et *Carbohydrate Response Element Binding Protein* (ChREBP) (Abdul-Wahed et al., 2017; Postic & Girard, 2008; Shimano & Sato, 2017). Dans le foie, SREBP1c et ChREBP sont respectivement activés par une augmentation de l'insulinémie et de la glycémie. Leur activation conduit à une augmentation de l'expression des principaux gènes de la lipogenèse (i.e. ACC, FAS, *Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase* [GPAT]) mais aussi de la glycolyse (e.g. glucokinase, pyruvate kinase). Ainsi, SREBP1c et ChREBP jouent un rôle fondamental dans la régulation du métabolisme glucido-lipidique *via* les effets transcriptionnels qu'ils exercent (Abdul-Wahed et al., 2017; Postic & Girard, 2008; Shimano & Sato, 2017). Nous verrons que l'activation excessive de ces deux facteurs de transcription favorise une accumulation significative de lipides dans le foie (Khan et al., 2019; Sakurai et al., 2021). Enfin, il a également été démontré *in vivo* que le facteur de transcription *Peroxisome Proliferator Activated γ* (PPAR γ) favorisait la lipogenèse dans le foie par l'activation de la *monoacylglycérol O-acyltransferase 1* (MGAT1) (Lee et al., 2012).

La lipogenèse conduit donc à la formation de palmitate dans le cytosol. Au niveau de la chaîne carbonée, cet acide gras peut subir des modifications de type élongation et/ou désaturation. Ces modifications ont lieu dans le réticulum endoplasmique et conduisent à la formation de nouveaux acides gras à plus longue chaîne avec la présence ou non de double liaison.

Elongation et désaturation des acides gras

L'élongation de la chaîne carbonée du palmitate est possible grâce à l'action d'élongases également appelés *Elongation of Very Long chain fatty acid protein* (ELOVL). Dans le foie, les isoformes ELOVL 3 et 6 permettent l'élongation des acides gras saturés et monoinsaturés tandis que les isoformes ELOVL 2, 4 et 5 permettent l'élongation des acides gras polyinsaturés (Jakobsson et al., 2006). L'introduction de doubles liaisons à des endroits spécifiques de la chaîne aliphatique implique l'action de différentes désaturases comme la $\Delta 5$ désaturase (ou *Fatty Acid Desaturase 1* [FADS1]), la $\Delta 6$ désaturase (ou *Fatty Acid Desaturase 2* [FADS2]) ou la $\Delta 9$ désaturase (ou *Stearoyl-CoA Desaturase 1* [SCD1]). Ces enzymes permettent l'introduction d'une double liaison respectivement au niveau des carbones 5, 6 et 9 à partir de l'extrémité carboxylique de l'acide gras. Ainsi, l'acide palmitique (C16:0) peut être allongé par l'enzyme ELOVL3 en acide stéarique (C18:0) qui lui-même peut être transformé en acide oléique (C18:1) après insertion d'une double liaison sur le carbone 9 par l'enzyme SCD1. L'ensemble de ces modifications biochimiques peut conduire à la formation d'acides gras monoinsaturés (1 seule double liaison) ou polyinsaturés (au moins 2 doubles liaisons). Il est à préciser que l'absence d'expression des désaturases $\Delta 12$ et $\Delta 15$ chez l'Homme ou l'animal ne permet pas la synthèse des acides gras polyinsaturés linoléique (C18:2) et α -linolénique (C18:3) à partir de l'acide oléique (C18:1). C'est pourquoi ces deux acides gras sont dits essentiels ou indispensables. L'alimentation (e.g. huiles de colza, noix, lin) reste donc l'unique source d'apport de ces acides gras. Des études chez l'Homme et l'animal ont permis de démontrer l'essentialité de ces deux acides gras dans le développement et le bon fonctionnement de l'organisme puisqu'un déficit d'apport pour ces acides gras est souvent associé à la survenue de divers dysfonctionnements (e.g. troubles cognitifs, cutanés, visuels, de la croissance, de la fertilité et troubles du métabolisme lipidique) (Choque et al., 2014).

Les lipides hépatiques peuvent aussi provenir directement de l'alimentation. Après leur absorption, les lipides alimentaires sont transportés dans la circulation systémique *via* la circulation lymphatique. Ce transport est assuré par les chylomicrons, lipoprotéines de grandes

tailles synthétisées par l'entérocyte. Les triglycérides sont les constituants lipidiques majeurs des chylomicrons puisqu'ils peuvent représenter jusqu'à 90% des lipides incorporés. Du cholestérol est également incorporé dans les chylomicrons à hauteur de 3% (Julve et al., 2016). Une grande partie des lipides contenus dans les chylomicrons est directement hydrolysée par une lipoprotéine lipase vasculaire au niveau du tissu adipeux et du muscle. Dans le tissu adipeux, les acides gras libérés sont captés puis stockés sous forme de triglycérides dans les graisses corporelles afin d'y être mobilisés pendant les phases inter-prandiales. Dans le muscle, les acides gras captés sont oxydés pour couvrir les besoins énergétiques propre de ce tissu. Les chylomicrons ainsi hydrolysés s'appauvrissent en acides gras et deviennent des résidus de chylomicrons ou remnants. Ceux-ci sont ensuite captés par le foie par les récepteurs *Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein* (LRP) et *Low Density Lipoprotein receptor* (LDLR). Ils y sont ensuite hydrolysés par la lipase acide lysosomale en acides gras et en cholestérol (**Figure 3D**) (Hecketsweiler & Hecketsweiler, 2006).

Les acides gras recyclés par la dégradation des résidus de chylomicrons et ceux synthétisés par l'intermédiaire de la lipogenèse *de novo* entrent alors dans la constitution de différentes espèces lipidiques comme le cholestérol, les phospholipides et les triglycérides.

Synthèse des triglycérides hépatiques

La synthèse des triglycérides résulte de l'estérification du glycérol-3-phosphate par trois acyl-CoA issus de la lipogenèse ou provenant de l'alimentation. La première estérification aboutit à la formation d'acide phosphatidique et est catalysée par la GPAT, qui est l'enzyme limitante de cette voie de synthèse (Wendel et al., 2009). Celui-ci est ensuite acylé par la *Phosphatidate Phosphatase* (PP) pour former un diglycéride qui subit une troisième acylation par la *Diglycéride Acyl Transférase* (DGAT) pour former un triglycéride (**Figure 3E**). Chez les individus sains, les triglycérides nouvellement synthétisés ne sont pas stockés de façon significative dans les hépatocytes. En effet, l'essentiel du contenu en triglycérides hépatiques est exporté vers le tissu adipeux *via* les *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL) (**Figure 3F**). Ces dernières contiennent en leur centre des triglycérides (~ 60%) et du cholestérol (~15%), et sont entourées de phospholipides (~15%) et d'apolipoprotéines dont l'APO B, qui est l'apolipoprotéine majeure (Gibbons et al., 2004). Nous verrons dans la partie 2.2.1. que la sécrétion de triglycérides sous forme de VLDL est altérée chez les patients obèses et/ou chez les patients souffrants de pathologies hépatiques dysmétaboliques (Søndergaard et al., 2012). Comme indiqué précédemment, les VLDL sécrétés gagnent ensuite le tissu adipeux où leurs triglycérides sont hydrolysés sous l'action de la lipoprotéine lipase. Les acides gras ainsi libérés

sont transportés dans l'adipocyte pour reformer à nouveau des triglycérides (Hecketsweiler & Hecketsweiler, 2006).

B) En période de jeûne

A jeun, l'absence d'apport alimentaire favorise la diminution de la glycémie. Cette hypoglycémie entrainera une diminution de l'insulinémie et une augmentation de la glucagonémie propice à la réduction du rapport insuline/glucagon. Dans le foie, la diminution de ce rapport orientera le métabolisme glucido-lipidique vers la production de glucose, l'oxydation des acides gras et la synthèse de corps cétoniques.

Concernant le métabolisme glucidique, la diminution du rapport insuline/glucagon permet l'activation de deux voies métaboliques spécifiques : la glycogénolyse et la néoglucogenèse (également appelée gluconéogenèse). L'induction de ces voies métaboliques permet respectivement l'utilisation des réserves de glycogène hépatique et la synthèse *de novo* de glucose (**Figure 4**).

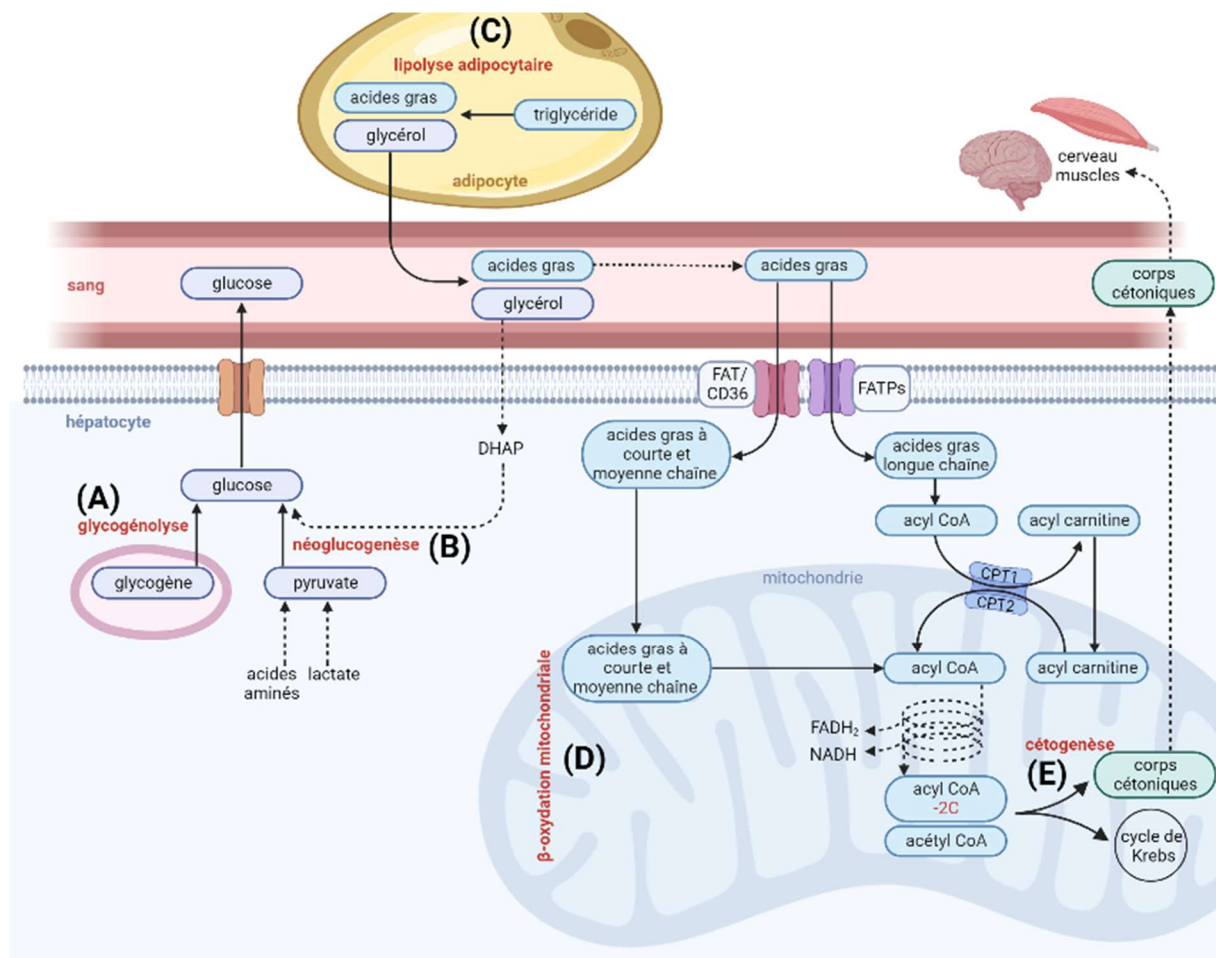


Figure 4 : Métabolisme glucido-lipidique en période de jeûne.

En période de jeûne, la libération de glucose par le foie est nécessaire pour maintenir une glycémie normale. Le glycogène intra-hépatique est alors dégradé en glucose par la voie de la glycogénolyse **(A)**. Lorsque le jeûne se prolonge, la néoglucogenèse se met en place, permettant la synthèse de glucose à partir de substrats non glucidiques (i.e. pyruvate, alanine, lactate, glycérol) **(B)**. Le jeûne aboutit également au catabolisme des acides gras provenant principalement du tissu adipeux suite à l'activation de la lipolyse adipocytaire **(C)**. Après leur entrée dans l'hépatocyte, les acides gras sont essentiellement oxydés par la β -oxydation mitochondriale, aboutissant à la libération d'acétyl CoA et de coenzymes réduits *Nicotinamide Adénine Dinucléotide* (NADH) et *Flavine Adénine Dinucléotide* (FADH₂) **(D)**. Une partie des acétyl CoA est oxydé par le cycle de Krebs mais la majeure partie est utilisée pour la synthèse de corps cétoniques *via* la voie de la cétogenèse **(E)**. Les corps cétoniques ainsi produits constituent des substrats énergétiques pour le cerveau et le muscle.

Dégradation du glycogène et synthèse de novo du glucose

La libération du glucose hépatique participe en partie au maintien d'une glycémie normale.

La glycogénolyse permet la dégradation du glycogène en glucose après activation de la glycogène phosphorylase par le glucagon, mais aussi par l'adrénaline et l'activation du système nerveux sympathique (Hatting et al., 2018) **(Figure 4A)**. A l'inverse, l'insuline et l'augmentation des taux intracellulaires de glucose inhibent cette enzyme.

Lorsque le jeûne se prolonge, les stocks de glycogène hépatique sont progressivement épuisés. Afin d'assurer une glycémie normale et un apport constant de glucose aux tissus glucodépendants (i.e. cerveau, globules rouges, médulle du rein), la néoglucogenèse est activée dans le foie (Petersen et al., 2017). Cette voie métabolique permet la synthèse *de novo* de glucose à partir de substrats non glucidiques (i.e. pyruvate, alanine, lactate et glycérol) issus de différents tissus périphériques **(Figure 4B)**.

A distance des repas et jusqu'à 10h à 12h de jeûne, la glycogénolyse et la néoglucogenèse contribuent chacune à 50% de la production endogène de glucose. Lorsque le jeûne se prolonge, la production de glucose endogène repose principalement sur la néoglucogenèse hépatique car les réserves de glycogène hépatique sont épuisées (Landau et al., 1996; Sargsyan & Herman, 2019).

Comme indiqué précédemment, la néoglucogenèse est la voie métabolique qui permet la synthèse endogène de glucose à partir de substrats non glucidiques comme les acides aminés, le glycérol et le lactate. La libération des acides aminés glucoformateurs et du glycérol résultera de l'activation de deux voies métaboliques spécifiques : la protéolyse et la lipolyse qui ont respectivement lieu au niveau du muscle et du tissu adipeux (Petersen et al., 2017). Quant au lactate, sa production peut provenir de la glycolyse anaérobie dans les cellules ayant une activité glycolytique intense, c'est-à-dire principalement les cellules musculaires (Li et al., 2022).

Le glucose intrahépatique nouvellement synthétisé sera ensuite libéré dans la circulation pour couvrir les besoins énergétiques des tissus glucodépendants comme le cerveau et assurer le maintien d'une glycémie à jeun normale. Il est à noter que le foie contrairement au muscle est capable d'exporter le glucose car il exprime la glucose-6-phosphate phosphatase, enzyme qui permet la déphosphorylation du glucose-6-phosphate en glucose. Le glucose « libre » sera alors capable de sortir de l'hépatocyte *via* le transporteur GLUT2 (Thorens, 2015). Dans le cadre d'un jeûne prolongé, la néoglucogenèse peut aussi être activée dans le rein et l'intestin. Cette production extra-hépatique de glucose peut contribuer jusqu'à 20% à 30% de la production basale de glucose pour chacun de ces tissus (Alsahli & Gerich, 2017; Mithieux & Gautier-Stein, 2014).

Oxydation des acides gras et céto-genèse

La diminution du rapport insuline/glucagon conduit également à une modification du métabolisme lipidique dans le foie avec notamment une augmentation du catabolisme des acides gras et une augmentation de la synthèse des corps cétoniques. Les acides gras oxydés dans le foie sont principalement issus du tissu adipeux. En effet, la réduction du rapport insuline/glucagon favorise l'activation de la lipolyse adipocytaire dans ce tissu. L'induction de cette voie métabolique conduit à la libération de trois molécules d'acides gras et d'une molécule de glycérol à partir des stocks de triglycérides (**Figure 4C**). L'enzyme limitante de cette voie métabolique est l'*Hormone-Sensitive Lipase* (HSL), dont l'inhibition par l'insuline est levée lors d'un jeûne. Nous verrons dans la partie 2.2.1. qu'une augmentation basale de la lipolyse adipocytaire est observée chez les patients atteints d'obésité (Ferramosca & Zara, 2014; Morigny et al., 2016).

Une fois libérés dans la circulation, les acides gras sont captés au niveau de différents tissus périphériques dont le foie. Cette captation s'effectue en grande partie par transport facilité mais aussi par certaines protéines membranaires telles que les *Fatty Acid Transporter Protein* (FATP 2, 5), les cavéolines-1 ou les *Fatty Acid Translocase Cluster of Differentiation* (FAT/CD36) (Black et al., 2009; Mashek, 2013). Nous verrons dans la partie 2.2. que l'expression du gène *FAT/CD36* est positivement corrélée au contenu de triglycérides hépatiques dans des modèles murins et chez l'Homme (Alves-Bezerra & Cohen, 2018; Rada et al., 2020).

Après leur entrée dans l'hépatocyte, les acides gras sont principalement oxydés dans la mitochondrie *via* la voie de la β -oxydation (**Figure 4D**). Cette oxydation requiert au préalable

l'activation des acides gras intrahépatiques en acyl-CoA par des acyl-CoA synthétases. Une fois activés, les acyl-CoA pénètrent directement ou indirectement dans la mitochondrie pour y être oxydés. Les acides gras à chaîne courte (4 à 6 carbones) et à chaîne moyenne (8 à 12 carbones) diffusent librement à travers les membranes mitochondriales. Il est à noter que leur activation en acyl-CoA s'effectue dans la matrice mitochondriale. En revanche, les acides gras à longue chaîne (> 14 carbones) nécessitent un système carnitine pour leur entrée dans la mitochondrie. Ce système implique les réactions successives de la *Carnitine Palmitoyltransférase I* (CPT1), localisée sur la membrane externe, de la *Carnitine-Acylcarnitine Translocase* (CACT) puis de la *Carnitine Palmitoyltransférase II* (CPT2) située sur la membrane interne mitochondriale (Savic et al., 2020).

La β -oxydation s'effectue ensuite sous forme de cycles successifs, dont chacun se compose de quatre réactions qui raccourcissent l'acyl-CoA de deux carbones et libèrent un acétyl-CoA ainsi que les coenzymes réduits NADH et *Flavine Adénine Dinucléotide* (FADH₂). Cette succession itérative de réactions enzymatiques constitue l'hélice de Lynen.

La β -oxydation est principalement régulée par le facteur de transcription PPAR α . Ce dernier est induit au cours du jeûne et est activé par certains acides gras insaturés (e.g. acide eicosapentaénoïque [C20:5, EPA] et acide docosahexaénoïque [C22:6, DHA]) ou d'autres dérivés lipidiques comme les prostaglandines (Kersten & Stienstra, 2017; Varga et al., 2011). Il existe également des agonistes synthétiques de PPAR α : les fibrates (e.g. fénofibrate [=clofibrate], gemfibrozil). Ces molécules sont couramment utilisées comme hypolémiantes dans la prise en charge thérapeutique des hyperlipidémies en particulier l'hypertriglycéridémie (Grygiel-Górniak, 2014). Il est à noter que d'autres facteurs de transcription régulateurs de la β -oxydation ont également été décrits, tels que le *PPAR γ coactivateur-1 α* et *1 β* (PGC-1 α/β), le *Forkhead box A2* (FoxA2) et le *cAMP-Response Element-Binding protein* (CREB) (Massart et al., 2013; Wolfrum & Stoffel, 2006). Il existe d'autres niveaux de régulation de la β -oxydation comme la régulation allostérique. Cette régulation peut impliquer différentes molécules comme le malonyl CoA. Dans le foie, le malonyl-CoA dont la synthèse est activée après un repas, est un inhibiteur allostérique important de la CPT1. En inhibant la CPT1, le malonyl-CoA joue un rôle important dans la régulation du flux de β -oxydation et dans l'équilibre entre la lipogenèse et le catabolisme des acides gras (Schlaepfer & Joshi, 2020). Nous verrons dans la partie 2.2.1. que la diminution de la β -oxydation mitochondriale fait partie des mécanismes à l'origine d'une accumulation de lipides intra-hépatiques (Dasarathy et al., 2011). D'autres inhibitions

allostériques impliquant les ratios NADH/NAD^+ et acétyl-CoA/CoA ont été également mises en évidence (Eaton, 2002).

A l'issue de la β -oxydation, les acétyl-CoA formés sont ensuite oxydés au niveau du cycle de Krebs. Cette oxydation s'accompagne de la formation des coenzymes réduits NADH et FADH_2 qui seront à leur tour oxydés au niveau de la chaîne respiratoire. Cette oxydation sera à l'origine de la synthèse d'ATP. Etant donné que l'oxydation de ces facteurs est couplée à la synthèse d'ATP, il est fait référence à la voie métabolique OXPHOS ou phosphorylation oxydative. Il est à préciser que la chaîne respiratoire est constituée de cinq complexes (complexes I, II, III, IV et V) (**Figure 5**). L'oxydation du NADH et FADH_2 a respectivement lieu au niveau des complexes I et II. Cette oxydation est à l'origine d'un flux d'électron le long de la chaîne respiratoire. Grâce à l'énergie fournie, ce flux d'électron est associé à un transfert des protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire créant ainsi un gradient électrochimique de protons. Ce gradient est à l'origine de la force proton-motrice qui fournira l'énergie nécessaire à la phosphorylation de l'ADP en ATP au niveau complexe V également appelé ATP synthase. Néanmoins, une partie des protons peut regagner la matrice mitochondriale sans passer par l'ATP synthase. Il est alors fait référence à un découplage mitochondrial puisque l'énergie associée au retour des protons dans la matrice mitochondriale n'est pas couplée à la synthèse d'ATP (Kanabus et al., 2013).

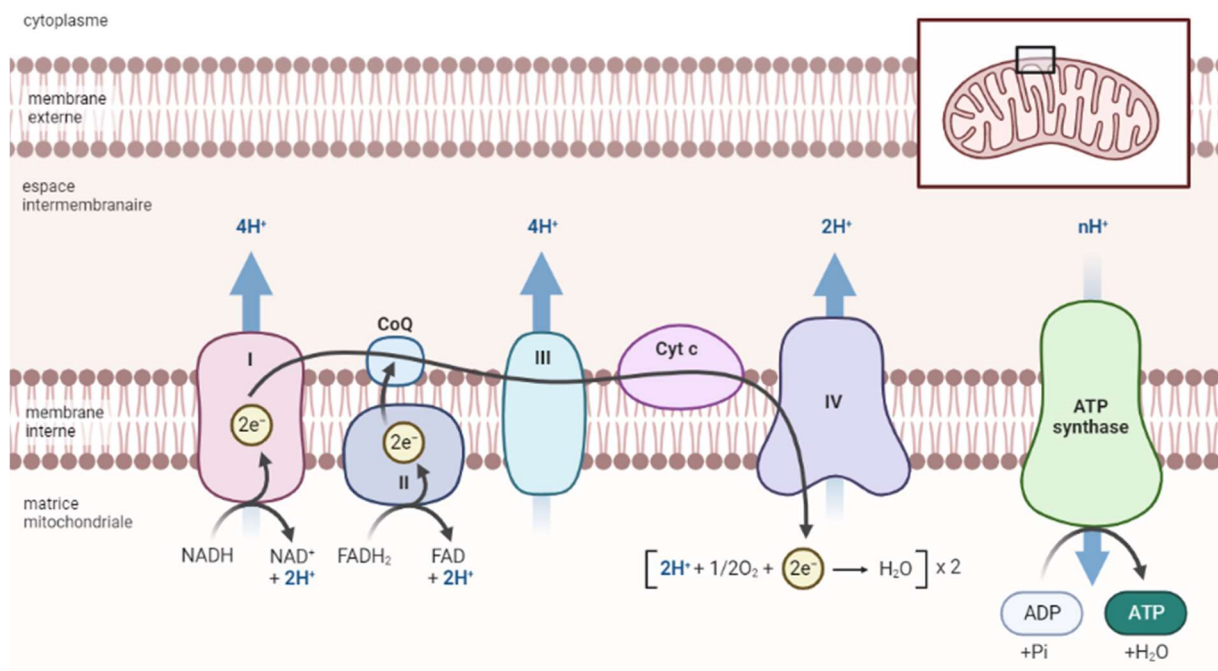


Figure 5 : Chaîne respiratoire mitochondriale. Adapté de (Kanabus et al., 2013).

En raison de l'activation importante de la β -oxydation à jeun, les acétyl-CoA produits en abondance sont alors transformés en corps cétoniques (i.e. acétoacétate, β -hydroxybutyrate et acétone) *via* l'activation de la voie de la céto-genèse. Les corps cétoniques ainsi formés sont ensuite libérés et transportés *via* la circulation sanguine vers les tissus extra-hépatiques dont le cerveau et les muscles afin de leur fournir de l'énergie (**Figure 4E**). Les corps cétoniques sont considérés comme une source énergétique majeure puisqu'ils peuvent fournir jusqu'à 60% de l'énergie consommée par ces tissus en cas de jeûne prolongé (Jensen et al., 2020).

b) Métabolisme des xénobiotiques

Tout comme les nutriments, les xénobiotiques subissent un premier passage dans le foie après leur absorption. Dans les années 1960, le Dr Howard Mason a défini un xénobiotique comme tout composé auquel le corps est exposé de façon extrinsèque. Cela comprend notamment les pesticides, les composés chimiques environnementaux, les drogues et les médicaments (Croom, 2012). Lors de l'exposition à un xénobiotique par voie orale, celui-ci passe par le foie avant d'être distribué dans le reste de l'organisme par la circulation sanguine. (Roberts & Hall, 2013). Le foie joue en effet un rôle primordial dans le métabolisme des xénobiotiques puisqu'il contient la majorité des enzymes de biotransformation nécessaires à leur élimination.

Le métabolisme hépatique des xénobiotiques est généralement divisé en quatre phases (**Figure 6**).

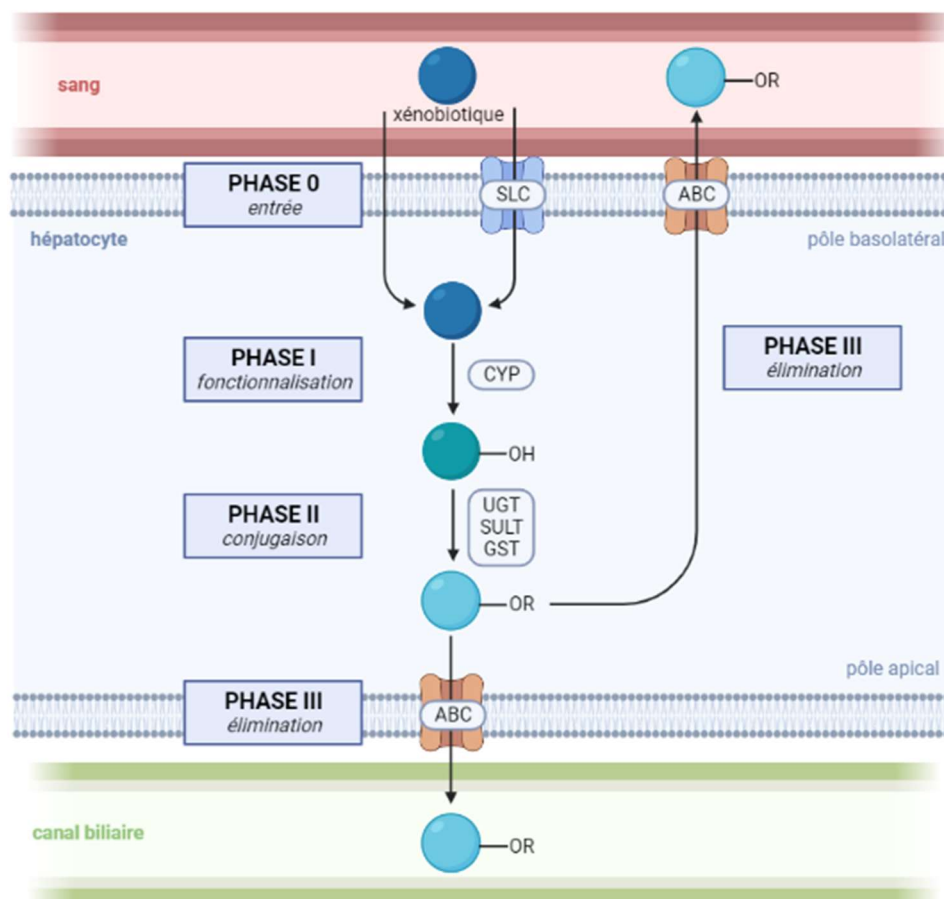


Figure 6 : Métabolisme hépatique des xénobiotiques.

Phase 0 = entrée du xénobiotique dans l'hépatocyte. Phase I = fonctionnalisation de la molécule, majoritairement catalysée par des cytochromes P450 (CYP). Phase II = conjugaison par des uridine-diphosphate-glucuronosyl (UGT), sulfotransférases (SULT) et glutathion-S-transférase (GST). Phase III = élimination des conjugués formés par efflux par le canal biliaire ou par le pôle basolatéral.

A) Phase 0 : entrée

L'entrée des xénobiotiques depuis la circulation sanguine représente la phase 0 du métabolisme hépatique des xénobiotiques. Elle est effectuée par le pôle basolatéral des hépatocytes et peut se faire soit par diffusion simple, soit par transport passif ou actif à l'aide de transporteurs membranaires. Le transport transmembranaire des molécules chargées ou hydrophiles est assuré par les *Solute Carrier* (SLC). Selon la nature de la molécule à transporter, plusieurs familles de SLC sont distinguées. Les substances anioniques telles que les statines (molécules hypocholestérolémiantes) sont prises en charge par les *Organic Anion Transporting Polypeptides* (OATPs) ou par les *Organic Anion Transporters* (OATs). Les substances de nature cationiques comme le tramadol (analgésique) sont quant à elles prises en charge par les *Organic Cation Transporters* (OCTs). Enfin, les acides biliaires et certains médicaments

comme la fluvastatine sont pris en charge par les *Na⁺- Taurocholate Cotransporting Polypeptide* (NTCP) (Jetter & Kullak-Ublick, 2020).

B) Phase I : fonctionnalisation

La phase I du métabolisme des xénobiotiques correspond à une phase de fonctionnalisation de la molécule. Les réactions mises en jeu sont principalement des oxydations, des réductions ou des hydrolyses, conduisant à la formation de métabolites.

Les enzymes de phase I sont principalement représentées par les *Cytochromes P450* (CYPs) (environ 75% des enzymes totales de phase I). D'autres enzymes comme les époxydes hydrolases, les *Dihydropyrimidine Déshydrogénases* (DPD), les *NAD(P)H Quinone Oxydoréductases* (NQO), les *Alcool Déshydrogénases* (ADH), les *Aldéhydes Déshydrogénases* (ALDH) sont également impliquées dans la phase I du métabolisme des xénobiotiques (**Figure 7**) (Croom, 2012; Roth & Lee, 2017).

Comme mentionné précédemment, les réactions de phase I sont en grande majorité catalysées par les enzymes CYPs. Ces derniers sont des monooxygénases, classés en 18 familles et 44 sous familles. Les formes principales retrouvées dans le foie sont les CYP3A4 (30%), 2D6 (20%), 2C9 (13%), 2E1 (3%) et 1A2 (9%) (Zanger & Schwab, 2013; Zhao et al., 2021). Le CYP3A4 est l'isomère le plus exprimé dans le foie et est impliqué dans la métabolisation d'environ la moitié des médicaments (Zhao et al., 2021). Le CYP2E1 participe quant à lui au métabolisme de molécules exogènes comme le paracétamol, l'éthanol et certains anesthésiques (e.g. halothane, isoflurane). Comme nous le verrons dans la partie IV, ce cytochrome intervient aussi dans le métabolisme de nombreux composés endogènes (e.g. acétone, éthanol, certains acides gras). Outre son rôle dans le métabolisme des molécules endogènes et exogènes, nous verrons également que ce cytochrome joue un rôle important dans la physiopathologie des hépatopathies dysmétaboliques (voir partie 2.2).

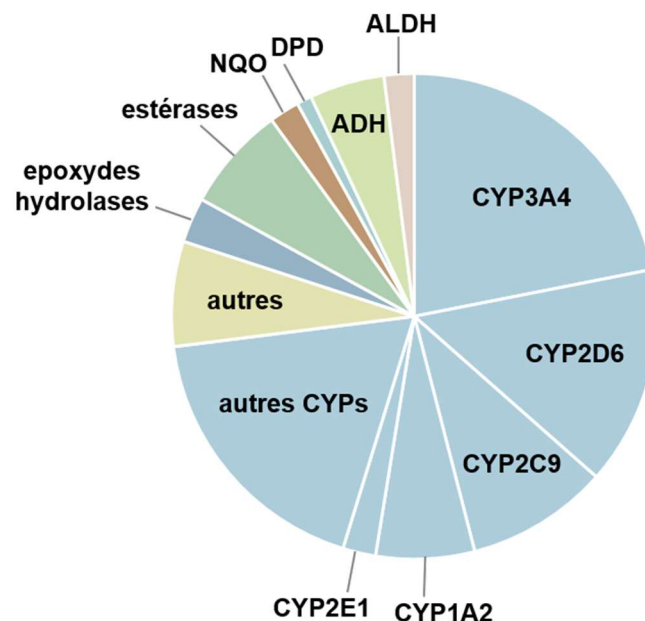


Figure 7 : Enzymes impliquées dans la phase I du métabolisme des xénobiotiques et leur proportion. Adapté de (Evans & Relling, 1999)

Les enzymes de phase I participent à la modification des groupes fonctionnels des xénobiotiques dans le but de leur élimination. Chaque section du graphique est proportionnelle à la contribution de l'enzyme correspondante dans le métabolisme. CYP = cytochrome P450 ; NQO = NAD(P)H quinone oxydoréductase ; DPD = dihydropyrimidine déshydrogénase ; ADH = alcool déshydrogénase ; ALDH = aldéhydes déshydrogénase.

Si les métabolites obtenus à l'issue de cette phase I sont suffisamment hydrophiles, ils peuvent être directement excrétés comme il sera détaillé dans le paragraphe D). Dans la plupart des cas, le métabolite sera néanmoins pris en charge par les enzymes de phase II pour augmenter son caractère hydrophile et ainsi permettre son élimination.

C) Phase II : conjugaison

La phase II correspond à la conjugaison des métabolites issus de la phase I dans le but de les rendre plus hydrophiles et plus facilement excrétables. Les réactions majoritairement retrouvées correspondent à des conjugaisons à l'acide glucuronique par les *Uridine-Diphosphate-Glucuronosyl Transférases* (UGT), dont les isoformes les plus exprimées dans le foie sont les UGT-1 et UGT-2. Des réactions de conjugaison au sulfate par des *sulfotransférases* (SULT) sont également retrouvées, principalement prises en charge par les SULT-1, SULT-2, SULT-4 et SULT-6 dans le foie. Enfin, des conjugaisons au glutathion sont possibles et prises en charge par les *Glutathion-S-Transférases* (GST), dont les isoformes les plus exprimées dans le foie sont les GST-A (α), GST-P (π), GST-T (θ) et GST-M (μ) (**Figure 8**) (Croom, 2012).

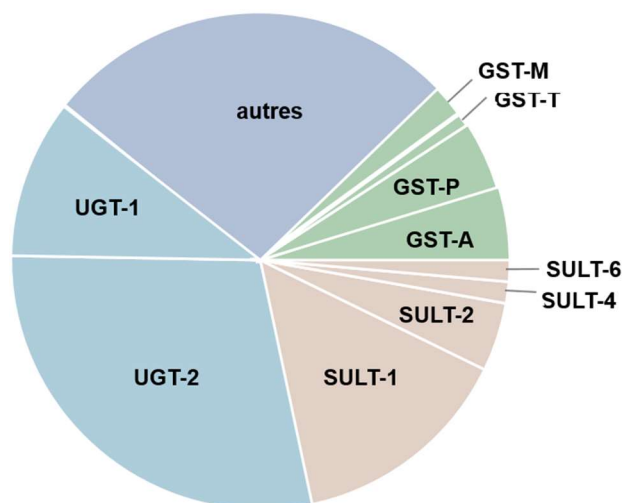


Figure 8 : Enzymes impliquées dans la phase II du métabolisme des xénobiotiques et leur proportion dans le foie. Adapté de (Evans & Relling, 1999)

Les enzymes de phase II participent à la conjugaison des métabolites formés lors de la phase I. Ces réactions correspondent à des conjugaisons par des UGT (*uridine-diphosphate-glucuronosyl transférases*), par des SULT (*sulfotransférases*) ou par des GST (*glutathion-S-transférases*). Chaque section du graphique est proportionnelle à la contribution de l'enzyme correspondante dans le métabolisme.

D) Phase III : élimination

Les métabolites ainsi obtenus sont excrétés par des transporteurs d'efflux lors de la phase III de leur métabolisme. Prise en charge par la famille des *ATP-binding cassette* (ABC), cette excrétion s'effectue au niveau hépatique soit par le pôle basolatéral, soit par le canal biliaire. L'efflux basolatéral est effectué par les transporteurs *Multidrug Resistance-Associated Proteins* (MRP), dont les isoformes majoritairement retrouvées dans le foie sont les MRP3 et 4. Ces derniers permettent le retour vers la circulation sanguine des métabolites pour une élimination au niveau du rein. L'efflux des métabolites par le canal biliaire s'effectue quant à lui principalement par l'intermédiaire de *Bile Salt Export Pump* (BSEP), de MRP2, de *Breast Cancer Resistance Protein* (BCRP), de glycoprotéines p et de *Multidrug Resistance Gene Product 3* (MDR3).

E) Régulations

La régulation de la plupart des enzymes du métabolisme des xénobiotiques s'effectue majoritairement de façon transcriptionnelle. Cette régulation implique généralement des récepteurs nucléaires tels que les récepteurs *Aryl Hydrocarbon* (AhR), *Constitutive Androstane Receptor* (CAR) et *Pregnane X Receptor* (PXR) (Tien & Negishi, 2006). Les xénobiotiques peuvent être eux-mêmes ligands de ces récepteurs nucléaires, modifiant ainsi leur propre métabolisme. De plus, les xénobiotiques peuvent interférer avec le métabolisme lipidique par

l'activation du facteur de transcription PPAR α , pouvant aboutir à une oxydation plus importante de lipides intrahépatiques (Grygiel-Górniak, 2014).

L'expression et l'activité de ces enzymes et transporteurs peuvent être altérées lors de l'obésité et de ses troubles métaboliques associés en particulier dans le contexte des pathologies hépatiques. La modification de l'expression et/ou de l'activité de ces enzymes impacte le métabolisme des xénobiotiques et peut conduire dans certains cas à des toxicités plus importantes de ces derniers. En effet, les hépatopathies d'origine dysmétabolique également désignées par le terme de *Non Alcoholic Fatty Liver Disease* (NAFLD) figurent parmi les pathologies les plus fréquentes à l'origine de l'altération des enzymes du métabolisme des xénobiotiques et ce par des mécanismes différents (Michaut et al., 2014). Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéresserons plus particulièrement au *Cytochrome P450 2E1* (CYP2E1) et au métabolisme du paracétamol. Nous verrons que dans un contexte d'obésité et/ou de NAFLD, la sensibilité à la toxicité hépatique de ce médicament peut être augmentée. Cette hépatotoxicité peut être en partie liée à l'induction du CYP2E1 hépatique qui apparaît lors de l'obésité et de la NAFLD, comme il sera détaillé dans la partie V de ce manuscrit (Sheka et al., 2020).

II. Les stéatopathies dysmétaboliques

2.1. Introduction

L'obésité, le diabète de type 2 sont des facteurs de risque majeurs pour la survenue des stéatopathies dysmétaboliques. En effet, l'incidence de ces maladies hépatiques est plus importante chez les patients obèses et/ou diabétiques (Younossi et al., 2019). Chez ces patients, la présence d'un syndrome métabolique est cruciale pour le développement de ces maladies hépatiques en raison de l'état d'insulinorésistance (Marušić et al., 2021). Ces hépatopathies dysmétaboliques plus communément désignées par le terme de NAFLD correspondent à un large spectre de lésions hépatiques d'origine non alcoolique, allant de la simple stéatose (NAFL, *Non Alcoholic Fatty Liver*) au *Carcinome Hépatocellulaire* (CHC). La NAFL se définit par une accumulation excessive de lipides dans le foie, principalement sous forme de triglycérides. Bien que souvent bénigne, la NAFL peut progressivement évoluer vers une stéatohépatite non alcoolique (NASH, *Non Alcoholic SteatoHepatitis*). La NASH est une lésion plus grave est définie par la présence concomitante d'une NAFL, de lésions nécro-inflammatoires évolutives, d'un ballonnement hépatocytaire (élargissement et gonflement de l'hépatocyte) et de fibrose

plus ou moins extensive (Schuppan et al., 2018). La NASH est une lésion potentiellement réversible puisqu'environ 5% des patients régressent vers un stade de NAFL simple à la suite de la mise en place de mesures hygiéno-diététiques (Sheka et al., 2020). Elle peut cependant aussi évoluer vers d'autres complications hépatiques telles que la cirrhose dans 20% des cas, ou le CHC (**Figure 9**) (Povsic et al., 2019). Il est à noter que la NASH peut évoluer directement vers le CHC chez une petite proportion de patients (0.08‰ environ) (Powell et al., 2021).

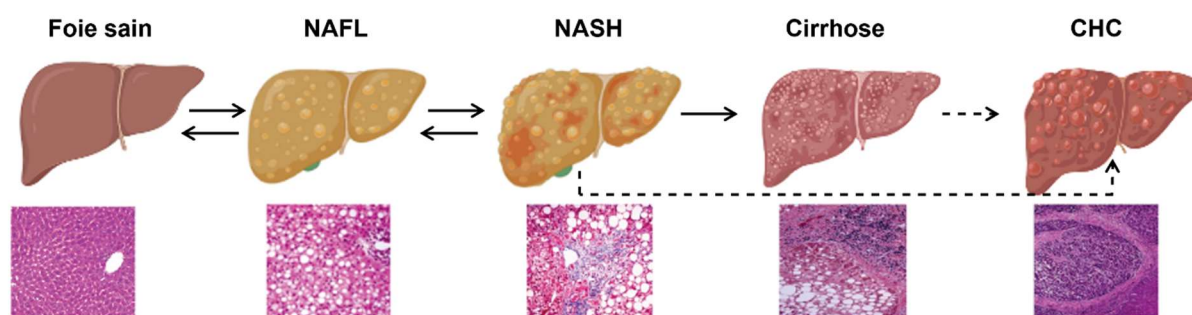


Figure 9 : Evolution et coupes histologiques de chaque stade de la NAFLD du foie sain au carcinome hépatocellulaire. Adapté de (Maurice & Manousou, 2018).

NAFL, *Non Alcoholic Fatty Liver*; NASH, *Non Alcoholic SteatoHepatitis*; CHC = carcinome hépatocellulaire.

Au cours des trente dernières années, les hépatopathies dysmétaboliques sont devenues un problème majeur de santé publique en raison de leur incidence croissante sur la population adulte et jeune, de leur impact négatif sur les maladies cardio-vasculaires et néoplasiques et de leurs coûts de santé (Sheka et al., 2020). La NAFLD est aujourd'hui la première cause de maladie chronique du foie dans les pays développés et pourraient même devenir la première cause de transplantation hépatique (Powell et al., 2021).

2.1.1. Diagnostic clinique

La nature asymptomatique de la NAFL rend son diagnostic compliqué. La plupart du temps, les investigations de diagnostic clinique sont mises en place chez un patient à la suite d'une détection de taux élevés de transaminases hépatiques lors d'un bilan de santé. Cependant, il est important de souligner que la plupart des patients atteints de NAFLD ne présentent aucune anomalie de biochimie hépatique (Mofrad et al., 2003). En effet, une large étude incluant 799 patients obèses a montré que seul 21% des sujets présentaient des taux de transaminases élevés (Marchesini et al., 2005). Malgré les similitudes histologiques avec l'*Alcoholic Liver Disease* (ALD), la NAFLD n'est diagnostiquée qu'après l'exclusion d'une consommation excessive d'alcool (i.e. consommation < 20g/jour chez la femme et 40g/jour chez l'homme). La prise de médicaments pro-stéatogènes (e.g. amiodarone, tamoxifène, corticostéroïdes) doit également

été écartée ainsi que la présence d'hépatites B et C (Björnsson & Angulo, 2007; Shi et al., 2021).

Plusieurs approches cliniques sont possibles pour diagnostiquer une NAFLD. Non invasifs et peu coûteux, certains marqueurs sérologiques accompagnés de calculs de scores existent pour contribuer au diagnostic d'une NAFL simple (*Fatty Liver Index* [FLI], NAFLD screening score, StéatoTest, *Hepatic Steatosis Index* [HSI]). Pour distinguer la NAFL de la NASH lors du diagnostic, d'autres marqueurs spécifiques à la NASH ont été proposés. Ceux-ci sont des marqueurs sérologiques (*cytokeratine-18* [CK18], marqueurs inflammatoires, FGF21) ainsi que des calculs de scores (NASHTest, NASH ClinLipMet score). Des techniques d'imagerie basées sur les ultrasons, la tomodensitométrie ou la *Résonnance Magnétique Nucléaire* (RMN) peuvent également être mises en place pour diagnostiquer la NAFL ou la NASH (Zhou et al., 2019). Néanmoins, l'ensemble de ces techniques comportent des limites puisqu'elles sont généralement trop peu sensibles.

La biopsie hépatique reste donc le moyen de référence pour confirmer une NAFLD et plus particulièrement la NASH puisqu'il n'existe pas à ce jour de méthode non invasive assez fiable permettant son diagnostic.

2.1.2. Caractérisation histologique de la NAFLD

Différentes colorations peuvent être utilisées pour la caractérisation histologique de la NAFLD à partir de biopsies de foie.

La coloration *Hématoxyline-Eosine* (HE) est une coloration d'usage courant réalisée sur des coupes de foie de 4 à 5µm d'épaisseur, préalablement fixée au formol et inclus en paraffine. C'est une coloration bichromatique permettant d'avoir des informations sur la morphologie des hépatocytes. Les éléments cellulaires chargés négativement comme le noyau sont mis en évidence en bleu/violet par l'hématoxyline, qui se fixe sur les acides nucléiques. Les éléments chargés positivement tel que le cytoplasme sont quant à eux colorés en rose par l'éosine. Les gouttelettes lipidiques apparaissent en blanc puisque les lipides sont éliminés lors de la préparation des échantillons, laissant leur place à des trous sur la lame. Ce type de coloration permet également d'apprécier l'inflammation par la coloration de granulomes en violet (amas de cellules inflammatoires tels que des macrophages) et la nécrose par une coloration rose clair. Ces deux éléments sont notamment présents lors de la NASH.

La coloration à l'huile rouge (*Oil Red O*) repose sur l'utilisation d'un colorant liposoluble pour permettre la mise en évidence des lipides neutres tels que les triglycérides et

les esters de cholestérol. En raison de l'élimination des lipides lors des étapes de déshydratation pour le paraffinage, la coloration à l'huile rouge contrairement à la coloration HE est réalisée sur des biopsies de tissus frais ou congelés en conditions particulières. Il s'agit d'une méthode quantitative et qualitative, permettant de déterminer la taille et la distribution des gouttelettes lipidiques au sein des cellules (Mehlem et al., 2013). L'évaluation de la stéatose *via* la visualisation de l'abondance des lipides neutres peut être déterminée par d'autres marquages basés sur l'utilisation de sondes fluorescentes telles que le Nile Red ou le Bodipy. Ces sondes sont particulièrement adaptés à la caractérisation *in vitro* de la stéatose (Bucher et al., 2018; McMillian et al., 2001).

D'autres colorations existent pour la mise en évidence et la caractérisation des autres lésions hépatiques telles que la fibrose. Par exemple, les colorations au trichrome de Masson et au rouge Sirius permettent la visualisation du collagène sur des coupes de foie.

A l'histologie, la NAFL est diagnostiquée lorsque plus de 5% des hépatocytes sont chargés de gouttelettes lipidiques. Il existe deux types morphologiques de stéatose qui se différencient par la taille des gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes et par l'emplacement du noyau dans la cellule. La stéatose macrovacuolaire est la forme la plus communément retrouvée puisque 80% à 90% des patients souffrants de NAFLD présentent cette forme (Celebi et al., 2020; Tandra et al., 2011). Au niveau de l'hépatocyte, elle est définie par la présence d'une gouttelette lipidique unique de grosse taille, déplaçant le noyau en périphérie (**Figure 10A**). Cette forme de NAFL est considérée comme bénigne avec un bon pronostic à long terme pour le patient (Fromenty & Pessayre, 1997; Tandra et al., 2011). Il existe une autre forme de stéatose qualifiée de stéatose microvésiculaire. Celle-ci est observée lorsque les hépatocytes contiennent plusieurs gouttelettes lipidiques de taille inférieure à celle du noyau et que celui-ci reste en position centrale (**Figure 10B**). Bien qu'elle soit plus rare (présente chez environ 10% à 20% de patients souffrants de NAFLD), la stéatose microvésiculaire est associée à un moins bon pronostic pour le patient puisqu'elle est liée à une altération sévère de la β -oxydation mitochondriale ainsi qu'à une dysfonction mitochondriale (Celebi et al., 2020; Fromenty & Pessayre, 1997; Söderberg et al., 2011; Tandra et al., 2011).

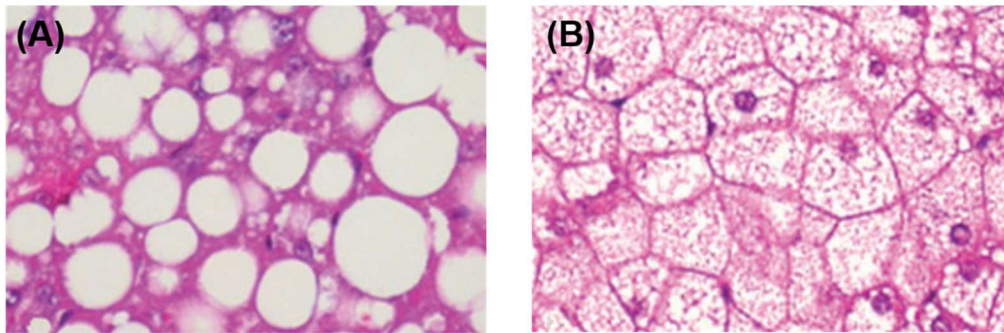


Figure 10 : Coupes histologiques de foie de souris représentant une stéatose macrovacuolaire (A) et une stéatose microvésiculaire (B). Source : (Trak-Smayra et al., 2011).

Les gouttelettes lipidiques majoritairement composées de triglycérides sont recouvertes à leur surface par des protéines spécifiques telles que les *Pérlipines* (PLIN). Ces dernières empêchent notamment l'hydrolyse des triglycérides dans les gouttelettes. Leur expression semble dépendre de la taille des gouttelettes lipidiques et être liée au degré de NAFL (Figure 11). En effet, la PLIN3 n'est par exemple retrouvée que sur les gouttelettes lipidiques de petites tailles. La PLIN2 et surtout la PLIN1 sont quant à elles retrouvées sur les gouttelettes de grosses tailles (Fujii et al., 2009; Pawella et al., 2014).

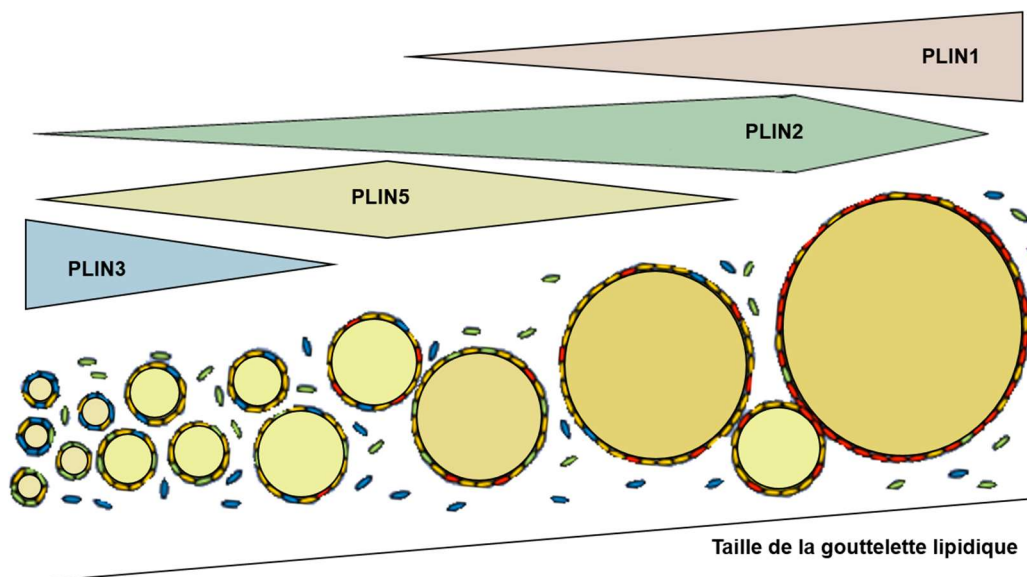


Figure 11 : Pérlipines retrouvées autour des gouttelettes lipidiques en fonction de la taille de ces dernières. Adapté de (Pawella et al., 2014).

A un stade précoce de la stéatose, la majeure partie des pérlipines (PLIN) retrouvées autour des gouttelettes lipidiques sont des PLIN3. Les PLIN2 et PLIN1 sont davantage retrouvées lors d'une stéatose installée et sur des gouttelettes de grosse taille.

2.1.3. Epidémiologie

La prévalence de la NAFLD n'a fait qu'augmenter ces trente dernières années jusqu'à atteindre aujourd'hui 25% de la population générale, dont 31% en Amérique du Sud et au Moyen Orient, 27% en Asie, 24% en Europe et en Amérique du Nord et 14% en Afrique

(Figure 12) (Ding et al., 2020; Younossi et al., 2016). De façon intéressante, cette progression est positivement corrélée à l'augmentation de la prévalence de l'obésité (Fazel et al., 2016). Cette maladie représente le facteur de risque principal de développer une NAFLD puisque 80% à 90% des sujets obèses en seraient atteints.

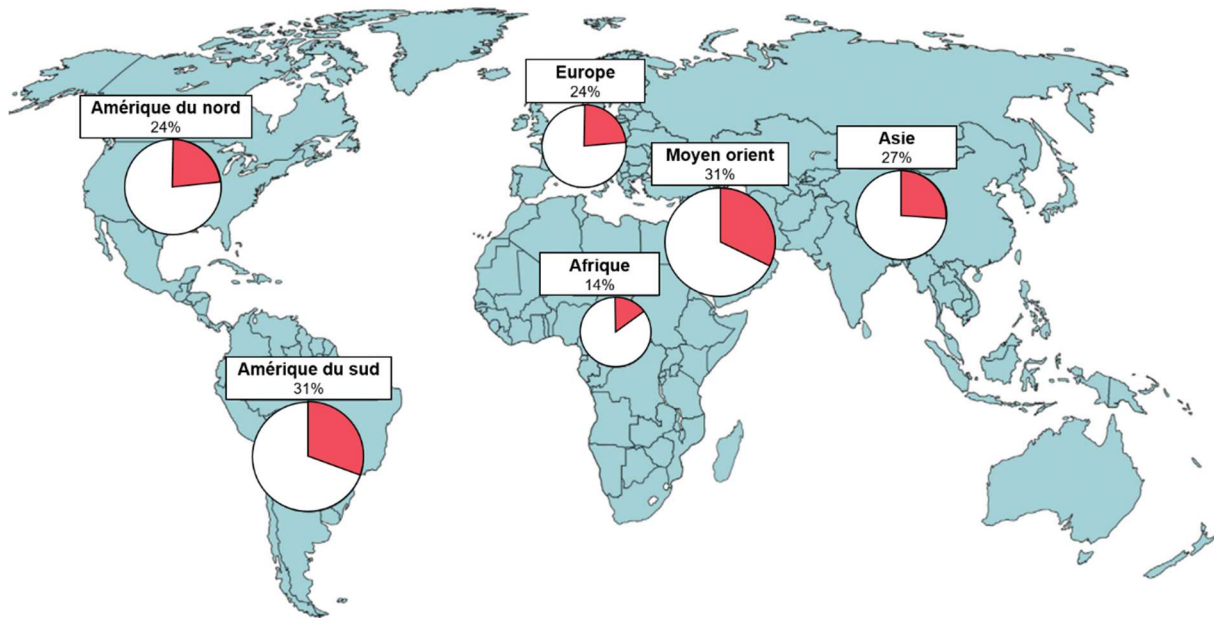


Figure 12 : Prévalence de la NAFLD dans le monde. Adapté de (Younossi & Henry, 2016).

Le risque de NAFLD varie également en fonction du sexe et de l'âge. Des études ont montré une plus forte prévalence chez les hommes comparativement aux femmes. Cette moindre sensibilité à développer une NAFLD chez les femmes est probablement liée aux propriétés anti-stéatogènes et anti-fibrogéniques des œstrogènes endogènes (Turola et al., 2015). A la ménopause, le risque augmente en raison de la diminution des œstrogènes (Ballestri et al., 2017; Hamaguchi et al., 2012; Volzke et al., 2006). Avec l'avancée en âge, le risque de NAFLD augmente également. Ce risque est en effet plus important à partir de 45 ans et ce indépendamment du sexe. La NAFLD observée est souvent sévère puisqu'elle est à un stade de fibrose avancée. Il a été suggéré que cette augmentation du risque de NAFLD avec l'âge est probablement en lien avec la hausse de la survenue de troubles métaboliques associés au vieillissement (e.g. syndrome métabolique, diabète de type 2) (Frith et al., 2009; Younossi et al., 2019). Enfin, une forte disparité ethnique est décrite puisque les américains hispaniques sont les plus touchés avec 45% de prévalence. A l'inverse, les personnes d'ethnie afro-américaine sont les moins disposées à développer une NAFLD avec une prévalence de 24% (Browning et al., 2004; Fazel et al., 2016; Williams et al., 2011).

2.1.4. Polymorphismes génétiques

Plusieurs polymorphismes génétiques ont été décrits et associés à un risque plus important de survenue de la NAFLD (Eslam et al., 2018).

Il a notamment été démontré que l'allèle rs738409G C>G du gène *Patatin-like phospholipase domain containing 3 gene* (PNPLA3) codant pour l'adiponutrine constituait le polymorphisme génétique le plus répandu puisqu'il a été retrouvé au niveau de plusieurs cohortes (Romeo et al., 2008; Sookoian & Pirola, 2011). Le domaine *patatin* que comporte cette protéine lui confère des propriétés de lipase et de transacylase (synthèse de triglycérides) mais la fonction propre de l'adiponutrine reste inconnue, bien qu'elle semble impliquée dans le métabolisme lipidique (Kienesberger et al., 2009; Lake et al., 2016). La substitution d'une isoleucine par une méthionine en position 148 de cette protéine (I148M) est responsable d'une perte de l'activité lipase de l'adiponutrine. Ainsi, cette perte d'activité se traduit par une séquestration des triglycérides dans les gouttelettes lipidiques, favorisant la survenue d'une NAFL. Il a également été rapporté que la perte d'activité de l'adiponutrine favorisait une activation des cellules étoilées, probablement par des mécanismes passant par une augmentation de l'expression de la voie IL6/STAT3 et participant ainsi à l'aggravation de la NAFL (Cherubini et al., 2021; Park et al., 2022). Ce polymorphisme est plus fréquent chez les américains hispaniques (49%) en comparaison aux autres ethnies (Romeo et al., 2008; Wagenknecht et al., 2011).

D'autres polymorphismes ont également été identifiés. Les gènes décrits étaient principalement des gènes impliqués dans le métabolisme glucido-lipidique. Par exemple, le variant rs58542926 C>T du gène *Transmembrane 6 Superfamily 2* (TM6SF2) impliqué dans le métabolisme des lipoprotéines et dans l'enrichissement en APO B100 des VLDL est également fortement corrélé avec une forte prévalence de NAFLD (Kozlitina et al., 2014; Luukkonen et al., 2017).

2.2. Physiopathologie

Concernant la physiopathologie de la NAFLD, il est important de faire la distinction entre l'apparition de la NAFL et son évolution vers la NASH. La théorie des deux attaques (ou « *two hits* » en anglais) a été proposée par Day et James en 1998 pour expliquer ce phénomène. La première attaque (ou « *first hit* » en anglais) correspond à l'accumulation excessive des triglycérides dans le foie en raison d'un déséquilibre entre les voies de synthèse et de

dégradation des lipides. Cette perturbation du métabolisme lipidique hépatique est principalement liée à une résistance à l'insuline. La survenue de la NAFL fragilise alors les hépatocytes et les rend plus sensibles aux attaques endogènes (e.g. stress oxydant, inflammation) et/ou exogènes (e.g. médicaments, polluants...) lors de la seconde attaque. Cette seconde attaque (ou « *second hit* » en anglais) favorisera la progression de la NAFL vers la NASH. L'élévation du stress oxydant, l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires et pro-fibrosantes et l'action de certains lipides toxiques sont les événements majeurs dans l'aggravation de la NAFL en NASH (Aubert et al., 2011; Day & James, 1998).

Plus récemment, ce concept des deux attaques a évolué, laissant place à une théorie des « multiples hits parallèles » (Bessone et al., 2019). Celle-ci repose sur le postulat que de multiples agressions auraient lieu en parallèle sur le foie stéatosé ou non, résultant en une inflammation et une fibrose hépatique. Dans cette hypothèse, les facteurs dérivés du tissu adipeux (adipocytokines *Interleukine 6* [IL6] et *Tumor Necrosis Factor α* [TNF α]) et ceux dérivés du microbiote (*Lipopolysaccharides* [LPS]) joueraient un rôle important dans la survenue de cette inflammation et de cette fibrose (Tilg et al., 2021; Tilg & Moschen, 2010).

2.2.1. Développement de la NAFL

Comme indiqué précédemment, la forte prévalence de la NAFL est souvent associée à un contexte d'obésité et plus précisément à la présence d'un syndrome métabolique. L'une des caractéristiques du syndrome métabolique est l'accumulation excessive de lipides au niveau du tissu adipeux viscéral à l'origine de l'obésité viscérale ou androïde. Cette obésité est souvent associée à une forte libération des acides gras dans la circulation sanguine en raison de la moindre sensibilité du tissu adipeux viscéral à l'action anti-lipolytique de l'insuline (Morigny et al., 2016; Rui, 2014). L'activation de la lipolyse dans le tissu adipeux conduit alors à une augmentation de l'efflux des acides gras à partir de ce tissu et à leur accumulation ectopique dans différents tissus dont le foie. Chez les patients souffrants de NAFLD, une augmentation de la lipolyse adipocytaire a été rapportée et les acides gras issus de cette voie métabolique contribuent à environ 59% du pool total des acides gras hépatiques (Donnelly et al., 2005; Sakurai et al., 2021). De plus, l'accumulation de lipides hépatiques résulte également du déséquilibre entre les voies de synthèse (i.e. lipogenèse *de novo*) et de dégradation des lipides dans le foie (i.e. β -oxydation) (**Figure 13**).

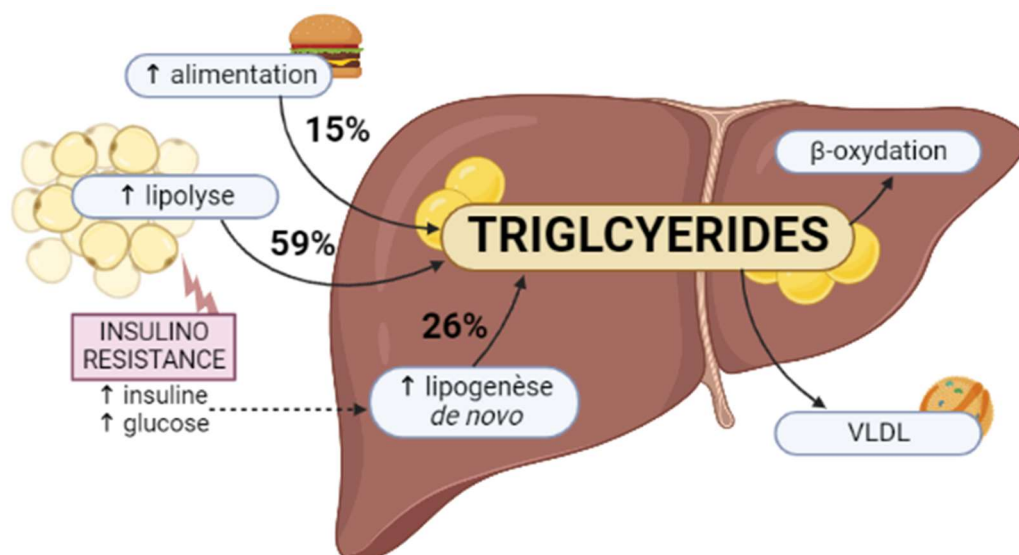


Figure 13 : Mécanismes impliqués dans le développement de la NAFL.

L'activation de la lipolyse adipocytaire, de la lipogenèse *de novo* ainsi que l'alimentation hypercalorique jouent un rôle important dans l'accumulation des triglycérides dans le foie. La résistance à l'insuline ou insulino-résistance favorise l'activation de la lipolyse au niveau du tissu adipeux. La synthèse *de novo* des acides gras dans le foie est favorisée par l'hyperinsulinémie et par l'hyperglycémie. Les acides issus du tissu adipeux ou nouvellement synthétisés seront accumulés sous la forme de triglycérides dans le foie. L'activation de la lipolyse adipocytaire et de la lipogenèse *de novo* contribuent respectivement à l'apport de 59% et 26% des acides gras totaux hépatiques. Quant aux acides gras apportés par l'alimentation, ils représentent 15% des acides gras totaux dans le foie. La β -oxydation et l'export de triglycérides sous forme de VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*) sont des mécanismes de compensation visant à limiter l'accumulation excessive de lipides dans le foie. Elles sont néanmoins altérées dans un contexte pathologique de NAFLD.

Dans le foie, l'hyperinsulinémie et l'hyperglycémie consécutives au contexte d'insulino-résistance conduisent à l'activation de la voie de la lipogenèse favorisant la synthèse *de novo* des acides gras. Comme indiqué précédemment dans le paragraphe 1.1.3., l'insuline et le glucose activent respectivement les facteurs de transcription SREBP1c et ChREBP. L'activation de ces facteurs conduit à l'augmentation de l'expression de gènes clés impliqués dans la synthèse *de novo* des acides gras (Khan et al., 2019; Sakurai et al., 2021). Une augmentation de l'expression de SREBP1c a été observée sur des modèles murins d'obésité présentant une stéatose (Nguyen et al., 2021; Shimomura et al., 2000). Une accumulation hépatique de lipides plus importante a également été rapportée chez des souris transgéniques surexprimant SREBP1c dans le foie et ceci même dans un contexte de régime normocalorique (Knebel et al., 2012). L'importance de ce facteur de transcription dans la physiologie de la NAFL a également été rapportée chez l'Homme puisque les patients atteints de NAFLD présentaient une expression plus importante de SREBP1c dans le foie que les patients sains (Higushi et al., 2008; Shimano & Sato, 2017). Concernant ChREBP, une étude chez la souris a montré que la diminution de l'expression de ce facteur de transcription était associée à une amélioration partielle de la NAFL et de la résistance à l'insuline (Dentin et al., 2006). Grâce à

des investigations reposant sur l'utilisation d'isotopes stables, il a été rapporté chez l'Homme que la lipogenèse *de novo* contribuait à 26% du pool total des acides gras hépatiques (Diraison et al., 2003; Donnelly et al., 2005; Lambert et al., 2014). Enfin, l'alimentation *via* les résidus de chylomicrons constitue la troisième source d'apport d'acides gras pour le foie. Cet apport alimentaire peut contribuer jusqu'à 15% du contenu en acides gras dans le foie (Donnelly et al., 2005).

Dans le foie, l'accumulation des lipides hépatiques est souvent exacerbée car les mécanismes de compensation (i.e. export des triglycérides sous forme de VLDL, β -oxydation des acides gras) visant à limiter la stéatose ne sont généralement pas suffisants. Il est à préciser que la sécrétion de triglycérides sous forme de VLDL est dans un premier temps augmentée chez les patients obèses atteints de NAFLD au stade de stéatose simple. Cette augmentation permet de limiter l'accumulation de lipides dans le foie et est en partie favorisée par l'augmentation de PPAR α ainsi que par l'insulinorésistance (Kawano & Cohen, 2013). Lorsque la NAFL progresse (au-delà de 10% de stéatose), l'exposition prolongée du foie aux acides gras favorise un stress oxydant, comme il sera détaillé dans la partie suivante. Celui-ci conduit à la dégradation de l'APO B et à la diminution de l'expression de la *Microsomal Triglyceride Transfer Protein* (MTTP), essentielles et limitantes dans la formation des lipoprotéines (Ota et al., 2008). La sécrétion de VLDL peut également être bloquée avec l'augmentation en taille des VLDL, qui deviennent supérieures aux diamètres des pores endothéliales sinusoidales et les séquestrant ainsi dans le foie (Fabbrini et al., 2008; Ipsen et al., 2018; Kawano & Cohen, 2013; Mittendorfer et al., 2016). En ce qui concerne le catabolisme des acides gras, les études menées chez l'Homme ont rapporté soit une augmentation (Dasarathy et al., 2011; Sanyal et al., 2001), soit une diminution (Crocì et al., 2013) ou pas de changement (Kotronen et al., 2009) de la β -oxydation hépatique. Ces variations de données relatives au catabolisme des acides gras pourraient en partie être expliquées par la progression de la NAFLD. En effet, une augmentation de la β -oxydation chez les patients à un stade précoce de NAFLD a été rapportée (Koliaki et al., 2015). Cela correspond à un phénomène de compensation pour limiter l'accumulation excessive des triglycérides hépatiques. A un stade plus avancé, une diminution de la β -oxydation et une diminution de la respiration mitochondriale ont été mesurées chez les patients atteints de NASH. Il a alors été suggéré le terme de « flexibilité mitochondriale hépatique » pour décrire cette adaptation hépatique aux stades précoces de la NAFLD, qui se perd lors du développement de la NASH (Koliaki et al., 2015).

2.2.2. Développement de la NASH

Dans 10% à 20% des cas, la NAFL peut s'aggraver et progresser vers un stade NASH, caractérisée par une accumulation excessive de triglycérides hépatiques ainsi que par des lésions nécro-inflammatoires et de la fibrose plus ou moins sévère. Bien que les mécanismes impliqués dans l'aggravation de la NAFL en NASH ne soient pas totalement élucidés, de nombreuses études ont néanmoins rapporté une implication majeure du stress oxydant ainsi que de l'action de certaines cytokines pro-inflammatoires et pro-fibrosantes (**Figure 14**).

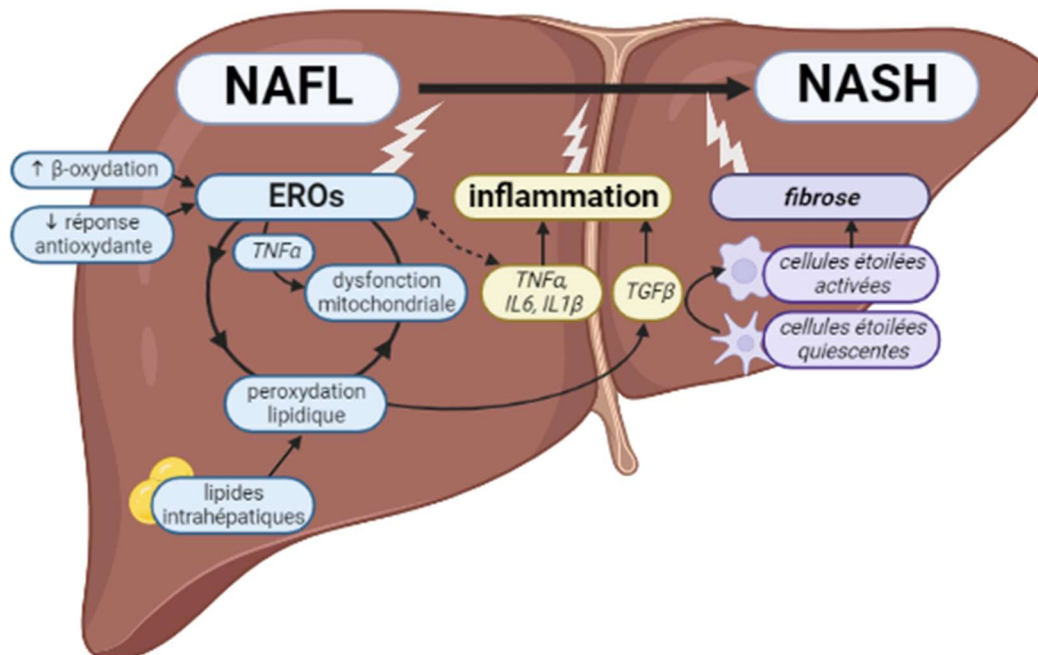


Figure 14 : Facteurs d'aggravation de la NAFL vers la NASH. Adapté de (Begrache et al., 2013; Pessayre et al., 2001).

La production d'EROs est centrale dans l'aggravation de la NAFL en NASH. Ils sont issus d'une augmentation de l'oxydation des acides gras ayant entraîné une augmentation de la production d'EROs par la chaîne respiratoire. Une diminution de la réponse antioxydante entraîne une accumulation d'EROs, aboutissant au développement d'un stress oxydant. Les EROs peuvent être responsables d'une dysfonction mitochondriale ainsi que de l'initiation de la peroxydation lipidique. Les EROs peuvent également être déclencheurs d'une inflammation *via* une production de cytokines pro-inflammatoires et *via* les produits de la peroxydation lipidique. La cytokine TGF- β est capable d'activer les cellules étoilées, produisant alors du collagène en excès et favorisant l'apparition d'une fibrose.

a) *Stress oxydant*

Le stress oxydant est un état qui résulte d'une rupture de l'homéostasie redox, soit de l'équilibre entre les facteurs prooxydants et les facteurs antioxydants. Lorsque cette rupture aboutit à un déséquilibre en faveur des facteurs prooxydants, la cellule sera soumise à des oxydations irréversibles des lipides, des protéines ou de l'ADN d'où le terme « stress oxydant ». Les facteurs prooxydants sont principalement représentés par les *Espèces Réactives de*

l'Oxygène (EROs), qui peuvent être produits à différents niveaux de la cellule (e.g. mitochondrie, peroxysome, CYP2E1).

Production des EROs

La mitochondrie est l'un des sites majeurs de production des EROs. Dans un contexte de NAFLD, cette surproduction d'EROs est souvent favorisée par l'augmentation de la β -oxydation mitochondriale des acides gras parfois associée à une altération de l'activité de la chaîne respiratoire (Begriche et al., 2013). Comme indiqué précédemment, l'oxydation des acides gras dans la mitochondrie génère les coenzymes réduits NADH et FADH₂. Ces coenzymes sont ensuite oxydés au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, donnant lieu à une production d'électrons (Pessayre et al., 2001). Ces électrons ainsi formés migrent le long des complexes de la chaîne respiratoire jusqu'au complexe IV également appelé *Cytochrome c Oxydase* (COX). A ce niveau, les électrons sont combinés à des protons et à de l'oxygène pour former de l'eau. Néanmoins, une partie de ces électrons peut s'échapper au niveau des complexes I et III et favoriser la formation d'anions superoxydes (O₂⁻) en s'associant à l'oxygène. Des études expérimentales chez les rongeurs ont rapporté une corrélation positive entre l'activation de la β -oxydation mitochondriale et la production d'EROs en raison de la plus forte affluence des coenzymes réduits NADH et FADH₂ issus de l'oxydation des acides gras (Kakimoto & Kowaltowski, 2016). Les enzymes antioxydantes (i.e. *Manganèse Superoxyde Dismutase* [MnSOD] puis *Glutathion Peroxydase-1* [GPx-1]) permettent normalement la prise en charge de ces anions superoxydes afin de limiter leur accumulation excessive dans le foie (Begriche et al., 2013). Cependant, des études cliniques ont mis en évidence que les personnes atteintes de NAFLD présentaient une diminution de l'activité de ces enzymes antioxydantes. Ainsi, les EROs ne sont pas suffisamment pris en charge par ce système et leur accumulation excessive conduit au développement d'un stress oxydant chez ces personnes (Leclercq, 2004; Videla et al., 2004).

Une autre source possible d'EROs est le CYP2E1. En effet, lorsqu'il est activé, le CYP2E1 produit des quantités significatives d'EROs au cours de son cycle catalytique (i.e. radical hydroxyle HO[•], anion superoxyde O₂⁻) (Harjumäki et al., 2021). De ce fait, de nombreuses études cliniques et expérimentales suggèrent un rôle important du CYP2E1 dans la physiopathologie de la NASH (Aljomah et al., 2015; Begriche et al., 2008; Gade et al., 2018; Mantena et al., 2009; Orellana et al., 2006). Il est à noter que ce cytochrome a la capacité de produire des EROs même sans être activé (Caro & Cederbaum, 2004; Mari & Cederbaum, 2000). Ces points seront spécifiquement discutés dans la partie 4.2. de ce manuscrit.

Conséquences d'une surproduction d'EROs

Ces EROs peuvent causer des mutations, des délétions ou même des oxydations (8-*hydroxydeoxyguanosine* ou 8-OH-dG), au niveau de l'ADN mitochondrial (Pessayre, 2007). Etant donné que l'ADN mitochondrial code pour 13 des polypeptides de la chaîne respiratoire dont l'ATP synthase, il a été rapporté que des altérations majeures de l'ADNmt pouvaient conduire à un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire. Il est donc important de souligner que l'augmentation de la β -oxydation associée à l'altération de la chaîne respiratoire exacerbe la production d'EROs (Pessayre & Fromenty, 2005). Ce cercle vicieux conduit progressivement à un dysfonctionnement de la mitochondrie.

Une production excessive d'EROs favorise également la peroxydation lipidique, qui est une chaîne de réactions provoquant l'oxydation des doubles liaisons des lipides insaturés. Les phospholipides constituant les membranes cellulaires sont alors particulièrement vulnérables à ces attaques par les EROs étant donné leur contenu important en lipides insaturés. L'attaque oxydative de lipides insaturés conduit à la formation de dérivés aldéhydes réactifs comme le *Malondialdéhyde* (MDA) et le *4-Hydroxynonénal* (4-HNE). Ces dérivés lipidiques altèrent les fonctions cellulaires en favorisant en particulier une dysfonction mitochondriale et la survenue d'une inflammation (Chen et al. 1998, 2000; Demeilliers et al. 2002).

b) Inflammation et fibrose

L'inflammation est un autre facteur important dans le développement de la NASH. Les EROs sont capables de provoquer une production directe ou indirecte de cytokines pro-inflammatoires dans le foie. En effet, les EROs eux-mêmes peuvent entraîner une production d'IL8, TNF α par les hépatocytes *via* l'induction de *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of Activated B cells* (NF- κ B). Il a aussi été montré que les EROs pouvait augmenter de façon indirecte l'expression du *Transforming Growth Factor β* (TGF- β) dans les macrophages *via* la formation du produit de peroxydation lipidique 4-HNE (Pessayre et al., 2001). Ces cytokines ainsi produites participent à l'induction d'une inflammation et alors propice à l'aggravation de la NAFL vers la NASH. Dans un contexte de stéatohépatite associé à une obésité, il est à noter que la production de cytokines pro-inflammatoires peut également être augmentée au niveau du tissu adipeux. Cette production de cytokines pro-inflammatoires par le tissu adipeux participe à l'inflammation de bas grade des sujets obèses (Kawai et al., 2021). Chez les patients atteints de NASH, une expression plus importante de TNF α a été mesurée dans les hépatocytes et les adipocytes (Aljabban et al., 2022; Crespo et al., 2001; Lu et al., 2022).

L'augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires a de multiples conséquences dans le foie. Celles-ci ont en effet des propriétés chemo-attractives et entraînent alors des infiltrats de neutrophiles, généralement observés chez les patients atteints de NASH (Pessayre, 2007). La production de cytokines pro-inflammatoires hépatiques ou adipocytaires participe également à la perméabilisation de la membrane mitochondriale *via* l'activation de médiateurs apoptotiques (caspase-8, *Bcl-2-Associated protein-X* [Bax], *Bcl-2-Associated protein-K* [Bak]). Cette perméabilisation provoque un relargage partiel du cytochrome c hors de la mitochondrie et une accumulation d'électrons qui participent de nouveau à la génération d'EROs (Pessayre & Fromenty, 2005). En raison de l'absence de cytochrome c dans la mitochondrie, les électrons sont accumulés et contribuent à altérer davantage la fonction mitochondriale. Enfin, une fibrose hépatique peut être initiée à la suite de l'ensemble de ces facteurs. En effet, les cytokines pro-inflammatoires et le 4-HNE sont des molécules activatrices des cellules de Kupffer qui ont la capacité de générer du TGF- β , une cytokine pro-fibrosante. Le TGF- β ainsi produit active les cellules étoilées qui passent alors d'un état quiescent à un état activé. Celles-ci produisent du collagène en excès, favorisant l'apparition d'une fibrose (Canbay et al., 2003; Zhan et al., 2006).

c) Autres facteurs influençant l'aggravation de la NAFL en NASH

A) Lipotoxicité

Bien que la stéatose hépatique résulte principalement d'une accumulation excessive de triglycérides au niveau des gouttelettes lipidiques, une augmentation du contenu intrahépatique de certaines espèces lipidiques (e.g. acides gras libres, diglycérides, céramides et cholestérol) a été également rapportée (Svegliati-Baroni et al. 2019). Celle-ci est souvent associée à une aggravation de la NAFL en NASH en raison des propriétés toxiques de ces lipides contrairement à une accumulation intrahépatique des lipides sous forme de triglycérides souvent décrite comme « neutre et inoffensive ». Il a par exemple été démontré chez des souris que l'inhibition de la DGAT2 (enzyme impliquée dans la dernière étape de la synthèse des triglycérides) améliorait la stéatose mais exacerbait les lésions hépatiques telles que la fibrose ou la nécro-inflammation. De plus, les auteurs ont observé une augmentation de la peroxydation lipidique ainsi que du stress oxydant chez ces animaux (Yamaguchi et al., 2007). Au niveau cellulaire, il a été montré lors d'études *in vitro* que ces espèces lipidiques (i.e. acides gras libres,

céramides, cholestérol libre) favorisaient une augmentation du stress oxydant, une dysfonction mitochondriale et la peroxydation lipidique (Svegliati-Baroni et al., 2019).

B) Dysbiose de la flore intestinale

L'impact de la composition du microbiote intestinal sur l'aggravation de la NAFL vers la NASH est aujourd'hui suggéré chez l'Homme. De façon intéressante, une proportion plus importante de *Proteobacteria* et de *Bacteroidetes* a été retrouvée chez les patients atteints de NASH (Boursier et al., 2017; Zhu et al., 2013). Cette dysbiose semble s'accroître avec la progression de la NAFLD, suggérant une évolution du microbiote intestinal au cours de la maladie (Loomba et al., 2017). Cette relation entre le microbiote et la NAFLD a également été démontrée chez la souris par des expériences de transplantations fécales de patients atteints de NAFL. En effet, dans cette étude les animaux ayant reçu le microbiote de patients atteints de NAFL présentaient une masse corporelle et une triglycéridémie plus élevée que les souris ayant reçu le microbiote de patients sains, suggérant l'installation d'une NAFL. Une quantification des triglycérides hépatiques sur les prélèvements de foie a permis de confirmer la présence de la stéatose (Burz et al. 2021).

Les mécanismes possibles liant le microbiote et la NAFLD sont une augmentation de la perméabilité intestinale avec une translocation des produits microbiens dans la circulation porte (Albillos et al., 2020; Kolodziejczyk et al., 2019), mais aussi des modifications des acides biliaires et la production de métabolites microbiens tels que l'éthanol, les acides gras à chaîne courte et les dérivés d'acides aminés capables de moduler le métabolisme hépatique et l'inflammation (Kolodziejczyk et al., 2019; Rives et al., 2020; Volynets et al., 2012; Zhu et al., 2013).

C) Xénobiotiques

De nombreux xénobiotiques ont été identifiés pour leur capacité à induire une aggravation de la NAFL vers la NASH. Parmi eux, les principaux retrouvés sont l'alcool, certains médicaments (e.g. tamoxifène, irinotecan, methotrexate et certains anti-rétroviraux) ainsi que des contaminants de l'environnement comme les dioxines.

Plusieurs études *in vivo* et cliniques ont décrit que la consommation chronique d'alcool (>60g par jour chez l'homme et >40g/j chez la femme) était particulièrement délétère pour la progression d'une NAFLD déjà installée (Mahli et al., 2015; Minato et al., 2014; Nascimento et al., 2013; Wang et al., 2010). La majeure partie de l'alcool est oxydé au niveau hépatique en acétaldéhyde par l'ADH puis en acétate par l'ALDH afin d'être éliminé. Une petite partie de

l'alcool peut néanmoins être métabolisée par le CYP2E1. L'induction du CYP2E1 a été identifiée parmi les facteurs impliqués dans la toxicité de l'alcool car elle conduit à la formation d'EROs et d'inflammation, participant à l'aggravation de la NAFL en NASH (Leung & Nieto, 2013; Singh & Ubaid, 2020). Il est important de souligner que l'alcool peut également être de source endogène par le microbiote intestinal, comme indiqué précédemment. Il a déjà été suggéré que cet éthanol de source endogène pouvait significativement contribuer à l'aggravation de la NAFL vers la NASH (Meijnikman et al., 2022).

Comme mentionné précédemment, quelques médicaments comme certains anticancéreux (i.e. tamoxifène, irinotecan, methotrexate) ou antirétroviraux ont également été identifiés pour augmenter le risque d'aggravation de la NAFL en NASH puisqu'ils peuvent induire un stress oxydant (Allard et al., 2019; Fromenty, 2013; Klaunig et al., 2018; Massart et al., 2013; Shi et al., 2019). En effet, ces médicaments peuvent entraîner une déplétion en glutathion (GSH) ainsi qu'une dysfonction mitochondriale. Comme expliqué plus longuement dans les parties précédentes, ces événements sont propices au développement d'un stress oxydant puisqu'une plus grande quantité d'EROs est produite mais qu'une plus faible partie est éliminée par le GSH. Etant donné que ces éléments sont pré-existants chez les patients atteints de NAFL, une potentialisation de cette aggravation de la NAFL vers la NASH est alors observée avec ces médicaments (Fromenty, 2013).

Enfin, les contaminants de l'environnement pourraient aussi jouer un rôle dans cette aggravation. Des études sur modèle murin d'obésité ont notamment rapporté un impact négatif des dioxines (polychlorinated dibenzo-*para*-dioxins [PCDDs]) et 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*para*-dioxin (TCDD)), des polychlorobiphényles (PCB) et du bisphénol A (Wahlang et al., 2013, 2019). Il a été démontré sur modèle murin que le PCB était capable d'impacter la réponse antioxydante en diminuant l'expression et l'activité de la glutathion peroxydase, de la superoxyde dismutase ainsi que de l'hème oxygénase, favorisant alors l'apparition d'un stress oxydant, comme décrit dans le paragraphe 2.2.2. Enfin, l'impact du benzo[a]pyrène en co-exposition à de l'éthanol a également été étudié sur modèles murin et *in vitro*, démontrant que l'exposition à ces molécules favorisaient la progression d'une NAFL simple vers une NASH (Bucher et al., 2018).

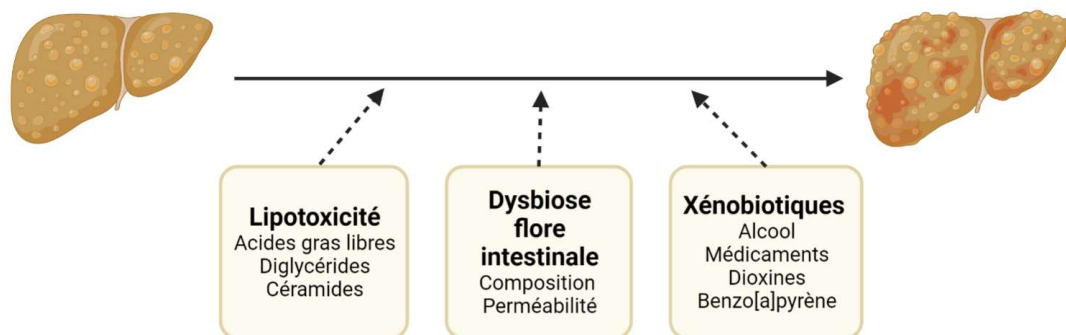


Figure 15 : Facteurs influençant l'aggravation de la NAFL vers la NASH.

La lipotoxicité, une dysbiose de la flore intestinale ainsi que certains xénobiotiques sont des facteurs qui peuvent favoriser l'aggravation de la NAFL vers la NASH.

III. Les modèles expérimentaux de NAFLD

Chez l'Homme, le développement de la NAFLD est un processus long et qui résulte de la combinaison de facteurs nutritionnels, environnementaux et génétiques, comme indiqué précédemment. Des limitations éthiques (i.e. collecte de tissus, interventions thérapeutiques) et temporelles (i.e. longue durée d'étude) sont cependant présentes lors de l'étude de la pathogenèse de la NAFLD (Kanuri & Bergheim, 2013; Vergani, 2017). Les modèles expérimentaux *in vivo* et *in vitro* représentent alors une bonne alternative pour étudier les mécanismes impliqués dans la mise en place et la progression de la NAFLD.

3.1. Modèles *in vivo*

Pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la NAFLD, différents modèles murins ont été utilisés du fait de caractéristiques génétiques proches de l'Homme. De plus, leurs propriétés zootechniques (petite taille, reproduction rapide et en grand nombre) leur confèrent de nombreux avantages pour l'étude de ces maladies.

Les modèles d'études murins peuvent être classés en deux groupes : les modèles génétiques qui développent spontanément une NAFLD et les modèles nutritionnels pour lesquels la maladie se déclare après un régime ou un traitement particulier. Chacun de ces modèles présentent des caractéristiques spécifiques avec des avantages et des limites.

3.1.1. Modèles génétiques

Les modèles génétiques de NAFLD les plus couramment utilisés sont ceux associés à une altération de la production de la leptine ou un défaut de sensibilité à la leptine.

Le modèle murin *ob/ob* présente une déficience totale en leptine tandis que le modèle *db/db* présente une perte de sensibilité à la leptine suite à une mutation sur le gène codant le récepteur de cette adipokine. Dans ces deux modèles, les animaux présentent une hyperphagie, une inactivité et une obésité sévère voire massive (Kanuri & Bergheim, 2013). Ces animaux présentent également les principaux troubles métaboliques associés à l'obésité comme une hyperglycémie, une hyperinsulinémie et une résistance à l'insuline. En revanche, des différences concernant le métabolisme du glucose sont présentes entre ces deux modèles puisque les souris *db/db* présentent un diabète de type 2 plus prononcé par rapport aux souris *ob/ob*, qui ne le présenteront que plus tardivement. Dans ces deux modèles, l'accumulation de lipides dans le foie entraîne l'apparition d'une NAFL à partir de 12 semaines mais la progression de la NAFL vers la NASH ne s'effectue pas de manière spontanée (Van Herck et al., 2017). Une intervention nutritionnelle (e.g. régime hyperlipidique) (Trak-Smayra et al., 2011) ou une exposition à des chimiques industriels est nécessaire (e.g. tétrachlorure de carbone). Ces données suggèrent que la leptine et que l'activation de sa voie de signalisation jouent un rôle important dans la physiopathologie de la NAFLD.

Outre ces deux modèles de référence, d'autres modèles génétiques *in vivo* ont été développés. Parmi eux, les souris surexprimant SREPB1c, les souris KK-Ay/a (mutation du gène *agouti*), les souris déficientes pour le récepteur aux mélanocortines de type 4 ou *Melanocortin 4 Receptor* (MC4R). Les rats Zucker (*fa/fa*) peuvent également être utilisés pour l'étude de la NAFLD puisqu'ils présentent certaines caractéristiques similaires à celles des souris *db/db* ou *ob/ob* (obésité sévère, hyperphagie, hyperglycémie...).

Au-delà du fait que la transposition de l'animal vers l'Homme soit complexe, il est cependant important de souligner que les mutations génétiques conduisant à l'inactivation totale de ces différents gènes sont rares chez l'Homme et représentent donc la limitation majeure de ces modèles.

3.1.2. Modèles nutritionnels

Une alimentation hypercalorique et hyperlipidique constitue un facteur de risque important pour le développement d'une obésité et d'une NAFLD. Ainsi, le modèle d'étude murin basé sur un apport nutritionnel riche en lipides (*High Fat Diet*, [HFD]) est souvent utilisé pour l'étude de la NAFLD. Ce régime contient généralement entre 30% et 75% de l'énergie apportée par des lipides, essentiellement par des acides gras saturés. Les animaux nourris avec un régime HFD développent une obésité et une NAFLD avec des troubles métaboliques associés similaires à ceux retrouvés chez l'Homme (i.e. hyperinsulinémie, hyperglycémie) (Van

Herk et al., 2017). Néanmoins, les limites de ce modèle résident en son hétérogénéité puisque le régime HFD n'est pas standardisé, ce qui peut induire des biais d'interprétation des résultats. En effet, en plus de leur quantité, le type de lipides apportés dans le régime est déterminant pour l'apparition d'une NAFLD. En fonction des études, la source des lipides contenus dans ces régimes peut être animale (lard, bœuf, poisson) ou végétale (maïs, soja). La nature des acides gras présents dans le régime est donc souvent différente entre les études. Cette hétérogénéité a pour conséquence d'induire de potentiels biais d'interprétation notamment en fonction de la quantité d'acide gras polyinsaturés apportés dans le régime.

Des régimes combinant un apport élevé en lipides, en fructose et en cholestérol ont été également développés en analogie avec ce qui est retrouvé dans l'alimentation occidentale. Des études expérimentales chez des souris nourries avec un régime hyperlipidique enrichi en cholestérol (2%) et supplémenté en fructose dans l'eau de boisson ont montré la survenue d'une NAFL après 4 semaines de régime et une NASH avec fibrose à 16 semaines de régime. Une cirrhose voire un CHC ont également été observés chez ces souris lorsque la durée du régime était plus longue (Asgharpour et al., 2016; Charlton et al., 2011; Clapper et al., 2013).

Le régime déficient en méthionine et en choline (*Methionine and Choline Deficient diet*, [MCD]) est également largement utilisé pour l'étude de la NAFLD. Ce régime est généralement constitué d'un apport modéré en lipides (10%) et d'un apport élevé en glucides (40%). Toutefois, le déficit en méthionine et en choline entraîne chez ces souris une diminution de la β -oxydation mitochondriale ainsi que de l'export des triglycérides sous forme de VLDL. Ces perturbations métaboliques aboutissent au développement d'une NAFL après 4 à 6 semaines de régime (Kanuri & Bergheim, 2013; Stephenson et al., 2017; Van Herck et al., 2017). Dans ce modèle d'étude, la NAFL évolue rapidement vers une NASH puisqu'une nécro-inflammation, un stress oxydant et une fibrose se mettent en place dans le foie après 8 à 10 semaines de régime. Des lésions hépatiques importantes sont retrouvées à plus long terme (≥ 15 semaines) avec un régime MCD, allant jusqu'au CHC. Néanmoins, l'obésité et ses perturbations métaboliques associées comme la résistance à l'insuline ne sont pas retrouvées chez ces souris, la masse corporelle de ces animaux étant même réduite de 40% après 10 semaines de régime et accompagnée d'une cachexie dans certains cas (Van Herck et al., 2017). Les mécanismes de mise en place de la NAFLD ne sont ainsi pas similaires à ceux retrouvés chez l'Homme, représentant l'une des principales limites de ce modèle.

3.2. Modèles *in vitro*

3.2.1. Hépatocytes primaires humains et lignées cellulaires

De nombreux modèles *in vitro* ont été développés depuis plusieurs années pour l'étude des maladies hépatiques. La culture d'hépatocytes est largement utilisée étant donné que ces cellules jouent un rôle majeur dans la plupart des fonctions du foie. Pour cela, l'utilisation de cultures d'hépatocytes primaires et de lignées hépatocytaires immortalisées est courante.

Les hépatocytes humains primaires (*Primary Human Hepatocytes*, [PHH]) sont les modèles *in vitro* ayant les caractéristiques les plus proches de la situation *in vivo*. Leur origine fraîchement isolée leur confère la quasi-totalité des fonctions du foie pendant quelques jours (5 jours en moyenne après ensemencement) (Castell et al., 2006). Les PHH expriment en effet la plupart des enzymes nécessaires au métabolisme glucido-lipidique et des xénobiotiques, rendant ce modèle pertinent pour les études nutritionnelles, pharmacologiques et toxicologiques. De plus, les PHH permettent d'observer la variabilité interindividuelle des polymorphismes génétiques et des maladies étudiées. Néanmoins, l'expression de la plupart des enzymes décroît après quelques jours, limitant l'utilisation des PHH sur des périodes plus longues d'expérimentations. Enfin, leur difficulté d'accès et leur coût élevé limite d'autant plus leur utilisation (Zeilinger et al., 2016).

Pour pallier ces défauts, de nombreuses lignées cellulaires hépatiques ont été développées au cours de ces dernières décennies. Outre leur coût avantageux, les cellules de ces lignées prolifèrent de façon continue et offrent des résultats reproductibles (homogénéité génétique, conditions de culture standardisées). Parmi elles, les lignées HepG2 et HuH7 dérivées d'hépatomes humains sont historiquement les plus utilisées puisqu'elles présentent la plupart des fonctions métaboliques retrouvées dans les hépatocytes humains. Il est cependant à noter que ces fonctions métaboliques sont souvent plus faibles comparativement à celles retrouvées chez l'Homme (Arzumanian et al., 2021). En effet, ces lignées présentent souvent une faible expression et activité de certaines enzymes du métabolisme des xénobiotiques (e.g. CYPs, UGT) ainsi qu'une altération de la fonction mitochondriale (Arzumanian et al., 2021; Westerink & Schoonen, 2007; Wiśniewski et al., 2016). Elles ne représentent donc pas un modèle idéal pour les études pharmacologiques et toxicologiques de la NAFLD.

La lignée cellulaire HepaRG a été mise au point dans notre laboratoire à Rennes à partir d'une tumeur hépatique d'une patiente souffrant d'un CHC (Gripon et al., 2002). Elle a initialement été conçue pour sa capacité à être infectée par le virus de l'hépatite B. Les cellules

HepaRG sont des cellules épithéliales à haut potentiel prolifératif et capables d'effectuer un programme complet de différenciation hépatocytaire. Au stade prolifératif, elles possèdent des propriétés de cellules progénitrices bipotentes et se divisent jusqu'à confluence à savoir 15 jours après leur ensemencement (**Figure 16 A et B**). A partir de ce stade (J15), elles amorcent le processus de différenciation : elles cessent alors de se diviser et commencent à se différencier en cellules hépatocytaires (55%) et en cellules biliaires (45%) (**Figure 16 C et D**). Cette différenciation est potentialisée par l'ajout de *Diméthylsulfoxyde* (DMSO) dans le milieu de culture. Après différenciation, les cellules HepaRG expriment la plupart des enzymes et des facteurs de transcription impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques (i.e. CYP3A4, CYP2E1, CYP2D6...) et dans le métabolisme glucido-lipidique (i.e. PPAR α , PPAR γ , PGC1 α , SREBP1, ChREBP, CPT1, glucokinase...) (Bucher et al., 2017; Guillouzo et al., 2007; Le Guillou et al., 2018; Michaut et al., 2016). Ces caractéristiques en font un modèle de choix pour les études de toxicité et de la NAFLD. Concernant la NAFLD, des études au laboratoire ont mis en évidence que les cellules HepaRG étaient capables d'accumuler les lipides en réponse à des traitements par certains acides gras comme l'acide stéarique (Michaut et al., 2016) et à un mélange d'acide stéarique et oléique (Bucher et al., 2018; Le Guillou et al., 2018). Les investigations conduites dans l'équipe ont montré que l'accumulation intracellulaire de lipides était associée à une augmentation de l'expression des gènes *PLIN1* et *PLIN2*, qui sont des marqueurs des gouttelettes lipidiques comme indiqué dans la partie 2.1. De plus, cette stéatose était associée à une induction du CYP2E1 en réponse à certains acides gras (i.e. acide stéarique, mélange acide stéarique et oléique). Cette induction était comparable à celle observée dans les foies stéatosiques des sujets obèses (Abdelmegeed et al., 2017; Allard et al., 2019; Bucher et al., 2018; Le Guillou et al., 2018; Michaut et al., 2016). De plus, il est important de souligner que les cellules HepaRG présentent des fonctions mitochondriales très proches des PHH, ce qui n'est par exemple pas le cas pour d'autres lignées cellulaires telles que les HepG2 (Le Guillou et al., 2018). En revanche, la limite de la lignée HepaRG réside dans le fait qu'elle provienne d'un unique patient, ne permettant pas d'avoir la variabilité interindividuelle retrouvée avec les PHH.

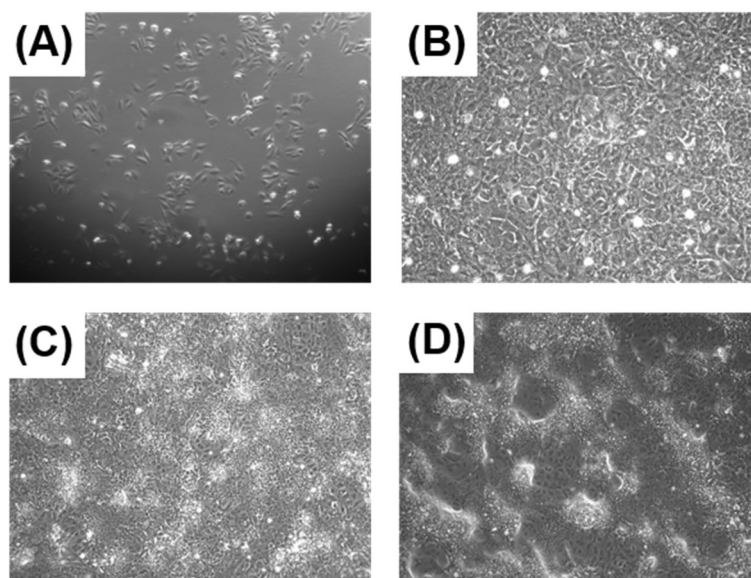


Figure 16 : Evolution morphologique des cellules HepaRG au cours de la prolifération et de la différenciation.

(A) Cellules progénitrices bipotentes ensemencées à faible densité (J1). **(B)** Cellules proliférantes (J8). **(C)** Cellules à confluence, en cours de différenciation (J15). **(D)** Cellules différenciées en hépatocytes et en cholangiocytes (J32).

3.2.2. Co-cultures et organoïdes

L'étude de la progression de la NAFL vers la NASH requiert cependant de considérer l'interaction des hépatocytes avec les autres types cellulaires hépatiques (i.e. cellules étoilées, cellules de Kupffer) (Vergani, 2017). Pour cela, des modèles de co-cultures ont été développés. Une étude a par exemple démontré qu'une co-culture d'hépatocytes et de cellules étoilées permettait l'induction de facteurs pro-fibrogéniques et pro-inflammatoires en condition de surcharge lipidique (Wobser et al., 2009). Une autre étude a mis en évidence qu'une activation des cellules de Kupffer par des endotoxines entraînait une inflammation dans les autres types cellulaires de la co-culture (e.g. hépatocytes), jouant un rôle majeur dans la progression de la NAFL vers la NASH (Spruss et al., 2011).

Plus récemment, un modèle d'organoïdes à partir de cellules souches pluripotentes induites (*induced Pluripotent Stem Cells*, [iPSC]) pour modéliser la NASH chez l'Homme a été mis au point (Ouchi et al., 2019). Une fois différencié, ce modèle est composé d'hépatocytes, de cellules étoilées et de cellules de Kupffer et présente de nombreuses homologues transcriptomiques vis-à-vis des tissus hépatiques *in vivo*. Il a notamment la capacité de reproduire les caractéristiques de la NAFL et de la NASH lors d'une surcharge lipidique puisqu'une accumulation de lipides, une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, un ballonnement hépatocytaire et de la fibrose ont été retrouvés dans ces organoïdes (Ouchi et al., 2019).

L'utilisation des co-cultures et des organoïdes offre donc de nouvelles perspectives pour l'étude de la physiopathologie des maladies hépatiques.

Ces modèles cellulaires ou animaux permettent notamment l'étude de mécanismes complexes liés à la NAFLD. En particulier, l'utilisation de certains de ces modèles a permis de mettre en évidence l'implication de plusieurs facteurs comme l'induction du CYP2E1 dans l'aggravation de la NAFL (Aljomah et al., 2015; Begriche et al., 2008; Gade et al., 2018; Mantena et al., 2009; Orellana et al., 2006).

IV. Le cytochrome P450 2E1

4.1. Généralités

4.1.1. Les cytochromes P450

Comme exposé dans la partie 1.1.3., les xénobiotiques requièrent d'être métabolisés afin d'être éliminés. Ce métabolisme est pris en charge par deux classes d'enzymes : les enzymes de phase I permettent la fonctionnalisation du xénobiotique par la modification d'une fonction chimique, généralement par oxydation. Les enzymes de phase II permettent quant à elles la conjugaison d'un groupement sur le métabolite formé lors de la phase précédente.

Les CYPs font partie des enzymes de phase I et sont des hémoprotéines impliquées dans 95% des biotransformations des xénobiotiques et de substances endogènes (Guengerich, 2020). Ils tiennent leur désignation de « P450 » du fait de leurs propriétés d'absorption à 450 nm dans le spectre UV (Omura & Sato, 1962). Ces enzymes sont principalement exprimées dans le foie mais également retrouvées en plus faible quantité dans les reins (Déri et al., 2020), l'intestin (Grangeon et al., 2021), le cerveau (Kuban & Daniel, 2021) et le poumon (Hukkanen et al., 2002). Au niveau cellulaire, les CYPs sont des protéines membranaires. Environ 90% d'entre eux sont situés dans la membrane du réticulum endoplasmique mais une petite proportion de CYPs est également retrouvée dans la membrane interne mitochondriale (Knockaert et al., 2011). Les CYPs présents dans les mitochondries sont les mêmes que les CYPs microsomaux (1A, 2A, 2B, 2C, 2E 3A...) mais retrouvés dans de plus petites proportions (Omura, 2006).

a) Structure et cycle catalytique

Les CYPs ne sont pas des cytochromes au sens strict puisqu'ils ne transfèrent pas d'électrons à d'autres protéines (Guengerich et al., 2016). Ce sont des monooxygénases de 45

kDa à 62 k Da composées d'un groupement protéique et d'un groupement prosthétique. Ce dernier est constitué d'une protoporphyrine IX (4 azotes) liée à un atome de fer par 4 liaisons covalentes. Cet atome de fer est également lié par une 5^e liaison covalente au groupement thiol d'une cystéine. Enfin, une 6^e liaison permet la fixation d'oxygène au cours du cycle catalytique (**Figure 17**). Le cycle catalytique des CYPs implique sa liaison au substrat puis la formation d'un groupement hydroxyle sur celui-ci selon l'équation suivante : $\text{RH} + \text{O}_2 + \text{H}^+ + \text{NADPH} \rightarrow \text{ROH} + \text{H}_2\text{O} + \text{NADP}^+$.

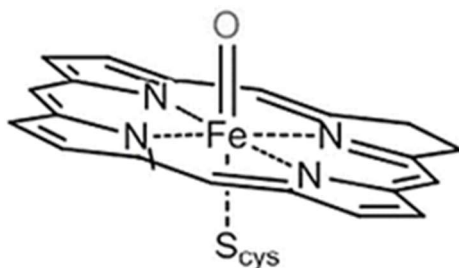


Figure 17 : Structure des cytochromes. Source : thèse Lionel Ducassou.

b) Classification

Les CYPs ont été classés en différentes familles et sous-familles en fonction de la structure de la protéine fixée à l'hème. Ils sont ainsi classés de la manière suivante : le nom « cytochrome P450 » est abrégé par « CYP », suivi d'un chiffre correspondant à la famille (protéine avec au moins 40% d'homologie de séquence en acides aminés), d'une lettre correspondant à la sous-famille (< 55% d'homologie de séquence en acides aminés) puis d'un chiffre désignant le gène (**Figure 18**). Les protéines ayant moins de 3% de divergence de séquence sont classées comme variants alléliques. Chez l'Homme, 18 familles, 44 sous-familles et 57 gènes de CYPs ont été répertoriés. Pour rappel, les formes les plus exprimées dans le foie sont les CYP3A4 (30%), 2D6 (20%), 2C9 (13%), 2E1 (3%) et 1A2 (9%) (Zanger & Schwab, 2013; Zhao et al., 2021).

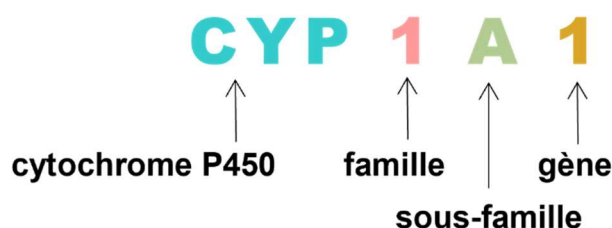


Figure 18 : Nomenclature des cytochromes.

Une seconde méthode de classification a été proposée, classant les CYPs en fonction de leur système donneur d'électrons (Hannemann et al., 2007). En effet, la monooxygénation catalysée par les CYPs requiert le couplage d'une source d'électrons provenant du NADPH à des partenaires redox (Nebert et al., 2013). Les CYPs de classe I sont bactériens et mitochondriaux et utilisent la *Ferredoxine Reductase* (FDR) et la *Ferredoxine* (FDX) comme partenaires redox. Les CYPs de classe II sont quant à eux microsomaux et sont donc les plus répandus chez les eucaryotes. Ils utilisent les cofacteurs *Flavine Adénine Dinucléotide* (FAD) et *Flavine Mononucléotide* (FMN) pour leur système donneur d'électrons. Certains CYPs de classe II comme le CYP3A4 ou le CYP1A1 sont également capables d'utiliser le cytochrome b5 en tant que cofacteur (Stiborová et al., 2016) (**Figure 19**). Des CYPs de classes III à X ont également été décrites par Hannemann et ses collaborateurs mais concernent essentiellement des CYPs bactériens.

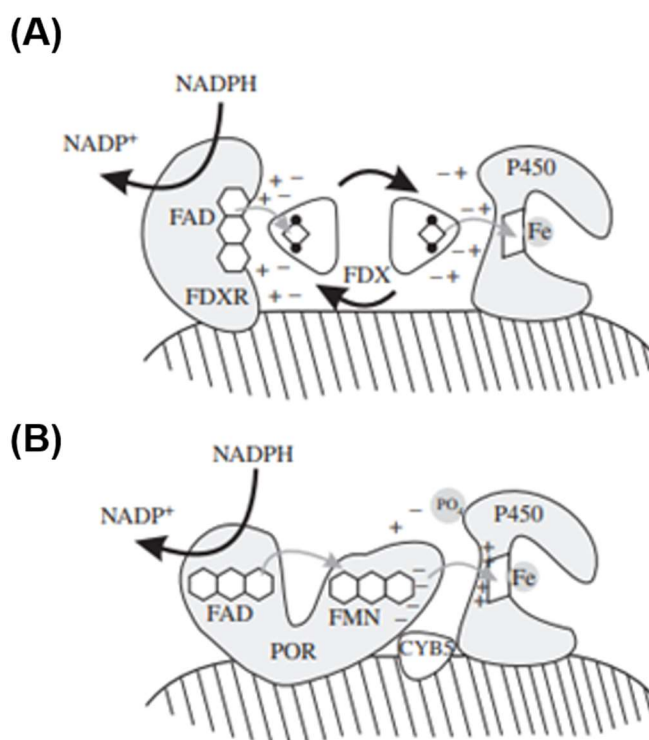


Figure 19 : Partenaires redox des CYPs de classe I (A) et de classe II (B). Source : (Nebert et al., 2013)

FAD, Flavine Adénine Dinucléotide ; FDR, Ferredoxine réductase ; FDX, Ferredoxine ; FMN, Flavine Mononucléotide ; CYB5, cytochrome b5 ; POR, P450 oxydoréductase.

c) Activités et rôles biologiques

Comme indiqué précédemment, les CYPs sont impliqués dans un grand nombre de réactions de biotransformation, démontrant leur diversité d'action. Les types d'activités réalisés par les CYPs sont une activité monooxygénase (dont l'hydroxylation est la plus répandue), une

activité oxydase (comprenant des réactions d'hydroxylation aromatique et d'oxydation de fonctions alcooliques), une activité réductase (notamment sur des fonctions azotées ou halogénées) et une activité peroxydase. Ces activités diverses permettent de métaboliser un grand nombre de molécules. Comme exposé dans la partie 1.1.3. de ce manuscrit, les CYPs interviennent dans la phase I du métabolisme de la plupart des xénobiotiques afin de les rendre plus polaires pour faciliter leur excrétion (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001). Les métabolites ainsi formés seront ensuite soit pris en charge par les enzymes de phase II, soit directement excrétés s'ils sont suffisamment polaires à cette étape.

Les CYPs jouent également un rôle dans le métabolisme de nombreuses molécules endogènes (Seliskar & Rozman, 2007). En effet, les CYPs 11A1, 17A1, 21A1, 11B et 4A sont impliqués dans le métabolisme des stéroïdes tels que les acides biliaires (Chiang & Ferrell, 2018). Les CYPs de la famille 4A et 2E sont également impliqués dans l' ω -oxydation de certains acides gras tel que l'acide arachidonique (C20:4, ARA) (Johnston et al., 2011). Cette métabolisation aboutit à la formation de 19- et 20- *hydroeicosatetraenoic acid* (HETE) (Isse et al., 2022; Nebert et al., 2013), comme il sera détaillé dans la partie 4.2. Il a également été mis en évidence sur des modèles *in vitro* que certains CYPs participent à l'hydroxylation de la vitamine D au niveau microsomal (CYP2D25, CYP27A1) et mitochondrial (CYP24, CYP27A1, CYP27B1) (Araya et al., 2003). Enfin, il a été montré que les CYPs de la famille 26 sont impliqués dans la clairance de la vitamine A en favorisant l'hydroxylation de l'acide rétinolique (Ross & Zolfaghari, 2011). Il est à noter que le métabolite obtenu pourrait jouer un rôle positif dans la modulation du système immunitaire et dans l'inflammation (Stevenson et al., 2015).

En raison de leur actions multiples sur de nombreuses molécules exogènes et endogènes, les CYPs sont des enzymes essentielles dans l'organisme.

4.2. Le cytochrome P450 2E1

Parmi la diversité de CYPs existants, le cytochrome P450 2E1 (famille 2 sous-famille E gène 1) ou CYP2E1 a été cloné et séquencé en 1988. Il présente un intérêt particulier étant donné son implication dans le métabolisme de nombreuses molécules exogènes et endogènes. Sa capacité à produire des EROs lorsqu'il est activé l'implique dans le développement de certaines maladies hépatiques comme la NAFLD.

4.2.1. Localisation du CYP2E1

Comme la plupart des CYPs, le CYP2E1 est essentiellement exprimé dans le foie, où il représente 3% du total des CYPs. Il a également été mis en évidence en plus petites proportions chez l'Homme dans le cerveau (Toselli et al., 2015), le poumon (Bernauer et al., 2006), le cœur (Sidorik et al., 2005), le colon (Plewka et al., 2014) et le tissu adipeux (Gopal et al., 2020).

Dans le foie, les niveaux de CYP2E1 les plus élevés se trouvent dans la zone centrolobulaire. Cette région est en effet la cible des substrats exogènes du CYP2E1 tels que l'alcool ou le paracétamol comme il sera détaillé dans la partie 4.2. (Jimenez-Lopez & Cederbaum, 2005). Plus précisément, le CYP2E1 est majoritairement retrouvé dans les hépatocytes mais également en plus petite proportion dans les cellules de Kupffer (Harjumäki et al., 2021; Ye et al., 2013).

Au niveau cellulaire, le CYP2E1 est essentiellement localisé à 60% dans le réticulum endoplasmique comme la plupart des CYPs. 30% à 40% du CYP2E1 est également retrouvé dans la mitochondrie. Une plus faible proportion a aussi été détectée dans les peroxysomes ainsi que dans la membrane plasmique (Loeper et al., 1989). Il est à préciser que le CYP2E1 présente une structure secondaire, un degré de phosphorylation et une activité différente en fonction de sa localisation cellulaire. Sa capacité d'induction est également différente en fonction de sa localisation cellulaire puisqu'elle semble être plus importante pour le CYP2E1 microsomal que pour le mitochondrial (Harjumäki et al., 2021). La localisation mitochondriale du CYP2E1 serait cependant plus délétère pour la cellule que la localisation microsomale, comme il sera détaillé dans le paragraphe 4.3.4.

4.2.2. Substrats du CYP2E1

Le CYP2E1 est impliqué dans le métabolisme de plus de 70 substrats exogènes et endogènes. Il a en effet la capacité de métaboliser une grande variété de petites molécules et a une forte affinité pour les molécules hydrophobes (Lu & Cederbaum, 2008).

a) Substrats exogènes

Le CYP2E1 participe au métabolisme de nombreuses molécules exogènes telles l'alcool, certains solvants (chloroforme, carbone tetrachloride), des hydrocarbures aromatiques (benzène, toluène), des aldéhydes (acétaldéhyde), de certains médicaments comme les anesthésiques halogénés (isoflurane, sevoflurane, enflurane, halothane, desflurane), le paracétamol et la chlorzoxazone (Jimenez-Lopez & Cederbaum, 2005).

A) L'éthanol

Bien que la majeure partie de l'éthanol soit métabolisée dans le foie par les enzymes ADH et ALDH comme indiqué dans la partie 2.2.2, une petite partie de l'éthanol peut néanmoins être prise en charge par le système MEOS (*Microsomal Ethanol Oxidizing System*) dans le réticulum endoplasmique et impliquant le CYP2E1 ainsi que les cytochromes CYP1A2 et 3A4.

Le métabolisme de l'éthanol par le CYP2E1 est responsable d'une toxicité notamment lors de consommation chronique d'alcool. Comme décrit dans la partie 2.2.2., une petite partie de l'éthanol est métabolisée par le CYP2E1 pour former de l'acétaldéhyde, qui sera ensuite transformé en acétate par l'ALDH. La métabolisation de l'alcool par le CYP2E1 peut également conduire à la formation du radical hydroxyéthyle (Lu & Cederbaum, 2008). Ce radical est délétère au niveau cellulaire puisqu'il est très réactif et est capable d'initier une peroxydation lipidique. Il est important de souligner que des études ont montré que le CYP2E1 était inductible suite à une intoxication à l'alcool, entraînant une formation plus importante de radical hydroxyéthyle et aggravant alors cette toxicité observée (Bai & Cederbaum, 2006; Bansal et al., 2010; Cederbaum, 2012; Lieber et al., 2007).

Une consommation excessive d'alcool peut donc entraîner des lésions hépatiques en partie liées à l'induction du CYP2E1. Ces lésions hépatiques peuvent être particulièrement exacerbées lors d'une NAFLD, comme discuté dans la partie 2.2.2. de ce manuscrit.

B) La chlorzoxazone

La chlorzoxazone est un relaxant musculaire qui peut être utilisé en clinique pour traiter des spasmes musculaires et son métabolisme hépatique est pris en charge par le CYP2E1. L'hydroxylation hépatique de la chlorzoxazone par le CYP2E1 aboutit à la formation de 6-hydroxychlorzoxazone. Chez l'Homme et chez l'animal, plus de 80% de la chlorzoxazone administrée est retrouvée dans le sérum sous forme de 6-hydroxychlorzoxazone. La chlorzoxazone est couramment utilisée en clinique ainsi que dans les études expérimentales pour la détermination de l'activité du CYP2E1 (Salhab et al., 2020; Witt et al., 2016). Néanmoins, il est à noter que certains modèles cellulaires comme les cellules HepaRG expriment davantage d'UGTs que les PHH. Il a en conséquence été montré que l'essentiel de la 6-hydroxychlorzoxazone était prise en charge par ces UGTs dans ce modèle cellulaire (UGT 1A1, 1A6 et 1A9) pour être métabolisé sous forme de chlorzoxazone-o-glucuronide (Quesnot et al., 2018). Ainsi, le dosage de la chlorzoxazone-o-glucuronide spécifiquement a été

développée au laboratoire afin de mesurer l'activité du CYP2E1 sur les cellules HepaRG (Quesnot et al. 2014).

L'utilisation du métabolisme de la chlorzoxazone comme marqueur de l'activité du CYP2E1 a par exemple permis de mettre en évidence des différences interindividuelles de l'activité de ce dernier chez les patients atteints de NAFLD (Orellana et al., 2006).

Il est néanmoins à noter que certaines études chez l'Homme et chez l'animal ont suggéré une implication des cytochromes de la famille des CYP3A et 1A dans le métabolisme de la chlorzoxazone (Gorski et al., 1997; Wiercinska & Squires, 2010). Il a alors été souligné par les auteurs l'importance de travailler avec des concentrations relativement élevées de chlorzoxazone afin de conserver une spécificité de mesure de l'activité du CYP2E1. En effet, les paramètres cinétiques de la réaction enzymatique (K_m et V_{max}) sont tout de même largement favorables au métabolisme de la chlorzoxazone par le CYP2E1 en comparaison aux autres CYPs.

C) Le paracétamol

Le paracétamol est un médicament métabolisé en partie par le CYP2E1. Le métabolisme du paracétamol sera spécifiquement discuté dans la partie 5.1.3.. Brièvement, en condition de dose thérapeutique (3g à 4g par jour) 90% à 95% du paracétamol est métabolisé par les enzymes de phase II (UGT [1A1 et 1A6], SULT [1E1, 1A1, 1A3, 1A4]) pour être éliminé sous forme de métabolites inactifs glucuronoconjugués ou sulfoconjugués dans la bile et les urines. Une petite partie du paracétamol (5% à 10%) est métabolisée par les cytochromes CYP2E1 et par le CYP3A4 et conduit à la formation du métabolite réactif N-acétyl-*para*-benzoquinone-imine (NAPQI) (Massart et al., 2021). Celui-ci est ensuite conjugué au glutathion pour générer du paracétamol-mercapturate, un métabolite inactif. Il est cependant à noter qu'un surdosage de paracétamol (>8-10g/j) entraîne une accumulation excessive de NAPQI intra-hépatique propice à la survenue d'une hépatotoxicité comme il sera discuté dans la partie 5.2. de ce manuscrit.

b) Substrats endogènes

Des molécules d'origine endogènes sont également métabolisées par le CYP2E1.

A) L'acétone

La plus importante des molécules endogènes métabolisées par le CYP2E1 est l'acétone. Ce corps cétonique est retrouvé en grande quantité dans le foie après une période de jeûne ou chez les patients diabétiques. Il peut être utilisé comme source d'énergie par le cerveau et les muscles lorsque l'organisme ne dispose plus d'apports suffisants en glucose comme discuté

dans la partie 1.1.3. Il a été montré *in vivo* que le CYP2E1 métabolisait 90% à 95% de l'acétone en acétol puis en méthylglyoxal. Ces deux métabolites sont des précurseurs du pyruvate et servent à la synthèse *de novo* de glucose (Kalapos, 2003). Dans cette même étude, il a été rapporté que les taux circulants d'acétone à jeun étaient 50 fois plus élevés chez des souris transgéniques *knock-out* CYP2E1 en comparaison au groupe de souris contrôles, démontrant le rôle déterminant du CYP2E1 dans le métabolisme de l'acétone (Bondoc et al., 1999).

B) Les acides gras

Certains acides gras font également partie des substrats endogènes du CYP2E1. Il a été montré *in vitro* que l'acide arachidonique (C20:4, ARA) représentait 78% des acides gras métabolisés par le CYP2E1 (Laethem et al., 1993). Son métabolisme aboutit à la formation d'acide 19- et 20- hydroeicosatetraénoïque (HETE) ainsi que d'acide epoxyeicosatriénoïque (EETs), respectivement par ω 1- et ω 2-hydroxylation (hydroxylation à partir du carbone le plus éloigné de l'extrémité carboxylique, appelé carbone ω). Dans le foie, le rôle de ces métabolites est assez peu caractérisé. Des études ont démontré que les HETEs et les EETs auraient des effets vasoconstricteurs (Sacerdoti et al., 2003). Ces propriétés leur confèreraient un rôle dans l'apparition de pathologies hépatiques en particulier la cirrhose. En effet, cette dernière est caractérisée par une hypertension portale, pouvant être consécutive en partie à l'action vasoconstrictrice des HETE et des EETs (Sacerdoti et al., 2003).

Dans une moindre mesure, d'autres acides gras sont également ω -hydroxylés par le CYP2E1, tels que les acides gras saturés C12 à C18 (Jimenez-Lopez & Cederbaum, 2005; Massart et al., 2022). Les métabolites ω -hydroxylés ainsi formés peuvent ensuite être oxydés dans le cytosol par l'ADH et l'ALDH pour former des acides dicarboxyliques (Fromenty & Pessayre, 1995). Ces derniers sont des métabolites toxiques puisqu'ils peuvent aboutir à une dysfonction mitochondriale. En effet, les acides dicarboxyliques issus des acides gras saturés ont la capacité d'engendrer un découplage de l'OXPHOS en favorisant l'inhibition de certaines enzymes mitochondriales (i.e. COX, NADH déshydrogénase) (Aubert et al., 2011; Fromenty & Pessayre, 1997). Ces altérations sont néfastes pour la cellule et peuvent impacter sa survie.

4.2.3. Facteurs impliqués dans la régulation du CYP2E1

Le CYP2E1 est un cytochrome inductible par certains de ses propres substrats. Cette induction conduit à une augmentation du métabolisme de ces derniers (Lu & Cederbaum, 2008). Cette observation a essentiellement été documentée pour l'alcool (Bardag-Gorce et al., 2006). Une augmentation de l'expression et/ou de l'activité du CYP2E1 a été aussi rapportée lors de certaines situations pathologiques comme l'obésité, le diabète ou la NAFLD. Comme discuté

ci-dessous, plusieurs facteurs caractéristiques de ces situations dysmétaboliques pourraient participer à l'induction du CYP2E1 (e.g. acides gras, résistance à l'insuline, hyperleptinémie...). A l'inverse, certaines situations pathologiques (e.g. inflammation aigue) et certains médicaments (e.g. chlorméthiazole, disulfiram) diminuent l'expression et/ou l'activité de ce cytochrome. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation du CYP2E1 sont différents en fonction des pathologies et des facteurs responsables de la modulation de l'expression et/ou activité du CYP2E1. Cette régulation peut survenir à différents niveaux : transcriptionnel, post-transcriptionnel ou post-traductionnel.

a) Mécanismes de régulations du CYP2E1

A) Régulation transcriptionnelle

L'expression du gène CYP2E1 chez l'Homme est majoritairement régulée au niveau transcriptionnel par les facteurs de transcription suivants : *Hepatocyte Nuclear Factor 1-α* (HNF-1α) (Ge et al., 2021), *Krüppel-Like Factor 15* (KLF15) (Han et al., 2019), *Activating Transcription Factor 4* (AFT4) (Wang et al., 2014), *Specifity Protein 1* (Sp1) (Jin et al., 2013) et par la voie wnt/β-caténine (Sekine et al., 2006). D'autres facteurs ont également été décrits en cas de condition pathologique. Lors d'un stress hyperosmotique, le *Tonicity-responsive Enhancer Binding Protein* (TonEBP) a en effet été décrit comme inducteur de l'expression du gène CYP2E1 (Ito et al., 2007). Le facteur NF-κB semble quant à lui être impliqué dans son induction au cours de situations inflammatoires (Lin et al., 2019).

B) Régulation post-transcriptionnelle

Des régulations post-transcriptionnelles ont également été rapportées concernant le CYP2E1. En effet, il a été décrit qu'une diminution des taux d'insuline entraînaient une augmentation de l'expression du gène CYP2E1, possiblement par une stabilisation de l'ARNm (Massart et al., 2021). Par conséquent, une élévation de l'expression du gène CYP2E1 est souvent observée dans un contexte d'insulinorésistance. Ce point sera discuté dans la partie b).

Le CYP2E1 peut également être régulé par certains *microARN* (miR). En effet, une étude sur 25 biopsies humaines a mis en évidence une diminution de l'expression du gène CYP2E1 par le miR-378 (Mohri et al., 2010). Il a également été montré *in vivo* et sur des biopsies humaines que le miR-122 pouvait aussi impacter négativement l'expression du gène CYP2E1 (Chowdhary et al., 2017). Une étude a permis de confirmer le rôle de ces miR sur modèle cellulaire HepaRG ainsi qu'en clinique sur des patients enfants après un surdosage en paracétamol. Dans cette étude, les auteurs ont en effet montré qu'une augmentation de ces miR

-378 et -122 lors d'un surdosage en paracétamol conduisait à une diminution de l'expression du gène CYP2E1 (Gill et al., 2017).

C) Régulation post-traductionnelle

Des régulations post-traductionnelles interviennent également et semblent représenter un mécanisme de régulation majeur du CYP2E1 étant donné que l'expression du gène CYP2E1 n'est pas systématiquement associée à une augmentation de l'expression de la protéine et/ou de l'activité de ce cytochrome. Parmi les mécanismes décrits pour la régulation post-traductionnelle, la phosphorylation de la serine 129 (ser129) est le mécanisme qui a été le plus étudié (Oesch-Bartlomowicz & Oesch, 2008). D'autres mécanismes impliquant des réactions d'ubiquitination (Wang et al., 2011) et de sumoylation (Tomasi et al., 2018) ont également été décrits. Ces régulations post-traductionnelles peuvent aboutir à une diminution de la dégradation protéasomale du CYP2E1 entraînant ainsi une augmentation de la protéine CYP2E1. Dans un contexte de diabète, l'augmentation des taux de corps cétoniques dont l'acétone entraîne par exemple une augmentation de l'expression protéique du CYP2E1 par des mécanismes de réduction de sa dégradation, possiblement par phosphorylation de la Ser¹²⁹ (Massart et al., 2021; Oesch-Bartlomowicz et al., 1998).

b) Facteurs de régulation du CYP2E1

Comme mentionné précédemment, l'expression et/ou l'activité du CYP2E1 peut être régulée par certains de ses propres substrats tels que l'éthanol ou l'acétone (Massart et al., 2022; Tomasi et al., 2018). Le CYP2E1 est également régulé lors de certaines conditions physiopathologiques (i.e. jeûne, obésité, NAFLD, diabète de type 2, inflammation aiguë) comme il sera détaillé dans cette partie.

A) Obésité et NAFLD

Plusieurs études chez l'Homme (Aljomah et al., 2015; Bell et al., 2010; Chalasani et al., 2003; Emery et al., 2003; Gade et al., 2018; Kohjima et al., 2007) et l'animal (Abdelmegeed et al., 2012; Begriche et al., 2008; Jian et al., 2017; Mantena et al., 2009; Osabe et al., 2008) ont rapporté une induction du CYP2E1 hépatique dans un contexte d'obésité et/ou de NAFLD. En fonction des études, l'induction était définie par une augmentation de l'expression (ARNm et/ou protéine) et/ou de l'activité du CYP2E1. De façon intéressante, une corrélation positive entre l'activité du CYP2E1 et le degré de sévérité de la NAFL a été observée chez l'Homme (Chtioui et al., 2007; Mitsuyoshi et al., 2009). De plus, une étude a même suggéré que l'activité du CYP2E1 pourrait être plus importante chez les patients obèses présentant une NASH comparativement à des patients obèses présentant une stéatose simple (Orellana et al., 2006). Il

est à noter que malgré ces nombreuses études cliniques rapportant une induction du CYP2E1 hépatique dans un contexte d'obésité/NAFLD, quelques études indiquent à l'inverse l'absence d'induction de ce cytochrome (Prompila et al., 2008) voire même une réduction (Fisher et al., 2009; Nakamuta et al., 2005) (**Annexe 1.1**). Ces différences pourraient être liées à des variabilités génétiques inter-individuelles, à des différences de corpulence des individus (e.g. surpoids, obésité modérée, sévère ou morbide) et/ou au stade d'avancement de la NAFLD. La présence d'une insulino-résistance peut aussi être responsable de ces différences dans l'expression et/ou l'activité du CYP2E1 comme il sera discuté ci-dessous dans le paragraphe B).

Chez l'animal, les études expérimentales rapportant une induction du CYP2E1 ont souvent été réalisées chez les rongeurs nourris avec une alimentation riche en lipides (**Annexe 1.2**). En effet, il a été montré que la consommation d'un régime hyperlipidique *ad libitum* augmentait l'expression et/ou l'activité du CYP2E1 dans divers modèles de rongeurs (souris et rats) (Abdelmegeed et al., 2012; Baumgardner et al., 2007; Begriche et al., 2008; Jian et al., 2017; Khemawoot et al., 2007; Mantena et al., 2009; Raucy et al., 1991; Wang et al., 2020). Dans ces études, l'obésité induite par le régime hyperlipidique était souvent associée à la présence d'une NAFLD. Il est cependant à noter que le type de régime utilisé et surtout la quantité de lipides dans le régime semblent jouer un rôle dans l'induction du CYP2E1. En effet, une étude de 2008 a mis en évidence une augmentation de l'expression du gène et de la protéine du CYP2E1 chez des rats nourris avec un régime HFD dont 65% de l'énergie était apportée sous forme de lipides tandis qu'aucune variation n'avait été mesurée chez les rats nourris par un régime HFD dont 24% de l'énergie était apportée sous forme de lipides (Osabe et al., 2008). Il est important de souligner que dans cette étude une NAFL avait été observée dans les deux groupes de rats (augmentation des triglycérides hépatiques). Une induction du CYP2E1 hépatique a été également rapportée dans des modèles murins d'obésité génétique. Une étude réalisée dans l'équipe sur des souris obèses *ob/ob* et *db/db* a notamment permis de rapporter une augmentation de l'expression et de l'activité du CYP2E1 dans le foie de souris *db/db* alors que celle-ci était inchangée chez les souris *ob/ob*, et ce malgré la présence d'une stéatose plus importante chez ces animaux (Aubert et al., 2012).. Il a alors été suggéré que l'induction du CYP2E1 hépatique serait davantage liée au type d'acides gras accumulés dans les hépatocytes plutôt qu'à leur abondance (Aubert et al., 2012). L'absence d'induction du CYP2E1 chez les souris *ob/ob* avait été déjà observée dans d'autres études (Dey & Cederbaum, 2007). Des études ont également été menées sur des modèles murins de NASH obtenus après la consommation

d'un régime MCD. Le développement d'une NASH a été observée chez ces animaux ainsi qu'une augmentation de l'expression du gène, de la protéine et de l'activité du CYP2E1 (Leclercq et al. 2007; Leclercq et al. 2000).

Bien que les mécanismes d'induction du CYP2E1 au cours de la NAFLD ne soient pas totalement élucidés, certaines études suggèrent donc un rôle direct de l'action de certains acides gras (Aubert et al., 2012; Michaut et al., 2016). En effet, des études sur modèles cellulaires hépatiques ont montré l'impact de certains acides gras sur l'expression et/ou l'activité du CYP2E1 (**Annexe 1.3**). Il a notamment été mis en évidence sur des cellules HepG2 et sur des hépatocytes primaires humains qu'un traitement en acide palmitique (C16:0) augmentait l'expression du transcript *CYP2E1* (Raucy et al., 2004). Il est cependant à noter que dans cette étude, l'activité du CYP2E1 n'avait pas été mesurée. D'autres études ont évalué l'impact d'un traitement en acide oléique (C18:1) sur l'expression et/ou l'activité du CYP2E1. Celui-ci n'impactait ni son expression, ni son activité (Aljomah et al., 2015; Mahli et al., 2015; Michaut et al., 2016). Certains acides gras seraient également capables de diminuer l'expression et/ou l'activité du CYP2E1. En effet, une étude de 2020 a mis en évidence une diminution de l'expression du transcript *CYP2E1* après un traitement en acide laurique (C12:0) sur des cellules HepG2. Les auteurs n'ont cependant pas étudié l'expression protéique et ni l'activité du CYP2E1 (Lua et al., 2020). Néanmoins, l'hétérogénéité des protocoles expérimentaux en termes de durée de traitement, de concentration en acides gras et de modèles cellulaires utilisés rendent l'interprétation des données plus complexes.

Au cours de l'obésité et de la NAFLD, les variations des concentrations circulantes de certaines adipokines comme la leptine et l'adiponectine pourraient aussi contribuer aux variations de l'expression et de l'activité CYP2E1. Une étude menée chez des souris *ob/ob* a montré que l'administration de leptine à ces animaux favorisait une augmentation de l'expression du gène, de la protéine ainsi que de l'activité du CYP2E1 indépendamment de la réduction de la prise alimentaire (Leclercq et al., 2000). Chez les patients obèses et/ou atteints de NAFLD, l'augmentation des taux circulants d'insuline et de leptine caractéristique de leur état respectif d'insulinorésistance et de leptinorésistance peut aussi contribuer à l'induction du CYP2E1 (Cobbina & Akhlaghi, 2017). L'impact de l'insuline et du diabète seront spécifiquement abordés dans le paragraphe suivant. L'adiponectine est également une adipokine pouvant jouer un rôle dans l'induction du CYP2E1. Chez des souris déficientes en adiponectine, une augmentation de l'expression de la protéine CYP2E1 a été rapportée en

comparaison à des souris non déficientes pour cette adipokine (souris sauvages *wild type*) (Kamada et al., 2007).

L'obésité et la NAFLD sont également étroitement liées au diabète de type 2 puisque 90% des personnes développant un diabète de type 2 sont en surpoids ou obèses (Fromenty & Roden, 2022; Pafili & Roden, 2021; Younossi, Golabi, et al., 2019). Le diabète de type 2 est une maladie métabolique chronique et évolutive. Il est à différencier du diabète de type 1 ou diabète insulino-dépendant, qui est une maladie auto-immune résultant de la combinaison de facteurs génétiques, épigénétiques et environnementaux (infection virale, toxique, stress...) et qui est caractérisé par un défaut majeur de la sécrétion d'insuline. Le diabète de type 2 est cependant la forme la plus répandue et représente plus de 90% des cas de diabètes (Galicia-Garcia et al., 2020). Sans prise en charge clinique, il se caractérise par un état d'hyperglycémie chronique résultant d'un défaut d'action de l'insuline dans les tissus cibles (foie, muscles squelettiques, tissu adipeux) auquel vient s'ajouter progressivement un déficit de la sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas.

La streptozotocine est un agent alkylant qui attaque spécifiquement les cellules β du pancréas et dont l'injection permet d'induire un diabète apparenté à un diabète de type 1 chez les animaux. La streptozotocine a ainsi notamment été utilisée au cours d'une investigations *in vivo* permettant de mettre en évidence une augmentation de l'activité du CYP2E1 chez des rats diabétiques (Baek et al., 2006). Ce résultat a également été montré au cours d'investigations menées chez l'Homme (Wang et al., 2003). Il est en revanche à noter que certaines études n'ont pas relevé de variations de l'activité du CYP2E1 au cours de ces situations pathologiques (Gravel et al., 2019; Wang et al., 2023). D'après les auteurs, ces résultats contradictoires pourraient être dûs à certains facteurs de confusion tels que des différences dans les comorbidités associées (obésité, NAFLD, alcoolisme), des caractéristiques démographiques (polymorphismes génétiques, disparités ethniques) ou encore la prise de médicaments modulateurs du CYP2E1. Plusieurs facteurs pourraient être responsables de cette induction du CYP2E1 chez les patients diabétiques (i.e. hypercétonémie, insulino-résistance, hyperglucagonémie) comme détaillé ci-après.

L'induction du CYP2E1 chez ces patients pourrait donc provenir d'une augmentation des taux circulants de corps cétoniques caractéristique aux patients atteints de diabètes de type 1 et de type 2 (Kolb et al., 2021; Laffel, 1999). Des études expérimentales *in vivo* et *in vitro* ont en effet montré une augmentation de l'expression protéique du CYP2E1 après un traitement par de l'acétone, du β -hydroxybutyrate et/ou de l'acétoacétate (Abdelmegeed et al., 2005; Song et

al., 1989). Ces augmentations ont essentiellement été rapportées au niveau protéique, suggérant des mécanismes de régulation post-transcriptionnel essentiellement par stabilisation de la protéine CYP2E1. Néanmoins, il a été suggéré *in vitro* que les corps cétoniques n'agissaient pas directement sur la régulation du CYP2E1 mais que leurs effets passaient davantage par une altération de la voie de signalisation à l'insuline (Novak & Woodcroft, 2000; Sangwung et al., 2020).

L'insulinorésistance qui précède la survenue du diabète de type 2 est caractérisée par une augmentation des concentrations circulantes d'insuline associées à un défaut de sensibilité à cette hormone. Une augmentation de l'activité du CYP2E1 a été rapportée chez des patients obèses présentant un diabète de type 2 (Lucas et al., 1998; Wang et al., 2003). Des études *in vitro* sur des hépatocytes de rats ont permis de montrer que l'insuline inhibait l'activité et l'expression du CYP2E1 en diminuant la transcription de l'ARNm (Kuzgun et al., 2020; Woodcroft et al., 2002; Woodcroft & Novak, 1999). Une étude récente du laboratoire a également permis de confirmer les effets de l'insuline sur la diminution de l'expression du CYP2E1 sur le modèle cellulaire HepaRG ainsi que sur des hépatocytes primaires humains (Michaut et al. 2016). Ces données suggèrent donc que l'hyperinsulinémie associée à l'insulinorésistance inhérente au diabète de type 2 contribue à l'induction du CYP2E1 (Liu et al., 2022; Massart et al., 2022).

L'hyperglucagonémie est aussi un facteur qui pourrait participer à l'induction du CYP2E1 lors d'un diabète de type 1 ou de type 2. Le glucagon est une hormone hyperglycémiante et a une action antagoniste à celle de l'insuline. Les patients atteints de diabètes de type 1 et de type 2 présentent généralement des taux de glucagon circulant à jeun plus élevés que les personnes saines (Junker et al., 2016; Pedersen et al., 2020). Contrairement à l'insuline, des investigations *in vitro* sur des hépatocytes de rat ont rapporté que le glucagon favorisait une augmentation de l'expression du gène *CYP2E1* consécutive à l'activation de la protéine kinase A (Woodcroft & Novak, 1999).

Ces données suggèrent que l'hyperglucagonémie caractéristique au diabète pourrait aussi contribuer à l'induction du CYP2E1 lors de diabète de type 1 et de type 2 (Liu et al., 2022; Massart et al., 2022).

B) Autres facteurs

Inflammation

Plusieurs investigations ont mis en évidence une diminution de l'expression et de l'activité de certains cytochromes dont le CYP2E1 en situation d'inflammation aiguë (Projean et al., 2005). Cet effet pourrait être lié à l'action des cytokines pro-inflammatoires comme le $\text{TNF}\alpha$, IL6 et IL1 β , dont la production peut être régulée par le facteur de transcription NF- κ B. En effet, des études *in vivo* et *in vitro* ont mis en évidence une diminution de la transcription du gène *CYP2E1* en réponse à ces cytokines pro-inflammatoires ainsi qu'à une augmentation de NF- κ B. Ces événements aboutissent à la diminution de l'expression du CYP2E1 hépatique (Abdel-razzak et al., 1993; Lin et al., 2019; Nakai et al., 2008). A l'inverse, une étude sur une lignée d'hépatome humain a mis en évidence que la cytokine anti-inflammatoire IL4 augmentait de manière significative l'expression du CYP2E1 *via* les facteurs de transcription *Signal transducer and activator of transcription 6* STAT6 (voie JAK-STAT) et *Nuclear factor activated T-cells* NFATc1 (voie IRS1/2) (Wang et al., 2010).

Médicaments

Certains médicaments sont également reconnus pour inhiber l'activité du CYP2E1. Le chlorméthiazole est un modulateur allostérique des récepteurs GABA, utilisé comme sédatif en clinique. Des études ont mis en évidence que le chlorméthiazole est un inhibiteur spécifique du CYP2E1 (Hohmann et al., 2022; Stresser et al., 2016). Dans le cadre d'investigations *in vitro*, ce médicament est souvent utilisé. Le disulfiram est un autre inhibiteur spécifique du CYP2E1 qui peut également être utilisé dans les études expérimentales. Il s'agit d'un inhibiteur de l'acétaldéhyde déshydrogénase, utilisé en clinique dans la prise en charge de la dépendance à l'alcool. Chez l'Homme, une inhibition de 95% de l'activité du CYP2E1 chez des patients traités au disulfiram a été mesurée lors d'une étude clinique (Frye et al., 1999).

4.3.4. Conséquences de l'induction du CYP2E1

L'ensemble de ces facteurs déclenchent la régulation du CYP2E1, par les divers mécanismes précédemment décrits. L'induction du CYP2E1 n'est néanmoins pas sans conséquence puisqu'elle a la particularité d'engendrer une production d'EROs. En effet, Le cycle catalytique du CYP2E1 est remarquable puisqu'il a la capacité de produire des quantités significatives d'EROs (Massart et al., 2022). Il a la particularité d'utiliser l' H^+ du NADPH pour réduire l' O_2 , aboutissant à la génération d'anions superoxydes et de peroxyde d'hydrogène. De manière intéressante, il a été démontré que le CYP2E1 a la capacité de générer des EROs même

en l'absence de substrat (Caro & Cederbaum, 2004; Mari & Cederbaum, 2000). Ce phénomène est en effet dû à l'activité NADPH oxydase des cytochromes, qui est particulièrement importante pour le CYP2E1 tout en étant indépendante des substrats utilisés par ce dernier (Abdelmegeed et al., 2017; Gonzalez, 2005).

Comme détaillé dans la partie 2.2.2., une surproduction d'EROs est délétère puisqu'elle favorise l'apparition d'une dysfonction mitochondriale ainsi que l'attaque des lipides insaturés par l'initiation d'une peroxydation lipidique. Ce phénomène aboutit à la formation de 4-HNE et de MDA, pouvant être des médiateurs de dommages cellulaires. Une surproduction d'EROs favorise également la production de cytokines pro-inflammatoires par les hépatocytes et ainsi le déclenchement d'une inflammation. Par ces mécanismes, l'induction du CYP2E1 pourrait jouer un rôle important dans l'aggravation de la NAFL en NASH.

V. Le paracétamol

5.1. Généralités

Le paracétamol (*para*-acétyl-aminophénol), ou *acetaminophen* en anglais a été introduit en clinique à partir de 1955. Il est utilisé comme antalgique (anti-douleur) et comme antipyrétique (anti-fièvre) et figure aujourd'hui parmi les médicaments les plus prescrits dans le monde. Le paracétamol a une structure dérivée de l'acétanilide (N-phényléthanamide), qui était également auparavant utilisée en clinique pour ses propriétés antalgiques et antipyrétiques (**Figure 20**). L'acétanilide a néanmoins été retirée du marché en raison de ses effets secondaires notables (méthémoglobinémie), laissant sa place au paracétamol dont les effets secondaires sont moins importants (essentiellement cutanés, hématologiques et gastrointestinaux).

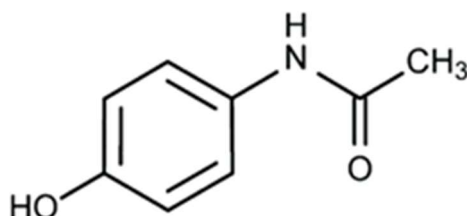


Figure 20 : Structure du paracétamol.

5.1.1. Pharmacologie

Les mécanismes d'action du paracétamol ne sont pas encore totalement élucidés. Deux hypothèses principales sont néanmoins avancées aujourd'hui.

La première hypothèse repose sur le fait que le paracétamol empêcherait la synthèse des prostaglandines pro-inflammatoires (PGE₂, PGI₂, PGF_{2α}) à partir de l'acide arachidonique en inhibant indirectement les enzymes cyclooxygénases COX1 et COX2 (Anderson, 2008). Les prostaglandines ont en effet une action de médiateur chimique contribuant notamment à la douleur liée à l'inflammation. Néanmoins, l'existence d'une COX3 sur laquelle agirait le paracétamol de manière directe est aujourd'hui soupçonnée. Celle-ci pourrait expliquer la faible activité anti-inflammatoire et les faibles effets indésirables que présente le paracétamol en comparaison aux anti-inflammatoires non stéroïdiens (e.g. ibuprofène, aspirine) (Botting & Ayoub, 2005; Chandrasekharan et al., 2002).

Une autre voie par laquelle le paracétamol exerce ses effets thérapeutiques est la voie conduisant à la production du dérivé *N-arachidonoylphénolamine* (AM404). Ce dérivé est produit dans le cerveau à partir de la conjugaison de l'aminophénol, métabolite provenant de la désacétylation hépatique du paracétamol (Högestätt et al., 2005). L'AM404 exerce ensuite ses effets antalgiques au niveau du cerveau en agissant sur les récepteurs cannabinoïdes CB1 et *transient receptor potential vanilloïde 1* (TRPV1), qui sont impliqués dans les voies de la douleur et de la thermorégulation (Ohashi & Kohno, 2020).

5.1.2. Posologie

La dose thérapeutique recommandée par 24 heures pour le paracétamol dépend du poids du patient (**Tableau 1**). Les recommandations pour les enfants et nourrissons de moins de 38 kgs sont de 60 mg/kg par jour en 4 prises. Pour les enfants et personnes dont le poids est compris entre 38 kgs et 50 kgs, une dose thérapeutique de 3 g en trois prises espacées de 6 heures est recommandée par 24 heures. Pour les adultes et enfants de plus de 50 kgs, la dose thérapeutique recommandée est 3 g par jour en 6 prises espacées de 4 heures est recommandée Enfin, la dose thérapeutique maximale est de 4 g par jour en 4 prises espacées de 6 heure.

Patient	Dose thérapeutique par 24 heures	Dose maximale par 24 heures
Enfants et nourrissons de moins de 38kgs	60mg/kg en 4 prises	80mg/kg
Enfants et adultes entre 38kgs et 50kgs	3g en 3 prises espacées de 6 heures	3g
Enfants et adultes de plus de 50kgs (à partir de 15 ans)	3 g en 6 prises espacées de 4 heures	4g en 4 prises espacées de 6 heures

Tableau 1: Recommandations pour la posologie du paracétamol, en France. Source : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM).

Les formes galéniques disponibles pour la prise du paracétamol sont le comprimé sec ou effervescent, la poudre en sachet ou en gélule, le stick, le sirop pédiatrique, le suppositoire ou la solution injectable par voie intraveineuse.

5.1.3. Métabolisme

Le paracétamol se distribue rapidement dans tous les tissus après absorption. Cependant, l'imprégnation du paracétamol dans le tissu adipeux est moindre du fait de la faible liposolubilité de ce médicament et de sa faible liaison aux protéines plasmatiques (Leise et al., 2014). Après absorption, le paracétamol est essentiellement métabolisé dans le foie (**Figure 21**). A dose thérapeutique (i.e. 3 g à 4 g par jour), 90% à 95% du paracétamol administré sera glucuronoconjugué (50% à 70%) par des glucotransférases (UGT 1A1 et 1A6) ou sulfoconjugué (SULT 1E1, 1A1, 1A3, 1A4) (25% à 35%) par des sulfotransférases (Achterbergh et al., 2022). Cette conjugaison de la molécule mère de paracétamol à un groupement glucuronide ou sulfate conduit à la production des métabolites polaires hydrosolubles paracétamol-glucuronide et paracétamol-sulfate qui seront éliminés par les urines.

Une fraction minime du paracétamol (5% à 10%) est métabolisée par les cytochromes, principalement le CYP2E1 et accessoirement par les isoformes CYP3A4 et CYP1A2. Ce métabolisme aboutit à la formation de NAPQI, un métabolite électrophile hautement réactif et toxique. Ce métabolite est conjugué au glutathion et conduit à la formation de nouveaux métabolites comme le paracétamol-glutathion, 3-cysteinyl-paracétamol (ou *APAP-cys* en anglais) puis paracétamol-mercapturate qui seront éliminés dans l'urine et la bile.

Bien que les deux voies décrites ci-dessus soient les plus importantes, d'autres voies mineures ont été décrites dans le foie et le cerveau. Au niveau hépatique, il a été rapporté la production de 3-hydroxyparacétamol et 3-méthoxyparacétamol par les CYPs. Ces métabolites non toxiques sont rapidement éliminés par glucurono- et sulfoconjugaison (Thareja et al., 2022). Dans le cerveau, une voie conduit à la production du métabolite AM404 comme mentionné précédemment. Ce métabolite est issu de la conjugaison de l'acide arachidonique avec le p-aminophénol, métabolite hépatique issu de la désacétylation du paracétamol sous l'action de la *Fatty Acid Amide Hydroxylase* (Högestätt et al., 2005).

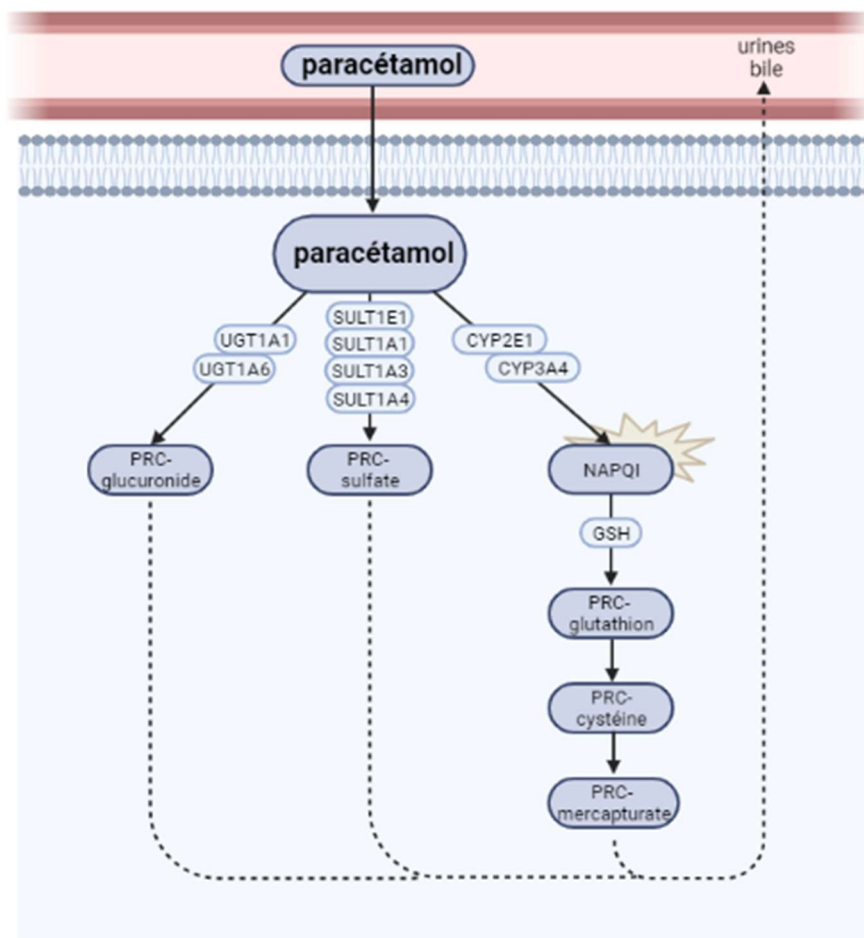


Figure 21 : Métabolisme du paracétamol. Adapté de (Achterbergh et al. 2022).

UGT = uridine-diphosphate-glucuronosyl transférases ; SULT = sulfotransférases ; CYP = cytochrome ; NAPQI = N-acétyl-*para*-benzoquinone-imine ; GSH = glutathion ; PRC = paracétamol.

5.2. Hépatotoxicité du paracétamol

Dans un contexte de surdosage, lorsque la prise de paracétamol excède 8 g à 10 g par jour, les voies de glucuronidation et surtout de sulfation sont saturées. Une fraction plus importante de paracétamol est alors dérivée vers la voie des cytochromes, donnant lieu à une production excessive de NAPQI qui sera à l'origine de la toxicité hépatique du paracétamol. A ce jour, l'intoxication au paracétamol est la première cause d'insuffisance hépatique dans de nombreux pays (Jaeschke et al., 2020b). Comme indiqué ci-dessous, plusieurs études ont été menées pour mieux comprendre les effets hépatotoxiques du paracétamol. Il a ainsi été montré que la production excessive de NAPQI à la suite d'une intoxication aigue au paracétamol favorisait la survenue d'un stress oxydant majeur, d'une dysfonction mitochondriale et d'une déplétion de l'ATP conduisant à la mort cellulaire des hépatocytes par nécrose (Ramachandran & Jaeschke, 2019a). Des travaux ont également rapporté que certaines conditions physiopathologiques (e.g. obésité, NAFLD) conduisant à une diminution de glutathion

pourraient favoriser l'hépatotoxicité du paracétamol (**Figure 22**) (Fernandez-Checa & Kaplowitz, 2005).

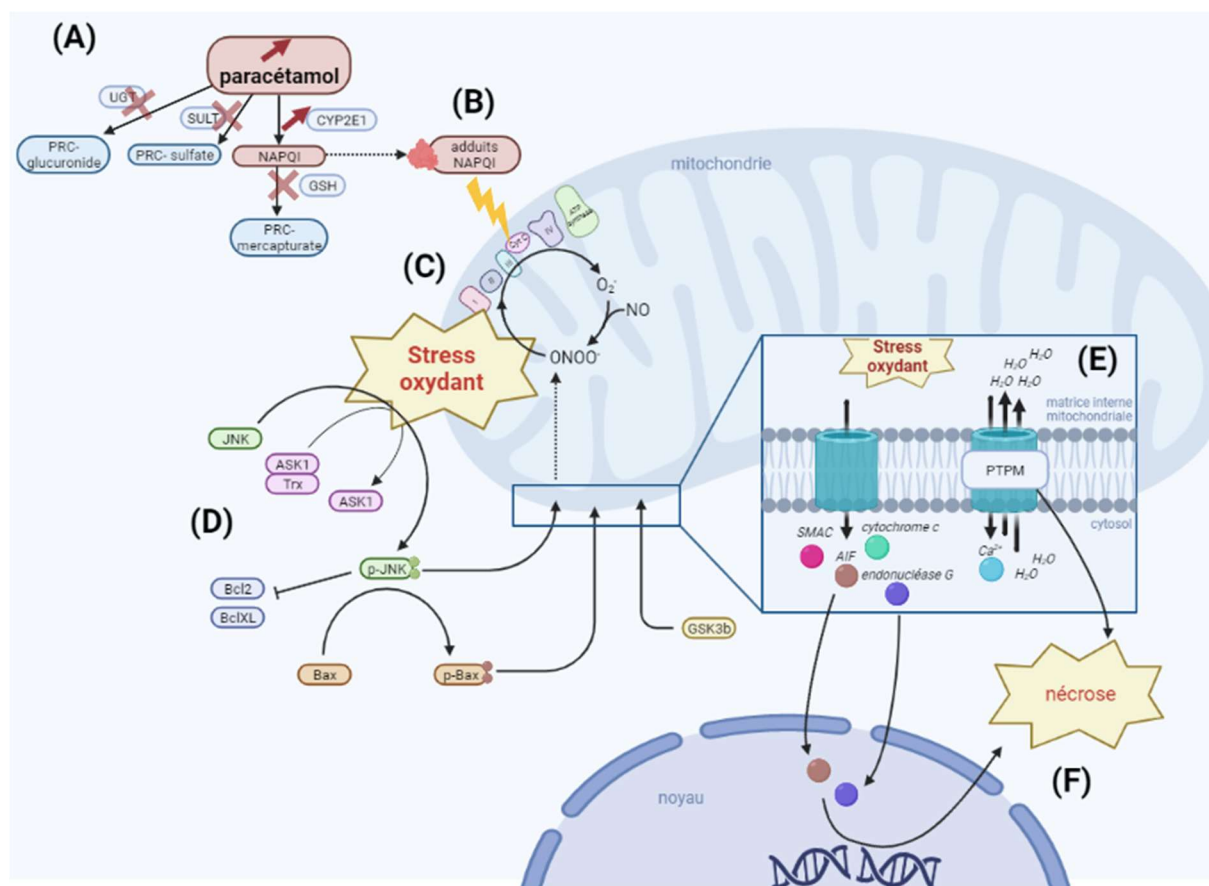


Figure 22 : Mécanismes d'hépatotoxicité du paracétamol observés lors d'un surdosage. Adapté de (Ramachandran & Jaeschke, 2019a)

Une saturation des systèmes uridine-diphosphate-glucuronosyl transférases (UGT) et sulfotransférases (SULT) aboutit à une augmentation de la proportion de paracétamol prise en charge par les cytochromes (CYPs). En cas de surdosage (>10g/j), une déplétion en glutathion entraîne une accumulation de N-acétyl-*para*-benzoquinone-imine (NAPQI) intra-hépatocytaire (A). Celui-ci est en grande partie responsable de l'hépatotoxicité du paracétamol (PRC). Une augmentation de la quantité de NAPQI favorise une déplétion en GSH et la formation d'adduits NAPQI-protéines (B). Ces adduits sont responsables d'un stress oxydant en favorisant une accumulation d'EROs. Ils entraînent également des dommages sur la chaîne respiratoire puisqu'ils ont la capacité d'altérer l'ADN mitochondrial (C). Ainsi, un cercle vicieux se met en place entre une dysfonction mitochondriale et une formation d'EROs. Le stress oxydant induit par un surdosage en paracétamol entraîne l'activation de *c-jun-N-terminal kinase* (JNK), dont la phosphorylation est dépendante du facteur *apoptosis signal-regulating kinase 1* (ASK1) et de l'oxydation des thiorédoxines 1 et 2 (Trx). La phosphorylation de JNK entraîne également l'inactivation des protéines anti-apoptotiques *B-cell lymphoma* (Bcl2 et Bcl-XL) et la phosphorylation de la protéine pro-apoptotique *Bcl2-associated X protein* (Bax) (D). La relocalisation du cytosol vers la mitochondrie de JNK phosphorylé (pJNK), Bax et de la *glycogène synthase kinase 3β* (GSK3β) aboutit à la formation de pores dans la membrane mitochondriale. Cet événement entraîne la sortie du cytochrome c, du *second mitochondrial activator of caspases* (SMAC), de l'endonucléase G ou encore l'*apoptosis-inducing factor* (AIF) via la relocalisation de Bax (E). L'ouverture du PTPM conduit à une entrée massive d'eau qui favorise la rupture de la membrane externe mitochondriale. L'ouverture du PTPM entraîne également la libération de calcium (Ca²⁺). La sortie de Ca²⁺ vers le cytosol favorise l'activation de protéases et d'endonucléases comme l'AIF et de l'endonucléase G. En migrant dans le noyau, l'AIF et l'endonucléase G participent à la fragmentation de l'ADN mitochondrial. La mort hépatocytaire par nécrose est alors observée (F).

5.2.1. Mécanismes d'hépatotoxicité

a) Phase d'initiation

A) Accumulation de NAPQI intra-hépatocytaire

Comme décrit précédemment, le métabolisme d'une petite partie du paracétamol (5% à 10%) est pris en charge par les cytochromes en particulier le CYP2E1. Le paracétamol métabolisé par le CYP2E1 conduit à la formation de NAPQI, un métabolite hautement réactif mais qui est rapidement éliminé par le glutathion comme discuté précédemment. En cas de surdosage au paracétamol (>8 g – 10 g par jour) et en raison de la saturation des systèmes UGT et SULT (Ramachandran & Jaeschke, 2019a), une plus forte proportion de paracétamol est alors métabolisée par les cytochromes (principalement le CYP2E1), ce qui conduit à une production excessive de NAPQI. Face à cette production importante de NAPQI, les stocks de GSH cellulaires ne sont pas suffisants pour permettre la détoxification du NAPQI par conjugaison. La production de NAPQI excédant les capacités de conjugaison et les stocks de GSH n'étant pas suffisamment restaurés, une déplétion importante ($\downarrow$ 90%) et rapide du GSH apparaît alors. Cette déplétion de GSH renforce l'accumulation de NAPQI (**Figure 22A**). Etant un métabolite électrophile et insatiable, le NAPQI se lie par des liaisons covalentes à des éléments nucléophiles de la cellule tels que les bases puriques et pyrimidiques de l'ADN et les groupements thiols des protéines formant ainsi des adduits (Leeming et al., 2015) (**Figure 22B**).

A) Formation d'adduits NAPQI-protéines

Plusieurs protéines cibles du NAPQI ont été identifiées à l'aide de techniques d'analyses chromatographiques comme la LC-MS/MS (Geib et al., 2021). Ainsi, il a été montré que le NAPQI était capable de se lier au résidu cystéine du glutathion, participant alors à sa déplétion observée après un surdosage en paracétamol (Ozawa et al., 2019). Il a également été montré que le NAPQI était capable de se fixer sur des protéines mitochondriales telles que la glutamate déshydrogenase, l'aldéhyde déshydrogenase, la carbamyl-phosphate synthétase-I et la sous-unité alpha de l'ATP synthétase (Geib et al., 2021). La fixation du NAPQI sur ces protéines entraîne leur inactivation et est responsable d'une inhibition de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale (Ramachandran & Jaeschke, 2019b).

b) Phase de propagation

La mitochondrie est la cible majeure pour l'hépatotoxicité du paracétamol puisque les adduits formés par le NAPQI ciblent essentiellement les protéines mitochondriales. Nous verrons dans cette partie que ces adduits-NAPQI favorisent l'initiation d'un stress cellulaire et

des altérations de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ces altérations sont ensuite amplifiées par l'activation de la voie *c-jun-N-terminal kinase* (JNK) et par l'ouverture du *Pore de Transition de Perméabilité Mitochondriale* (PTPM) conduisant à la mort hépatocytaire par nécrose (Ramachandran & Jaeschke, 2020).

A) Initiation des lésions mitochondriales et stress cellulaire

La formation d'adduits-NAPQI est aujourd'hui reconnue comme un élément critique concernant l'hépatotoxicité du paracétamol puisqu'elle participe à une altération de la chaîne respiratoire mitochondriale, comme décrit précédemment. Une surcharge en NAPQI entraîne également directement une déplétion de glutathion cytosolique et mitochondrial. Dans la mitochondrie, la déplétion en glutathion favorise l'accumulation d'EROs en raison de leur moindre élimination (Kalsi et al., 2011).

Ces EROs ont une action directe sur la mitochondrie. Il a en effet déjà été démontré que l'anion peroxynitrite (ONOO^-) issu de la réaction entre un anion superoxyde (O_2^-) et de l'oxyde d'azote (NO) entraînait des dommages au niveau de la chaîne respiratoire notamment par altération de l'ADN mitochondrial (Cover et al., 2005). L'anion peroxynitrite peut également endommager les membranes mitochondriales en initiant une peroxydation lipidique et en endommageant des protéines antioxydantes comme la MnSOD (Demicheli et al., 2018).

Ces altérations de la chaîne respiratoire mitochondriale entraînent une formation plus importante d'EROs *via* les complexes I et III (**Figure 22C**). Cela aboutit à un cercle vicieux entre la formation d'EROs et la dysfonction mitochondriale, comme discuté dans la partie 2.2.2.

B) Amplification de la dysfonction mitochondriale et activation des voies de stress

Activation de la voie *c-jun-N-terminal kinase* (JNK)

Le stress oxydant généré dans la mitochondrie par les EROs et les ONOO^- sont capables d'activer des voies de signalisation de stress cellulaire comme la voie JNK. L'activation de JNK par phosphorylation survient dans les 2 heures suivant l'intoxication au paracétamol puisqu'une augmentation de la phosphorylation des isoformes JNK1 et JNK2 a été rapportée (**Figure 22D**). L'activation de JNK peut être consécutive à l'action de l'*Apoptosis Signal-regulating Kinase 1* (ASK1) dont l'activation est dépendante de l'oxydation des thiorédoxines Trx1 et Trx2 par le stress oxydant. La *Mixed-Lineage Kinase 3* (MLK3) participe également à l'activation de JNK

par l'intermédiaire des *Mitogen-Activated Protein Kinase* MKK et MAPK2. Une étude *in vivo* a en effet montré une moindre phosphorylation de JNK et une moindre hépatotoxicité du paracétamol chez des souris transgéniques *knockout* MLK3 en comparaison à des souris *wild-type* (Sharma et al., 2012). Les EROs induisent également l'activation de la *Glycogène Synthase Kinase 3 β* (GSK3 β) qui est une kinase également impliquée dans l'induction de JNK (Shinohara et al., 2010).

L'activation de JNK entraîne une cascade de réaction aboutissant à des lésions cellulaires allant jusqu'à la mort de l'hépatocyte. En effet, JNK activé permet la phosphorylation des protéines anti-apoptotiques *B-cell Lymphoma* (Bcl2 et Bcl-XL) et conduisant ainsi à leur inactivation. L'activation de JNK entraîne également la phosphorylation de la protéine pro-apoptotique *Bcl2-Associated X protein* (Bax), qui devient alors active. L'activation de Bax entraîne sa relocalisation du cytosol vers la mitochondrie. Cette relocalisation cellulaire participe, en collaboration avec Bak, à la formation de pores dans la membrane externe mitochondriale (**Figure 22E**). Cet événement entraîne la libération dans le cytosol de protéines situées dans l'espace intermembranaire telles que le cytochrome c, le *Second Mitochondrial Activator of Caspases* (SMAC), l'endonucléase G ou encore l'*Apoptosis-Inducing Factor* (AIF). Le relargage du cytochrome c entraîne une importante dysfonction mitochondriale et la libération de AIF et de l'endonucléase G participent à la mort cellulaire en participant à la fragmentation de l'ADN nucléaire (**Figure 22F**) (Bajt et al., 2006).

Il est à noter que d'autres protéines que Bax peuvent également être relocalisées du cytosol vers la mitochondrie. C'est le cas pour la GSK3 β et phospho-JNK. La relocalisation de GSK3 β dans la mitochondrie favorise la dégradation de la protéine *Induced Myeloid Leukemia Cell Differentiation* (Mcl-1), qui est une protéine anti-apoptotique de la membrane mitochondriale externe (Shinohara et al., 2010). La relocalisation de phospho-JNK engendre quant à elle un stress oxydant puisqu'elle favorise la production d'EROs et de ONOO $^-$ (Hanawa et al., 2008; Saito et al., 2010). Cette augmentation du stress oxydant par JNK potentialise alors le stress oxydant déjà existant. De récentes études *in vivo* ont montré que les mécanismes impliqués dans cette génération d'EROs sont conséquents à la liaison de JNK avec la protéine membranaire mitochondriale *SH3 Domain-Binding Protein* (Sab, ou Sh3bp5), qui a une action directe sur la chaîne respiratoire mitochondriale (Win et al., 2011, 2016). En effet, Cette liaison entraîne en effet le relargage de la *Tyrosine Phosphatase Nonreceptor Type 6* (SHP1) par Sab, qui a une action inhibitrice sur la chaîne respiratoire mitochondriale (Win et al., 2016).

Ouverture du Pore de Transition de Perméabilité Mitochondriale (PTPM)

L'augmentation de la production d'EROs et de peroxynitrite favorise aussi l'ouverture du PTPM (**Figure 22E**). Celle-ci conduit ensuite à un découplage de la phosphorylation oxydative associé à une chute du potentiel de membrane puisque les protons initialement présents dans l'espace membranaire peuvent passer dans la matrice mitochondriale par le PTPM plutôt que par l'ATP synthase (Ramachandran & Jaeschke, 2019b). Ces événements conduisent à une déplétion en ATP et entraîne la mort des hépatocytes par nécrose (Masubuchi et al., 2005)

L'ouverture du PTPM engendre également un déséquilibre osmotique entre le cytosol et la matrice mitochondriale conduisant à une entrée massive d'eau dans la mitochondrie, entraînant la rupture de la membrane externe mitochondriale. Cette rupture aboutit à la libération de facteurs pro-apoptotiques tels que le cytochrome c. Une libération de calcium (Ca^{2+}) est également observée, entraînant l'augmentation de la concentration calcique dans le cytosol et favorisant l'activation de protéases et d'endonucléases. Des études chez la souris ont montré que l'inhibition de l'ouverture du PTPM par la cyclosporine A concordait avec une diminution de l'hépatotoxicité du paracétamol. En effet, les souris prétraitées à la cyclosporine A dans cette étude présentaient une moindre élévation de transaminases malgré la présence d'une déplétion en GSH (Haouzi et al. 2002; Masubuchi et al. 2005).

Bien que la mitochondrie soit centrale dans les mécanismes impliqués dans l'hépatotoxicité du paracétamol, quelques études ont soulevé l'implication d'autres facteurs comme le stress du reticulum endoplasmique (Hur et al., 2012; Uzi et al., 2013) et le rôle du supresseur de tumeur p53 dans la toxicité aigue de ce médicament (Huo et al., 2017).

C) Apoptose et nécrose

Les mécanismes de mort cellulaire associés à la toxicité du paracétamol ont fait l'objet de nombreuses discussions. De récentes publications ont suggéré une contribution importante de l'apoptose au cours de l'hépatotoxicité du paracétamol (Jaeschke et al., 2018). En effet, la mort cellulaire induite par le paracétamol comporte certaines caractéristiques de l'apoptose en raison de la translocation mitochondriale de la protéine pro-apoptotique Bax, de la libération du cytochrome c dans le cytosol, de l'activation de JNK et de la fragmentation de l'ADN. Il a également été démontré que la mort cellulaire induite par le paracétamol entraînait une positivité des noyaux par le test *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated dUTP Nick-end Labeling* TUNEL (test de détection de la fragmentation apoptotique de l'ADN). Pour l'ensemble de ces raisons, certains auteurs ont alors conclu que l'intoxication au paracétamol

entraînait une mort cellulaire par apoptose (Kon et al., 2007). Cependant, d'autres études ont pu mettre en évidence une profonde différence entre l'apoptose et la mort cellulaire induite par le paracétamol en raison de l'absence du compactage de la chromatine sous la membrane nucléaire, de la condensation du cytoplasme et de la fragmentation cellulaire en corps apoptotiques (Gujral et al., 2002). Au contraire, des lésions cellulaires caractéristiques de la nécrose ont été observées, telles que le gonflement des cellules avec rupture de leur membrane plasmique, la dégradation du noyau et la réponse inflammatoire (Jaeschke et al., 2018). De plus, certaines études ont montré que l'intoxication au paracétamol n'entraînait pas d'activation des caspases en particulier de la caspase 3 (Adams et al., 2001; Gujral et al., 2002; Lawson et al., 1999). Il est à souligner que ces observations sur l'impact des caspases sont néanmoins différentes en fonction des études (Jaeschke & Ramachandran, 2020b).

Ces arguments supportent le fait que la mort cellulaire induite par le paracétamol s'effectuerait essentiellement par nécrose. Cette dernière est aujourd'hui reconnue comme le type de mort majeure au cours de l'hépatotoxicité du paracétamol, chez l'animal et chez l'Homme (Jaeschke et al., 2018).

5.2.2. Prise en charge médicale

La majorité des intoxications au paracétamol sont volontaires puisqu'il s'agit d'un médicament souvent utilisé lors de tentatives de suicide (Chiew & Buckley, 2021). Néanmoins, un quart des intoxications au paracétamol sont d'origine involontaires. Celles-ci peuvent être causées par des prises répétées de doses supra-thérapeutiques de paracétamol souvent favorisées par la présence de paracétamol dans plusieurs spécialités médicamenteuses vendues sur le marché (Doliprane®, Efferalgan®, Dafalgan®, Fervex®, Actifed®...).

Les symptômes et la toxicité d'un surdosage au paracétamol sont variables selon la dose ingérée. La dose toxique est estimée à 135 mg/kg chez l'enfant et entre 8 et 10g par jour chez l'adulte.

a) Symptômes

L'intoxication au paracétamol est généralement divisée en 4 stades cliniques. Le premier stade est caractérisé par des nausées, des vomissements et des douleurs abdominales dans la partie supérieure droite de l'abdomen. Il a lieu dans les premières heures après ingestion et le taux de transaminases plasmatiques est communément normal chez ces patients. Ce premier stade peut néanmoins être asymptomatique notamment chez les patients ayant ingéré une dose potentiellement mortelle de paracétamol (Fisher & Curry, 2019). Le deuxième stade

d'intoxication au paracétamol est marqué par une élévation de transaminases dans les 24 heures suivant la prise. Un pic de transaminases est généralement marqué au cours d'un troisième stade, qui marque également un pic de cytolysé hépatique ayant lieu dans les 3 à 4 jours suivant l'ingestion. Enfin, le quatrième stade marque la guérison puisque le taux de transaminases diminue, jusqu'à retourner à un niveau basal à 14 jours.

b) Diagnostic clinique

Le diagnostic clinique d'une intoxication au paracétamol repose sur plusieurs critères. Premièrement, il convient d'estimer la dose de paracétamol ingérée par le patient ainsi que l'heure de la prise, basées sur un interrogatoire du patient.

La paracétamolémie (concentration de paracétamol dans le sang) peut ensuite être évaluée. Son interprétation ainsi que le risque de lésions hépatiques peuvent être prédits par l'utilisation du nomogramme de Rumack-Matthew. Néanmoins, ce dernier ne peut être utilisé qu'après un surdosage aigu au paracétamol, entre 4 heures et 24 heures suivant la prise. Il ne prend également pas en compte certains facteurs individuels comme les variations métaboliques, la pré-existence de lésions hépatiques ou encore la prise concomitante d'autres médicaments (Fisher & Curry, 2019; Rumack & Matthew, 1975).

Enfin, la demi-vie du paracétamol dans le plasma peut être évaluée chez les patients afin de prédire une éventuelle hépatotoxicité. Une étude menée sur 112 patients a en effet mis en évidence qu'une demi-vie du paracétamol supérieure à 5,5 heures avaient 91% de risque de progresser vers une hépatotoxicité, contre 74% de risque si la demi-vie était inférieure à cette valeur (Schiodt et al., 2002).

c) Traitements

A l'heure actuelle, la Food and Drug Administration (FDA) recommande une administration par voie orale ou intraveineuse de *N*-acétyl-cystéine (NAC) comme option thérapeutique de référence et de 1^{ère} intention chez les patients présentant une intoxication au paracétamol. En effet, après la compréhension des mécanismes d'hépatotoxicité du paracétamol impliquant la déplétion de glutathion, l'utilisation de la NAC s'est rapidement imposée en raison de son efficacité. Concernant son mécanisme d'action, la NAC n'agit pas directement sur le NAPQI mais participe à la restauration du glutathion mitochondrial par l'apport de cystéine, qui est un acide aminé limitant lors de sa synthèse. La NAC prévient ainsi la formation d'adduits-NAPQI et améliore l'élimination des EROs, limitant alors les effets toxiques précédemment décrits qu'ils entraînent (Jaeschke et al., 2020a). La NAC est ainsi plus efficace

si elle est administrée rapidement, dans les 10 premières heures suivant l'ingestion du paracétamol. Néanmoins, l'utilisation de la NAC comporte des limites puisque des effets secondaires ont été rapportés, tels que des vomissements, des nausées, voire des réactions anaphylactiques après administration (Pakravan et al., 2008). De plus, l'action de la NAC semble insuffisante chez les patients en surdosage très important de paracétamol. Une initiation trop tardive du traitement à la NAC est en effet la principale cause d'insuffisance hépatique et de décès après un surdosage de paracétamol puisque les lésions engendrées sont déjà trop importantes. Il semble donc important aujourd'hui de proposer des alternatives thérapeutiques à l'étude. Parmi celles-ci, l'utilisation de 4-méthylpyrazole, de calmagofodipir ou de metformine ont été proposés (Jaeschke et al., 2020b).

5.3. Facteurs de susceptibilité à l'hépatotoxicité du paracétamol

Plusieurs conditions physiologiques ou pathologiques entraînent une susceptibilité plus importante à l'hépatotoxicité du paracétamol. L'obésité et la NAFLD, l'alcool, ainsi que le jeûne prolongé en sont les principales. Dans la plupart du temps, l'induction du CYP2E1 et la déplétion de glutathion semblent jouer un rôle important dans l'augmentation de cette susceptibilité, comme il sera détaillé ci-dessous.

5.3.1. Obésité et NAFLD

Plusieurs études cliniques ont déjà montré que l'obésité et la NAFLD constituaient un facteur de susceptibilité important à l'hépatotoxicité du paracétamol (Myers & Shaheen, 2009; Nguyen et al., 2008). En effet, dans ces études les patients obèses en hospitalisation à la suite d'un surdosage de paracétamol présentaient 4 à 7 fois plus de risque de développer une intoxication au paracétamol (Begrache et al., 2023). De façon intéressante, des études cliniques ont aussi rapporté une hépatotoxicité du paracétamol dans un contexte de doses thérapeutiques (Louvet et al., 2021; Watkins et al., 2006). La prise de ce médicament peut en effet s'avérer régulière chez les personnes obèses en raison des nombreux troubles que cette maladie entraîne. De ce fait, l'induction d'une cytolysé hépatique a été observée chez des patients obèses ayant une consommation chronique de paracétamol (Borlak et al., 2013; Louvet et al., 2021). Dans certains cas, quelques études ont même observé des dommages hépatiques plus sévères comme l'apparition d'une hépatite ou d'une cirrhose (Biour et al., 2004; Watelet et al., 2007; Yaghi & Assaf, 2017). Malgré ces études rapportant une susceptibilité plus importante des patients obèses et/ou atteints de NAFLD à la toxicité hépatique du paracétamol, d'autres études montrent à l'inverse que l'hépatotoxicité de ce médicament était soit inchangée ou même diminuée dans un contexte d'obésité/NAFLD (Radosevich et al., 2016; Rutherford et al. 2006).

Dans ces études, ces différences de sensibilité à la toxicité hépatique du paracétamol pourraient essentiellement être expliquées par le degré de stéatose et d'obésité de ces patients (Rutherford et al., 2006).

Des investigations *in vivo* ont également étudié l'effet d'une intoxication aiguë au paracétamol dans des différents modèles murins d'obésité et/ou de NAFLD (Aubert et al., 2011; Blouin et al., 1977; Ito et al., 2006). Plusieurs d'entre elles ont rapporté que la présence d'une NAFLD induisait des lésions plus sévères (i.e. augmentation des transminases et des cytokines pro-inflammatoires, lésions à l'histologie) après une intoxication aiguë au paracétamol (Aubert et al., 2008; Kučera et al., 2012). Une hépatotoxicité plus importante du paracétamol a également été observée chez des animaux soumis à un régime MCD. Cependant, il est important de noter que ce modèle ne peut pas être directement comparé aux autres modèles de NAFLD car ces animaux ne présentent pas d'obésité, comme discuté précédemment (Leclercq et al., 2007).

Ces études expérimentales chez l'animal ont permis d'identifier quelques facteurs pouvant expliquer cette sensibilité accrue au paracétamol chez les personnes obèses ou atteintes de NAFLD.

a) Rôle de l'induction du CYP2E1

Comme décrit dans la partie 4.2.3., l'obésité et la NAFLD sont souvent associées à une induction du CYP2E1 (Aljomah et al., 2015; Chalasani et al., 2003; Emery et al., 2003; Kohjima et al., 2007). Or, il a été montré que celui-ci était impliqué dans l'hépatotoxicité du paracétamol en cas de surdosage ou à dose thérapeutique dans plusieurs études cliniques et expérimentales (Louvet et al., 2021; Michaut et al., 2014). En effet, l'induction du CYP2E1 consécutive à l'obésité entraîne une production plus importante de NAPQI ainsi qu'une déplétion en glutathion, aboutissant à des lésions hépatiques sévères telles que décrites dans la partie 5.2.1. Une étude clinique a en effet mis en évidence une cytolyse associée à une activité du CYP2E1 plus importante chez des patients obèses après l'administration de 4 g à 5 g de paracétamol en comparaison avec des personnes ayant un *Indice de Masse Corporelle* (IMC) normal (Van Rongen et al., 2016). Une étude a également montré sur des souris *ob/ob* et *db/db* que l'induction du CYP2E1 était plus néfaste que le degré de stéatose sur l'hépatotoxicité aiguë du paracétamol, (Aubert et al., 2012). Il est à noter que dans cette étude, les concentrations plasmatiques des métabolites paracétamol-glucuronide et paracétamol-sulfate étaient similaires

entre les souris *ob/ob* et les souris *db/db*, écartant l'hypothèse d'une différence de glucuronidation ou de sulfatation après une intoxication au paracétamol. L'hypothèse d'une accumulation de certaines espèces lipidiques toxiques (i.e. acides gras et cholestérol libres, céramides) dans les gouttelettes lipidiques ne peut cependant pas être écartée puisque la composition lipidique peut contribuer à l'hépatotoxicité induite par le paracétamol (Svegliati-Baroni et al., 2019).

La souche de souris est donc aussi déterminante pour dans le cadre de l'hépatotoxicité du paracétamol puisque d'autres études *in vivo* avaient déjà rapporté une moindre toxicité de ce médicament chez les souris *ob/ob* en comparaison avec des souris *wild type*. Dans ces études, ces résultats pourraient être expliqués par aucune induction voire par même une diminution de l'activité du CYP2E1 chez ces souris obèses (Enriquez et al., 1999; Ito et al., 2006).

b) Diminution des taux de glutathion

Comme décrit dans la partie II de cette thèse, la NAFLD est associée à un stress oxydant. Celui-ci peut provenir d'un déséquilibre entre la production d'EROs et leur prise en charge par les systèmes antioxydants. De ce fait, des niveaux bas ou insuffisants de glutathion peuvent favoriser une sensibilité accrue à l'hépatotoxicité du paracétamol. Il a en effet été mis en évidence une diminution significative du niveau basal de glutathion chez les personnes obèses ou atteintes de NAFLD (Hardwick et al., 2010; Videla et al., 2004), pouvant être conséquente à la surproduction d'EROs et à la dysfonction mitochondriale présente au cours de cette maladie, comme exposé dans la partie 2.2.2. (Begrache et al., 2013; Fromenty & Roden, 2022). Par conséquent, la sensibilité au paracétamol accrue observée chez les patients obèses ou atteints de NAFLD pourrait en partie être liée à un stress oxydant plus important chez ces individus. Néanmoins, il est important de souligner que seules les concentrations de glutathion totales ont été mesurées dans la plupart de ces études. Il serait ainsi important de mesurer le glutathion mitochondrial puisque des études ont mis en évidence un rôle clé du glutathion mitochondrial dans l'hépatotoxicité du paracétamol. En effet, celui-ci a un rôle critique dans le métabolisme des EROs générés par la chaîne respiratoire mitochondriale, qui pour rappel est la source majeure d'EROs cellulaire. Une déplétion de glutathion mitochondrial compromet ainsi la fonction mitochondriale et participe donc à l'hépatotoxicité induite par le paracétamol (Fernandez-Checa & Kaplowitz, 2005).

c) Dysfonction mitochondriale

Les atteintes mitochondriales sont importantes lors de la prise de paracétamol, comme exposé dans la partie 5.2.1. Ainsi, une dysfonction mitochondriale associée au stress oxydant précédemment décrit peut être un évènement critique et potentialisant la toxicité mitochondriale induite par le paracétamol. Cette dysfonction mitochondriale observée chez les patients obèses ou atteints de NAFLD pourrait alors contribuer en partie à une hépatotoxicité accrue au paracétamol (Chrøis et al., 2019). Néanmoins, peu d'études sont actuellement disponibles pour confirmer cette hypothèse.

d) Inflammation lobulaire

Au cours des maladies hépatiques d'origine dysmétaboliques, l'inflammation lobulaire est caractéristique de la NASH et est causée par une surproduction de cytokines pro-inflammatoires (i.e. $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$, IL6) (Kazankov et al., 2019). Outre leur rôle dans l'induction du CYP2E1 (voir partie 4.2.2.), ces cytokines pourraient sensibiliser le foie à la toxicité induite par le paracétamol (Begrache et al., 2023). En effet, la nécrose entraînée par le paracétamol conduit à la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages, aboutissant à une inflammation (Jaeschke & Ramachandran, 2020a). Une inflammation déjà présente chez les patients atteints de NASH pourrait alors potentialiser celle entraînée par le paracétamol. Cette exacerbation a notamment été montrée sur un modèle de souris $\text{Nlrp6}^{-/-}$ présentant une dysbiose intestinale associée à une inflammation augmentée (Schneider et al., 2021).

e) Activation de JNK

Enfin, une activation de JNK entraînant des lésions cellulaires allant jusqu'à la mort cellulaire par apoptose ou par nécrose a été mise en évidence au cours de la NAFLD (voir partie 5.2.1). Une étude *in vivo* a observé une activation de JNK après une intoxication au paracétamol plus forte chez les souris obèses en comparaison avec les souris contrôles (Kon et al., 2010). Ces résultats suggèrent une implication de cette voie dans la susceptibilité accrue des personnes obèses à l'hépatotoxicité du paracétamol. Néanmoins, aucune corrélation entre l'activation de JNK et une toxicité accrue au paracétamol n'avait été mesurée dans une autre étude *in vivo* (Aubert et al., 2012). Des études complémentaires seront donc nécessaires pour mettre en évidence l'implication ou non de JNK dans la sensibilité accrue à un surdosage de paracétamol des personnes obèses.

L'obésité et la NAFLD représentent donc des facteurs de susceptibilité importants pour l'hépatotoxicité du paracétamol. Cette toxicité accrue a été démontrée en cas de surdosage mais également dans un contexte de dose thérapeutique, suggérant alors d'appliquer une vigilance particulière quant à la consommation de paracétamol chez ces patients.

5.3.2. Alcool

L'alcool pourrait aussi représenter un facteur de susceptibilité important au paracétamol. En effet, la prise d'alcool entraîne une augmentation de l'activité du CYP2E1, probablement par une diminution de la dégradation protéasomale de cette protéine (Gonzalez, 2005). Ainsi, davantage de paracétamol est pris en charge par le CYP2E1 notamment lors d'un surdosage, entraînant une formation plus importante de NAPQI. La prise d'alcool entraîne également une déplétion des stocks de glutathion intra-hépatocytaires, probablement par un stress oxydant induit par l'alcoolisation et/ou par la malnutrition fréquemment observée au cours de cette situation physio-pathologique (Labbe et al., 2008). Il est cependant à noter que la prise d'alcool chronique semble plus délétère que la prise d'alcool aiguë. En effet, le métabolisme de l'alcool par le CYP2E1 entre en compétition avec celui du paracétamol (Guengerich, 2020). Lors d'une prise aiguë d'alcool et de paracétamol concomitantes, une part moins importante de NAPQI est formée puisque le CYP2E1 participe également au métabolisme de l'alcool (Sato & Lieber, 1981; Waring et al., 2008).

5.3.3. Jeûne prolongé et dénutrition

Un jeûne prolongé ainsi qu'un état de dénutrition peuvent également augmenter le risque d'hépatotoxicité du paracétamol.

Le jeûne entraîne une diminution du rapport insuline/glucagon et une augmentation de la cétogenèse comme détaillé dans la première partie de cette introduction. Les corps cétoniques ainsi produits peuvent alors être à l'origine d'une augmentation de l'expression du CYP2E1, comme décrit dans la partie 4.2.3. (Chalasani et al., 2003). Il est à noter qu'une altération du métabolisme du paracétamol a également été observée lors d'un jeûne. En effet, une étude menée sur des rats Sprague-Dawley a mis en évidence une augmentation de son excrétion sous forme glucuroconjuguée (35% vs 12%) et une diminution de sa forme sulfoconjuguée (41% vs 70%), en comparaison à des rats contrôles nourris (Jung, 1985). Ces données suggèrent qu'une

part plus importante de NAPQI pourrait être métabolisée par le CYP2E1 lors d'un surdosage en paracétamol effectué pendant un jeûne prolongé ou dans un état de dénutrition.

Le jeûne altère également les stocks intra-hépatocytaires de glutathion. En effet, une réduction des stocks de glutathion est observée lors du jeûne (Pessayre et al., 1980). De plus, il est important de souligner que le glutathion est un tripeptide constitué d'acide glutamique, de cystéine et de glycine. Une déprivation de protéines alimentaires sources de ces acides aminés essentiels à la synthèse de glutathion entraîne alors un appauvrissement des stocks de celui-ci (Claridge et al., 2010).

Ainsi, une augmentation de l'expression du CYP2E1 et une diminution des stocks de glutathion pourraient potentialiser l'hépatotoxicité du paracétamol en cas de jeûne prolongé ou de dénutrition.

OBJECTIFS DE L'ETUDE

La NAFL est une maladie hépatique caractérisée par une accumulation excessive de triglycérides dans le foie et touche aujourd'hui un quart de la population mondiale. Bien que souvent bénigne, la NAFL peut progressivement évoluer chez certains sujets vers une NASH pouvant elle-même être à l'origine d'une cirrhose voire d'un CHC. Une meilleure compréhension des mécanismes d'aggravation de la NAFL vers la NASH représente donc un enjeu majeur de santé publique. Plusieurs études ont mis en évidence que le CYP2E1 pourrait être impliqué dans ces mécanismes d'aggravation (Aljomah et al., 2015; Begriche et al., 2008; Harjumäki et al., 2021). L'induction du CYP2E1 a en effet pour particularité de générer des EROs qui sont sources d'un stress oxydant propice à l'aggravation de la NAFL en NASH. Parmi les facteurs métaboliques susceptibles d'activer le CYP2E1, des études ont rapporté le rôle de certains acides gras dans l'induction de ce cytochrome (Jimenez-Lopez & Cederbaum, 2005; Laethem et al., 1993; Massart et al., 2022).

Outre son rôle potentiel dans l'aggravation de la NAFL en NASH, le CYP2E1 est impliqué dans le métabolisme de certains médicaments dont le paracétamol (McGill & Jaeschke, 2013). Lorsqu'il est administré à des doses thérapeutiques (3g - 4 g par jour), la majeure partie du paracétamol (>90%) est métabolisée dans le foie par des enzymes de phase II (i.e. SULT, UGT) pour être éliminé sous forme de dérivés conjugués glucuronides et sulfate par les urines et la bile. Une faible partie du paracétamol (5% à 10% environ) est métabolisée par le CYP2E1 en NAPQI, qui est un métabolite hautement réactif. Celui-ci est ensuite conjugué au glutathion pour être à son tour éliminé sous forme d'acide mercapturique non toxique. Toutefois, en cas de surdosage (>10g par jour), une formation plus importante de NAPQI est générée et le stock de glutathion cellulaire est insuffisant pour son élimination. Cette accumulation de NAPQI intra-hépatique ainsi que la formation d'adduits-NAPQI aux protéines sont les points de départ d'une hépatotoxicité du paracétamol (Aubert et al., 2012; Louvet et al., 2021; Michaut et al., 2016). Ainsi, le paracétamol pourrait être plus toxique dans un contexte de NAFL et d'obésité en raison de l'induction du CYP2E1 inhérente à ces situations physiopathologiques.

Plusieurs travaux ont déjà été menés au laboratoire sur le CYP2E1 et le paracétamol. Une étude *in vivo* de 2012 a permis de mettre en évidence sur des souris génétiquement obèses *ob/ob* et *db/db* que l'hépatotoxicité aigue du paracétamol était davantage liée à une induction du CYP2E1 hépatique qu'au degré de stéatose (Aubert et al., 2012). En effet, des lésions hépatiques (i.e. transaminases, atteintes histologiques, analyse TUNEL) plus importantes liées à une intoxication au paracétamol ont été observées chez des souris *db/db* par rapport à des

souris *ob/ob*, malgré un degré de stéatose moins élevé chez les souris *db/db*. Cette hépatotoxicité accrue était toutefois corrélée à une plus forte induction du CYP2E1 chez les souris *db/db*.

Par la suite, des investigations sur un modèle *in vitro* de NAFLD ont été réalisées. Pour cela, des cellules HepaRG différenciées ont été traitées pendant une semaine par 100µM d'acide stéarique (SA, C18:0) ou oléique (OA, C18:1). Dans cette étude, la toxicité du paracétamol était plus importante lorsque les cellules HepaRG étaient supplémentées par l'acide gras SA. De façon intéressante, seul cet acide gras favorisait l'induction du CYP2E1. Les cellules HepaRG incubées avec de l'OA ne présentaient en effet pas d'augmentation de la toxicité du paracétamol, probablement lié au fait qu'aucune différence d'activité du CYP2E1 n'avait été relevée après un traitement en acide gras OA (Michaut et al., 2016).

Dans ce contexte et étant donné le rôle du CYP2E1 hépatique dans la physiopathologie de la NAFLD et dans l'hépatotoxicité du paracétamol, ce travail de recherche a eu plusieurs objectifs :

- 1) Le premier objectif a été d'identifier les acides gras capables de réguler positivement l'expression et/ou l'activité du CYP2E1 hépatique dans le modèle cellulaire HepaRG. Après identification de ces acides gras, leurs effets sur le métabolisme lipidique hépatique ont été étudiés.**
- 2) Le second axe de travail de cette thèse a été d'évaluer l'impact des acides gras inducteurs du CYP2E1 sur l'hépatotoxicité aiguë du paracétamol, ainsi que d'étudier les éventuels mécanismes de toxicité sous-jacents.**

RESULTATS

Au vu de quelques études expérimentales rapportant les effets de certains acides gras sur l'induction du CYP2E1 hépatique, mon travail de thèse a d'abord consisté à identifier d'autres acides gras inducteurs du CYP2E1 et d'évaluer l'impact de ces acides gras sur le métabolisme lipidique hépatique. Puis, nous avons cherché à déterminer si l'induction du CYP2E1 par ces nouveaux acides gras était associée à une toxicité aiguë plus importante du paracétamol. Pour répondre à ces deux objectifs, nous avons mené des investigations *in vitro* sur la lignée cellulaire HepaRG.

Dans le cadre de notre étude, les cellules HepaRG différenciées ont été traitées pendant une semaine avec 9 acides gras différant entre eux par leur longueur de chaîne carbonée et par leur degré d'insaturation. Ils correspondent à des acides gras les plus couramment retrouvés dans l'alimentation. Les acides gras sélectionnés pour notre étude étaient l'acide laurique (C12:0 ou LAU), l'acide palmitique (C16:0 ou PA), l'acide stéarique (C18:0 ou SA), l'acide oléique (C18:1 ou OA), l'acide linoléique (C18:2 ou LA), l'acide α -linoléique (18:3 ou ALA), l'acide arachidonique (C20:4 ou ARA), l'acide eicosapentaénoïque (C20:5 ou EPA) et l'acide docosahexaénoïque (C22:6 ou DHA). Avant de déterminer l'impact de ces différents acides gras sur l'activité du CYP2E1 dans les cellules HepaRG, des investigations préliminaires avaient été d'abord réalisées afin de définir les concentrations de traitement non cytotoxiques pour chacun de ces acides gras. Grâce à une large gamme de concentrations allant de 10 μ M à 400 μ M, nous avons pu ainsi déterminer que la concentration de 150 μ M était une concentration optimale non-cytotoxique pour le traitement des acides gras suivants : LAU, PA, SA, OA, LA et ALA. Pour les acides polyinsaturés à plus longue chaîne, à savoir ARA, EPA et DHA, la concentration non-cytotoxique sélectionnée était de 25 μ M. Il est à noter que ces deux concentrations utilisées pour le traitement des cellules HepaRG se situent dans la moyenne des concentrations circulantes physiologiques de la plupart des acides gras non estérifiés (Kangani et al., 2008; Puri et al., 2009). Pour répondre au deuxième objectif de notre étude, les cellules HepaRG supplémentées ou non par les acides gras inducteurs du CYP2E1 ont été traitées ou non par 10 mM ou 20 mM de paracétamol lors des dernières 24 h ou 48 h de traitement.

Les résultats de ce travail sont présentés sous la forme d'un article scientifique rédigé en anglais qui sera soumis pour publication dans les prochaines semaines.

Les principaux résultats obtenus sont présentés ci-dessous et seront plus largement discutés dans un chapitre dédié.

Principaux résultats obtenus

► Après une semaine de traitement, nous avons montré que seuls les acides gras PA, SA et LA augmentaient significativement l'activité du CYP2E1. A l'inverse, l'ALA réduisait l'activité de ce cytochrome. Concernant les autres acides gras (i.e. LAU, OA, ARA, EPA et DHA), aucune variation significative de l'activité du CYP2E1 n'a été mesurée dans les cellules HepaRG. Pour la suite des investigations, seuls les acides gras inducteurs du CYP2E1 ont été conservés.

► Au vu des effets inducteurs du PA, SA et LA sur l'activité du CYP2E1, nous avons également cherché à déterminer si les expressions du gène et de la protéine CYP2E1 étaient augmentées. L'expression du gène *CYP2E1* était inchangée quel que soit l'acide gras utilisé pour le traitement. Quant à l'expression de la protéine CYP2E1, une tendance à l'augmentation était observée dans les cellules HepaRG traitées par du PA, SA ou LA.

► En recherchant les mécanismes impliqués dans l'induction du CYP2E1, nous avons montré que cette induction pouvait être due à une moindre dégradation et/ou stabilisation du CYP2E1 au niveau protéique, contribuant ainsi à une activité plus élevée de ce cytochrome.

► Dans ce contexte de surcharge lipidique, la stéatose a également été évaluée dans les cellules HepaRG. Nos résultats ont montré que le LA favorisait une augmentation significative du contenu en triglycérides intracellulaires alors que le PA et le SA ne favorisaient pas cette accumulation.

► L'effet pro-stéatosant du LA résulte principalement d'une augmentation de l'entrée de cet acide gras dans les cellules HepaRG (↑ significative de l'expression du gène *FAT/CD36*). L'absence de stéatose avec le PA et le SA est principalement liée à une moindre entrée de ces acides gras dans la cellule (↓ de l'expression du gène *FAT/CD36*) et à une augmentation de la β -oxydation mitochondriale. Ces différents acides gras n'avaient peu ou pas d'impact sur la lipogenèse *de novo* et la sécrétion des VLDL.

► Concernant la toxicité du paracétamol dans les cellules HepaRG, la cytotoxicité de ce médicament est particulièrement importante lorsque la concentration de traitement utilisée et la durée d'exposition à ce médicament sont élevées (i.e. 20 mM et 48 h). Les acides gras PA et SA exacerbent la toxicité du paracétamol dans les cellules HepaRG exposées pendant 48 h à ce médicament. La supplémentation en LA prévient la toxicité du paracétamol dans les cellules

HepaRG traitées par ce médicament pendant 24 h. Cependant, les effets préventifs du LA sur la toxicité du paracétamol disparaissent lorsque la durée d'exposition à ce médicament augmente (i.e. 48 h). Néanmoins, cette cytotoxicité est équivalente à celle observée dans les cellules HepaRG traitées par le paracétamol seul. Nos résultats indiquent donc l'absence d'exacerbation de la toxicité du paracétamol dans les cellules HepaRG supplémentées en LA malgré la présence de l'induction du CYP2E1 dans ces cellules.

➤ L'induction CYP2E1 et le traitement en paracétamol peuvent favoriser la survenue d'un stress oxydant par des mécanismes différents. Dans l'ensemble, les cellules HepaRG supplémentées en PA, SA ou LA ne présentent pas de stress oxydant majeur malgré l'induction du CYP2E1 dans ces cellules. Les effets du paracétamol sur le stress oxydant ont été déterminés après 24 h d'incubation et pour une concentration de traitement de 20 mM. Dans ces conditions expérimentales, le paracétamol seul favorise rapidement l'apparition d'un stress oxydant (i.e 15 minutes). Ce stress diminue néanmoins au cours du temps (i.e. à 90 minutes) indiquant alors la mise en place d'une réponse cellulaire anti-oxydante.

Dans les conditions de co-incubation avec les acides gras, nos résultats ont globalement montré une tendance à la majoration du stress oxydant (en particulier dans la mitochondrie) dans les cellules HepaRG supplémentées en PA et LA et traitées par le paracétamol comparativement aux cellules HepaRG traitées par le paracétamol seul. De façon intéressante, cette potentialisation du stress oxydant mitochondrial était même significative dans les cellules HepaRG supplémentées en SA.

➤ Etant donné que l'induction du CYP2E1 et la toxicité du paracétamol peuvent également favoriser une dysfonction mitochondriale, nous avons évalué la fonction mitochondriale en mesurant la respiration mitochondriale basale et maximale ainsi que la consommation d'oxygène couplée à la synthèse d'ATP. Nos résultats ont montré une tendance à la diminution de la respiration maximale dans les cellules HepaRG supplémentées en SA. Le traitement au paracétamol seul tend à diminuer la respiration basale et la synthèse d'ATP. En condition de co-incubation de paracétamol et d'acide gras, la diminution de la respiration basale et de la synthèse d'ATP ne sont pas modifiées quel que soit l'acide gras utilisé pour la supplémentation. Cependant, nos résultats indiquent une altération plus importante de la respiration maximale dans les cellules HepaRG supplémentées en SA et traitées par le paracétamol comparativement aux cellules HepaRG traitées par le paracétamol seul.

Fatty acids-mediated CYP2E1 increased activity is not necessarily associated with exacerbated acute acetaminophen hepatotoxicity

Clémence Penhoat¹, Julie Massart¹, Gregory Pinon¹, Daniel Catheline ^{1,2}, Vincent Rioux^{1,2}, Bernard Fromenty¹, Karima Begriche ^{1,*}

¹ INSERM, Univ Rennes, INRAE, Institut NUMECAN (Nutrition Metabolisms and Cancer) UMR_A 1341, UMR_S 1241, F-35000 Rennes, France

² Laboratoire de Biochimie-Nutrition Humaine, Agrocampus Ouest, Rennes, France

*Correspondence: karima.begriche@univ-rennes1.fr; Tel.: +33 2 23 23 75 08

Keywords: obesity; non-alcoholic fatty liver disease; non-alcoholic steatohepatitis; cytochrome P450 2E1; fatty acids; acetaminophen.

ABSTRACT

Hepatic cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) is thought to contribute to the progression of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Increased activity of CYP2E1 in obese (NAFL) subjects may contribute to higher oxidative stress and mitochondrial dysfunction. Acetaminophen (APAP) is metabolized by CYP2E1 to N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI), a highly toxic metabolite responsible for APAP-induced hepatotoxicity. Thus, pathological conditions increasing CYP2E1 activity can favor APAP-induced liver injury. Evidence suggest that hepatic CYP2E1 activity is regulated by fatty acids (FAs). In this study, we investigated the effect of 9 FAs differing by their carbon chain length and their degree of unsaturation on CYP2E1 activity in differentiated HepaRG cells. One-week incubation with palmitic acid (PA), stearic acid (SA) and linoleic acid (LA) induced CYP2E1 activity. LA-induced CYP2E1 activity was associated with increased lipid accumulation, but not with PA or SA. APAP hepatotoxicity was then assessed in HepaRG cells with or without PA, SA or LA. Acute APAP cytotoxicity was exacerbated in presence of PA or SA and this was accompanied with higher reactive oxygen species production and altered mitochondrial respiratory capacity. These affects were not observed when HepaRG cells were incubated with LA. Hence, FA-induced CYP2E1 activity is not intrinsically associated with APAP-induced liver injury but most likely rely on FAs cellular effect such as inflammation and oxidative stress.

INTRODUCTION

Initially described as a fat accumulation in the liver without excessive alcohol consumption, Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) refers to a large spectrum of liver diseases ranging from non-alcoholic fatty liver (NAFL) or simple steatosis to more severe hepatic diseases such as non-alcoholic steatohepatitis (NASH), fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma (Lindenmeyer et al., 2018). NAFLD concerns about 25% of the worldwide general adult population but this prevalence is significantly higher among patients with obesity or diabetes (Fazel et al., 2016; Younossi., 2019). Most importantly, these two metabolic disturbances were reported to be closely linked to NASH, a severe form of NAFLD (Wanless et al., 1990; Leung et al., 2017; Polyzos et al., 2019; Sheka et al., 2020; Stefan and Cusi., 2022). NASH is the inflammatory subtype of NAFLD characterized by hepatocyte ballooning and necrosis. NASH can evolve to fibrosis (Brown and Kleiner, 2016) and cirrhosis (Suzuki and Diehl, 2017). These advanced forms of NAFLD have been often associated with a greater risk of liver-related morbidity and mortality (Dulai et al., 2017; Taylor et al., 2020; Loomba et al., 2021). Because of these negative clinical outcomes, the understanding of the mechanisms involved in the aggravation of NAFL to NASH appears thus crucial. Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) has been hypothesized as one of the key player in NASH disease since increased hepatic expression and/or activity of this cytochrome was reported in different animal models of obesity (Raucy et al., 1991; Begriche et al., 2008; Aubert et al., 2011), steatohepatitis (Weltman et al., 1996) as well as in NAFLD / NASH patients (Weltman et al., 1998; Niemelä et al., 2000; Chalasani et al., 2003). The critical role of CYP2E1 in NAFL aggravation to NASH was subsequently pinpointed in *Cyp2E1* null mice since CYP2E1 deletion provided a protection against high fat diet-induced steatohepatitis (Abdelmegeed et al., 2012). The clinical relevance of CYP2E1 induction on NAFLD progression was strongly suggested by the positive correlation between CYP2E1 activity and degree of steatosis in patients (Emery et al., 2003; Chtioui et al., 2007). Moreover, hepatic CYP2E1 activity might even be higher in obese NASH patients compared to obese individuals with simple steatosis (Orellana et al., 2006). Since CYP2E1 is able to generate significant amounts of reactive oxygen species (ROS) and deleterious endogenous lipid derivatives such as dicarboxylic acids (Robertson et al., 2001; Caro et al., 2004; Leung and Nieto., 2013), this cytochrome could then promote the progression of NAFLD by triggering an oxidative stress and various related cellular damages such as lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction (Begriche et al., 2013; Abdelmegeed et al., 2017; Massart et al., 2022). In obesity-associated NAFLD, high circulating levels of fatty acids (FAs),

hyperleptinemia and insulin resistance have been reported as possible metabolic inducers of hepatic CYP2E1 (Aubert et al., 2011; Massart et al., 2022). Various experimental studies using high fat fed rodent models or hepatic cells emphasized the amount of fat intake (Osabe et al., 2008) and most importantly the role of specific FAs in the induction of hepatic CYP2E1 (Yoo et al., 1991; Aubert et al., 2011; Jian et al., 2017; Wang et al., 2020; Raucy et al., 2004; Sung et al., 2004; Michaut et al., 2016; Le Guillou et al., 2018; Bucher et al., 2018; Liu et al., 2019). For instance, *in vitro* investigations carried out on human primary hepatocytes or on differentiated human hepatoma HepaRG cells revealed an enhanced CYP2E1 expression or activity after incubation with palmitic or stearic FAs (Raucy et al., 2004; Michaut et al., 2016; Le Guillou et al., 2018; Bucher et al., 2018). More recently, we showed on HepaRG cells a significant increase in gene expression and activity of CYP2E1 after a 2-week treatment with a mixture of stearate and oleate (Le Guillou et al., 2018; Bucher et al., 2018). Interestingly, this CYP2E1 induction was associated with a moderate overproduction of ROS and a mild mitochondrial dysfunction (Bucher et al., 2018).

Besides its role in NAFLD progression, CYP2E1 plays also an important role in the biotransformation of numerous exogenous compounds such as alcohol, drugs, environmental toxicants and industrial chemicals (Chen et al., 2019). Regarding some drugs such as the painkiller acetaminophen (APAP) also referred as paracetamol, CYP2E1 has long been known to be pivotal in the metabolism and liver toxicity of this drug especially when provided at high doses. In this context, CYP2E1-mediated biotransformation of APAP generates excessive N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI) leading to severe liver damage. Indeed, NAPQI is a highly reactive metabolite inducing oxidative stress, mitochondrial dysfunction, ATP depletion and massive necrotic cell death (Ramachandran and Jaescke., 2019; McGill and Hinson., 2020). Although there are some discrepancies between studies in the higher susceptibility to acute APAP hepatotoxicity during metabolic diseases (Ito et al., 2006; Kim et al., 2017; Rutherford et al., 2006; Radosevich et al., 2016), some studies have reported that obesity and NAFLD could increase the risk and/or the severity of APAP-induced liver injury in humans (Nguyen et al., 2008; Myers and Shaheen 2009; Chomchai and Chomchai., 2018) and in rodents (Corcoran et al., 1987; Aubert et al., 2012; Kučera et al., 2012; Piccinin et al., 2019; Shi et al., 2019). Acute toxicity of APAP was also investigated in steatotic hepatocytes indicating that exposure to some FAs could exacerbate APAP hepatotoxicity (Michaut et al., 2016; Yang et al., 2020). Among the various factors contributing to the increased susceptibility to acute APAP hepatotoxicity in

the context of obesity and NAFLD, CYP2E1 induction may be involved in part in this greater toxicity (Aubert et al., 2012; Michaut et al., 2016).

To better understand the role of hepatic CYP2E1 in NAFLD pathophysiology and its implication in the susceptibility to acute APAP hepatotoxicity, our present work aims at identifying FAs that could induce CYP2E1 in differentiated HepaRG cells, a suitable cell model to investigate NAFLD and APAP toxicity (Michaut et al., 2016; McGill et al., 2011). For this purpose, we performed a screening on a set of 9 FAs differing from each other by their carbon chain length and their degree of unsaturation. The selected FAs were lauric acid (C12:0 or LAU), palmitic acid (C16:0 or PA), stearic acid (C18:0 or SA), oleic acid (C18:1 or OA), linoleic acid (C18:2 or LA), α -linolenic acid (18:3 or ALA), arachidonic acid (C20:4 or ARA), eicosapentaenoic acid (C20:5 or EPA) and docosahexaenoic acid (C22:6 or DHA). After a 1-week incubation period with the different FAs, CYP2E1 activity was measured. FAs able to induce CYP2E1 were then investigated further to determine whether hepatic CYP2E1 induction could contribute to the worsening of NAFL to NASH. Finally, we determined if the acute hepatotoxicity of APAP would be exacerbated based on both pre-existing CYP2E1 induction and NAFLD. Hence, the present study may provide new insights into the hepatic induction of CYP2E1 in response to FAs through a better identification of these latter and further characterization of their metabolic impact. In addition to a better understanding of the role of hepatic CYP2E1 induction in NAFLD progression, this study will also contribute to reinforce the knowledge of acute APAP hepatotoxicity especially in the context of NAFLD.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and reagents

Acetaminophen (APAP), chlorzoxazone (CZX), cycloheximide (CHX), dimethylsulfoxide (DMSO), L-carnitine, linoleic acid, palmitic acid, stearic acid, fatty acid-free bovine serum albumin (BSA), insulin, protease and phosphatase inhibitors were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). William's E medium, Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS), Hanks Balanced Salt Solution (HBSS), glutamine, penicillin, streptomycin, MitoSOX Red probe, dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA) probe, Nile Red, Hoechst 33342, High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and the Pierce bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit were obtained from ThermoFisher Scientific (Courtaboeuf, France). Fetal bovine serum (FBS) was supplied by Lonza (Levallois-Perret, France) and Eurobio Scientific (Les-ULis, France). Hydrocortisone hemisuccinate was obtained from SERB laboratories (Paris, France). Radiolabeled [U-¹⁴C] palmitic and [2-¹⁴C] acetic acid were purchased from PerkinElmer (Villebon-sur-Yvette, France). RIPA buffer 10X (9806- Cell Signaling) was purchased from Ozyme (Saint-Cyr-L'Ecole, France). Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) antibody (PA26- Oxford Biomedical) was purchased from Euromedex (Souffelweyersheim, France) and Heat-shock cognate 70 (HSC 70) antibody (sc-7298- Santa Cruz Biotechnology) was supplied by Clinisciences (Nanterre, France).

Cell culture and treatments

The HepaRG cell line was cultured as previously described (Gripon et al., 2002). Briefly, HepaRG progenitors were seeded at a low density of 2.6×10^4 cells/cm² and incubated for two weeks in a growing medium containing William's E medium supplemented with 10% FBS, 100 units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 5 µg/mL insulin, and 50 µM hydrocortisone hemisuccinate. Cells were grown at 37°C, 5% CO₂ in a humidified incubator and media was refreshed three times a week. When committed to differentiation, HepaRG cells were shifted to a differentiation medium for two additional weeks. The differentiation medium is composed of the growing medium supplemented with 1.75 % DMSO. Once differentiated, HepaRG cells were subsequently treated with different FAs and/or APAP in the differentiation medium

slightly modified for FBS (5%) and DMSO (1%). For fatty acid treatments, differentiated HepaRG cells were incubated for one week with 150 μ M of palmitic (C16:0 or PA), stearic (C18:0 or SA) or linoleic (C18:2 or LA) FAs. For the APAP treatment, differentiated HepaRG cells were treated with this drug at 10 mM or 20 mM during the last 24 h or 48 h.

Of note, all FAs and APAP were dissolved in DMSO and final DMSO concentration in culture media was always set up at 1% regardless of the treatment. HepaRG cells were used between passage 12 to 16. Unless specified, all investigations were performed 24 h after the last treatment.

RNA extraction and gene expression

Total RNAs were extracted from about 6×10^6 HepaRG cells using a Nucleospin RNA isolation Kit (Macherey-Nagel, Hoert, France) following manufacturer's instructions. After RNA quantification with the NanoDrop One (ThermoFisher Scientific, Courtaboeuf, France), cDNAs were synthesized from 500 ng of total RNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). cDNAs were then amplified with specific primers using the Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and a 384-well QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). The primer sequences used for quantitative PCR are detailed in table 1. The relative expression of each selected gene was normalized to *cyclophilin B* gene expression. Non-treated cells were used as a control group for gene expression which was arbitrarily set at 1. The $2^{-\Delta\Delta T}$ method was used to express the relative expression of each selected gene.

CYP2E1 activity

CYP2E1 activity was measured by determining the production of chlorzoxazone-O-glucuronide (CZX-O-Glc) from chlorzoxazone (CZX) as previously described (Quesnot et al., 2018). Prior to CZX incubation, HepaRG cells were rinsed twice with pre-warmed DPBS and then incubated for 6 h at 37°C in phenol red-free William's E medium containing 300 μ M CZX. At the end of the incubation, aliquots of culture media were harvested and CZX-O-Glc was quantified using a high-performance liquid chromatography (HPLC Agilent Series 1260 Infinity II, Santa Clara, CA). The sample injection volume was 45 μ L and the separation was performed with a C18 column (150mm $\times$ 3 mm Accupore PFP, ThermoFisher Scientific). The

mobile phase consisted of a mixture of two solvents: solvent A (0.1% of acetic acid + 0.25% of triethylamine hydrochloride) and solvent B (100% of acetonitrile), pumped at a rate of 0.5 mL/min. The gradient program was as follows: 0-1 min: 98% of solvent A and 2% of solvent B; 20-22 min: 10% of solvent A and 90% of solvent B; 27-30 min: 98% of solvent A and 2% of solvent B. The eluates were monitored by an ultraviolet detector at $\lambda = 284$ nm. The peak areas of the CZX-O-Glc were automatically integrated using the Agilent 1100 software and quantification was performed from a calibration curve generated with known amounts of CZX-O-Glc. CYP2E1 activity was expressed as pmol CZX-O-Glc/mg of proteins/hour.

Protein extraction and Western Blot analysis

Prior to cell lysis, media was removed and HepaRG cells were rinsed twice in ice-cold DPBS buffer. Then, cells were lysed in ice-cold 1X RIPA buffer supplemented with protease and phosphatase inhibitors. Protein concentration was determined using the Pierce BCA protein assay kit as recommended by the manufacturer's instructions. Equal amounts of protein (25 μ g) were diluted with Laemmli buffer and heated at 56°C for 20 minutes before being separated by SDS-PAGE using NuPAGE 4-12% Bis-tris gels (ThermoFisher Scientific, Courtaboeuf, France) and then transferred to 0.2 μ M nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Les Ulis, France). Ponceau staining was used to confirm equal loading and transfer. Membranes were then blocked in 7.5 % skimmed dry milk in TBST (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.03 % Tween 20) for 1h at room temperature and incubated overnight with CYP2E1 antibody (dilution 1:2000) or HSC70 (dilution 1:500). After three successive wash steps in TBST, membrane was incubated with an appropriate HRP-conjugated secondary antibody and protein bands were revealed by enhanced chemiluminescence (Pierce SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate, ThermoFisher Scientific) and visualized using Fusion FX imaging system (Vilber Lourmat, Marne La Vallée, France). Protein content was quantified by densitometry with ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD). HSC70 protein content was used for normalization.

Assessment of mechanisms involved in CYP2E1 protein expression regulation

To assess mechanisms involved in CYP2E1 protein expression regulation, HepaRG cells were treated or not with 150 μ M of PA, SA or LA for 1 week. To follow CYP2E1 protein expression

over time, cells were subsequently incubated with cycloheximide (50 μ M), a protein synthesis inhibitor for 48 h, 72 h and 96 h. CYP2E1 protein content was determined by western-blot for each time point. CYP2E1 protein expression was normalized to Ponceau staining intensity around CYP2E1 area. To display variation in CYP2E1 protein expression results were expressed as $\Delta_{t(x)-t(0)}$ CYP2E1/Ponceau.

Nile Red staining, intracellular triglyceride content and apolipoprotein B secretion

Nile Red staining was used to visualize neutral lipids accumulation within HepaRG cells after a one-week treatment with the different FAs. As previously described (Bucher et al., 2018), cells were first rinsed with pre-warmed DPBS and fixed with 4 % paraformaldehyde for 20 minutes at room temperature. Cells were then washed three times with DPBS and incubated with 0.1 μ g/mL Nile Red in DPBS for 30 minutes at room temperature. After a washing step, cells were incubated with 10 μ g/mL Hoechst 33342 in DPBS for 15 minutes at room temperature to label nuclei. Intracellular accumulation of neutral lipids was assessed using fluorescent microscope (Axio Vert.A1 and Colibri.2 controller, Zeiss) with the appropriate excitation/emission wavelengths respectively 531/461nm for Nile Red and 531/593nm for Hoechst 33342. To determine triglyceride content within HepaRG cells, the triglyceride quantification kit from BioVision was used (Waltham, MA). Briefly, HepaRG cells were homogenized in 5 % NP-40 detergent to allow triglyceride extraction. Then, to completely solubilize triglycerides, samples were heated at 100°C for 5 minutes and centrifuged. Solubilized triglycerides were collected and then hydrolyzed to FAs and glycerol by adding lipase. Lipase was also added to each triglyceride standard aliquot. According to the manufacturer's instructions, free glycerol was then oxidized in a specific mixture containing a probe. After 30 minutes incubation at room temperature, the newly formed oxidized product reacts with the probe to generate a color derivative. This derivative was then measured at $\lambda=570$ nm using a FLUOstar omega microplate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). Of note, the triglyceride content of each sample is determined by comparison to a standard curve generated with known amounts of triglycerides.

To assess ApoB secretion, culture media was harvested at the end of the 7 days of treatment with the different fatty acids. The Human Apolipoprotein B Elisa kit from Mabtech (Nacka Strand, Sweden) was used for ApoB quantification and as previously described (Allard et al., 2021).

De novo lipogenesis and mitochondrial β -oxidation

De novo lipogenesis was assessed in adherent HepaRG cells by measuring newly synthesized lipids from [2- 14 C] acetic and as previously described (Allard et al., 2021). Mitochondrial fatty acid oxidation was determined by measuring the acid-soluble radiolabeled metabolites resulting from mitochondrial oxidation of [U- 14 C] palmitate. Briefly, adherent HepaRG cells in 96-well plate were incubated for 3 hours at 37°C in a red-free William's E medium supplemented with 1 % fatty acid free BSA, 1 mM L-carnitine, [U- 14 C] palmitic acid (185 Bq/well), 100 μ M cold PA and 1 % DMSO. At the end of the incubation, 100 μ L of 6 % perchloric acid was directly added in each well to promote precipitation of non-oxized fatty acids. Then, cells were centrifuged at 2 000 g for 10 minutes at room temperature. After centrifugation, 130 μ L of supernatant was collected and transferred in 4 mL of scintillation liquid. [U- 14 C] labeled acid soluble β -oxidation products were measured in a Tri-Carb 4910TR liquid scintillation counter (PerkinElmer, Villebon-sur-Yvette, France). Results were normalized to total protein content and expressed as count per minute (CPM)/ μ g of proteins.

Assessment of intracellular ATP levels

Intracellular content of ATP was measured using the CellTiter Glo Luminescent cell viability assay kit from Promega (Charbonnières-les-Bains, France). Of note, ATP quantification reflects cell viability since ATP is produced from metabolically active cells. To assess cell viability in response to FA treatment and APAP, differentiated HepaRG cells were first incubated for 1 week with 150 μ M of PA, SA or LA. The last 24 or 48 hours, some cells were co-treated or not with 10 or 20 mM of APAP. Before performing the ATP assay, HepaRG cells were first rinsed twice with pre-warmed DPBS and kept for 30 minutes at room temperature in phenol red-free William's E medium to equilibrate plate temperature and avoid any inconsistent results due to temperature differences. Cells were subsequently incubated with the CellTiter-Glo reagent mix for 10 minutes at room temperature. At the end of the incubation, HepaRG cells were transferred in a white opaque 96-well microplate and the emitted luminescent signal was quantified using a FLUOstar Omega microplate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). Results were expressed in comparison to control cells.

Assessment of reactive oxygen species (ROS) production

To measure ROS production, H₂DCFDA and MitoSox Red fluorescent probes were used for detection of hydrogen peroxides and superoxide anion respectively. Prior to the assay, HepaRG cells were treated for one week with 150 μ M of PA, SA or LA. During the last 24h, some cells were co-incubated or not with 20 mM of APAP. The day of the assay, HepaRG cells were treated one more time for 15 or 90 minutes with APAP alone or in combination with the different FAs. At the end of the kinetic, medium was quickly removed and HepaRG cells were rinsed once with pre-warmed HBSS. Then, cells were incubated for 30 minutes at 37°C in HBSS supplemented with 2 μ M of H₂DCFDA or 5 μ M of MitoSox Red probes. At the end of the incubation, living cells were gently rinsed and fluorescence was measured using a FLUOstar Omega microplate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) with excitation/emission wavelengths of 485/520 nm for H₂DCFDA and 520/590 nm for MitoSOX Red. Fluorescence intensity was normalized to total protein content and results were expressed in comparison to control cells.

Assessment of mitochondrial respiration

Mitochondrial respiration was assessed by measuring the oxygen consumption rate (OCR) using the Seahorse XFe24 analyzer and XF Cell Mito Stress test kit (Agilent, Santa Clara, CA) and according to the manufacturer's instruction. Briefly, HepaRG cells were seeded and differentiated in the XF24 cell culture plate (Agilent, Santa Clara, CA). Once differentiated, cells were treated or not for 1 week with 150 μ M of PA, SA or LA. Some cells were co-treated with 20 mM of APAP during the last 24h. The day of the assay, medium was removed and replaced with a bicarbonate-free low-buffered medium (Seahorse Bioscience) containing 10 mM glucose, 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate (pH 7.4). After a 45 minutes incubation at 37°C in the absence of CO₂, cells were then placed into the XF24 extracellular flux analyzer, and the OCR was evaluated by sequential injection of 2 μ M oligomycin, 2 μ M carbonyl cyanide-4-trifluoromethoxy phenylhydrazone (FCCP), and 0.5 μ M rotenone/antimycin A. Then, the OCR provided by the Seahorse Mito Stress Test profile and corresponding to basal respiration, maximal respiration (induced by the OXPHOS uncoupler FCCP), ATP production, and proton leak were normalized in each well to the number of cells estimated by the fluorescence intensity of the Hoechst 33342 dye (10 μ g/ml) using the FLUOstar Omega

microplate reader from BMG Labtech (Ortenberg, Germany) with excitation/emission wavelengths of 355/460 nm.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.0.2 software. All results are expressed as mean $\pm$ SEM (standard error of mean). Non-parametric tests were used. The significance was evaluated by Mann Whitney test. Comparisons were considered statistically significant at $p \leq 0.05$.

RESULTS

Identification of FAs inducing hepatic CYP2E1 and associated mechanisms

In order to identify FAs that could possibly induce CYP2E1 in differentiated HepaRG cells, we performed a screening with a set of 9 FAs differing each other by their carbon chain length and degree of unsaturation. The selected FAs were lauric acid (LAU or C12:0), palmitic acid (PA or C16:0), stearic acid (SA or C18:0), oleic acid (OA or C18:1), linoleic acid (LA or C18:2), α -linolenic acid (ALA or 18:3), arachidonic acid (ARA or C20:4), eicosapentaenoic acid (EPA or C20:5) and docosahexaenoic acid (DHA or C22:6). First, we assessed intracellular ATP content following 1-week treatment for each of these FAs using a wide range of concentrations (i.e 10, 25, 50, 100, 150, 200, 300 and 400 μ M) to determine the non-cytotoxic concentration. HepaRG cells incubated for 1 week with PA, SA or ALA, exhibited toxicity when concentration was equal to or greater than 200 μ M whereas no effect was observed for LAU and OA (data not shown). Treatment with concentrations greater or equal to 50 μ M of ARA, EPA or DHA induced cell toxicity (data not shown). We thus chose for our study to use 150 μ M for the medium to long chain FAs (LAU, PA, SA, OA, LA and ALA) and 25 μ M for the long chain polyunsaturated FAs namely ARA, EPA and DHA. Of note, these two concentrations are within the range of physiological circulating levels of most non-esterified FAs with a carbon chain length going from C12 to C22 (Kangani et al., 2008; Puri et al., 2009).

We next determined CYP2E1 activity in differentiated HepaRG cells treated for 1 week with each of the 9 aforementioned FAs at the concentration of 150 μ M for LAU, PA, SA, OA, LA,

ALA and 25 μ M for ARA, EPA and DHA. In these experimental conditions, PA, SA and LA were able to significantly increase the activity of CYP2E1 by 59 %, 44 % and 28 % respectively (**Figure 1**). Conversely, CYP2E1 activity dropped in HepaRG cells incubated with ALA (**Figure 1**). CYP2E1 activity remained unchanged following 1-week treatment with LAU, OA, ARA EPA or DHA (**Figure 1**). Since NAFLD is most commonly associated with an induction of CYP2E1 (Aubert et al., 2011), FAs that resulted in increased CYP2E1 activity (i.e. PA, SA and LA) were further investigated. Induction of CYP2E1 could result from enhanced gene expression, increased translation or protein stability. We thus measured CYP2E1 mRNA and protein levels after 1-week treatment with 150 μ M PA, SA or LA. HepaRG cells loaded with PA, SA or LA did not increase *CYP2E1* gene expression compared to untreated control cells (**Figure 2 A**). Additional molecular investigations based on a luciferase assay reporting the activity of CYP2E1 promoter were performed in HepG2 cells. Cells transfected with the entire human promoter were then exposed to PA, SA or LA for 24 h. Luciferase reporter assays showed that none of the 3 FAs caused *CYP2E1* promoter transactivation (**Supplemental Figure 1**). Thus, these results indicate that neither PA, SA or LA have a direct effect on CYP2E1 gene expression (**Supplemental Figure 1**). Similar to our mRNA and luciferase assay results, CYP2E1 protein levels were not significantly increased, despite a trend after a 1-week incubation with PA, SA or LA (**Figure 2 B**). In order to investigate if PA, SA or LA induces CYP2E1 activity through posttranscriptional mechanism, we next treated HepaRG cells with PA, SA or LA for 1 week in presence of cycloheximide for the last 48 h, 72 h or 96 h of the treatment. As expected, CYP2E1 protein expression in HepaRG cells progressively declined with protein synthesis inhibition. Interestingly, this decrease tended to be attenuated when HepaRG cells were loaded with PA, SA or LA (**Figure 2 C**). After a 96 h co-incubation with cycloheximide, CYP2E1 protein expression decreased by half in untreated control cells whereas this reduction was less marked in HepaRG cells treated with PA, SA or LA (**Figure 2 C**). Hence, these results suggest that PA, SA or LA mediated CYP2E1 induction might be due to less degradation and/or stabilization of CYP2E1 at the protein level, contributing to higher activity.

Assessment of intracellular lipids and investigation on metabolic pathways regulating hepatic lipid homeostasis

Neutral lipids stored within the HepaRG cells were first visualized by fluorescence microscopy using Nile Red staining, a dye used to label fat accumulation in the cytosol (McMillian et al., 2001; Bucher et al., 2018). After 1 week of treatment, only HepaRG cells supplemented with

LA exhibited an increase in the intracellular content of neutral lipids compared to untreated control cells (**Figure 3 A**). HepaRG cells incubated with PA or SA had a weak signal equivalent to the one observed in control cells. We further confirmed these observations by direct quantification of intracellular triglycerides. Indeed, triglyceride content was significantly increased in HepaRG cells loaded with LA while unchanged under PA or SA supplementation (**Figure 3 B**). A lipidomic analysis showing fatty acid composition of lipid and triglyceride fractions confirmed the greater content of total lipids and triglycerides in HepaRG cells under LA supplementation (**Supplemental Figure 2 A-B**). Moreover, the data indicated a higher incorporation of LA into triglycerides in HepaRG cells supplemented for 1 week with LA (**Supplemental Figure 2 B**). In order to further characterize lipid accumulation, we investigated the mRNA levels of some lipid droplet-associated genes such as perilipin 1 (PLIN1) and perilipin 2 (PLIN2) as relevant biomarkers of steatosis as previously described (Pawella et al., 2014). Consistent with lipid content, both *PLIN1* and *PLIN2* expressions were significantly enhanced after an incubation with LA whereas remained unchanged after PA or SA incubation (**Figure 3 C**). All these results indicate that only LA induces steatosis in our experimental conditions. Thus, CYP2E1 induction in HepaRG cells is not systematically associated with the presence of steatosis as induction of this cytochrome was also observed under PA and SA supplementation that did not promote significant intracellular triglyceride accumulation. Therefore, induction of hepatic CYP2E1 may rely on FA itself and its downstream intracellular effects than the presence of steatosis.

De novo lipogenesis, fatty acid oxidation, fatty acid uptake and very low-density lipoprotein (VLDL) secretion are the four major pathways contributing to lipid homeostasis in the liver. A disruption in one or more of these pathways can promote the development of NAFLD (Ipsen et al., 2018; Loomba et al., 2021). To determine whether these metabolic pathways are impacted by PA, SA or LA, we first measured gene expression of the fatty acid translocase C (FAT/CD36), one of the transporters that mediates uptake of long-chain fatty acids in hepatocytes and many other cell types. Hepatic expression of *FAT/CD36* is increased in a similar manner than triglyceride content in the liver (**Figure 4 A**). Indeed, expression of this transporter is significantly increased in HepaRG cells supplemented with LA which is consistent with the LA-mediated increased intracellular triglycerides content (**Figure 4 A**). HepaRG cells loaded with PA, and to a non significant extent with SA, showed a reduced expression of *FAT/CD36* gene expression in comparison to control cells (**Figure 4 A**). These data are consistent with increased expression of *FAT/CD36* reported in different animal models of steatosis and humans with NAFLD (Greco et al., 2008; Miquilena-Colina et al., 2011). *De*

novo lipogenesis was slightly but significantly decreased in HepaRG cells incubated with LA compared to control cells, whereas PA or SA supplementation had no effect (**Figure 4 B**). Of note, downregulation of lipogenesis is generally observed in response to high fat intake as a compensatory mechanism to lipid overload (Ren et al., 2012). In our experimental conditions, the maintenance of a basal rate of lipogenesis despite PA or SA supplementation is probably linked to reduced FA uptake as suggested by decreased *FAT/CD36* expression. We also assessed the expression of some key lipogenic genes, namely sterol regulatory element binding protein 1c (*SREBF1c*), fatty acid synthase (*FAS*), acetyl-CoA carboxylase 1 (*ACACA*), glycerol phosphate acyl transferase mitochondrial isoform (mt GPAT). A trend for decreased expression of *SREBF1c* is observed following FAs treatment, which is reinforced by decreased expression of its target genes *FAS* and *ACACA* (**Supplemental Figure 2 C**). Yet, the expression of mtGPAT was decreased only following PA and SA exposure (**Supplemental Figure 2 C**), the 2 FAs that did not induce lipid accumulation. For mitochondrial fatty acid oxidation, a mild but significant increase was measured in HepaRG cells loaded with PA (+14%) or SA (+15%) compared to control cells while LA treatment was without effect (**Figure 4 C**). Since fatty acid oxidation can be controlled in part by peroxisome proliferator-activated receptor alpha (*PPARα*), we performed additional investigations to study gene expression of this nuclear receptor and some of its target genes such as carnitine palmitoyl transferase 1 (*CPT1*) and acyl-CoA oxidase 1 (*ACOX1*). The expression of all these genes was unchanged regardless of the FA treatment (**Supplemental Figure 3 A**). These results suggest that increased mitochondrial β -oxidation under PA and SA supplementation might result from non-transcriptional activation but further investigations will be needed to decipher the involved mechanisms. Finally, we investigated VLDL secretion by measuring apolipoprotein B (ApoB) levels in the culture medium as well as the expression of genes encoding the ApoB and the enzyme microsomal triglyceride transfer protein (*MTTP*) which is crucial for the lipidation of ApoB. We did not observe any variation in ApoB secretion (**Figure 4 D**) as well as in *ApoB* and *MTTP* gene expression regardless the FA treatment (**Supplemental Figure 3 B**). Thus, our data suggest that both PA and SA exposure are not steatogenic in our experimental condition due to slight increase in fatty acid oxidation and reduced lipogenic gene expression. On the other hand, LA supplementation might induce lipid accumulation through increased FA uptake.

APAP induced cytotoxicity, oxidative stress and mitochondrial dysfunction

As noted above, some studies argue that hepatic CYP2E1 induction may be involved at least in part in the greater acute hepatotoxicity of APAP (Aubert et al., 2012; Michaut et al., 2014). Previously, we reported that SA-dependent CYP2E1 induction promoted higher APAP cytotoxicity in the HepaRG cell line (Michaut et al., 2016). To determine whether PA and LA, two newly identified FAs mediating CYP2E1 induction, also exacerbate APAP cytotoxicity, we incubated HepaRG cells with 150 μ M of PA, SA and LA for 1 week and treated with 10 mM or 20 mM of APAP the last 24 h or 48 h of the treatment. APAP cytotoxicity was assessed by quantification of intracellular ATP levels. As expected, APAP induced toxicity in HepaRG cells in comparison to control cells not exposed to this drug (**Figure 5**). Overall, this cytotoxicity increases with APAP concentration and exposure time. Under FAs supplementation conditions, APAP cytotoxicity was more pronounced in HepaRG cells incubated with PA or SA and exposed to 20 mM of APAP for 24 h (**Figure 5 B**). After longer exposure to APAP (48h), ATP levels in HepaRG cells loaded with PA or SA were significantly decreased compared to HepaRG cells treated with APAP alone (**Figure 5 C and D**). HepaRG cells supplemented with LA exhibited a reduced cytotoxicity to APAP as decreased ATP levels were not significantly different from control cells after a 24 h exposure to 10 mM or 20 mM of APAP (**Figure 5 A and B**). However, for longer exposure (i.e. 48 h) LA does not affect APAP cytotoxicity as ATP levels in HepaRG cells loaded with LA are similar to HepaRG cells treated with APAP alone (**Figure 5 C and D**). Collectively, these results indicate that only PA and SA exposures exacerbate APAP cytotoxicity in HepaRG cells whereas LA does not. Thus, induction of hepatic CYP2E1 does not seem to be the sole factor contributing to higher APAP cytotoxicity. In order to better understand the metabolic difference of the FAs that could explain the divergent effect on APAP cytotoxicity, we determined the impact of FA exposure in presence or absence of APAP on oxidative stress and mitochondrial function as these alterations are important in the initiation of cell death (Ramachandran and Jaescke., 2019; McGill and Hinson., 2020). To first determine if oxidative stress was a cause of increased cytotoxicity, ROS production was estimated on HepaRG cells treated for 24 h with 20 mM of APAP to detect the early event responsible for the exacerbated toxicity observed after 48 h. ROS were measured with the probes H₂DCFDA and MitoSox that detect hydrogen peroxides and mitochondrial superoxide anion respectively. In absence of APAP, LA induced quickly hydrogen peroxides as evidenced by the progressive increase following 15 minutes and 90 minutes of LA last addition (**Figure 6 A-B**). While PA was without effect on intracellular ROS production, SA

exposure increased generation of hydrogen peroxides only 90 minutes after the last FA treatment. Of note, none of the tested FAs impacted the production of mitochondrial superoxide (**Figure 6 C-D**). In presence of APAP, both hydrogen peroxides and superoxide increased quickly following the last treatment but returned rapidly to basal levels (**Figure 6**), suggesting that antioxidant cell capacity is still efficient. Yet, addition of PA, SA or LA in presence of APAP increased ROS production and this sustained over time (**Figure 6**). These data suggest that in presence of FAs, APAP treatment leads to a more pronounced oxidative stress that could be linked to the induction of CYP2E1 since this cytochrome is able to produce significant amount of ROS, notably at the mitochondria, as aforementioned (Begriche et al., 2013, Abdelmegeed et al., 2017; Massart et al., 2022).

Besides, mitochondrial respiration was not affected FAs treatment alone, despite a trend for decreased maximal respiration with SA exposure (**Figure 7**), suggesting that SA alters reserve respiratory capacity. APAP treatment for 24 h decreased basal respiration and ATP production (**Figure 7**). These effects were also observed when HepaRG cells were incubated with PA or SA prior to APAP. SA exposure also reduced maximal respiration, while the same trend was observed for PA (**Figure 7**). Incubation with LA prior to APAP was without effect when compared to APAP alone. Thus, PA and SA seem to further impact mitochondrial function in presence of APAP, which combined to enhanced oxidative stress, could trigger APAP cytotoxicity.

DISCUSSION

NAFLD is the leading cause of chronic liver diseases worldwide and can evolve into more severe forms such as NASH, fibrosis and cirrhosis. Induction of hepatic CYP2E1 has been raised as an important metabolic driver in the worsening of NAFL to NASH (Aubert et al., 2011). Numerous experimental studies have proposed that hepatic CYP2E1 induction in the context of obesity and/or steatosis could result in part from the action of specific FAs (Aubert et al., 2012; Michaut et al., 2016; Osabe et al., 2008; Raucy et al., 2004; Sung et al., 2004). In obesity-associated NAFLD, hepatic induction of CYP2E1 has been suggested as a possible adaptative mechanisms to limit fat accretion in the liver by promoting ω -oxidation of FAs reinforcing thus β -oxidation of FAs in mitochondria and peroxisomes (Reddy et al., 2006). Besides its implication in NAFLD pathophysiology, greater expression and/or activity of hepatic CYP2E1 has been also implicated in the higher susceptibility to acute APAP hepatotoxicity especially in the setting of obesity and/or NAFLD (Michaut et al., 2014). Here, we show that PA, SA and LA are FAs inducers of CYP2E1 activity, with only LA as being steatogenic in differentiated HepaRG cells. Furthermore, PA and SA exposure aggravate APAP-induced cytotoxicity, probably through concomitant increase of oxidative stress and mitochondrial function.

The current study first characterized new FAs inducers of CYP2E1 in HepaRG cells and to determine whether these FAs were associated with a greater acute APAP toxicity. Differentiated HepaRG cells were treated for 1 week with 9 FAs differing from each other by their carbon chain length and their degree of unsaturation. This broad screening led to the identification of PA, SA and LA as inducers of CYP2E1 activity in HepaRG cells. It is not surprising that only 3 out of the 9 FAs tested induced CYP2E1 activity as previous studies have highlighted that hepatic CYP2E1 induction may differ depending on the type of FAs used for cell lipid overload (Sung et al., 2004; Michaut et al., 2016). Indeed, investigations performed in differentiated HepaRG cells incubated for 1 week with 100 μ M of SA or OA showed that only SA induced CYP2E1 activity in low insulin condition whereas OA had no effect (Michaut et al., 2016). In HepG2 cells, increased CYP2E1 protein level was observed after 12 h of LA or OA incubation whereas an exposition to ALA and DHA induced no change (Sung et al., 2004). Besides confirming our previously published data on SA-mediated CYP2E1 induction in differentiated HepaRG cells (Michaut et al., 2016), the present study identified PA and LA

as two new additional FAs increasing CYP2E1 activity in the HepaRG cell line. Moreover, it is interesting to note that enhanced CYP2E1 activity increased greater with PA and SA in comparison to LA suggesting a more potent effect of long-chain saturated FAs to elevate CYP2E1 activity compared to long-chain polyunsaturated FAs. This hypothesis is even more relevant considering the absence of CYP2E1 induction in response to ARA, a FA deriving directly from LA. Yet, PA, SA and LA had no effect on CYP2E1 gene expression while these 3 FAs were able to slightly increase CYP2E1 protein expression.

Since the exact mechanisms whereby FAs could induce CYP2E1 remain still unknown, we conducted a series of molecular investigations to determine possible regulatory mechanisms. Of note, the mechanisms involved in CYP2E1 induction mostly depends on the nature of the molecules that modulate CYP2E1 expression and/or activity. Regulation of CYP2E1 is complex and relies on several mechanisms such as transcriptional activation, increased mRNA stabilization or translation and decreased protein degradation (Koop and Tierney, 1990; Novak and Woodcroft., 2000). Our results suggested that PA, SA or LA mediated CYP2E1 induction may result in decreased protein degradation and/or better protein stabilization rather than increased transcription of CYP2E1 gene. In the present study, regulation of CYP2E1 by FAs seems thus to rely more on posttranslational mechanisms promoting CYP2E1 activity. One of the most important regulatory mechanism for CYP2E1 is mainly stabilization of CYP2E1 protein by its own substrates which often prevents its degradation from proteasome (Song et al., 1987; Eliasson et al., 1990). Thus, further studies will be required to determine the exact mechanisms by which PA, SA and LA increased CYP2E1 activity by protein stabilization and degradation as well as modification, such as phosphorylation.

CYP2E1 activity is often correlated with the degree of hepatic steatosis (Emery et al., 2003; Chtioui et al., 2007). Here, we report that only LA promoted an increase in the intracellular levels of triglycerides while PA and SA were unable to increase the hepatic fat content in HepaRG cells. Thus, steatosis development is not directly associated to CYP2E1 increased activity. It is likely that CYP2E1 activity and degree steatosis are linked to the presence of certain FA derivatives or associated cellular events such as inflammation. As such, hepatic CYP2E1 activity is increased in db/db mice but not in ob/ob mice despite a more pronounced steatosis (Aubert et al., 2012). These two rodent models of obesity present striking difference in hepatic inflammatory profile and circulating lipidome (Suriano et al., 2021) that could impact CYP2E1 activity.

As liver plays a major role in lipid homeostasis by regulating uptake, export, oxidation and synthesis of FAs (Ipsen et al., 2018), we investigated the four major metabolic pathways (i.e. fatty acid uptake, *de novo* lipogenesis, mitochondrial β -oxidation and VLDL secretion) controlling intrahepatic fat content. Overall, our results suggest that LA-induced steatosis mainly results from increased FA uptake as experimental and clinical investigations reported that increased expression of FAT/CD36 gene and/or protein enhances FAs uptake and fat accumulation in the liver (Koonen et al., 2007; Greco et al., 2008; Miquilena-Colina et al., 2011). FAT/CD36 gene expression is often increased in patients diagnosed with NAFL or NASH in comparison to healthy individuals (Greco et al., 2008; Zhu et al., 2011). Furthermore, our lipidomic data indicate that LA is highly incorporated into intracellular triglycerides following one week of treatment, suggesting that LA is preferentially used for storage. In contrast, HepaRG cells loaded with PA or SA did not induce lipid accumulation, probably due both to a decrease in FAs uptake and to an increase in fatty acid oxidation (FAO). The significant reduced expression of FAT/CD36 in HepaRG cells incubated with PA and the trend to a decreased expression of this transporter after SA supplementation is unclear but we can hypothesize that FAT/CD36 would be preferentially induced by specific FAs. Interestingly, a study conducted on 3T3-L1 adipocytes exposed to various FAs showed that only SA was able to significantly reduce FAT/CD36 gene expression indicating that regulation of FAT/CD36 gene may effectively differ depending on the type of FAs (Yang et al., 2007). Conversely, expression of FAT/CD36 gene was significantly increased when 3T3-L1 cells were incubated with 2-bromopalmitate, a non-metabolizable FA analog (Yang et al., 2007). Thus, intracellular accumulation of unprocessed FAs could function as a signal triggering the induction of FAT/CD36 gene expression. In our study, one hypothesis might be that increased expression of FAT/CD36 could result from the non-accessibility of LA to metabolization since this FA is preferentially forwarded towards triglyceride storage pathway. Reduced expression of FAT/CD36 in HepaRG cells supplemented with PA or SA might be favored by the greater metabolizing properties of these two FAs as mitochondrial FAO (mtFAO) was significantly increased in HepaRG cells treated with PA and SA.

In obesity-associated NAFLD, FA oxidation could be either increased, decreased or unchanged during NAFLD depending on the severity of the disease (Begrache et al., 2013; Morio et al., 2021). Activation of mtFAO was described as an adaptative mechanism to limit fat accumulation during the first stage of NAFL, and as NAFL progresses FAO declines gradually (Koliaki et al., 2015). As mentioned above, enhanced mtFAO oxidation in HepaRG cells loaded

with PA or SA limits intracellular lipid accumulation preventing the occurrence of steatosis. Regulation of mtFAO is complex and could involve different mechanisms and factors (Houten et al., 2016). Polyunsaturated FAs have long been described as good activators of mtFAO by promoting the expression of PPAR α and its target genes (Jump et al., 2005). Conversely, saturated FAs were reported as less efficient to enhance mtFAO (Jump et al., 2005; Jump., 2008). In the present study, we do not confirm these observations since PA and SA rather increase mtFAO in HepaRG cells while LA has no effect. Indeed, levels of mtFAO in HepaRG cells loaded with LA were similar to the levels measured in control cells. Moreover, no variation in expression of PPAR α or its target genes was observed. These discrepancies could be explained by the different experimental models used in studies (in vivo vs in vitro; various cell models; different duration for FA incubation) and the availability of FAs. Regarding this latter hypothesis, *in vitro* investigations conducted on primary rat hepatocytes loaded with OA or EPA indicated an increased mtFAO in response to EPA and unchanged mtFAO in response to OA (Pawar and Jump., 2003). In this study, assessment of metabolic fate of these FAs allowed to show that incorporation of OA into neutral lipids prevents its oxidation whereas EPA barely assimilated into triglycerides were more accessible to oxidation. In our study, LA is mainly incorporated into triglycerides as previously mentioned in contrast to PA and SA. Therefore, PA- and SA-induced mtFAO could be favored by the accessibility of these two FAs to oxidation whereas unchanged mtFAO with LA could be due to a preferential use towards storage. This last effect is in line with decreased lipogenesis by LA exposure as a metabolic adaptation to excess exogenous lipid supply.

CYP2E1 induction may be a major trigger of acute APAP-induced hepatotoxicity namely in the context of obesity and NAFLD (Michaut et al., 2014 ; Massart et al., 2022). Indeed, clinical and experimental studies reported increased acute APAP toxicity in obesity and NAFLD (Corcoran et al., 1987; Aubert et al., 2012; Kučera et al., 2012; Piccinin et al., 2019; Shi et al., 2019, Nguyen et al., 2008; Myers and Shaheen 2009; Chomchai and Chomchai., 2018). Our experimental model prove that CYP2E1 increased activity is not the sole driver of APAP cytotoxicity. While PA and SA treatment exacerbate APAP-induced toxicity, LA is without effect compared to APAP alone. The additive effect of SA and APAP exposure on cell viability was previously reported (Michaut et al., 2016). Of note, activity of CYP2E1 in HepaRG cells was increased to a lesser extend after LA exposure than PA or SA that could have less impact on APAP metabolism and subsequent toxicity. Yet, the FA degree of saturation and the incorporation into neutral lipid might prevent cells from oxidative stress and mitochondrial

dysfunction that would trigger cell death in presence of APAP. Thus, PA and SA might be metabolized as toxic lipid intermediate favouring metabolic dysfunction, while LA is mostly stored as triglycerides. Saturated FAs are more hepatotoxic than unsaturated species. Monounsaturated fatty acids such as palmitoleate and OA are less toxic than saturated FAs such as PA or SA *in vitro* (Wei et al., 2009; Akasawa et al., 2010; Pardo et al., 2015). Esterification of unsaturated FAs probably protect cells from hepatotoxicity (Listenberger., 2003). Furthermore, we cannot exclude that CYP2E1 localization play a role in APAP-mediated toxicity. ROS overproduction by CYP2E1 arises both within the endoplasmic reticulum (ER) and in mitochondria in accordance with its dual localization (Massart et al., 2022). Thus, CYP2E1 increased activity mediated by PA or SA might be more located at the mitochondria, as evidence by increased mitochondrial superoxide production. In presence of APAP, NAPQI is generated at the mitochondria and will principally target mitochondrial proteins leading to reduced respiratory capacity (Ramachandran and Jaescke., 2019; McGill and Hinson., 2020). Further investigations are needed to better characterize NAPQI production at the subcellular level as well as the exact contribution of CYP2E1 in the observed effects.

In summary, we report new FAs inducers of CYP2E1 activity in HepaRG cells. PA- and SA-mediated CYP2E1 induction exacerbate acute APAP hepatotoxicity while LA-induced CYP2E1 activity did not despite increased lipid accumulation. Our results give new insight into FA-induced CYP2E1 activity and its role in the development of NAFLD. APAP-induced liver injury in the context of obesity and NAFLD is not solely dependent on CYP2E1 activity but most likely rely on pre-existing cellular inflammation and oxidative stress.

Conflict of interest statement

On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest.

Acknowledgement

This work was supported by INSERM (Institut National de la Recherche et de la Santé Médicale). A part of this work was also supported by Université de Rennes 1 (Défis Scientifiques), SFN (Société Française de Nutrition) and GLN (Groupe Lipides Nutrition). Clémence Penhoat was a recipient of a joint fellowship from the Region Bretagne (ARED) and INSERM. We are grateful to master students who participated to this work (Matthieu Franc, Jules Vaxelaire and Cassandra Rayer).

REFERENCES

- Abdelmegeed MA, Banerjee A, Yoo SH, Jang S, Gonzalez FJ, Song BJ. **Critical role of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in the development of high fat-induced non-alcoholic steatohepatitis.** J Hepatol. 2012 Oct;57(4):860-6. doi: 10.1016/j.jhep.2012.05.019. Epub 2012 Jun 2. PMID: 22668639
- Abdelmegeed MA, Ha SK, Choi Y, Akbar M, Song BJ. **Role of CYP2E1 in Mitochondrial Dysfunction and Hepatic Injury by Alcohol and Non-Alcoholic Substances.** Curr Mol Pharmacol. 2017;10(3):207-225. doi: 10.2174/1874467208666150817111114. PMID: 26278393
- Akazawa Y, Cazanave S, Mott JL, Elmi N, Bronk SF, Kohno S, Charlton MR, Gores GJ. **Palmitoleate attenuates palmitate-induced Bim and PUMA up-regulation and hepatocyte lipoapoptosis.** J Hepatol. 2010 Apr;52(4):586-93. doi: 10.1016/j.jhep.2010.01.003. Epub 2010 Feb 13. PMID: 20206402
- Allard J, Bucher S, Massart J, Ferron PJ, Le Guillou D, Loyant R, Daniel Y, Launay Y, Buron N, Begriche K, Borgne-Sanchez A, Fromenty B. **Drug-induced hepatic steatosis in absence of severe mitochondrial dysfunction in HepaRG cells: proof of multiple mechanism-based toxicity.** Cell Biol Toxicol. 2021 Apr;37(2):151-175. doi: 10.1007/s10565-020-09537-1. Epub 2020 Jun 14. PMID: 32535746
- Aubert J, Begriche K, Knockaert L, Robin MA, Fromenty B. **Increased expression of cytochrome P450 2E1 in nonalcoholic fatty liver disease: mechanisms and pathophysiological role.** Clin Res Hepatol Gastroenterol. 2011 Oct;35(10):630-7. doi: 10.1016/j.clinre.2011.04.015. Epub 2011 Jun 12. PMID: 21664213 Review.
- Aubert J, Begriche K, Delannoy M, Morel I, Pajaud J, Ribault C, Lepage S, McGill MR, Lucas-Clerc C, Turlin B, Robin MA, Jaeschke H, Fromenty B. **Differences in early acetaminophen hepatotoxicity between obese ob/ob and db/db mice.** J Pharmacol Exp Ther. 2012 Sep;342(3):676-87. doi: 10.1124/jpet.112.193813. Epub 2012 May 30. PMID: 22647274
- Begriche K, Lettéron P, Abbey-Toby A, Vadrot N, Robin MA, Bado A, Pessayre D, Fromenty B. **Partial leptin deficiency favors diet-induced obesity and related metabolic disorders in mice.** Am J Physiol Endocrinol Metab. 2008 May;294(5):E939-51. doi: 10.1152/ajpendo.00379.2007. Epub 2008 Mar 18. PMID: 18349116

- Begriche K, Massart J, Robin MA, Bonnet F, Fromenty B. **Mitochondrial adaptations and dysfunctions in nonalcoholic fatty liver disease.** Hepatology. 2013 Oct;58(4):1497-507. doi: 10.1002/hep.26226. Epub 2013 Aug 7. PMID: 23299992 Review
- Brown GT, Kleiner DE. **Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis.** Metabolism. 2016 Aug;65(8):1080-6. doi: 10.1016/j.metabol.2015.11.008. Epub 2015 Dec 2. PMID: 26775559
- Bucher S, Le Guillou D, Allard J, Pinon G, Begriche K, Tête A, Sergent O, Lagadic-Gossmann D, Fromenty B. Possible Involvement of Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in a Cellular Model of NAFLD Progression Induced by Benzo[a]pyrene/Ethanol CoExposure. Oxid Med Cell Longev. 2018 Jul 26; 2018:4396403. doi:10.1155/2018/4396403. eCollection 2018. PMID: 30147834
- Caro AA, Cederbaum AI. **Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1.** Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2004; 44:27-42. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121704. PMID: 14744237
- Chalasani N, Gorski JC, Asghar MS, Asghar A, Foresman B, Hall SD, Crabb DW. **Hepatic cytochrome P450 2E1 activity in nondiabetic patients with nonalcoholic steatohepatitis.** Hepatology. 2003 Mar;37(3):544-50. doi: 10.1053/jhep.2003.50095. PMID: 12601351
- Chen J, Jiang S, Wang J, Renukuntla J, Sirimulla S, Chen J. **A comprehensive review of cytochrome P450 2E1 for xenobiotic metabolism.** Drug Metab Rev. 2019 May;51(2):178-195. doi: 10.1080/03602532.2019.1632889. Epub 2019 Jun 28. PMID: 31203697
- Chomchai S, Chomchai C. **Being overweight or obese as a risk factor for acute liver injury secondary to acute acetaminophen overdose.** Pharmacoepidemiol Drug Saf. 2018 Jan;27(1):19-24. doi: 10.1002/pds.4339. Epub 2017 Nov 17. PMID: 29148111
- Chtioui H, Semela D, Ledermann M, Zimmermann A, Dufour JF. **Expression and activity of the cytochrome P450 2E1 in patients with nonalcoholic steatosis and steatohepatitis.** Liver Int. 2007 Aug;27(6):764-71. doi: 10.1111/j.1478-3231.2007.01524.x. PMID: 17617119
- Corcoran GB, Wong BK. **Obesity as a risk factor in drug-induced organ injury: increased liver and kidney damage by acetaminophen in the obese overfed rat.** J Pharmacol Exp Ther. 1987 Jun;241(3):921-7. PMID: 3598908

- Dulai PS, Singh S, Patel J, Soni M, Prokop LJ, Younossi Z, Sebastiani G, Ekstedt M, Hagstrom H, Nasr P, Stal P, Wong VW, Kechagias S, Hultcrantz R, Loomba R. **Increased risk of mortality by fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease: Systematic review and meta-analysis.** Hepatology. 2017 May;65(5):1557-1565. doi: 10.1002/hep.29085. Epub 2017 Mar 31. PMID: 28130788
- Eliasson E, Mkrtchian S, Ingelman-Sundberg M. **Hormone- and substrate-regulated intracellular degradation of cytochrome P450 (2E1) involving MgATP-activated rapid proteolysis in the endoplasmic reticulum membranes.** J Biol Chem. 1992 Aug 5;267(22):15765-9. PMID: 1639811
- Emery MG, Fisher JM, Chien JY, Kharasch ED, Dellinger EP, Kowdley KV, Thummel KE. **CYP2E1 activity before and after weight loss in morbidly obese subjects with nonalcoholic fatty liver disease.** Hepatology. 2003 Aug;38(2):428-35. doi: 10.1053/jhep.2003.50342. PMID: 12883487
- Fazel Y, Koenig AB, Sayiner M, Goodman ZD, Younossi ZM. **Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease.** Metabolism. 2016 Aug;65(8):1017-25. doi: 10.1016/j.metabol.2016.01.012. Epub 2016 Jan 29. PMID: 26997539 Review
- Greco D, Kotronen A, Westerbacka J, Puig O, Arkkila P, Kiviluoto T, Laitinen S, Kolak M, Fisher RM, Hamsten A, Auvinen P, Yki-Järvinen H. **Gene expression in human NAFLD.** Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2008 May;294(5):G1281-7. doi: 10.1152/ajpgi.00074.2008. Epub 2008 Apr 3. PMID: 18388185
- Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaize D, Canine I, Guyomard C, Lucas J, Trepo C, Guguen-Guillouzo C. **Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Nov 26;99(24):15655-60. doi: 10.1073/pnas.232137699. Epub 2002 Nov 13. PMID: 12432097
- Houten SM, Violante S, Ventura FV, Wanders RJ. **The Biochemistry and Physiology of Mitochondrial Fatty Acid β -Oxidation and Its Genetic Disorders.** Annu Rev Physiol. 2016;78:23-44. doi: 10.1146/annurev-physiol-021115-105045. Epub 2015 Oct 14. PMID: 26474213 Review
- Ipsen DH, Lykkesfeldt J, Tveden-Nyborg P. **Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease.** Cell Mol Life Sci. 2018 Sep;75(18):3313-3327. doi: 10.1007/s00018-018-2860-6. Epub 2018 Jun 23. PMID: 29936596 Free PMC article. Review.

- Ito Y, Abril ER, Bethea NW, McCuskey MK, McCuskey RS. **Dietary steatotic liver attenuates acetaminophen hepatotoxicity in mice.** Microcirculation. 2006 Jan;13(1):19-27. doi: 10.1080/10739680500383423. PMID: 16393943
- Jian T, Ao X, Wu Y, Lv H, Ma L, Zhao L, Tong B, Ren B, Chen J, Li W. **Total sesquiterpene glycosides from Loquat (*Eriobotrya japonica*) leaf alleviate high-fat diet induced non-alcoholic fatty liver disease through cytochrome P450 2E1 inhibition.** Biomed Pharmacother. 2017 Jul;91:229-237. doi: 10.1016/j.biopha.2017.04.056. Epub 2017 Apr 28. PMID: 28458161
- Jump DB, Botolin D, Wang Y, Xu J, Christian B, Demeure O. **Fatty acid regulation of hepatic gene transcription.** J Nutr. 2005 Nov;135(11):2503-6. doi: 10.1093/jn/135.11.2503. PMID: 16251601 Review.
- Jump DB. **N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription.** Curr Opin Lipidol. 2008 Jun;19(3):242-7. doi: 10.1097/MOL.0b013e3282ffaf6a. PMID: 18460914 Free PMC article. Review.
- Kangani CO, Kelley DE, Delany JP. **New method for GC/FID and GC-C-IRMS analysis of plasma free fatty acid concentration and isotopic enrichment.** J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2008 Sep 15;873(1):95-101. doi: 10.1016/j.jchromb.2008.08.009. Epub 2008 Aug 19. PMID: 18757250
- Kim TH, Choi D, Kim JY, Lee JH, Koo SH. **Fast food diet-induced non-alcoholic fatty liver disease exerts early protective effect against acetaminophen intoxication in mice.** BMC Gastroenterol. 2017 Nov 28;17(1):124. doi: 10.1186/s12876-017-0680-z. PMID: 29179698
- Koliaki C, Szendroedi J, Kaul K, Jelenik T, Nowotny P, Jankowiak F, Herder C, Carstensen M, Krausch M, Knoefel WT, Schlensak M, Roden M. **Adaptation of hepatic mitochondrial function in humans with non-alcoholic fatty liver is lost in steatohepatitis.** Cell Metab. 2015 May 5;21(5):739-46. doi: 10.1016/j.cmet.2015.04.004. PMID: 25955209
- Koonen DP, Jacobs RL, Febbraio M, Young ME, Soltys CL, Ong H, Vance DE, Dyck JR. **Increased hepatic CD36 expression contributes to dyslipidemia associated with diet-induced obesity.** Diabetes. 2007 Dec;56(12):2863-71. doi: 10.2337/db07-0907. Epub 2007 Aug 29. PMID: 17728375

- Koop DR, Tierney DJ. **Multiple mechanisms in the regulation of ethanol-inducible cytochrome P450IIE1.** Bioessays. 1990 Sep;12(9):429-35. doi: 10.1002/bies.950120906. PMID: 2256907 Review.
- Kučera O, Roušar T, Staňková P, Haňáčková L, Lotková H, Podhola M, Cervinková Z. **Susceptibility of rat non-alcoholic fatty liver to the acute toxic effect of acetaminophen.** J Gastroenterol Hepatol. 2012 Feb;27(2):323-30. doi: 10.1111/j.1440-1746.2011.06807.x. PMID: 21649732
- Le Guillou D, Bucher S, Begriche K, Hoët D, Lombès A, Labbe G, Fromenty B. **Drug-Induced Alterations of Mitochondrial DNA Homeostasis in Steatotic and Nonsteatotic HepaRG Cells.** J Pharmacol Exp Ther. 2018 Jun;365(3):711-726. doi: 10.1124/jpet.117.246751. Epub 2018 Apr 18. PMID: 29669730
- Leung JC, Loong TC, Wei JL, Wong GL, Chan AW, Choi PC, Shu SS, Chim AM, Chan HL, Wong VW. **Histological severity and clinical outcomes of nonalcoholic fatty liver disease in nonobese patients.** Hepatology. 2017 Jan;65(1):54-64. doi: 10.1002/hep.28697. Epub 2016 Jul 25. PMID: 27339817
- Leung TM, Nieto N. **CYP2E1 and oxidant stress in alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease.** J Hepatol. 2013 Feb;58(2):395-8. doi: 10.1016/j.jhep.2012.08.018. Epub 2012 Aug 28. PMID: 22940046
- Lindenmeyer CC, McCullough AJ. Clin Liver Dis. **The Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease-An Evolving View.** 2018 Feb;22(1):11-21. doi: 10.1016/j.cld.2017.08.003. PMID: 29128051
- Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV Jr, Ory DS, Schaffer JE. **Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Mar 18;100(6):3077-82. doi: 10.1073/pnas.0630588100. Epub 2003 Mar 10. PMID: 12629214
- Liu Y, Liao L, Chen Y, Han F. **Effects of daphnetin on lipid metabolism, insulin resistance and oxidative stress in OA-treated HepG2 cells.** Mol Med Rep. 2019 Jun;19(6):4673-4684. doi: 10.3892/mmr.2019.10139. Epub 2019 Apr 5. PMID: 30957185
- Loomba R, et al. **Mechanisms and disease consequences of nonalcoholic fatty liver disease.** Cell. 2021. PMID: 33989548 Review.

- Massart J, Begriche K, Hartman JH, Fromenty B. **Role of Mitochondrial Cytochrome P450 2E1 in Healthy and Diseased Liver.** Cells. 2022 Jan 15;11(2):288. doi: 10.3390/cells11020288. PMID: 35053404
- McGill MR, Yan HM, Ramachandran A, Murray GJ, Rollins DE, Jaeschke H. **HepaRG cells: a human model to study mechanisms of acetaminophen hepatotoxicity.** Hepatology. 2011 Mar;53(3):974-82. doi: 10.1002/hep.24132. Epub 2011 Feb 11. PMID: 21319200
- McGill MR, Hinson JA. **The development and hepatotoxicity of acetaminophen: reviewing over a century of progress.** Drug Metab Rev. 2020 Nov;52(4):472-500. doi: 10.1080/03602532.2020.1832112. Epub 2020 Oct 14. PMID: 33103516
- McMillian MK, Grant ER, Zhong Z, Parker JB, Li L, Zivin RA, Burczynski ME, Johnson MD. **Nile Red binding to HepG2 cells: an improved assay for in vitro studies of hepatosteatosis.** In Vitro Mol Toxicol. 2001 Fall;14(3):177-90. doi: 10.1089/109793301753407948. PMID: 11846991
- Michaut A, Moreau C, Robin MA, Fromenty B. **Acetaminophen-induced liver injury in obesity and nonalcoholic fatty liver disease.** Liver Int. 2014 Aug;34(7):e171-9. doi: 10.1111/liv.12514. Epub 2014 Mar 21. PMID: 24575957 Review
- Michaut A, Le Guillou D, Moreau C, Bucher S, McGill MR, Martinais S, Gicquel T, Morel I, Robin MA, Jaeschke H, Fromenty B. **A cellular model to study drug-induced liver injury in nonalcoholic fatty liver disease: Application to acetaminophen.** Toxicol Appl Pharmacol. 2016 Feb 1; 292:40-55. doi: 10.1016/j.taap.2015.12.020. Epub 2015 Dec 29. PMID: 26739624
- Miquilena-Colina ME, Lima-Cabello E, Sánchez-Campos S, García-Mediavilla MV, Fernández-Bermejo M, Lozano-Rodríguez T, Vargas-Castrillón J, Buqué X, Ochoa B, Aspichueta P, González-Gallego J, García-Monzón C. **Hepatic fatty acid translocase CD36 upregulation is associated with insulin resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C.** Gut. 2011 Oct;60(10):1394-402. doi: 10.1136/gut.2010.222844. Epub 2011 Jan 26. PMID: 21270117
- Morio B, Panthu B, Bassot A, Rieusset J. **Role of mitochondria in liver metabolic health and diseases.** Cell Calcium. 2021 Mar;94:102336. doi: 10.1016/j.ceca.2020.102336. Epub 2020 Dec 25. PMID: 33387847 Review.

- Myers RP, Shaheen AA. **Hepatitis C, alcohol abuse, and unintentional overdoses are risk factors for acetaminophen-related hepatotoxicity.** Hepatology. 2009 Apr;49(4):1399-400. doi: 10.1002/hep.22798. PMID: 19330871
- Nguyen GC, Sam J, Thuluvath PJ. **Hepatitis C is a predictor of acute liver injury among hospitalizations for acetaminophen overdose in the United States: a nationwide analysis.** Hepatology. 2008 Oct;48(4):1336-41. doi: 10.1002/hep.22536. PMID: 18821593
- Niemelä O, Parkkila S, Juvonen RO, Viitala K, Gelboin HV, Pasanen M. **Cytochromes P450 2A6, 2E1, and 3A and production of protein-aldehyde adducts in the liver of patients with alcoholic and non-alcoholic liver diseases.** J Hepatol. 2000 Dec;33(6):893-901. doi: 10.1016/s0168-8278(00)80120-8. PMID: 11131450
- Novak RF, Woodcroft KJ. **The alcohol-inducible form of cytochrome P450 (CYP 2E1): role in toxicology and regulation of expression.** Arch Pharm Res. 2000 Aug;23(4):267-82. doi: 10.1007/BF02975435. PMID: 10976571 Review
- Orellana M, Rodrigo R, Varela N, Araya J, Poniachik J, Csendes A, Smok G, Videla LA. **Relationship between in vivo chlorzoxazone hydroxylation, hepatic cytochrome P450 2E1 content and liver injury in obese non-alcoholic fatty liver disease patients.** Hepatol Res. 2006 Jan;34(1):57-63. doi: 10.1016/j.hepres.2005.10.001. PMID: 16321567
- Osabe M, Sugatani J, Fukuyama T, Ikushiro S, Ikari A, Miwa M. **Expression of hepatic UDP-glucuronosyltransferase 1A1 and 1A6 correlated with increased expression of the nuclear constitutive androstane receptor and peroxisome proliferator-activated receptor alpha in male rats fed a high-fat and high-sucrose diet.** Drug Metab Dispos. 2008 Feb;36(2):294-302. doi: 10.1124/dmd.107.017731. Epub 2007 Oct 29. PMID: 17967931
- Pardo V, González-Rodríguez Á, Muntané J, Kozma SC, Valverde ÁM. **Role of hepatocyte S6K1 in palmitic acid-induced endoplasmic reticulum stress, lipotoxicity, insulin resistance and in oleic acid-induced protection.** Food Chem Toxicol. 2015 Jun;80:298-309. doi: 10.1016/j.fct.2015.03.029. Epub 2015 Apr 3. PMID: 25846498
- Pawar A, Jump DB. **Unsaturated fatty acid regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity in rat primary hepatocytes.** J Biol Chem. 2003 Sep 19;278(38):35931-9. doi: 10.1074/jbc.M306238200. Epub 2003 Jul 9. PMID: 12853447

- Pawella LM, Hashani M, Eiteneuer E, Renner M, Bartenschlager R, Schirmacher P, Straub BK. **Perilipin discerns chronic from acute hepatocellular steatosis.** J Hepatol. 2014 Mar;60(3):633-42. doi: 10.1016/j.jhep.2013.11.007. Epub 2013 Nov 19. PMID: 24269473
- Piccinin E, Ducheix S, Peres C, Arconzo M, Vegliante MC, Ferretta A, Bellafante E, Villani G, Moschetta A. **PGC-1 β Induces Susceptibility To Acetaminophen-Driven Acute Liver Failure.** Sci Rep. 2019 Nov 14;9(1):16821. doi: 10.1038/s41598-019-53015-6. PMID: 31727907
- Polyzos SA, Kountouras J, Mantzoros CS. **Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics.** Metabolism. 2019 Mar; 92:82-97. doi: 10.1016/j.metabol.2018.11.014. Epub 2018 Nov 29. PMID: 30502373
- Puri P, Baillie RA, Wiest MM, Mirshahi F, Choudhury J, Cheung O, Sargeant C, Contos MJ, Sanyal AJ. **A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease.** Hepatology. 2007 Oct;46(4):1081-90. doi: 10.1002/hep.21763. PMID: 17654743
- Quesnot N, Bucher S, Gade C, Vlach M, Vene E, Valença S, Gicquel T, Holst H, Robin MA, Loyer P. **Production of chlorzoxazone glucuronides via cytochrome P4502E1 dependent and independent pathways in human hepatocytes.** Arch Toxicol. 2018 Oct;92(10):3077-3091. doi: 10.1007/s00204-018-2300-2. Epub 2018 Aug 27. PMID: 30151596
- Radosevich JJ, Patanwala AE, Erstad BL. **Hepatotoxicity in Obese Versus Nonobese Patients With Acetaminophen Poisoning Who Are Treated With Intravenous N-Acetylcysteine.** Am J Ther. 2016 May-Jun;23(3): e714-9. doi: 10.1097/01.mjt.0000434043.62372.00. PMID: 24263163
- Ramachandran A, Jaeschke H. **Acetaminophen Hepatotoxicity.** Semin Liver Dis. 2019 May;39(2):221-234. doi: 10.1055/s-0039-1679919. Epub 2019 Mar 8. PMID: 30849782
- Raucy JL, Lasker JM, Kraner JC, Salazar DE, Lieber CS, Corcoran GB. **Induction of cytochrome P450IIE1 in the obese overfed rat.** Mol Pharmacol. 1991 Mar;39(3):275-80. PMID: 2005876
- Raucy JL, Lasker J, Ozaki K, Zoleta V. **Regulation of CYP2E1 by ethanol and palmitic acid and CYP4A11 by clofibrate in primary cultures of human hepatocytes.** Toxicol Sci. 2004 Jun;79(2):233-41. doi: 10.1093/toxsci/kfh126. Epub 2004 Mar 31. PMID: 15056802

- Reddy JK, Rao MS. Lipid metabolism and liver inflammation. II. **Fatty liver disease and fatty acid oxidation**. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2006 May;290(5):G852-8. doi: 10.1152/ajpgi.00521.2005. PMID: 16603729
- Ren LP, Chan SM, Zeng XY, Laybutt DR, Iseli TJ, Sun RQ, Kraegen EW, Cooney GJ, Turner N, Ye JM. **Differing endoplasmic reticulum stress response to excess lipogenesis versus lipid oversupply in relation to hepatic steatosis and insulin resistance**. PLoS One. 2012;7(2):e30816. doi: 10.1371/journal.pone.0030816. Epub 2012 Feb 15. PMID: 22355328
- Robertson G, Leclercq I, Farrell GC. **Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress**. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2001 Nov;281(5): G1135-9. doi: 10.1152/ajpgi.2001.281.5. G1135. PMID: 11668021
- Rutherford A, Davern T, Hay JE, Murray NG, Hassanein T, Lee WM, Chung RT; Acute Liver Failure Study Group. **Influence of high body mass index on outcome in acute liver failure**. Clin Gastroenterol Hepatol. 2006 Dec;4(12):1544-9. doi: 10.1016/j.cgh.2006.07.014. Epub 2006 Sep 25. PMID: 16996806
- Sheka AC, Adeyi O, Thompson J, Hameed B, Crawford PA, Ikramuddin S. **Nonalcoholic Steatohepatitis: A Review**. JAMA. 2020 Mar 24;323(12):1175-1183. doi: 10.1001/jama.2020.2298. PMID: 32207804
- Shi C, Xue W, Han B, Yang F, Yin Y, Hu C. **Acetaminophen aggravates fat accumulation in NAFLD by inhibiting autophagy via the AMPK/mTOR pathway**. Eur J Pharmacol. 2019 May 5;850:15-22. doi: 10.1016/j.ejphar.2019.02.005. Epub 2019 Feb 10. PMID: 30753863
- Song BJ, Matsunaga T, Hardwick JP, Park SS, Veech RL, Yang CS, Gelboin HV, Gonzalez FJ Song BJ, Matsunaga T, Hardwick JP, Park SS, Veech RL, Yang CS, Gelboin HV, Gonzalez FJ. **Stabilization of cytochrome P450j messenger ribonucleic acid in the diabetic rat**. Mol Endocrinol. 1987 Aug;1(8):542-7. doi: 10.1210/mend-1-8-542. PMID: 3153476
- Sung M, Kim I, Park M, Whang Y, Lee M. **Differential effects of dietary fatty acids on the regulation of CYP2E1 and protein kinase C in human hepatoma HepG2 cells**. J Med Food. 2004 Summer;7(2):197-203. doi: 10.1089/1096620041224157. PMID: 15298768
- Stefan N, Cusi K. **A global view of the interplay between non-alcoholic fatty liver disease and diabetes**. Lancet Diabetes Endocrinol. 2022 Apr;10(4):284-296. doi: 10.1016/S2213-8587(22)00003-1. Epub 2022 Feb 17. PMID: 35183303

- Suriano F, Vieira-Silva S, Falony G, Roumain M, Paquot A, Pelicaen R, Régnier M, Delzenne NM, Raes J, Muccioli GG, Van Hul M, Cani PD. **Novel insights into the genetically obese (ob/ob) and diabetic (db/db) mice: two sides of the same coin.** Microbiome. 2021 Jun 28;9(1):147. doi: 10.1186/s40168-021-01097-8. PMID: 34183063
- Suzuki A, Diehl AM. **Nonalcoholic Steatohepatitis.** Annu Rev Med. 2017 Jan 14; 68:85-98. doi: 10.1146/annurev-med-051215-031109. Epub 2016 Oct 5. PMID: 27732787 Review.
- Taylor RS, Taylor RJ, Bayliss S, Hagström H, Nasr P, Schattenberg JM, Ishigami M, Toyoda H, Wai-Sun Wong V, Peleg N, Shlomain A, Sebastiani G, Seko Y, Bhala N, Younossi ZM, Anstee QM, McPherson S, Newsome PN. **Association Between Fibrosis Stage and Outcomes of Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis.** Gastroenterology. 2020 May;158(6):1611-1625.e12. doi: 10.1053/j.gastro.2020.01.043. Epub 2020 Feb 4. PMID: 32027911
- Wang P, Shao X, Bao Y, Zhu J, Chen L, Zhang L, Ma X, Zhong XB. **Impact of obese levels on the hepatic expression of nuclear receptors and drug-metabolizing enzymes in adult and offspring mice.** Acta Pharm Sin B. 2020 Jan;10(1):171-185. doi: 10.1016/j.apsb.2019.10.009. Epub 2019 Nov 28. PMID: 31993314
- Wanless IR, et al. **Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors.** Hepatology. 1990. PMID: 2227807
- Wei Y, Wang D, Gentile CL, Pagliassotti MJ. **Reduced endoplasmic reticulum luminal calcium links saturated fatty acid-mediated endoplasmic reticulum stress and cell death in liver cells.** Mol Cell Biochem. 2009 Nov;331(1-2):31-40. doi: 10.1007/s11010-009-0142-1. Epub 2009 May 15. PMID: 19444596
- Weltman MD, Farrell GC, Liddle C. **Increased hepatocyte CYP2E1 expression in a rat nutritional model of hepatic steatosis with inflammation.** Gastroenterology. 1996 Dec;111(6):1645-53. doi: 10.1016/s0016-5085(96)70028-8. PMID: 8942745
- Weltman MD, Farrell GC, Hall P, Ingelman-Sundberg M, Liddle C. **Hepatic cytochrome P450 2E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis.** Hepatology. 1998 Jan;27(1):128-33. doi: 10.1002/hep.510270121. PMID: 9425928
- Yang Y, Chen M, Loux TJ, Harmon CM. **Regulation of FAT/CD36 mRNA gene expression by long chain fatty acids in the differentiated 3T3-L1 cells.** Pediatr Surg Int. 2007 Jul;23(7):675-83. doi: 10.1007/s00383-007-1942-6. Epub 2007 May 22. PMID: 17516074

- Yang J, Peng T, Huang J, Zhang G, Xia J, Ma M, Deng D, Gong D, Zeng Z. **Effects of medium- and long-chain fatty acids on acetaminophen- or rifampicin-induced hepatocellular injury.** Food Sci Nutr. 2020 May 19;8(7):3590-3601. doi: 10.1002/fsn3.1641. eCollection 2020 Jul. PMID: 32724621
- Yoo JS, Ning SM, Pantuck CB, Pantuck EJ, Yang CS. **Regulation of hepatic microsomal cytochrome P450IIE1 level by dietary lipids and carbohydrates in rats.** J Nutr. 1991 Jul;121(7):959-65. doi: 10.1093/jn/121.7.959. PMID: 2051238
- Younossi ZM. **Non-alcoholic fatty liver disease - A global public health perspective.** J Hepatol. 2019 Mar;70(3):531-544. doi: 10.1016/j.jhep.2018.10.033. Epub 2018 Nov 9. PMID: 30414863
- Zhu L, Baker SS, Liu W, Tao MH, Patel R, Nowak NJ, Baker RD. **Lipid in the livers of adolescents with nonalcoholic steatohepatitis: combined effects of pathways on steatosis.** Metabolism. 2011 Jul;60(7):1001-11. doi: 10.1016/j.metabol.2010.10.003. Epub 2010 Nov 13. PMID: 21075404

Figures

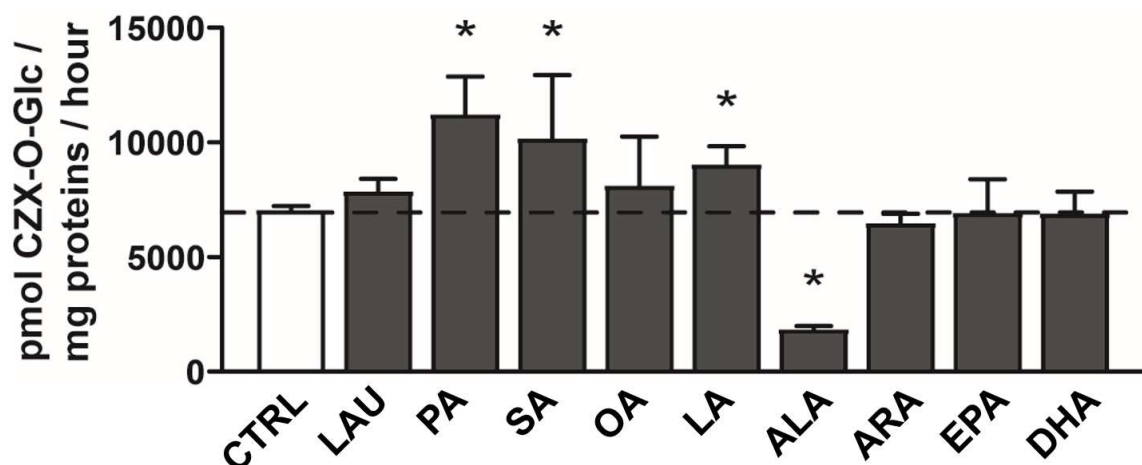


Figure 1: CYP2E1 activity in HepaRG cells treated for 1 week with various fatty acids

Differentiated HepaRG cells were incubated for 1 week with 150 μ M of lauric (C12:0), palmitic (C16:0), stearic (C18:0), oleic (C18:1), linoleic (C18:2) or α -linolenic (C18:3) acids; or with 25 μ M of arachidonic (C20:4), eicosapentaenoic (C20:5) and docosahexaenoic (C22:6) acids. Results are expressed as mean $\pm$ SEM from 4 independent cell cultures. The horizontal dashed line represents the level of vehicle-treated control cells (CTRL). * significantly different from control cells (CTRL) ($p \leq 0.05$)

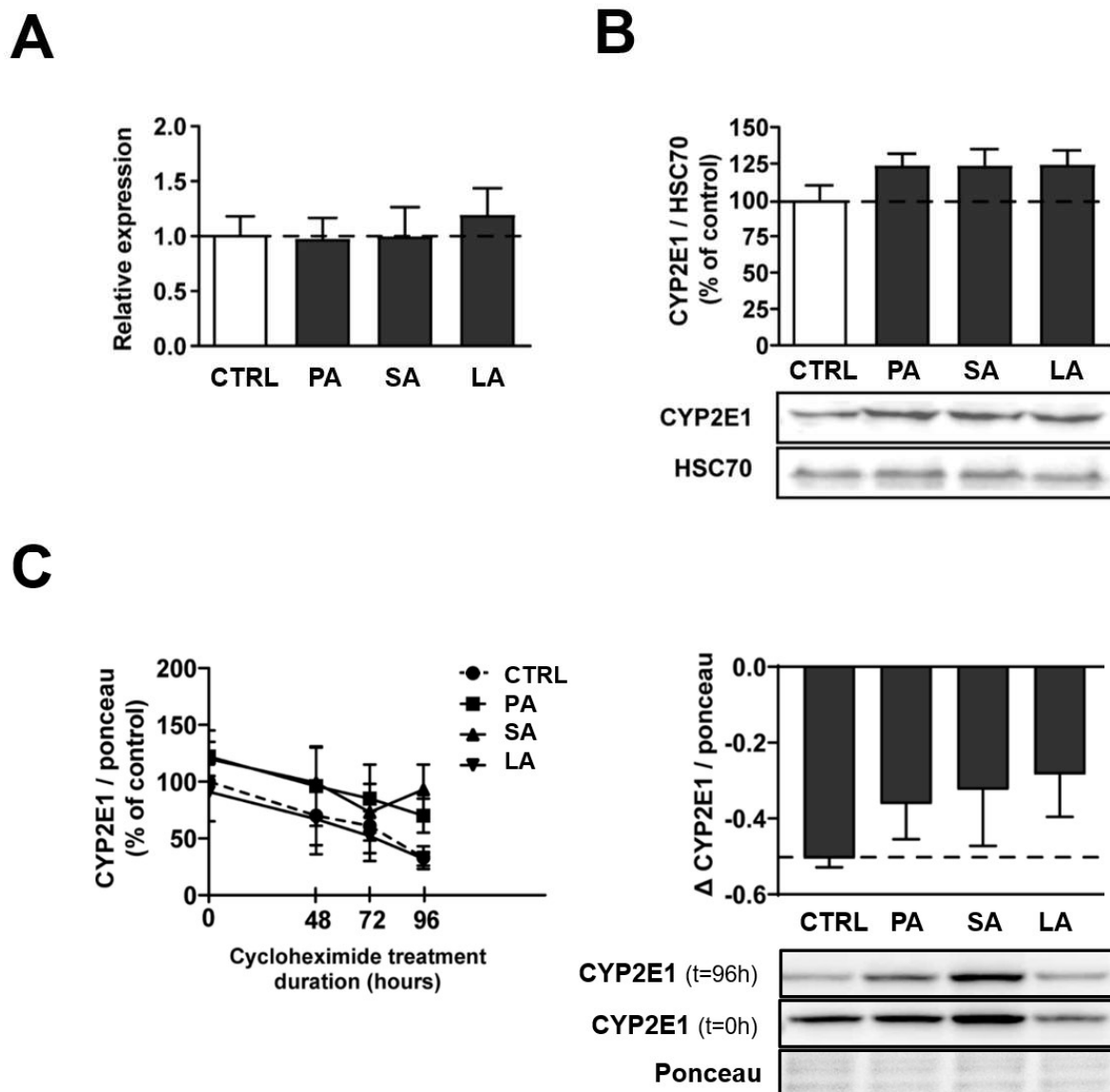


Figure 2: CYP2E1 expression in HepaRG cells treated for 1 week with palmitic, stearic or linoleic acids

Differentiated HepaRG cells were incubated for 1 week with 150 μ M of palmitic (C16:0), stearic (C18:0) or linoleic (C18:2) acids. (A) Gene expression of *CYP2E1* determined by RT-qPCR (n=7). (B) Western blot analysis of CYP2E1 (n=4) with a representative image. (C) CYP2E1 protein expression in response to cycloheximide time course treatment (n=5) and relative decrease in expression over the 96 h time course. Results are expressed as mean $\pm$ SEM. n indicates the number of independent cell cultures. The dashed line represents the level of control cells (CTRL).

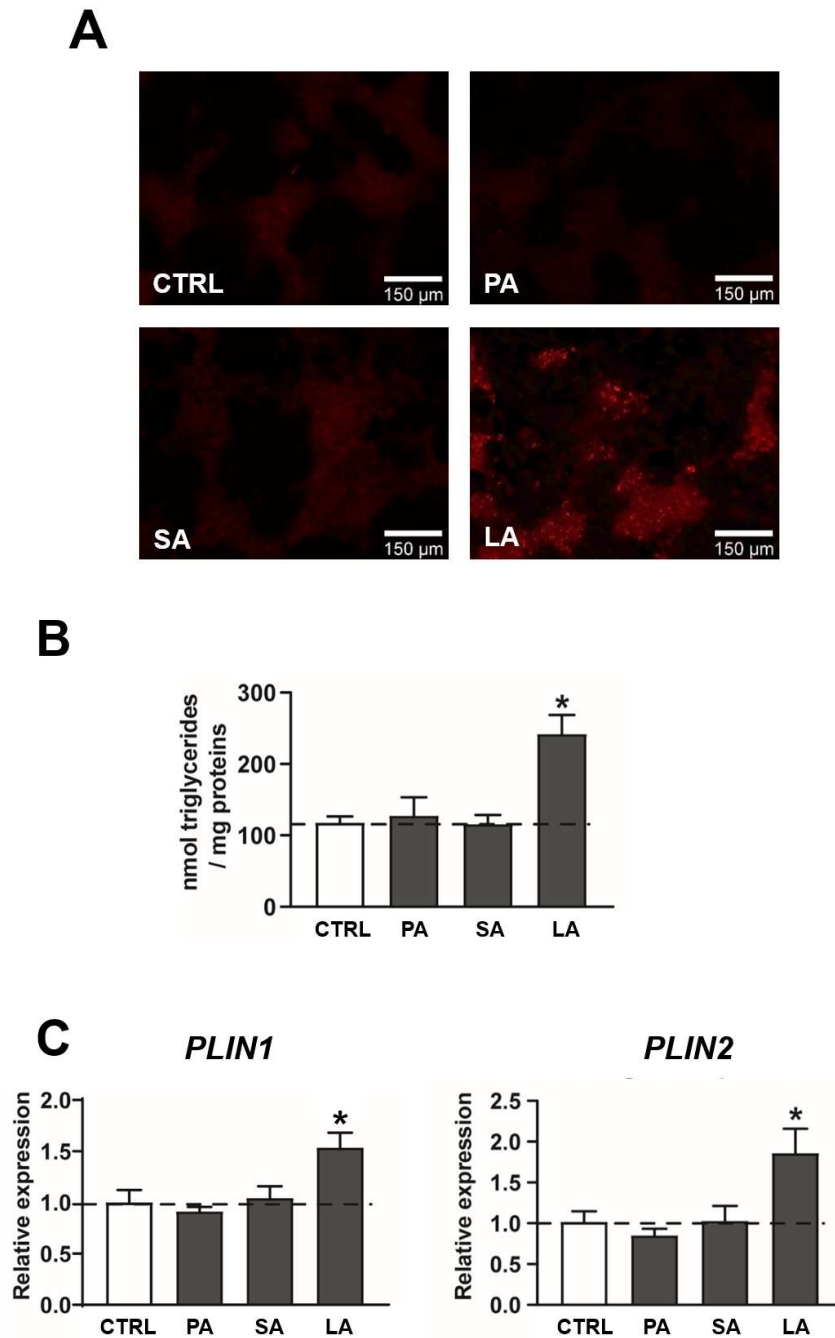


Figure 3: Steatosis in HepaRG cells treated for 1 week with palmitic, stearic or linoleic acids

Differentiated HepaRG cells were incubated for 1 week with 150 μ M of palmitic (C16:0), stearic (C18:0) or linoleic (C18:2) acids. (A) Cellular neutral lipids stained with Nile Red. (B) Cellular levels of triglycerides (n=5). (C) Gene expression of perilipin 1 (*PLIN1*) and perilipin 2 (*PLIN2*) determined by RT-qPCR (n=7). Results are expressed as mean $\pm$ SEM. n indicates the number of independent cell cultures. The dashed line represents the level of control cells (CTRL). * significantly different from control cells (CTRL) ($p \leq 0.05$).

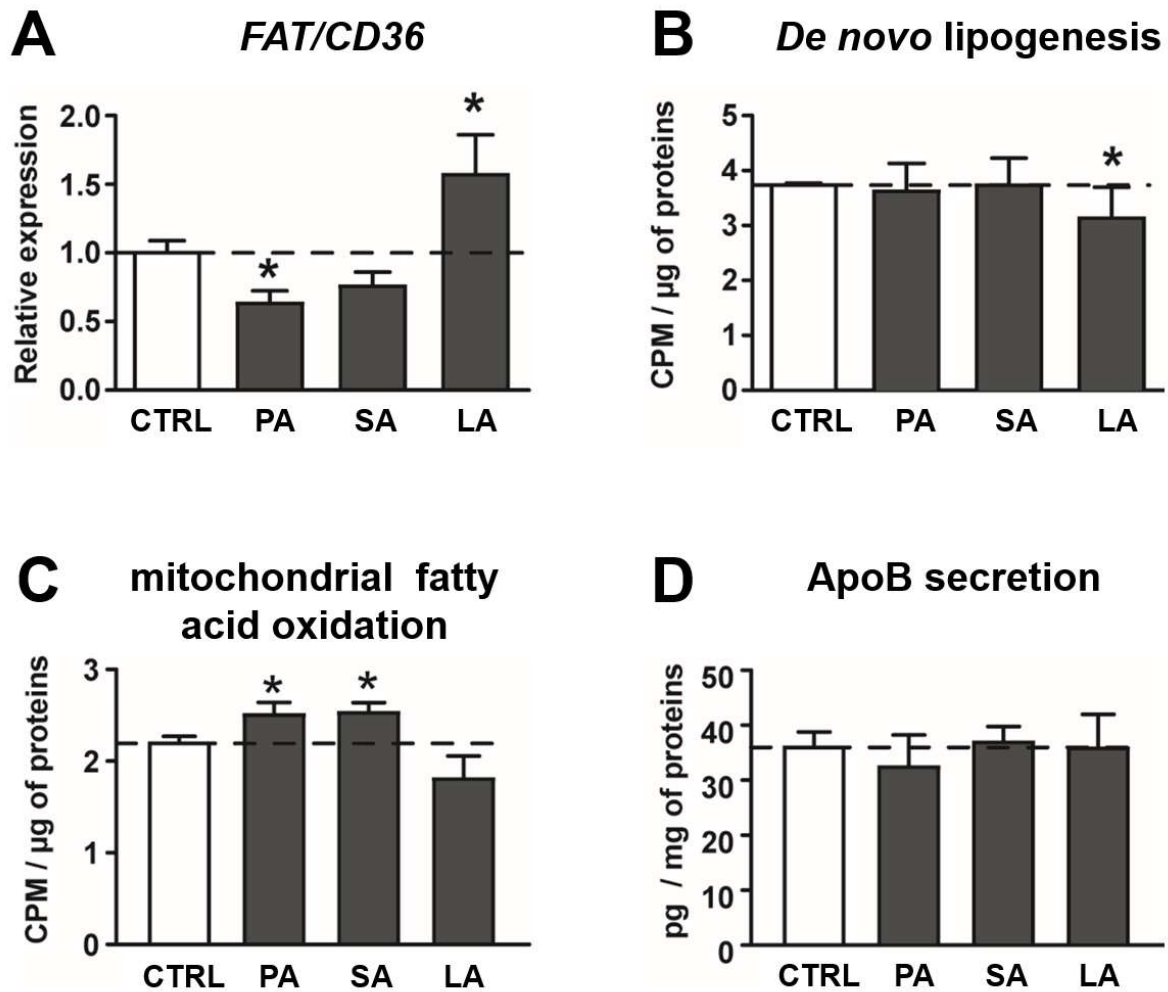


Figure 4: *FAT/CD36* gene expression, *de novo* lipogenesis, mitochondrial fatty acid oxidation and ApoB secretion in HepaRG cells treated for 1 week with palmitic, stearic or linoleic acids

Differentiated HepaRG cells were incubated for 1 week with 150 μ M of palmitic (C16:0), stearic (C18:0) or linoleic (C18:2) acids. (A) *FAT/CD36* gene expression (n=7). (B) *De novo* lipogenesis (n=7). (C) Mitochondrial fatty acid oxidation (n=7). (D) ApoB secretion (n=3). Results are expressed as mean $\pm$ SEM. n indicates the number of independent cell cultures. The dashed line represents the level of control cells (CTRL). * significantly different from control cells (CTRL) ($p \leq 0.05$).

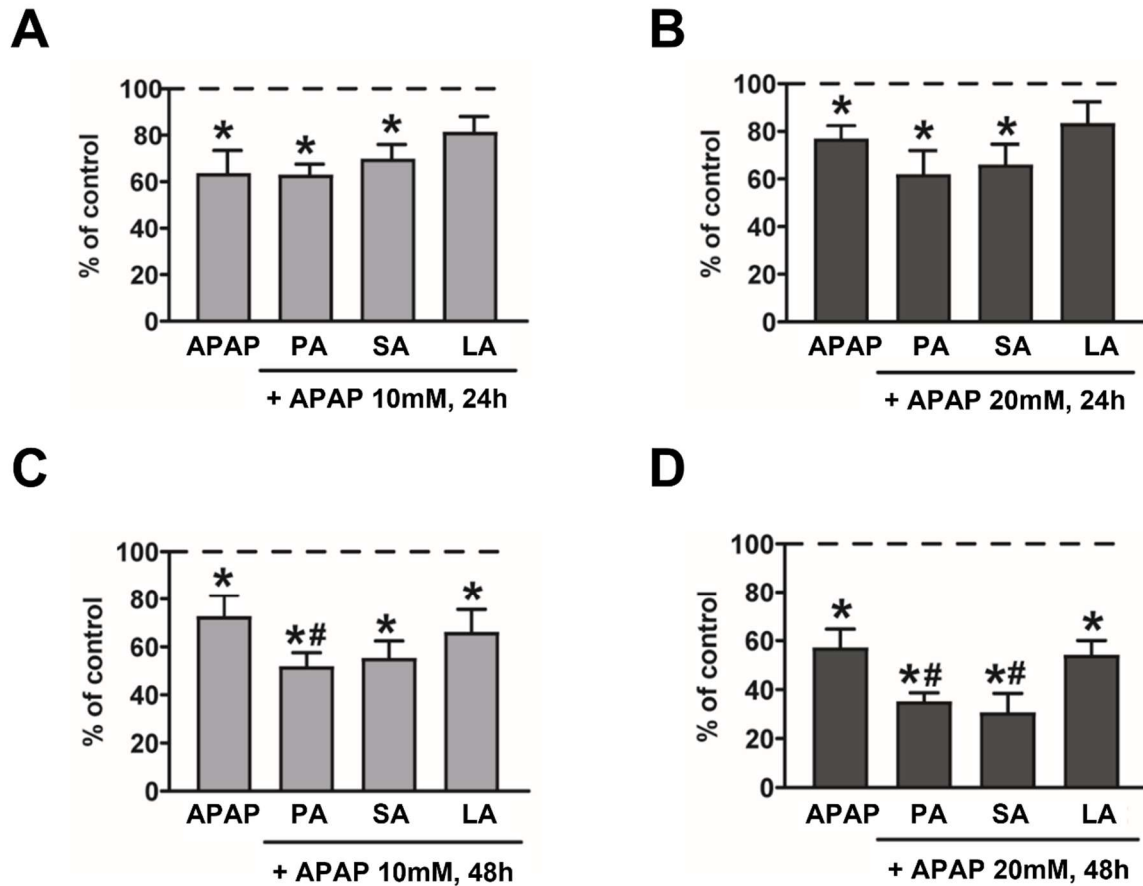


Figure 5: ATP levels in HepaRG cells treated for 1 week with palmitic, stearic or linoleic acids

Differentiated HepaRG cells were incubated for 1 week with 150 μ M of palmitic (C16:0), stearic (C18:0) or linoleic (C18:2) acids and exposed to 10 mM or 20 mM of acetaminophen (APAP) for the last 24 h or 48 h of the treatment. APAP toxicity was assessed by quantification of intracellular ATP levels. ATP levels after a 10 mM (A) or 20 mM (B) of APAP treatment for 24 h (n=5). ATP levels after a 10 mM (C) or 20 mM (D) of APAP treatment for 48 h (n=5). Results are expressed as mean $\pm$ SEM. n indicates the number of independent cell cultures. The dashed line represents the level of control cells (CTRL). * significantly different from control cells (CTRL) ($p \leq 0.05$). # significantly different from HepaRG cells treated with APAP and without fatty acids ($p \leq 0.05$).

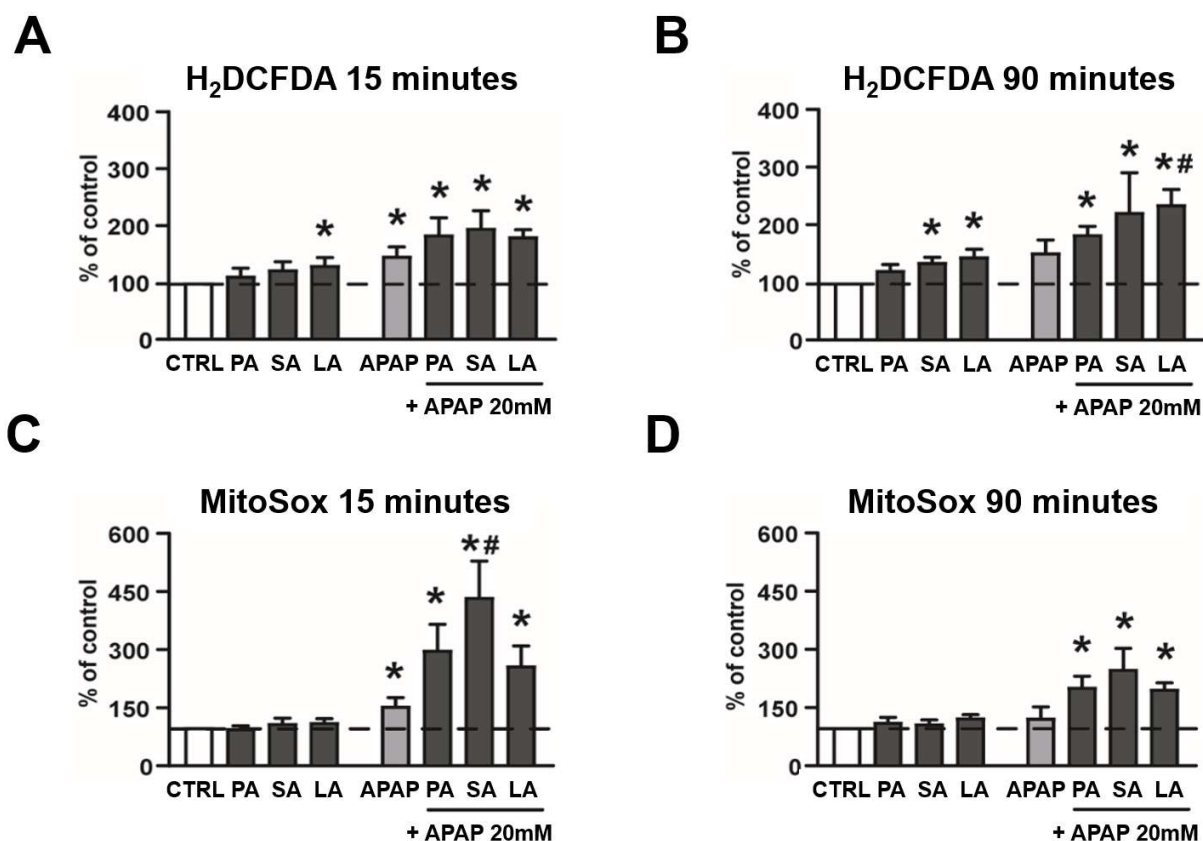


Figure 6: Oxidative stress in HepaRG cells treated for 1 week with palmitic, stearic or linoleic acids and exposed or not to acetaminophen

Differentiated HepaRG cells were incubated for 1 week with 150 μ M of palmitic (C16:0), stearic (C18:0) or linoleic (C18:2) acids and exposed or not to 20 mM of acetaminophen (APAP) for the last 24 h of the treatment. Oxidative stress was measured 15 or 90 minutes after the last addition of FAs and APAP with H₂DCFDA and MitoSox probes that detect hydrogen peroxides and superoxide anion respectively. Hydrogen peroxides levels at 15 minutes (A) and 90 minutes (B) (n=5). Mitochondrial superoxide anion levels at 15 minutes (C) and 90 minutes (D) (n=5). Results are expressed as mean $\pm$ SEM. n indicates the number of independent cell cultures. The dashed line represents the level of control cells (CTRL). * significantly different from control cells (CTRL) ($p \leq 0.05$). # significantly different from HepaRG cells treated with APAP and without fatty acids ($p \leq 0.05$)

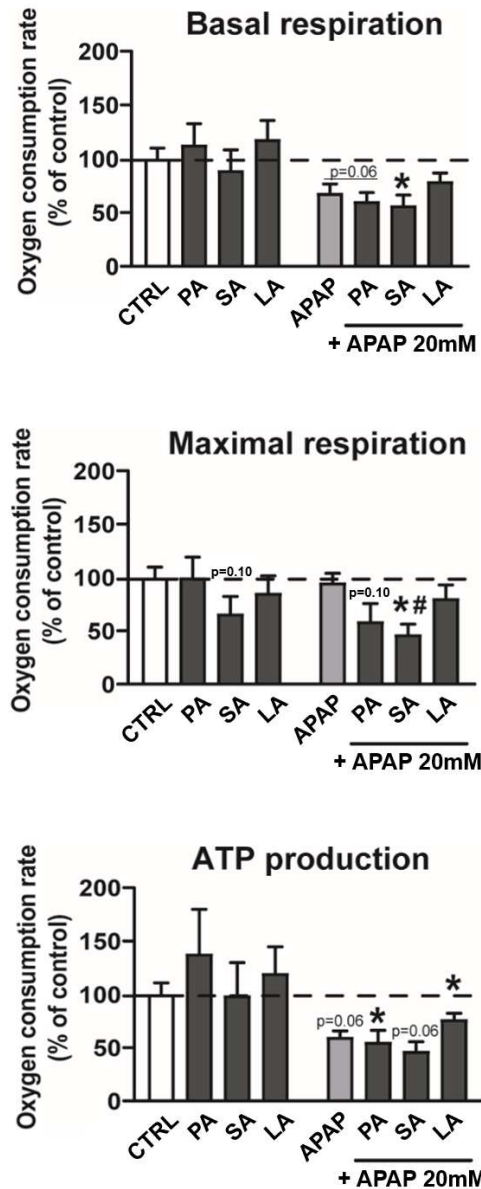


Figure 7: Mitochondrial respiration in HepaRG cells treated for 1 week with palmitic, stearic or linoleic acids and exposed or not to acetaminophen

Differentiated HepaRG cells were incubated for 1 week with 150 μ M of palmitic (C16:0), stearic (C18:0) or linoleic (C18:2) acids and exposed or not to 20 mM of acetaminophen (APAP) for the last 24 h of the treatment. Basal, maximal mitochondrial respiration and ATP production coupled to mitochondrial respiration profiles were provided by the XF Cell Seahorse Mito Stress Test. Results are expressed as mean $\pm$ SEM from 5 independent cultures. * significantly different from control cells (CTRL) ($p \leq 0.05$). # significantly different from HepaRG cells treated with APAP and without fatty acids ($p \leq 0.05$).

Table 1

Primer name	Forward	Reverse	Accession number
Cyclophilin B (CYCLO B)	CAGTGGATAATTTTGTGGCCTTAG	CTCACCGTAGATGCTCTTTCC	NM_000942.5
Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1)	GAACTTCCACCTACTCAGCAC	CTCCTTCACCCTTTCAGACAC	NM_000773.4
Fatty acid translocase (FAT/CD36)	GCCAGGTATTGCAGTTCTTTTC	TGTCTGGGTTTTCAACTGGAG	NM_001001548.3
Perilipin 1 (PLIN 1)	GCCATGTCCCTATCAGATGC	GTTGTCGATGTCCCGCCGGAATT	NM_002666.5
Perilipin 2 (PLIN 2)	GCTCCATTCTACTGTTACCTG	CTCCTTTTCCACTCTACCCATG	NM_001122.4

Supplementary data

Supplementary Materials and Methods

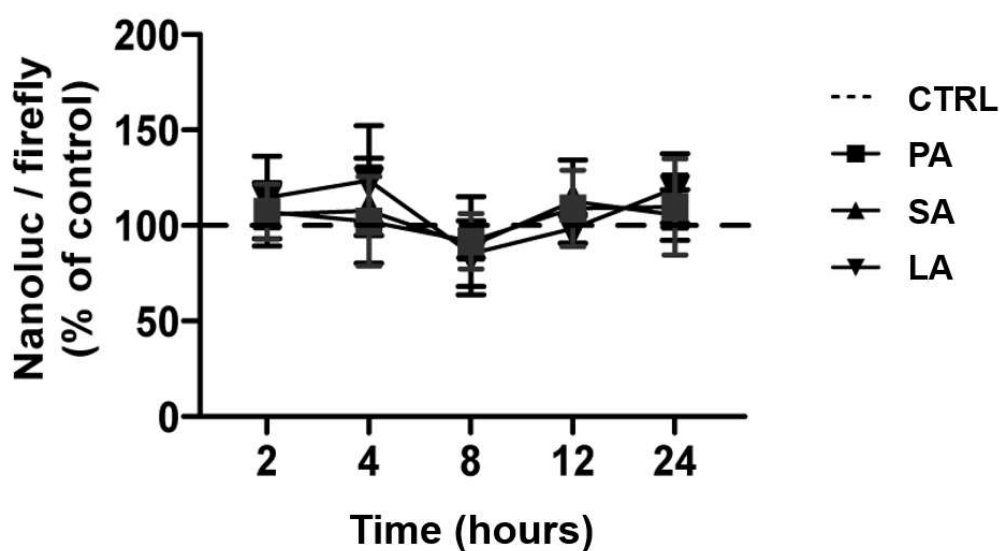
Fatty acid composition of lipid and triglyceride fractions

Hexane–isopropanol (3/2, v/v) was used to extract total lipids from HepaRG cells treated with 150 μ M of palmitic, stearic and linoleic acids for 1 week (Rioux et al., 2000). Lipid classes were then separated by thin layer chromatography. Glass plates (20×20 cm) were coated with SilicaGel 60H (Merck, Darmstadt, Germany) according to 0.5-mm thickness. Glass plates with samples were developed with a mix of hexane/diethyl ether/acetic acid (85/15/1, v/v/v). Spots of interest were revealed with primuline (0.02% in acetone w/v) under UV light and then collected. To determine fatty acid composition of total lipid and triglyceride fractions, fatty acids of each fraction were transformed to *Fatty Acid Methyl Esters (FAMES)*. *First*, fatty acids were methylated according to a two-step procedure using NaOH (0.5 M in methanol) and BF₃ (12% in methanol) (Metcalf et al., 1966) and then extracted twice with pentane and NaCl (0.9%). Then, FAMES were analyzed with an Agilent 6890N gas chromatograph (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with a bonded fused silica capillary column (BPX70; 60 m×0.25 mm, 0.25 μ m thickness; SGE Analytical Science, Melbourne, Australia). The temperature program started at 150°C, then increased to 250°C at 4°C/min and finally held for 2 min. Helium was used as carrier gas. Mass spectra were recorded with an Agilent 5975C (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) operated under electron impact ionization conditions (electron energy 70 eV, source temperature 230°C). Mass spectrum of peaks was carefully checked to ensure proper identification. Peak integration was accomplished with MassHunter WorkStation Software Qualitative Analysis vB.07.00 (Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA). Fatty acid data were handled as a percentage of total fatty acids and then expressed as percentage of control.

Cloning of CYP2E1 promoter and transcriptional assay

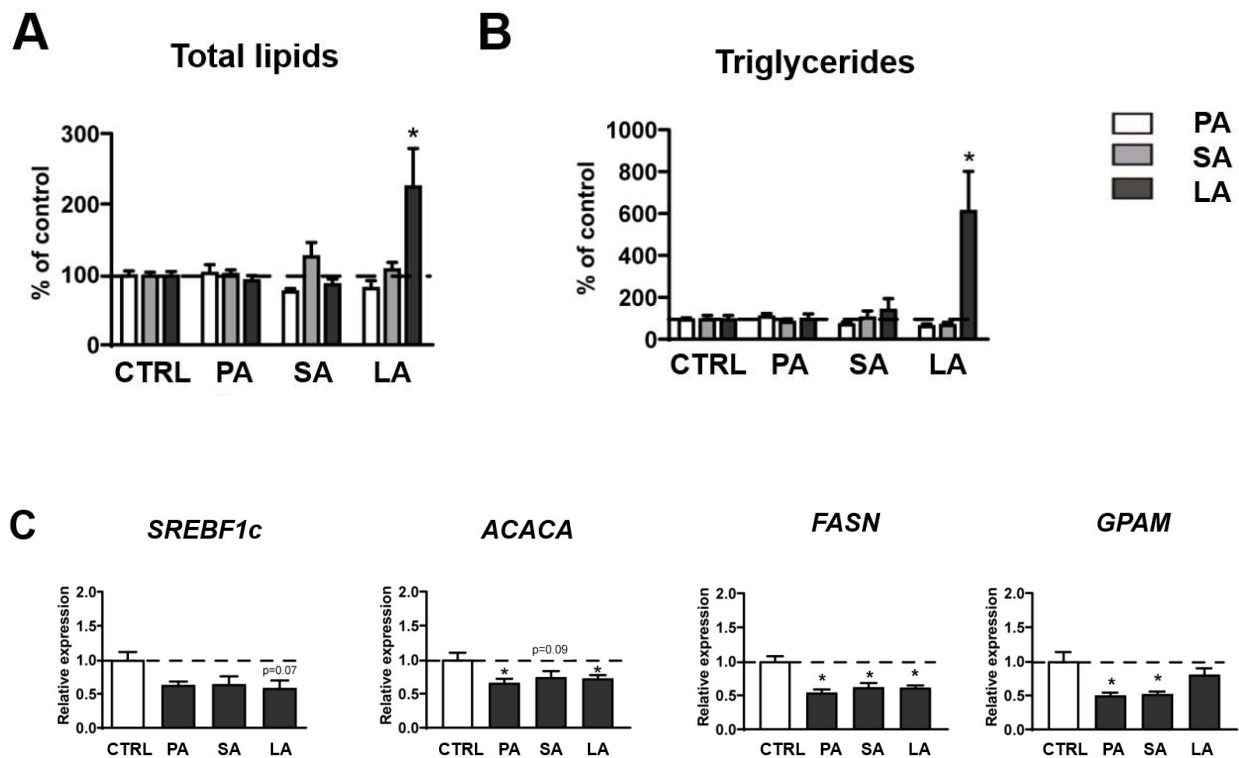
Genomic DNA fragment corresponding to HepaRG CYP2E1 promoter gene sequence was amplified by PCR using 2x Platinum™ SuperFi™ PCR Master Mix kit (ThermoFisher Scientific) with the forward primer 5' TGGCCTCGGCGGCCAAGCTTCCCTCGGGGCCTCAGGGAGCCGCAGCC 3' and the reverse primer 5'TCTTCGAGTGTGAAGACCATGGTGCCGCTGGGGCCCTGCTGCCAG 3'. PCR products were purified on agarose gel and cloned into the pNLucP reporter vector (Promega) using NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix kit (NEB). A sequencing was performed (Eurofins) in order to ensure the proper amplification and insertion of CYP2E1 promoter gene into pNLucP reporter vector. Prior to transcriptional assay, HepG2 cells were plated 48 h before transfection in 24-well culture plates at 5×10^4 cells/cm² and incubated in DMEM medium supplemented with 10% FBS, 100 units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 5 µg/mL insulin, and 50 µM hydrocortisone hemisuccinate. Lipofection was performed using pCYP2E1NLucP reporting vector, amplified as previously described. RedFLuc plasmid was used as normalization vector. Lipofection complexes were prepared in OptiMEM Reduced Serum Medium with 200 ng of pCYP2E1nLuc, 2 ng of RedFLuc (pCYP2E1nLuc:RedFLuc ratio of 100:1) and 4 µL of ViaFect™ (plasmids:ViaFect™ ratio of 1:2) per well, kept at room temperature for 20 minutes, and added dropwise on the cells. Media was renewed the day after transfection to stop the reaction. HepG2 cells were subsequently treated with palmitic, stearic or linoleic fatty acids for 2h, 4h, 8h, 12h or 24h. Luciferase measurement was then performed using the NanoGlo Dual Luciferase Reporter Assay System kit (Promega). CYP2E1 promoter activity was expressed as luminescent signal of Nanoluc/Firefly. This model was validated using IL4 dose-response, given the known inductive effects of this cytokine on CYP2E1 promoter as previously described (xxx). HepG2 cells were used at passage 13 to 30.

Supplementary figures



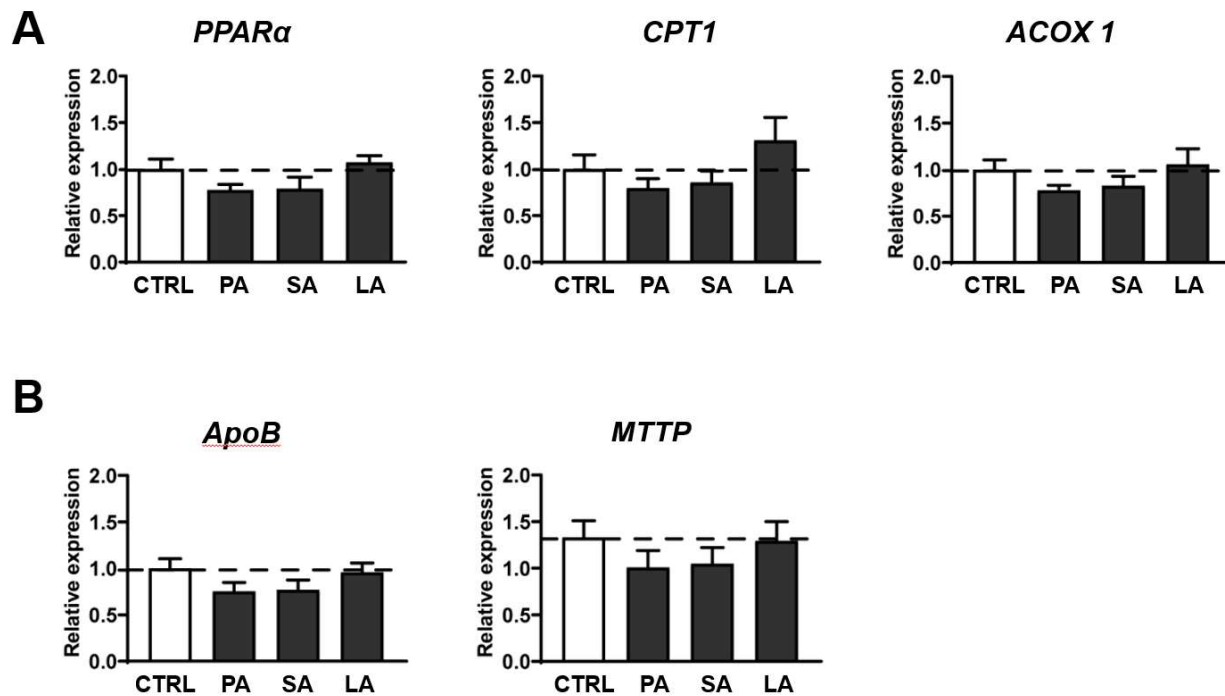
Supplementary Figure 1: CYP2E1 promoter activity in HepG2 cells treated with palmitic, stearic and linoleic acids

HepG2 cells transfected with pCYP2E1NLucP reporting vector were treated with palmitic (C16:0), stearic (C18:0) and linoleic (C18:2) acids for 2, 4, 8, 12 and 24h. CYP2E1 promoter activity was determined by luciferase assay. Results are expressed as mean $\pm$ SEM from 4 independent cell cultures. The horizontal dashed line represents the level of control cells (CTRL).



Supplementary Figure 2: Fatty acid composition of intracellular lipids and lipogenic gene expression in HepaRG cells treated for 1 week with palmitic, stearic or linoleic acids.

Differentiated HepaRG cells were incubated for 1 week with 150 μ M of palmitic (C16:0), stearic (C18:0) or linoleic (C18:2) acids. Fatty acid composition of total lipid (A) and triglyceride (B) fractions determined by GC-MS (n=4). (C) Expression of different genes involved in *de novo* lipogenesis (n=7). Results are expressed as mean $\pm$ SEM. n indicates the number of independent cell cultures. The dashed line represents the level of control cells (CTRL). * significantly different from control cells (CTRL) ($p \leq 0.05$).



Supplementary Figure 3: Expression of different genes involved in fatty acid oxidation and VLDL secretion in HepaRG cells treated for 1 week with palmitic, stearic or linoleic acids.

Differentiated HepaRG cells were incubated for 1 week with 150 μ M of palmitic (C16:0), stearic (C18:0) or linoleic (C18:2) acids. Expression of different genes involved in fatty acid oxidation (A) and VLDL secretion (B) (n=7). Results are expressed as mean $\pm$ SEM. n indicates the number of independent cell cultures. The dashed line represents the level of control cells (CTRL). * significantly different from control cells (CTRL) ($p \leq 0.05$).

Primer name	Forward	Reverse	Accession number
Acetyl CoA Carboxylase (ACACA)	GGTGGATCGGAGATTTTCATAGAG	AGGCTCCAGATGACGATAGA	NM_198839.2
Acetyl CoA Oxidase 1 (ACOX 1)	AGCCAGCGTTATGAGGTG	ATGCCCAAGTGAAGATCCAG	NM_001185039.2
Apolipoprotein B (ApoB)	AAGTATGGGATGGTAGCACAAG	TGGAGGTGATGTGGATTG	NM_000384.3
Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1)	GAACTTCCACCTACTCAGCAC	CTCCTTCACCCTTTCAGACAC	NM_000773.4
Carnitine palmitoyltransferase I (CPT1)	CTGGGATCCGGGAAGTATTA	CGGGAGGAAATCAAACCAATTC	NM_017770
Fatty acid translocase (FAT/CD36)	GCCAGGTATTGCAGTTCTTTTC	TGTCTGGGTTTTCAACTGGAG	NM_001001548.3
Mitochondrial glycerol-3- phosphate acyltransferase (GPAM)	AGCAAGTCCTGCGCTATCAT	GTGGAAGACTTCTTTGTGAT	NM_020918.6
Perilipin 1 (PLIN 1)	GCCATGTCCCTATCAGATGC	GTTGTCGATGTCCCGCCGAATT	NM_002666.5
Perilipin 2 (PLIN 2)	GCTCCATTCTACTGTTACCTG	CTCCTTTTCCACTCTACCCATG	NM_001122.4
Peroxisome proliferator- activated receptor alpha (PPAR α)	GTTCTGGAAGCTTTGGCTTTAA	GAAAGCGTGTCCGTGATGA	NM_001001929.3
Sterol regulatory element- binding protein 1 (SREBF1c)	CCATGGATTGCACTTTGAA	AAGTCACTGTCTTGGTTGTTGA	NM_00005291.5

REFERENCES

- Metcalfe LD, Schmitz AA, Pelka JR. **Rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis.** Anal Chem. 1966;38(3):p514-515. doi : 10.1021/ac60235a044
- Rioux V, Lemarchal P, Legrand P. **Myristic acid, unlike palmitic acid, is rapidly metabolized in cultured rat hepatocytes.** J Nutr Biochem. 2000;11(4):p198-207. doi: 10.1016/S0955-2863(00)00065-6
- Wang J, Hu Y, Nekvindova J, Ingelman-Sundberg M, Neve EP. **IL-4-mediated transcriptional regulation of human CYP2E1 by two independent signaling pathways.** Biochem Pharmacol. 2010 Nov 15;80(10):1592-600. doi: 10.1016/j.bcp.2010.08.005. Epub 2010 Aug 17. PMID: 20723539

DISCUSSION

La NAFLD touche un quart de la population générale dans le monde et cette prévalence ne cesse d'augmenter en raison de l'incidence croissante de l'obésité. La NAFLD est aujourd'hui la première cause de maladie chronique du foie dans les pays développés et pourrait même devenir la première cause de transplantation hépatique (Powell et al., 2021). C'est pourquoi de nombreuses études ont été menées pour mieux comprendre la physiopathologie de la NAFLD. Certaines de ces études ont montré que le CYP2E1 pouvait jouer un rôle central dans la NAFLD en favorisant l'aggravation de la NAFL vers la NASH. Comme mentionné précédemment, l'implication du CYP2E1 dans la pathogenèse de la NAFLD a été suggérée par de nombreuses études expérimentales et cliniques rapportant une induction de ce cytochrome dans différents modèles murins d'obésité (Aubert et al., 2011; Begriche et al., 2008; Raucy et al., 1991), de stéatohépatite (Weltman et al., 1996) ainsi que chez certains patients atteints d'une NAFLD/NASH (Chalasani et al., 2003; Niemelä et al., 2000; Weltman et al., 1998). Dans le cas de la NAFLD associée à l'obésité, il a été proposé que l'augmentation des concentrations circulantes d'acides gras pourrait en partie être impliquée dans l'induction du CYP2E1 (Aubert et al., 2011; Massart et al., 2022). Certaines études expérimentales *in vivo* ont permis de souligner l'importance de l'apport quantitatif en lipides (Osabe et al., 2008) et de l'accumulation de certains lipides hépatiques dans l'augmentation de l'expression et/ou de l'activité du CYP2E1 (Aubert et al., 2012). Des investigations *in vitro* sur différentes lignées d'hépatocytes et sur des hépatocytes primaires ont permis l'identification de certains acides gras inducteurs du CYP2E1 (Michaut et al., 2016; Raucy et al., 2004; Sung et al., 2004). Outre son implication dans la physiopathologie de la NAFLD, l'induction du CYP2E1 a également été proposée comme un facteur important dans l'aggravation de la toxicité hépatique de certains médicaments dont le paracétamol (Allard et al., 2019). Quelques études cliniques montrent même que la toxicité hépatique de ce médicament pourrait être plus importante dans un contexte d'obésité et/ou de NAFLD (Michaut et al., 2014). Parmi les facteurs possibles favorisant la susceptibilité accrue des sujets obèses/NAFLD à l'hépatotoxicité du paracétamol, il a été proposé que l'induction du CYP2E1 hépatique souvent observée chez ces patients pourrait expliquer en partie la plus grande sensibilité des sujets obèses à la toxicité hépatique de ce médicament.

C'est dans ce contexte que s'est inscrit mon travail de thèse. En effet, les investigations menées au cours de mon doctorat avaient pour premier objectif l'identification d'acides gras inducteurs du CYP2E1 et l'étude de leur impact sur le métabolisme lipidique hépatique. Le second objectif de ma thèse a consisté à déterminer si l'induction du CYP2E1 était associée à une toxicité aigue plus importante du paracétamol. Pour répondre à ces objectifs,

l'ensemble de mes investigations ont été réalisées sur des cellules HepaRG différenciées. Comme mentionné précédemment, ces cellules initialement issues d'un hépatocarcinome humain sont constituées à l'état différencié d'hépatocytes et de cholangiocytes fonctionnels. Plusieurs études réalisées au laboratoire et par d'autres équipes ont souligné la pertinence de ce modèle cellulaire pour l'étude de la NAFLD et de la toxicité des xénobiotiques dont la toxicité du paracétamol (Le Guillou et al., 2018; McGill et al., 2011; Michaut et al., 2016).

Les travaux réalisés au cours de ma thèse et les résultats ainsi obtenus ont permis de faire les constatations suivantes :

► L'étude d'un large panel d'acides gras (9 au total), nous a permis de montrer que seuls les acides gras PA, SA et LA favorisaient une induction du CYP2E1 dans les cellules HepaRG. Malgré le contexte de surcharge lipidique, la capacité du PA, SA ou LA à induire une stéatose était différente en fonction de l'acide gras. En effet, nos résultats ont montré que seul le LA était pro-stéatosant dans nos conditions expérimentales alors que le PA et SA ne favorisaient pas l'accumulation intracellulaire des triglycérides dans les cellules HepaRG. Ces résultats que nous discuterons plus loin sont intéressants dans la mesure où l'induction du CYP2E1 ne semble pas systématiquement corrélée à la présence d'une stéatose. D'après nos résultats, l'induction du CYP2E1 repose davantage sur la nature de l'acide gras que de l'accumulation intracellulaire de lipides.

► Nous avons également montré que l'induction du CYP2E1 par le PA, SA ou LA était aussi associée à des différences dans la toxicité cellulaire du paracétamol. En effet, nos résultats ont indiqué une exacerbation de la cytotoxicité de ce médicament en présence de PA ou de SA. A l'inverse, le LA a diminué en partie la toxicité cellulaire de ce médicament. Même si l'induction du CYP2E1 hépatique est importante dans la toxicité du paracétamol, nos résultats suggèrent que le devenir métabolique et l'impact de certains acides gras sont également des facteurs importants à considérer dans la toxicité de ce médicament.

I. Identification des acides gras inducteurs du CYP2E1 et des mécanismes impliqués dans cette induction

Comme mentionné précédemment, seuls les acides gras PA, SA et LA ont favorisé une augmentation significative de l'activité du CYP2E1 dans les cellules HepaRG. Concernant les autres acides gras, nos résultats ont montré que l'ALA favorisait à l'inverse une diminution de l'activité du CYP2E1 et que les acides gras LAU, OA, ARA, EPA et DHA ne modifiaient pas l'activité de ce cytochrome. Etant donné que la problématique de ma thèse porte sur l'induction du CYP2E1, la discussion des résultats ne portera donc que sur les 3 acides gras inducteurs du CYP2E1.

Cette première partie de résultats relative à l'induction du CYP2E1 confirme les données de certaines études qui ont comparé les effets de différents acides gras sur l'expression et/ou l'activité du CYP2E1 (Michaut et al., 2016; Sung et al., 2004). Dans ces études, il avait été montré que l'induction du CYP2E1 pouvait différer selon la nature de l'acides gras utilisée lors de la surcharge lipidique. Nos données relatives aux effets de SA et de l'OA sur l'activité du CYP2E1 confirme une étude précédemment menée au laboratoire sur des cellules HepaRG différenciées et traitées pendant une semaine avec 100 μ M de SA ou OA. Dans cette étude, il avait été montré que le SA augmentait significativement l'activité du CYP2E1 alors que l'activité de ce cytochrome était inchangée en présence de l'OA (Michaut et al., 2016). Une autre étude menée sur les cellules HepG2 a comparé les effets de cinq acides gras différents (PA, OA, LA, ALA et DHA) sur l'expression protéique du CYP2E1. Il a alors été montré que seuls les acides gras PA, OA et LA étaient capables d'augmenter significativement l'expression en protéine CYP2E1 alors que les acides gras ALA et DHA n'impactaient pas l'expression de cette protéine. Il est à préciser que l'activité du CYP2E1 n'avait pas été mesurée dans cette étude (Sung et al., 2004).

En plus de confirmer nos données précédemment publiées sur l'induction du CYP2E1 par le SA (Michaut et al., 2016), cette étude nous permet d'identifier les acides gras PA et LA comme deux nouveaux acides gras inducteurs du CYP2E1 dans la lignée cellulaire HepaRG. Au-delà de l'effet inducteur global du PA, SA et LA sur le CYP2E1, il est important de souligner que l'augmentation de l'activité de ce cytochrome est plus importante en présence de PA ($\uparrow$ 59%) et SA ($\uparrow$ 44%) que de LA ($\uparrow$ 28%). Ces résultats pourraient suggérer un effet inducteur plus important des acides gras saturés comparativement aux acides gras polyinsaturés. De façon intéressante, nous n'avons pas observé de variation d'activité du

CYP2E1 après incubation avec l'ARA, un acide gras issu directement de la voie de biosynthèse de LA.

Concernant l'expression du CYP2E1, l'expression du gène *CYP2E1* était inchangée quel que soit l'acide gras utilisé pour le traitement. Quant à l'expression de la protéine CYP2E1, une tendance à l'augmentation était observée dans les cellules HepaRG traitées par le PA, SA ou LA. Etant donné que l'augmentation de l'activité du CYP2E1 n'est pas associée à une variation de l'expression du gène, il semblerait que la régulation du CYP2E1 dépende davantage d'une régulation post-transcriptionnelle. Il est à noter que la régulation du CYP2E1 est complexe et peut reposer sur plusieurs mécanismes tels que l'activation transcriptionnelle, l'augmentation de la stabilisation ou de la traduction de l'ARNm et la diminution de la dégradation des protéines (Koop & Tierney, 1990; Novak & Woodcroft, 2000). Les mécanismes impliqués dans l'induction du CYP2E1 dépendent principalement de la nature des molécules qui modulent l'expression et/ou l'activité du CYP2E1. En ce qui concerne les acides gras, les mécanismes exacts par lesquels ces molécules pourraient induire le CYP2E1 restent encore inconnus à ce jour.

Dans notre étude, l'absence d'effet direct du PA, SA ou LA sur l'activité du promoteur *CYP2E1* confirme une régulation post-transcriptionnelle de ce cytochrome. Des investigations complémentaires utilisant un inhibiteur de la synthèse protéique (i.e. cycloheximide) ont permis de suggérer que l'induction du CYP2E1 pourrait être due à une moindre dégradation et/ou meilleure stabilisation du CYP2E1 au niveau protéique, contribuant ainsi à une activité plus élevée de ce cytochrome. Cependant, des investigations supplémentaires seront nécessaires pour confirmer cette hypothèse. D'autres investigations évaluant la dégradation du CYP2E1 par le protéasome ainsi que des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, l'ubiquitination ou sumoylation (Oesch-Bartlomowicz et al., 1998; Tomasi et al., 2018; Wang et al., 2011) pourraient être également envisagées pour mieux comprendre les mécanismes par lesquels les acides gras régulent l'activité du CYP2E1. Parmi ces différentes modifications post-traductionnelles, un intérêt particulier sera porté à la phosphorylation étant donné que des investigations sur des hépatocytes de rat ont montré que la phosphorylation du CYP2E1 par la *Protéine Kinase A* (PKA) sur la Ser¹²⁹ favorisait une réduction de l'activité de ce cytochrome (Oesch-Bartlomowicz et al., 1998). Ainsi, dans le cadre de nos investigations, il serait intéressant de vérifier si le PA, SA et LA sont capables de réduire l'activité de la PKA dans les cellules HepaRG.

II. Evaluation de la stéatose et voies métaboliques impliquées dans l'homéostasie des lipides hépatiques

Nos résultats ont montré que seul le LA favorisait une accumulation significative des triglycérides intracellulaires alors que PA et SA ne modifiaient pas le contenu intracellulaire en lipides dans les cellules HepaRG. Ces résultats rapportant une dissociation entre l'induction du CYP2E1 et l'accumulation intracellulaire de triglycérides (reflétant la stéatose) sont très intéressants. Dans la littérature, la plupart des études ont montré que l'induction du CYP2E1 est souvent associée à la présence d'une NAFLD. Chez l'Homme, deux études ont même rapporté que l'activité du CYP2E1 était positivement corrélée au degré de sévérité de la stéatose (Chtioui et al., 2007; Emery et al., 2003). Dans notre étude, l'induction du CYP2E1 dépend davantage de la nature de l'acide gras que de la présence de la stéatose. Ces données confirment deux études précédentes menées au laboratoire (Aubert et al., 2012; Michaut et al., 2016). La première étude avait été réalisée sur des souris femelles obèses *ob/ob* et *db/db* (Aubert et al., 2012). Il avait été montré que l'activité du CYP2E1 hépatique était significativement augmentée chez les souris *db/db* par rapport aux souris non obèses mais pas chez les souris *ob/ob*, alors que la quantité de lipides et de triglycérides intra-hépatiques était bien moindre chez les souris *db/db* par rapport au souris *ob/ob* (Aubert et al., 2012). La deuxième étude a été réalisée sur les cellules HepaRG traitées pendant 1 semaine par SA et OA (Michaut et al., 2016). Comme indiqué ci-dessus, seul le SA avait favorisé une augmentation significative de l'activité du CYP2E1. Dans cette étude, il avait été montré que les effets de SA et OA sur l'accumulation intracellulaire des triglycérides était identique. Ainsi, l'effet pro-stéatosant de l'OA dans cette étude n'était pas corrélé à l'induction du CYP2E1 (Michaut et al., 2016).

Dans notre étude, pour mieux comprendre l'effet stéatosant de LA et l'absence d'effet de PA et SA sur l'induction de la stéatose, nous avons étudié les quatre principales voies métaboliques (i.e. entrée des acides gras, lipogenèse *de novo*, β -oxydation mitochondriale et sécrétion de VLDL) impliquées dans la régulation de l'homéostasie des lipides hépatiques (Ipsen et al., 2018). Comme mentionné dans la partie introduction, une altération dans l'une ou plusieurs de ces voies métaboliques peut favoriser le développement d'une NAFLD (Ipsen et al., 2018; Loomba et al., 2021).

Dans l'ensemble, nos résultats ont montré que la stéatose induite par le LA résulte principalement de l'augmentation de l'entrée de cet acide gras dans les cellules HepaRG en

raison de l'augmentation significative de l'expression du gène *FAT/CD36*. Ce résultat est en accord avec les données de certaines études expérimentales et cliniques qui ont montré qu'une augmentation de l'expression du gène et/ou de la protéine *FAT/CD36* était associée à une entrée plus importante des acides gras dans le foie et à leur accumulation (Greco et al., 2008; Koonen et al., 2007; Miquilena-Colina et al., 2011). Il est à noter que l'expression du gène *FAT/CD36* est souvent augmentée chez les patients NAFL/NASH comparativement à des individus sains (Greco et al., 2008; Zhu et al., 2011). De plus, nous avons montré que la stéatose induite par le LA était associée à une augmentation significative de l'expression des gènes *PLIN1* et *PLIN2*, codant pour les protéines périlipines et précédemment décrits comme des marqueurs pertinents de la stéatose hépatique (Pawella et al., 2014). L'absence de stéatose dans les cellules HepaRG incubées avec du PA ou du SA semble principalement liée à une diminution de l'entrée de ces acides gras et à une augmentation de la β -oxydation mitochondriale.

➤ Expression du gène *FAT/CD36*

La réduction de l'expression du gène *FAT/CD36* en réponse au PA (et accessoirement au SA) est assez surprenante puisque dans la plupart des études, l'expression de ce transporteur membranaire est positivement corrélée à l'apport lipidique (Chabowski et al., 2013; Krammer et al., 2011; Rada et al., 2020). Etant donné que l'expression du gène *FAT/CD36* est uniquement induite par le LA, il serait tentant de suggérer que l'augmentation de l'expression de ce transporteur pourrait être favorisée par certains acides gras spécifiques. De façon intéressante, une étude menée sur des adipocytes 3T3-L1 et exposés à différents acides gras (i.e. PA, OA, SA) a montré que seul le SA était capable de réduire significativement l'expression du gène *FAT/CD36* (Yang et al., 2007). A l'inverse, l'expression du gène *FAT/CD36* était significativement augmentée lorsque les cellules 3T3-L1 étaient incubées avec du 2-bromopalmitate, un acide gras non métabolisable (Yang et al., 2007). Les auteurs de cette étude ont alors suggéré que l'accumulation intracellulaire d'acide gras non transformés pourrait fonctionner comme un signal positif pour augmenter l'expression du gène *FAT/CD36*. Dans notre étude, une hypothèse pourrait être que l'augmentation de l'expression du gène *FAT/CD36* pourrait résulter de la non-accessibilité du LA à être métabolisé en raison de son incorporation dans les triglycérides. Cette hypothèse est confortée par nos résultats sur la composition en acides gras des différentes fractions lipidiques obtenus par analyse GC-MS. Cette analyse nous avait en effet permis de montrer une accumulation de LA dans les triglycérides des cellules HepaRG supplémentées en cet acide gras, alors que ce résultat n'avait pas été retrouvé avec le

PA ni le SA. Quant à la diminution de l'expression du gène *FAT/CD36* dans les cellules HepaRG supplémentées en PA ou SA, celle-ci pourrait être favorisée par les propriétés « plus métabolisables de ces acides gras » étant donné qu'ils ont favorisé une augmentation significative de la β -oxydation mitochondriale.

➤ **β -oxydation mitochondriale**

L'oxydation des acides gras au cours de la NAFLD peut être augmentée, diminuée ou inchangée selon le stade de la pathologie (Begrache et al., 2013). Au stade NAFL, l'activation de la β -oxydation mitochondriale des acides a été décrite comme un mécanisme adaptatif pour limiter l'accumulation de lipides dans le foie. Cette adaptation diminue lorsque la NAFL progresse (Koliaki et al., 2015). Comme mentionné ci-dessus, l'oxydation accrue de la β -oxydation mitochondriale dans les cellules HepaRG supplémentées en PA ou SA limite l'accumulation de lipides intracellulaires empêchant ainsi l'apparition de la stéatose.

La régulation de la β -oxydation mitochondriale est complexe et pourrait impliquer différents facteurs et mécanismes (Houten et al., 2016). Les acides gras polyinsaturés ont longtemps été décrits comme de bons inducteurs de la β -oxydation mitochondriale en favorisant l'augmentation de l'expression du facteur de transcription *PPAR α* et de ses gènes cibles (Jump et al., 2005). A l'inverse, les acides gras saturés ont été rapportés comme moins efficaces pour l'activation de l'oxydation des acides gras (Jump, 2008; Jump et al., 2005). Dans notre étude, nous ne confirmons pas ces observations puisque le PA et le SA augmentent plutôt la β -oxydation mitochondriale dans les cellules HepaRG et que le LA n'a aucun effet. De plus, nous n'avons pas mesuré de variation dans l'expression du gène *PPAR α* ou de ses gènes cibles *CPT1* et *ACOX1*. Ces divergences entre nos résultats et certaines données de la littérature pourraient être liées à des différences dans les modèles expérimentaux utilisés dans les études (*in vivo* vs *in vitro* ; diversité des modèles cellulaires ; durée d'exposition aux acides gras différentes...) et la disponibilité des acides gras. En ce qui concerne cette dernière hypothèse, des études *in vitro* menées sur des hépatocytes primaires de rat exposés à l'OA ou l'EPA ont montré que l'EPA favorisait une augmentation de la β -oxydation mitochondriale alors que l'OA n'avait aucun effet (Pawar & Jump, 2003). Dans cette étude, l'évaluation du devenir métabolique de ces deux acides gras a permis de montrer que l'assimilation de l'OA dans les triglycérides empêche son oxydation alors que l'EPA peu assimilé dans les triglycérides était plus accessible à l'oxydation. Dans notre étude, le LA est principalement incorporé dans les triglycérides comme mentionné précédemment contrairement au PA et au SA. Par conséquent, l'élévation de la β -oxydation

mitochondriale observée dans les cellules HepaRG supplémentées par le PA et SA pourrait être favorisée par l'accessibilité de ces deux acides gras à l'oxydation alors que l'absence de variation de la β -oxydation mitochondriale dans les cellules HepaRG supplémentées en LA est liée à la non-accessibilité de cet acide gras du fait qu'il est principalement stocké dans les triglycérides.

➤ **Lipogenèse de novo et sécrétion de VLDL**

Au stade de NAFL, la lipogenèse *de novo* est une voie métabolique qui a été décrite comme augmentée en raison des conditions d'hyperinsulinémie et d'hyperglycémie conséquentes au contexte d'insulinorésistance chez les patients (Diraison et al., 2003). Dans notre étude, nos résultats montrent à l'inverse une diminution de la lipogenèse *de novo* par le LA. Ces résultats ne sont cependant pas surprenants puisqu'il s'agit d'un phénomène de compensation en réponse à l'apport exogène important d'acide gras par le traitement (Ren et al., 2012). Aucune variation n'a cependant été observée avec le SA et le PA. Ce résultat peut être relié à leur moindre entrée dans la cellule en raison de la moindre induction de l'expression du gène *FAT/CD36* que nous avons mesuré en réponse à ces acides gras.

L'hypothèse d'une modification de la sécrétion de VLDL a également été testée étant donné que celle-ci est souvent altérée chez les patients souffrant de NAFLD (Ipsen et al., 2018; Kawano & Cohen, 2013; Ota et al., 2008). Celle-ci est en effet augmentée chez les patients atteints de stéatose simple afin de limiter l'accumulation excessive de triglycérides intra-hépatiques. Lorsque la NAFL progresse, la sécrétion de VLDL est ensuite diminuée sous l'effet du stress oxydant issu de l'exposition prolongée du foie aux acides gras. Toutefois, nos résultats n'indiquent aucun effet des acides gras sur la sécrétion de VLDL. La NAFL observée après un traitement en LA ne semble donc pas être expliquée par une altération de la sécrétion de VLDL.

III. Impact des acides gras inducteurs de l'activité du CYP2E1 sur l'hépatotoxicité du paracétamol

Dans cette deuxième partie de l'étude, nous nous sommes intéressés à la toxicité aiguë du paracétamol. En particulier, nous avons cherché à déterminer si ce médicament présentait une toxicité plus élevée dans les cellules HepaRG présentant une induction du CYP2E1 suite à l'exposition de ces cellules aux acides gras PA, SA et LA.

➤ Induction du CYP2E1

Dans un contexte de d'obésité et/ou de NAFLD, le CYP2E1 joue un rôle important dans l'hépatotoxicité du paracétamol puisqu'il contribue à exacerber la toxicité de ce médicament (Massart et al., 2022; Michaut et al., 2014). En effet, plusieurs études expérimentales (Aubert et al., 2012; Corcoran & Wong, 1987; Piccinin et al., 2019; Shi et al., 2019) et cliniques (Chomchai & Chomchai, 2018; Myers & Shaheen, 2009; Nguyen et al., 2008) ont rapporté une potentialisation de la toxicité aiguë du paracétamol dans un contexte d'obésité et/ou de NAFLD. Nos résultats montrent une toxicité plus importante à 48 h dans les cellules HepaRG incubées avec du PA et du SA comparativement aux cellules traitées au paracétamol seul. En revanche, aucune potentialisation de la toxicité du paracétamol n'a été observée avec le LA à 48 h. Une absence de toxicité a même été observée au temps 24 h quelle que soit la concentration de paracétamol utilisée. Ces résultats confirment et complètent ceux d'une étude déjà publiée dans le laboratoire, ayant montré une exacerbation de la toxicité du paracétamol après une semaine de traitement par l'acide gras SA à 100µM (Michaut et al., 2016).

De façon surprenante, nos résultats ne montrent cependant aucune potentialisation de la toxicité du paracétamol après un traitement en LA. Cela pourrait suggérer que l'induction du CYP2E1 serait davantage délétère que l'accumulation de triglycérides intra-hépatiques concernant l'hépatotoxicité du paracétamol. Cette hypothèse a d'ailleurs déjà été avancée dans une étude *in vivo* de 2012 visant à étudier le rôle du CYP2E1 dans l'intoxication aiguë au paracétamol sur des animaux génétiquement obèses. Celle-ci avait mis en évidence une augmentation plus importante des transaminases et de la cytolyse hépatique chez des souris *db/db* ayant une induction du CYP2E1 hépatique mais une stéatose modérée que chez des souris *ob/ob* pour lesquelles la stéatose était pourtant plus massive mais le CYP2E1 moins induit (↑ 50% pour les *db/db* et ↑ 4% pour les *ob/ob*) (Aubert et al., 2012). Dans notre étude, cette hypothèse n'est également pas à écarter puisque l'activité du CYP2E1 mesurée dans les cellules

HepaRG incubées avec du PA et du SA était plus importante que celle mesurée après incubation avec du LA (↑59% avec PA ; ↑44% avec SA et ↑28% avec LA).

➤ **Lipotoxicité**

La nature des acides gras n'est également pas sans conséquences vis-à-vis de leur toxicité, en plus de leur impact sur le CYP2E1. D'après la littérature, la lipotoxicité des acides gras dépend en effet de leur degré d'insaturation ainsi que de leur incorporation dans les triglycérides. Ainsi, une toxicité plus importante des acides gras saturés a été observée comparativement aux acides gras insaturés. Des expérimentations *in vitro* ont en effet déjà montré une toxicité accrue du PA et du SA notamment sous leur forme d'acides gras libres en comparaison aux formes insaturées comme le POA (acide palmitoléique ou C16:1) ou le OA (Akazawa et al., 2010; Pardo et al., 2015; Wei et al., 2009). Cette toxicité accrue observée avec les acides gras saturés pourrait s'expliquer par leur moindre incorporation dans les triglycérides, qui est décrite comme une forme de stockage « neutre et inoffensive » et qui constituerait plutôt un mécanisme de protection contre la lipotoxicité (Listenberger et al., 2003). La toxicité accrue que nous avons observé avec les acides gras PA et SA pourrait ainsi être expliquée par cette hypothèse puisque nos résultats suggèrent également une moindre accumulation de ces acides gras dans les triglycérides (i.e. pas d'accumulation retrouvée dans les triglycérides par GC-MS, pas d'augmentation de l'expression du gène *FAT/CD36*, augmentation de la β -oxydation).

➤ **Stress oxydant et dysfonction mitochondriale**

Pour mieux comprendre cette toxicité plus importante du paracétamol lorsque les cellules sont incubées avec du PA et du SA, nous avons conduit des expériences pour évaluer la présence d'un stress oxydant et d'une dysfonction mitochondriale.

Comme introduit dans la partie 2.2.2., plusieurs sites de production d'EROs cellulaires ont été décrits. La mitochondrie représente la principale source d'EROs cellulaire, notamment lors d'une augmentation de la β -oxydation mitochondriale associée à une altération de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale. Le CYP2E1 représente également une source importante de production d'EROs puisqu'il a la particularité de produire une quantité significative d'EROs au cours de son cycle catalytique (Abdelmegeed et al., 2017; Harjumäki et al., 2021; Massart et al., 2022). Ces EROs peuvent être responsables d'un stress oxydant qui est un acteur majeur dans l'hépatotoxicité du paracétamol. Nous n'avons pas observé de production majeure d'EROs après un traitement en acide gras seul, et ce malgré l'induction du CYP2E1. L'induction modeste de ce cytochrome que nous avons observé n'est probablement

pas suffisante pour induire un stress oxydant mesurable avec les sondes que nous avons utilisé. Un traitement en paracétamol seul augmentait toutefois la production d'EROs en comparaison aux cellules contrôles et cette augmentation était potentialisée au niveau mitochondrial lors d'une co-incubation avec l'acide gras SA 15 minutes après l'addition de ce dernier. Néanmoins, cette production d'EROs diminuait avec le temps, suggérant la mise en place de mécanismes anti-oxydants. L'ensemble de ces données suggèrent l'installation d'un stress oxydant au niveau de la mitochondrie à des temps précoces lors d'une co-incubation de paracétamol et de SA. Ces résultats sont en accord avec la littérature puisqu'il est décrit que les protéines mitochondriales sont préférentiellement ciblées par le NAPQI pour former des adduits responsables de l'installation d'un stress oxydant et d'une dysfonction mitochondriale (McGill et al., 2011; Ramachandran & Jaeschke, 2019a). Cette majoration du stress oxydant au niveau mitochondrial avec le SA est cohérent avec la diminution de la respiration mitochondriale maximale que nous avons observée dans les cellules HepaRG co-incubées avec le paracétamol et le SA. Ces mécanismes pourraient ainsi participer à la potentialisation de la toxicité hépatique du paracétamol observée avec cet acide gras.

CONCLUSION

Pour conclure, notre étude a permis de mettre en évidence que les acides gras n'ont pas tous le même impact sur le CYP2E1 et sur la stéatose, dans le modèle cellulaire HepaRG. En effet, nous avons montré qu'un traitement d'une semaine par les acides gras PA, SA et LA à des concentrations physiologiques retrouvées chez l'Homme augmentaient l'activité du CYP2E1. Dans nos conditions expérimentales, l'induction du CYP2E1 n'est pas forcément corrélée à l'apparition d'une stéatose puisque seul un traitement en LA favorisait l'accumulation de triglycérides intra-hépatiques ainsi que l'augmentation de l'expression des gènes *PLIN1* et *PLIN2*. Nos investigations sur le métabolisme lipidique hépatique ont permis de montrer que les mécanismes de compensation du métabolisme lipidique en réponse aux différents traitements en acides gras semblent s'effectuer de manière différente entre les traitements. Ces résultats pourraient expliquer la différence de stéatose observée entre les acides gras.

Le paracétamol est un médicament dont l'hépatotoxicité peut être augmentée chez les patients atteints d'obésité et/ou de NAFLD. Notre étude a permis d'identifier plus particulièrement les acides gras PA et SA comme des facteurs de potentialisation de l'hépatotoxicité induite par le paracétamol. Les mécanismes par lesquels ces acides gras pourraient potentialiser la toxicité du paracétamol pourraient passer par une production plus importante d'EROs possiblement *via* l'induction du CYP2E1 et par une altération de la fonction mitochondriale. Des investigations supplémentaires seraient toutefois nécessaires afin de déterminer les mécanismes impliqués avec plus de précision.

PERSPECTIVES

Nos travaux ont montré l'effet des acides gras PA, SA et LA sur le CYP2E1 et ont permis d'en mesurer certaines conséquences, en particulier quant à l'hépatotoxicité du paracétamol. Les perspectives de ce projet seront premièrement de compléter ces investigations afin de mieux comprendre les mécanismes par lesquels les acides gras PA et SA potentialisent l'hépatotoxicité induite par le paracétamol. Ainsi, des investigations sur la formation et/ou l'accumulation d'acides gras lipotoxiques (e.g. acides gras et cholestérol libres, acides dicarboxyliques), sur la phosphorylation de JNK ou encore sur la déplétion en glutathion pourront permettre de compléter la réponse à cette question.

➤ Adduits NAPQI

La quantification des adduits-NAPQI serait également une investigation intéressante à mener. Comme détaillé dans l'introduction, la formation et l'accumulation d'adduits NAPQI représente l'initiation de l'hépatotoxicité due au paracétamol. En effet, une production plus importante de NAPQI est observée à la suite d'un surdosage en paracétamol, à une induction du CYP2E1 et à une déplétion des stocks de GSH. Ce NAPQI est très instable et est capable de se lier aux éléments nucléophiles cellulaires (i.e. bases puriques et pyrimidiques de l'ADN, groupements thiols des protéines) et formant ainsi des adduits-NAPQI. Néanmoins, la quantité d'adduits-NAPQI formé après une intoxication au paracétamol n'est pas forcément représentative d'une hépatotoxicité accrue. En effet, une étude menée au laboratoire n'avait pas mis en évidence de différence de quantité d'adduits-NAPQI (PRC-CYS) sur des souris intoxiquées au paracétamol malgré l'observation de lésions hépatiques importantes (i.e. augmentation des transaminases, lésions à l'histologie). Les auteurs avaient alors suggéré que la qualité des protéines impactées serait plus importante que leur quantité puisqu'il n'est pas à exclure que les adduits-NAPQI ne se soient formés que sur certains sous-ensembles spécifiques de protéines chez ces souris (Aubert et al., 2012). En accord avec cette idée, aucune différence significative de quantité d'adduits-NAPQI n'avait non plus été mise en évidence lors d'une étude *in vitro* sur les cellules HepaRG traitées une semaine avec les acides gras SA ou OA et du paracétamol à 2.5 mM ou 20 mM pendant 6 heures. Ces résultats ont été obtenus malgré une potentialisation de la diminution de viabilité cellulaire mesurée après un traitement en SA par rapport au paracétamol seul (Michaut et al., 2016). Toujours en lien avec cette hypothèse, une étude a même observé une diminution de la quantité d'adduits-NAPQI malgré des lésions plus importantes liées à une intoxication au paracétamol, chez des souris IL4^{-/-} (Ryan et al., 2012). Dans le cadre de nos investigations, il serait ainsi intéressant de quantifier les adduits-NAPQI après un co-traitement en acides gras PA, SA, LA et en paracétamol. L'hypothèse d'une

formation plus importante d'adduits-NAPQI après un traitement en PA et SA n'est en effet pas à exclure, bien que les études précédemment citées n'aillent pas forcément dans ce sens. Pour cela, nous avons optimisé un dosage du PRC-CYS par HPLC-MS/MS à partir du protocole de H. Jaeschke et ses collaborateurs et en collaboration avec l'entreprise Biopredic International (McGill et al., 2013). Il est à noter que notre méthode permettra de quantifier indépendamment les adduits PRC-cystéine, PRC-glutathion ainsi que PRC-mercapturate dans la mitochondrie et dans les microsomes, nous apportant alors des informations plus précises que les méthodes utilisées dans les études précédemment citées. Il est à noter que les optimisations ont été effectuées et que les expérimentations sont toujours en cours.

➤ **Rôle du CYP2E1 dans les effets observés**

Il sera ensuite important de confirmer que les effets néfastes observés soient bien liés à l'activation du CYP2E1 et aux EROs qu'il est capable de produire lorsqu'il est activé. Il n'est en effet pour le moment pas possible de distinguer avec précision les effets dus à l'activation du CYP2E1 de ceux provenant des acides gras directement.

Un moyen de confirmer que les effets observés soient bien liés à l'activation du CYP2E1 serait d'utiliser *in vitro* des inhibiteurs spécifiques de ce cytochrome. Plusieurs inhibiteurs sont actuellement disponibles sur le marché et validés pour leur spécificité envers le CYP2E1. Parmi eux, la chlorméthiazole est une molécule utilisée en clinique depuis les années 1960 pour traiter les insomnies et l'agitation puisqu'il s'agit d'un sédatif (Stresser et al., 2016). Des études ont ensuite décrit la chlorméthiazole comme un inhibiteur du CYP2E1 *in vivo* et *in vitro* (Gebhardt et al., 1997; Stresser et al., 2016) et des investigations plus récemment menées ont permis de confirmer la spécificité de la chlorméthiazole envers le CYP2E1 (Stresser et al., 2016). Une étude précédemment menée au laboratoire a confirmé l'impact d'une induction du CYP2E1 par un traitement en SA sur l'hépatotoxicité observée après un traitement en paracétamol (i.e. hépatotoxicité accrue) grâce à l'utilisation de chlorméthiazole (Michaut et al., 2016). En effet, l'utilisation de cet inhibiteur a permis dans cette étude de diminuer de 30% la toxicité induite par un traitement en paracétamol et en SA. Néanmoins, l'utilisation de chlorméthiazole dans cette étude n'avait pas permis d'offrir de protection concernant la déplétion en GSH et la formation d'adduits-NAPQI qui avait été observée après un traitement en SA.

Une seconde étude menée sur des microsomes isolés d'hépatocytes humains a mené des investigations sur l'efficacité de différents inhibiteurs de cytochromes dans le cadre d'une intoxication au paracétamol. Ainsi, le diallyl sulfide, le 4-méthyl pyrazole et le disulfiram ont

été identifiés. Toutefois, l'étude n'a pas démontré une inhibition spécifique du CYP2E1 puisqu'elle portait sur l'ensemble des CYPs pouvant être responsables de la toxicité induite par le paracétamol (Hazai et al., 2002). En effet, des travaux ayant purifié les isoformes spécifiques des cytochromes ont identifié les CYP3A4 et 1A2 comme participant également à la formation de NAPQI à partir du paracétamol (Harvison et al., 1988; Morgan et al., 1983; Sinclair et al., 1998). Ainsi, ces isoformes pourraient également jouer un rôle dans l'hépatotoxicité de ce médicament. Il est par ailleurs à noter qu'une étude a déjà montré que l'activité du CYP1A2 pouvait être augmentée après un traitement en acides gras polyinsaturés n-3 (Kravchenko et al., 2014), démontrant alors l'action possible des acides gras sur l'activité de ce cytochrome. Le CYP3A4 ne semble quant à lui pas être un cytochrome inductible mais il s'agit de l'isoforme de CYP majoritairement retrouvée dans le foie (McGill & Hinson, 2020). Ainsi, il serait intéressant de savoir si les acides gras sont capables d'induire d'autres cytochromes que le CYP2E1 et d'en identifier les conséquences dans le cadre de nos investigations. Il est toutefois important de souligner que le CYP2E1 semble jouer un rôle majeur dans l'hépatotoxicité du paracétamol par rapport aux autres isoformes.

L'utilisation de molécules inhibitrices du CYP2E1 impose néanmoins un traitement supplémentaire aux cellules et il n'est pas à exclure que ces inhibiteurs puissent avoir des effets intrinsèques. La génération d'une lignée HepaRG *knockout* pour le gène CYP2E1 à l'aide de la technologie CRISPR/Cas9 représenterait ainsi une alternative idéale à l'utilisation de ces inhibiteurs.

➤ Autres modèles expérimentaux

Un autre axe de perspective à notre projet serait de confirmer l'effet des acides gras sur le CYP2E1 dans d'autres modèles *in vitro* et *in vivo* afin de s'assurer que les résultats que nous avons obtenus ne soient pas uniquement valables dans la lignée cellulaire HepaRG. En effet, l'utilisation unique du modèle cellulaire HepaRG est l'une des faiblesses de notre étude. Pour cela, l'utilisation de PHH pourrait être utile étant donné leurs caractéristiques très proches de la situation *in vivo* chez l'Homme. Il est également important de garder en tête que la NAFLD est une maladie complexe impliquant un rôle important des cellules de Kupffer et des cellules étoilées (Vergani, 2017). Ainsi, la considération de l'interaction des hépatocytes avec ces autres types cellulaires dans un modèle de co-culture 2D ou sous forme d'organoïdes est importante. De tels modèles cellulaires ont déjà été développées pour répondre à cette problématique, comme présenté dans la partie 3.2. de l'introduction de ce manuscrit (Ouchi et al., 2019; Spruss et al., 2011; Wobser et al., 2009). Ces co-cultures représentaient de bons modèles pour l'étude

de la NAFLD puisqu'une accumulation de lipides ainsi que l'induction de facteurs pro-inflammatoires et pro-fibrogéniques étaient observés en condition de surcharge lipidique. L'utilisation de ce type de modèles semble désormais être une perspective du projet importante à tester, notamment dans l'optique d'étude de l'aggravation de la stéatose vers la NASH.

Il serait ensuite important de tester notre hypothèse sur un modèle *in vivo*. Pour cela, l'utilisation de souris C57BL6/J nourries avec un régime HFD enrichi ou non par des acides gras PA, SA ou LA serait intéressant. L'administration de paracétamol par l'eau de boisson dans un groupes de souris pourra également être réalisé afin d'évaluer l'impact d'une induction du CYP2E1 par les acides gras sur l'hépatotoxicité du paracétamol à l'échelle d'un organisme. Après euthanasie des souris, il serait ainsi important de mesurer l'ensemble des paramètres permettant de déterminer si la modulation du CYP2E1 par les acides gras peut avoir un impact sur l'aggravation de la stéatose et ainsi que sur la sensibilité du foie à la toxicité du paracétamol.

REFERENCES

- Abdelmegeed, M. A., Banerjee, A., Yoo, S.-H., Jang, S., Gonzalez, F. J., & Song, B.-J. (2012). Critical role of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in the development of high fat-induced nonalcoholic steatohepatitis. *Journal of Hepatology*, 57(4), 860–866. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.05.019>
- Abdelmegeed, M. A., Carruthers, N. J., Woodcroft, K. J., Kim, S. K., & Novak, R. F. (2005). Acetoacetate induces CYP2E1 protein and suppresses CYP2E1 mRNA in primary cultured rat hepatocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 315(1), 203–213. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.084608>
- Abdelmegeed, M. A., Ha, S.-K., Choi, Y., Akbar, M., & Song, B.-J. (2017). Role of CYP2E1 in mitochondrial dysfunction and hepatic tissue injury in alcoholic and non-alcoholic diseases. *Current Molecular Pharmacology*, 10(3), 207–225. <https://doi.org/10.2174/1874467208666150817111114>
- Abdel-razzak, Z., Loyer, P., Fautrel, A., Gautier, J.-C., Corcos, L., Turlin, B., Beaune, P., & Guillouzo, A. (1993). Cytokines Down-regulate Expression of Major Cytochrome 450 Enzymes in Adult Human Hepatocytes in Primary Culture. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 44(4), 707–715.
- Abdul-Wahed, A., Guilmeau, S., & Postic, C. (2017). Sweet Sixteenth for ChREBP: Established Roles and Future Goals. *Cell Metabolism*, 26(2), 324–341. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.07.004>
- Achterbergh, R., Lammers, L. A., Klümper, H.-J., Mathôt, R. A. A., & Romijn, J. A. (2022). Short-term high-fat diet alters acetaminophen metabolism in healthy individuals. *Therapeutic Drug Monitoring, Publish Ah*. <https://doi.org/10.1097/ftd.0000000000000993>
- Adams, M. L., Pierce, R. H., Vail, M. E., White, C. C., Tonge, R. P., Kavanagh, T. J., Fausto, N., Nelson, S. D., & Bruschi, S. A. (2001). Enhanced Acetaminophen Hepatotoxicity in Transgenic Mice Overexpressing BCL-2. *Molecular Pharmacology*, 60(5), 907–915. <https://doi.org/10.1124/mol.60.5.907>
- Akazawa, Y., Cazanave, S., Mott, J. L., Elmi, N., Bronk, S. F., Kohno, S., Charlton, M. R., & Gores, G. J. (2010). Palmitoleate attenuates palmitate-induced Bim and PUMA up-regulation and hepatocyte lipoapoptosis. *Journal of Hepatology*, 52(4), 586–593. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.01.003>

- Albillos, A., de Gottardi, A., & Rescigno, M. (2020). The gut-liver axis in liver disease: Pathophysiological basis for therapy. *Journal of Hepatology*, 72(3), 558–577. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.10.003>
- Aljabban, J., Rohr, M., Syed, S., Khorfan, K., Borkowski, V., Aljabban, H., Segal, M., Mukhtar, M., Mohammed, M., Panahiazar, M., Hadley, D., Spengler, R., & Spengler, E. (2022). Transcriptome changes in stages of non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Hepatology*, 14(7), 1382–1397. <https://doi.org/10.4254/wjh.v14.i7.1382>
- Aljomah, G., Baker, S. S., Liu, W., Kozielski, R., Oluwole, J., Lupu, B., Baker, R. D., & Zhu, L. (2015). Induction of CYP2E1 in non-alcoholic fatty liver diseases. *Experimental and Molecular Pathology*, 99(3), 677–681. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.11.008>
- Allard, J., le Guillou, D., Begriche, K., & Fromenty, B. (2019). Drug-induced liver injury in obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Advances in Pharmacology*, 85, 75–107. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2019.01.003>
- Alsahli, M., & Gerich, J. E. (2017). Renal glucose metabolism in normal physiological conditions and in diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 133, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2017.07.033>
- Alves-Bezerra, M., & Cohen, D. E. (2018). Triglyceride metabolism in the liver. *Comprehensive Physiology*, 8(1), 1–22. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170012>
- Anderson, B. J. (2008). Paracetamol (Acetaminophen): Mechanisms of action. *Pediatric Anesthesia*, 18(10), 915–921. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9592.2008.02764.x>
- Anzenbacher, P., & Anzenbacherová, E. (2001). Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58(5–6), 737–747. <https://doi.org/10.1007/pl00000897>
- Araya, Z., Hosseinpour, F., Bodin, K., & Wikvall, K. (2003). Metabolism of 25-hydroxyvitamin D3 by microsomal and mitochondrial vitamin D3 25-hydroxylases (CYP2D25 and CYP27A1): A novel reaction by CYP27A1. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1632(1–3), 40–47. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(03\)00062-3](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(03)00062-3)
- Arzumanian, V. A., Kiseleva, O. I., & Poverennaya, E. v. (2021). The curious case of the HepG2 cell line: 40 years of expertise. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23). <https://doi.org/10.3390/ijms222313135>

- Asgharpour, A., Cazanave, S. C., Pacana, T., Seneshaw, M., Vincent, R., Banini, B. A., Kumar, D. P., Daita, K., Min, H., Mirshahi, F., Bedossa, P., Sun, X., Hoshida, Y., Srinivas, V., Contaifer Jr, D., Warncke, U. O., Wijesinghe, D. S., & Sanyal, A. J. (2016). A diet-induced animal model of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular cancer. *Journal of Hepatology*, 65(3), 579–588. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.05.005.A>
- Aubert, J., Begriche, K., Delannoy, M., Morel, I., Pajaud, J., Ribault, C., Lepage, S., McGill, M. R., Lucas-Clerc, C., Turlin, B., Robin, M.-A., Jaeschke, H., & Fromenty, B. (2012). Differences in early acetaminophen hepatotoxicity between obese ob/ob and db/db mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 342(3), 676–687. <https://doi.org/10.1124/jpet.112.193813>
- Aubert, J., Begriche, K., Knockaert, L., Robin, M.-A., & Fromenty, B. (2011). Increased expression of cytochrome P450 2E1 in nonalcoholic fatty liver disease: Mechanisms and pathophysiological role. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 35, 630–637. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2011.04.015>
- Baek, H., Bae, S., Lee, M., & Sohn, Y. (2006). Pharmacokinetics of Chlorzoxazone in Rats with Diabetes: Induction of CYP2E1 on 6-Hydroxychlorzoxazone Formation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 95(11), 2452–2462. <https://doi.org/10.1002/jps>
- Bai, J., & Cederbaum, A. I. (2006). Overexpression of CYP2E1 in mitochondria sensitizes HepG2 cells to the toxicity caused by depletion of glutathione. *Journal of Biological Chemistry*, 281(8), 5128–5136. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510484200>
- Bajt, M. L., Cover, C., Lemasters, J. J., & Jaeschke, H. (2006). Nuclear Translocation of Endonuclease G and Apoptosis-Inducing Factor during Acetaminophen-Induced Liver Cell Injury. *Toxicological Sciences*, 94(1), 217–225. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl077>
- Ballestri, S., Nascimbeni, F., Baldelli, E., Marrazzo, A., Romagnoli, D., & Lonardo, A. (2017). NAFLD as a Sexual Dimorphic Disease: Role of Gender and Reproductive Status in the Development and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Inherent Cardiovascular Risk. *Advances in Therapy*, 34. <https://doi.org/10.1007/s12325-017-0556-1>
- Banales, J. M., Huebert, R. C., Karlsen, T., Strazzabosco, M., LaRusso, N. F., & Gores, G. (2019). Cholangiocyte pathobiology. *Nature Rev Gastroenterology Hepatology*, 16(5), 269–281. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0125-y>

- Bansal, S., Liu, C. P., Sepuri, N. B. V., Anandatheerthavarada, H. K., Selvaraj, V., Hoek, J., Milne, G. L., Guengerich, F. P., & Avadhani, N. G. (2010). Mitochondria-targeted cytochrome P450 2E1 induces oxidative damage and augments alcohol-mediated oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 285(32), 24609–24619. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.121822>
- Bardag-Gorce, F., French, B. A., Nan, L., Song, H., Nguyen, S. K., Yong, H., Dede, J., & French, S. W. (2006). CYP2E1 induced by ethanol causes oxidative stress, proteasome inhibition and cytokeratin aggresome (Mallory body-like) formation. *Experimental and Molecular Pathology*, 81(3), 191–201. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2006.07.007>
- Baumgardner, J. N., Shankar, K., Hennings, L., Badger, T. M., & Ronis, M. J. J. (2007). A new model for nonalcoholic steatohepatitis in the rat utilizing total enteral nutrition to overfeed a high-polyunsaturated fat diet. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 294(1), 27–38. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00296.2007>
- Begriche, K., Lettéron, P., Abbey-Toby, A., Vadrot, N., Robin, M. A., Bado, A., Pessayre, D., & Fromenty, B. (2008). Partial leptin deficiency favors diet-induced obesity and related metabolic disorders in mice. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 294(5), 939–951. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00379.2007>
- Begriche, K., Massart, J., Robin, M.-A., Bonnet, F., & Fromenty, B. (2013). Mitochondrial adaptations and dysfunctions in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 58(4), 1497–1507. <https://doi.org/10.1002/hep.26226>
- Begriche, K., Penhoat, C., Bernabeu-Gentey, P., Massart, J., & Fromenty, B. (2023). Acetaminophen-induced hepatotoxicity in obesity and nonalcoholic fatty liver disease: a critical review. *Livers*, 3(33), 33–53. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/livers3010003>
- Bell, L. N., Temm, C. J., Saxena, R., Vuppalachchi, R., Schauer, P., Rabinovitz, M., Krasinskas, A., Chalasani, N., & Mattar, S. (2010). Bariatric Surgery-Induced Weight Loss Reduces Hepatic Lipid Peroxidation Levels and Affects Hepatic Cytochrome P-450 Protein Content. *Annals of Surgery*, 251(6), 1041–1048. <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e3181dbb572>
- Bernauer, U., Heinrich-Hirsch, B., Tönnies, M., Peter-Matthias, W., & Gundert-Remy, U. (2006). Characterisation of the xenobiotic-metabolizing Cytochrome P450 expression pattern in human lung tissue by immunochemical and activity determination. *Toxicology Letters*, 164(3), 278–288. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.01.007>

- Bessone, F., Razori, M. V., & Roma, M. G. (2019). Molecular pathways of nonalcoholic fatty liver disease development and progression. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(1), 99–128. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2947-0>
- Biour, M., ben Salem, C., Chazouillères, O., Grangé, J. D., Serfaty, L., & Poupon, R. (2004). Drug-induced liver injury; fourteenth updated edition of the bibliographic database of liver injuries and related drugs. *Gastroenterologie Clinique et Biologique*, 28(8–9), 720–759. [https://doi.org/10.1016/s0399-8320\(04\)95062-2](https://doi.org/10.1016/s0399-8320(04)95062-2)
- Björnsson, E., & Angulo, P. (2007). Hepatitis C and Steatosis. *Archives of Medical Research*, 38(6), 621–627. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2006.09.001>
- Black, P. N., Sandoval, A., Arias-Barrau, E., & DiRusso, C. C. (2009). Targeting the Fatty Acid Transport Proteins (FATP) to Understand the Mechanisms Linking Fatty Acid Transport To Metabolism. *Immunology, Endocrine and Metabolic Agents in Medicinal Chemistry*, 9(1), 11–17.
- Blouin, A., Bolender, R. P., & Weibel, E. R. (1977). Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. *Journal of Cell Biology*, 72(2), 441–455. <https://doi.org/10.1083/jcb.72.2.441>
- Bondoc, F. Y., Bao, Z., Hu, W. Y., Gonzalez, F. J., Wang, Y., Yang, C. S., & Hong, J. Y. (1999). Acetone catabolism by cytochrome P450 2E1: Studies with CYP2E1-null mice. *Biochemical Pharmacology*, 58(3), 461–463. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(99\)00111-2](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(99)00111-2)
- Borlak, J., Chatterji, B., Londhe, K. B., & Watkins, P. B. (2013). Serum acute phase reactants hallmark healthy individuals at risk for acetaminophen-induced liver injury. *Genome Medicine*, 5(9). <https://doi.org/10.1186/gm493>
- Botting, R., & Ayoub, S. S. (2005). COX-3 and the mechanism of action of paracetamol/acetaminophen. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 72(2 SPEC. ISS.), 85–87. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2004.10.005>
- Boursier, J., Mueller, O., Barret, M., Machado, M., Fizanne, L., Araujo-perez, F., Guy, C. D., Seed, P. C., Rawls, J. F., Lawrence, A., Hunault, G., Oberti, F., Calès, P., & Diehl, A. M. (2017). The severity of NAFLD is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota. *Hepatology*, 63(3), 764–775. <https://doi.org/10.1002/hep.28356>

- Browning, J. D., Szczepaniak, L. S., Dobbins, R., Nuremberg, P., Horton, J. D., Cohen, J. C., Grundy, S. M., & Hobbs, H. H. (2004). Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: Impact of ethnicity. *Hepatology*, 40(6), 1387–1395. <https://doi.org/10.1002/hep.20466>
- Bucher, S., Jalili, P., le Guillou, D., Begriche, K., Rondel, K., Martinais, S., Zalko, D., Corlu, A., Robin, M.-A., & Fromenty, B. (2017). Bisphenol A induces steatosis in HepaRG cells using a model of perinatal exposure. *Environmental Toxicology*, 32(3), 1024–1036. <https://doi.org/10.1002/tox>
- Bucher, S., Tête, A., Podechard, N., Liamin, M., Guillou, D. le, Chevanne, M., Coulouarn, C., Imran, M., Gallais, I., Fernier, M., Hamdaoui, Q., Robin, M., Sergent, O., Fromenty, B., & Lagadic-gossmann, D. (2018). Co-exposure to benzo[a]pyrene and ethanol induces a pathological progression of liver steatosis in vitro and in vivo. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24403-1>
- Burz, S. D., Monnoye, M., Philippe, C., Farin, W., Ratzu, V., Strozzi, F., Paillarse, J. M., Chêne, L., Blottière, H. M., & Gérard, P. (2021). Fecal microbiota transplant from human to mice gives insights into the role of the gut microbiota in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Microorganisms*, 9(1), 1–27. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010199>
- Canbay, A., Taimr, P., Torok, N., Higuchi, H., Friedman, S., & Gores, G. J. (2003). Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic. *Laboratory Investigation*, 83(5), 655–663. <https://doi.org/10.1097/01.LAB.0000069036.63405.5C>
- Caro, A. A., & Cederbaum, A. I. (2004). Oxidative Stress, Toxicology, and Pharmacology of CYP2E1. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 44, 27–42. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121704>
- Castell, J. V., Jover, R., Martínez-Jiménez, C. P., & Gómez-Lechón, M. J. (2006). Hepatocyte cell lines: Their use, scope and limitations in drug metabolism studies. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 2(2), 183–212. <https://doi.org/10.1517/17425255.2.2.183>
- Cederbaum, A. I. (2012). Alcohol Metabolism. *Clinics in Liver Disease*, 16(4), 667–685. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2012.08.002>
- Celebi, G., Cicek, A. F., Gurel, H., Genc, H., Kirik, A., Ercin, C. N., & Dogru, T. (2020). Microvesicular steatosis: A missed item in the management of nonalcoholic fatty liver disease? *Acta Gastro-Enterologica Belgica*, 83(4), 565–570.

- Chabowski, A., Zendzian-Piotrowska, M., Konstantynowicz, K., Pankiewicz, W., Mikołajczyk, A., Łukaszuk, B., & Górski, J. (2013). Fatty acid transporters involved in the palmitate and oleate induced insulin resistance in primary rat hepatocytes. *Acta Physiologica*, 207(2), 346–357. <https://doi.org/10.1111/apha.12022>
- Chalasani, N., Gorski, J., Asghar, M., Asghar, A., Foresman, B., Hall, S., & Crabb, D. (2003). Hepatic cytochrome P450 2E1 activity in nondiabetic patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 37(3), 544–550.
- Chandrasekharan, N. v, Dai, H., Lamar, K., Roos, T., Evanson, N. K., Tomsik, J., Elton, T. S., & Simmons, D. L. (2002). COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression PCOX-1 proteins). *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 99(21), 13926–13931. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.162468699
- Charlton, M., Krishnan, A., Viker, K., Sanderson, S., Cazanave, S., McConico, A., Masuoko, H., & Gores, G. (2011). Fast food diet mouse: Novel small animal model of NASH with ballooning, progressive fibrosis, and high physiological fidelity to the human condition. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 301(5). <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00145.2011>
- Chen, J., Petersen, D. R., Schenker, S., & Henderson, G. I. (2000). Formation of malondialdehyde adducts in livers of rats exposed to ethanol: Role in ethanol mediated inhibition of cytochrome c oxidase. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 24(4), 544–552. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2000.tb02023.x>
- Chen, J., Schenker, S., Frost, T. A., & Henderson, G. I. (1998). Inhibition of cytochrome c oxidase activity by 4-hydroxynonenal (HNE). Role of HNE adduct formation with the enzyme subunits. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1380(3), 336–344. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(98\)00002-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(98)00002-6)
- Cherubini, A., Casirati, E., Tomasi, M., & Valenti, L. (2021). PNPLA3 as a therapeutic target for fatty liver disease: the evidence to date. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 25(12), 1033–1043. <https://doi.org/10.1080/14728222.2021.2018418>
- Chiang, J. Y. L., & Ferrell, J. M. (2018). Bile acid metabolism in liver pathobiology. *Gene Expression*, 18(2), 71–87. <https://doi.org/10.3727/105221618X15156018385515>

- Chiew, A. L., & Buckley, N. A. (2021). Acetaminophen Poisoning. *Critical Care Clinics*, 37(3), 543–561. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2021.03.005>
- Chomchai, S., & Chomchai, C. (2018). Being overweight or obese as a risk factor for acute liver injury secondary to acute acetaminophen overdose. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*, 27(1), 19–24. <https://doi.org/10.1002/pds.4339>
- Choque, B., Catheline, D., Rioux, V., & Legrand, P. (2014). Linoleic acid: Between doubts and certainties. *Biochimie*, 96(1), 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.07.012>
- Chowdhary, V., Teng, K. yu, Thakral, S., Zhang, B., Lin, C. hao, Wani, N., Bruschweiler-Li, L., Zhang, X., James, L., Yang, D., Junge, N., Brüscheiler, R., Lee, W. M., & Ghoshal, K. (2017). miRNA-122 Protects Mice and Human Hepatocytes from Acetaminophen Toxicity by Regulating Cytochrome P450 Family 1 Subfamily A Member 2 and Family 2 Subfamily E Member 1 Expression. *American Journal of Pathology*, 187(12), 2758–2774. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.08.026>
- Chrøis, K. M., Larsen, S., Pedersen, J. S., Rygg, M. O., Boilsen, A. E. B., Bendtsen, F., & Dela, F. (2019). Acetaminophen toxicity induces mitochondrial complex I inhibition in human liver tissue. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 126(1), 86–91. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13304>
- Chtioui, H., Semela, D., Ledermann, M., Zimmermann, A., & Dufour, J. F. (2007). Expression and activity of the cytochrome P450 2E1 in patients with nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. *Liver International*, 27(6), 764–771. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2007.01524.x>
- Clapper, J. R., Hendricks, M. D., Gu, G., Wittmer, C., Dolman, C. S., Herich, J., Athanacio, J., Villescáz, C., Ghosh, S. S., Heilig, J. S., Lowe, C., & Roth, J. D. (2013). Diet-induced mouse model of fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis reflecting clinical disease progression and methods of assessment. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 305(7), 483–495. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00079.2013>
- Claridge, L. C., Eksteen, B., Smith, A., Shah, T., & Holt, A. P. (2010). Acute liver failure after administration of paracetamol at the maximum recommended daily dose in adults. *British Medical Journal*, 341, c6764–c6764. <https://doi.org/10.1136/bmj.c6764>
- Cobbina, E., & Akhlaghi, F. (2017). Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)—pathogenesis, classification, and effect on drug metabolizing enzymes and transporters. In *Drug Metabolism*

Reviews (Vol. 49, Issue 2, pp. 197–211). Taylor and Francis Ltd.
<https://doi.org/10.1080/03602532.2017.1293683>

- Corcoran, G. B., & Wong, B. K. (1987). Obesity as a Risk Factor in Drug-Induced Organ Injury: Increased Liver and Kidney Damage by Acetaminophen in the Obese Overfed Rat. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 241(3), 921–927.
- Cover, C., Mansouri, A., Knight, T. R., Bajt, M. L., Lemasters, J. J., Pessayre, D., & Jaeschke, H. (2005). Peroxynitrite-induced mitochondrial and endonuclease-mediated nuclear DNA damage in acetaminophen hepatotoxicity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 315(2), 879–887. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.088898>
- Crespo, J., Cayón, A., Fernández-Gil, P., Hernández-Guerra, M., Mayorga, M., Domínguez-Díez, A., Fernández-Escalante, J. C., & Pons-Romero, F. (2001). Gene expression of tumor necrosis factor α and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology*, 34(6), 1158–1163. <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.29628>
- Croci, I., Byrne, N. M., Choquette, S., Hills, A. P., Chachay, V. S., Clouston, A. D., O'Moore-Sullivan, T. M., Macdonald, G. A., Prins, J. B., & Hickman, I. J. (2013). Whole-body substrate metabolism is associated with disease severity in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*, 62(11), 1625–1633. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302789>
- Croom, E. (2012). Metabolism of xenobiotics of human environments. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (1st ed., Vol. 112). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415813-9.00003-9>
- Dasarathy, S., Yang, Y., McCullough, A. J., Marczewski, S., Bennet, C., & Kalhan, S. C. (2011). Elevated hepatic fatty acid oxidation, high plasma fibroblast growth factor 21, and fasting bile acids in nonalcoholic steatohepatitis. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 23(5), 382–388. <https://doi.org/10.1097/MEG.0b013e328345c8c7>.Elevated
- Day, C. P., & James, O. F. W. (1998). Steatohepatitis: A tale of two 'Hits'? *Gastroenterology*, 114(4 I), 842–845. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(98\)70599-2](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(98)70599-2)
- DeLeve, L., & Maretta-Mira, A. (2017). Liver Sinusoidal Endothelial Cell: An Update. *Semin Liver Disease*, 37(4), 377–387. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1617455>.Liver

- Demicheli, V., Moreno, D. M., & Radi, R. (2018). Human Mn-superoxide dismutase inactivation by peroxynitrite: A paradigm of metal-catalyzed tyrosine nitration: In vitro and in vivo. *Metallomics*, 10(5), 679–695. <https://doi.org/10.1039/c7mt00348j>
- Dentin, R., Benhamed, F., Hainault, I., Fauveau, V., Foulfelle, F., Dyck, J. R. B., Girard, J., & Postic, C. (2006). Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. *Diabetes*, 55(8), 2159–2170. <https://doi.org/10.2337/db06-0200>
- Déri, M. T., Kiss, A. F., Toth, K., Paulik, J., Sarvary, E., Kobori, L., & Monostory, K. (2020). End-stage renal disease reduces the expression of drug-metabolizing cytochrome P450s. *Pharmacological Reports*, 72(6), 1695–1705. <https://doi.org/10.1007/s43440-020-00127-w>
- Dey, A., & Cederbaum, A. I. (2007). Induction of cytochrome promotes liver injury in ob/ob mice. *Hepatology*, 45(6), 1355–1365. <https://doi.org/10.1002/hep.21603>
- Ding, L., Oligschlaeger, Y., Shiri-Sverdlov, R., & Houben, T. (2020). *Nonalcoholic Fatty Liver Disease* (pp. 1–37). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/164_2020_352
- Diraison, F., Moulin, P., & Beylot, M. (2003). Contribution of hepatic de novo lipogenesis and reesterification of plasma non esterified fatty acids to plasma triglyceride synthesis during non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes & Metabolism*, 29(5), 478–485. [https://doi.org/10.1016/s1262-3636\(07\)70061-7](https://doi.org/10.1016/s1262-3636(07)70061-7)
- Dixon, L. J., Barnes, M., Tang, H., Pritchard, M. T., Laura, E., & Clinic, C. (2013). Kupffer Cells in the Liver. *Comprehensive Physiology*, 3(2), 785–797. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120026>
- Donnelly, K. L., Smith, C. I., Schwarzenberg, S. J., Jessurun, J., Boldt, M. D., & Parks, E. J. (2005). Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(5), 1343–1351. <https://doi.org/10.1172/JCI23621>
- Donthamsetty, S., Bhawe, V. S., Mitra, M. S., Latendresse, J. R., & Mehendale, H. M. (2008). Nonalcoholic steatohepatitic (NASH) mice are protected from higher hepatotoxicity of acetaminophen upon induction of PPAR α with clofibrate. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 230(3), 327–337. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.02.031>
- Eaton, S. (2002). Control of mitochondrial β -oxidation flux. *Progress in Lipid Research*, 41(3), 197–239. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(01\)00024-8](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(01)00024-8)

- Emery, M. G., Fisher, J. M., Chien, J. Y., Kharash, E. D., Dellinger, E. P., Kowdley, K. v., & Thummel, K. E. (2003). CYP2E1 activity before and after weight loss in morbidly obese subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 38(2), 428–435.
- Enriquez, A., Leclercq, I., Farrell, G. C., & Robertson, G. (1999). Altered Expression of Hepatic CYP2E1 and CYP4A in Obese, Diabetic ob/ob Mice, and fa/fa Zucker Rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 255, 300–306. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0202>
- Eslam, M., Valenti, L., & Romeo, S. (2018). Genetics and epigenetics of NAFLD and NASH: Clinical impact. *Journal of Hepatology*, 68(2), 268–279. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.09.003>
- Evans, W. Ep. T. F. G. into R. T., & Relling, M. v. (1999). Pharmacogenomics: Translating Functional Genomics into Rational Therapeutics. *Science*, 286(5439), 487–491. <https://doi.org/10.1126/science.286.5439.487>
- Fabbrini, E., Mohammed, B. S., Magkos, F., Korenblat, K. M., & Bruce, W. (2008). Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 134(2), 424–431. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.11.038>
- Fazel, Y., Koenig, A. B., Sayiner, M., Goodman, Z. D., & Younossi, Z. M. (2016). Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease. *Metabolism*, 1017–1025. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2016.01.012>
- Fernandez-Checa, J. C., & Kaplowitz, N. (2005). Hepatic mitochondrial glutathione: Transport and role in disease and toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 204(3), 263–273. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.10.001>
- Ferramosca, A., & Zara, V. (2014). Modulation of hepatic steatosis by dietary fatty acids. *World Journal of Gastroenterology*, 20(7), 1746. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i7.1746>
- Fisher, C. D., Lickteig, A. J., Augustine, L. M., Ranger-moore, J., Jackson, J. P., Ferguson, S. S., & Cherrington, N. J. (2009). Hepatic Cytochrome P450 Enzyme Alterations in Humans with Progressive Stages of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Drug Metabolism and Disposition*, 37(10), 2087–2094. <https://doi.org/10.1124/dmd.109.027466>
- Fisher, E. S., & Curry, S. C. (2019). Evaluation and treatment of acetaminophen toxicity. *Advances in Pharmacology*, 85, 263–272. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2018.12.004>

- Frith, J., Day, C. P., Henderson, E., Burt, A. D., & Newton, J. L. (2009). Non-alcoholic fatty liver disease in older people. *Gerontology*, 55(6), 607–613. <https://doi.org/10.1159/000235677>
- Fromenty, B. (2013). Drug-induced liver injury in obesity. *Journal of Hepatology*, 58(4), 824–826. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.12.018>
- Fromenty, B., & Pessayre, D. (1995). Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. *Pharmacology & Therapeutics*, 67(1), 101–154. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(95\)00012-6](https://doi.org/10.1016/0163-7258(95)00012-6)
- Fromenty, B., & Pessayre, D. (1997). Impaired mitochondrial function in microvesicular steatosis Effects of drugs, ethanol, hormones and cytokines. *Journal of Hepatology*, 26, 43–53. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(97\)80496-5](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(97)80496-5)
- Fromenty, B., & Roden, M. (2022). Mitochondrial alterations in fatty liver diseases. *Journal of Hepatology*, 22. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.09.020>
- Frye, R. F., Tammara, B., Cowart, D., & Bramer, S. (1999). Effect of disulfiram-mediated CYP2E1 inhibition on the disposition of vesnarinone. *Journal of Clinical Pharmacology*, 39(11), 1177–1183.
- Fujii, H., Ikura, Y., Arimoto, J., Sugioka, K., Iezzoni, J. C., Park, S. H., Naruko, T., Itabe, H., Kawada, N., Caldwell, S. H., & Ueda, M. (2009). Expression of perilipin and adipophilin in nonalcoholic fatty liver disease; relevance to oxidative injury and hepatocyte ballooning. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 16(6), 893–901. <https://doi.org/10.5551/jat.2055>
- Gade, C., Dalhoff, K., Petersen, T. S., Riis, T., Schmeltz, C., Chabanova, E., Christensen, H. R., Mikus, G., Burhenne, J., Holm, J. C., & Holst, H. (2018). Higher chlorzoxazone clearance in obese children compared with nonobese peers. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 84(8), 1738–1747. <https://doi.org/10.1111/bcp.13602>
- Galicía-García, U., Benito-Vicente, A., Jebari, S., Larrea-Sebal, A., Siddiqi, H., Uribe, K. B., Ostolaza, H., & Martín, C. (2020). Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 1–34. <https://doi.org/10.3390/ijms21176275>
- Ge, W., Wang, T., Zhao, Y., Yang, Y., Sun, Q., Yang, X., Gao, Y., Xu, X., & Zhang, J. (2021). Period1 mediates rhythmic metabolism of toxins by interacting with CYP2E1. *Cell Death and Disease*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03343-7>

- Gebhardt, A. C., Lucas, D., Menez, J., & Seitz, H. K. (1997). Chlormethiazole inhibition of cytochrome P450 2E1 as assessed by chlorzoxazone hydroxylation in humans. *Hepatology*, 26(4), 957–961. <https://doi.org/10.1002/hep.510260423>
- Geib, T., Moghaddam, G., Supinski, A., Golizeh, M., & Sleno, L. (2021). Protein Targets of Acetaminophen Covalent Binding in Rat and Mouse Liver Studied by LC-MS/MS. *Frontiers in Chemistry*, 9. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.736788>
- Gibbons, G. F., Wiggins, D., Brown, A.-M., & Hebbachi, A.-M. (2004). Synthesis and function of hepatic very-low-density lipoprotein. *Biochemical Society Transactions*, 32(1), 59–64. <https://doi.org/10.1042/bst0320059>
- Gill, P., Bhattacharyya, S., McCullough, S., Letzig, L., Mishra, P. J., Luo, C., Dweep, H., & James, L. (2017). MicroRNA regulation of CYP 1A2, CYP3A4 and CYP2E1 expression in acetaminophen toxicity. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11811-y>
- Gnoni, A., & Giudetti, A. M. (2016). Dietary long-chain unsaturated fatty acids acutely and differently reduce the activities of lipogenic enzymes and of citrate carrier in rat liver. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 72(3), 485–494. <https://doi.org/10.1007/s13105-016-0495-3>
- Gonzalez, F. J. (2005). Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: Studies with CYP2E1. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 569(1–2), 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.04.021>
- Gopal, T., Kumar, N., Perriotte-Olson, C., Casey, C. A., Donohue, T. M., Harris, E. N., Talmon, G., Kabanov, A. V., & Saraswathi, V. (2020). Nanoformulated SOD1 ameliorates the combined NASH and alcohol-associated liver disease partly via regulating CYP2E1 expression in adipose tissue and liver. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 318(3), G428–G438. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00217.2019>
- Gorski, C., Jones, D. R., Wrighton, S. A., & Hall, S. D. (1997). Contribution of human CYP3A subfamily members to the 6-hydroxylation of chlorzoxazone. *Xenobiotica*, 27(3), 243–256. <https://doi.org/10.1080/004982597240578>
- Grangeon, A., Clermont, V., Barama, A., Gaudette, F., Turgeon, J., & Michaud, V. (2021). Determination of CYP450 expression levels in the human small intestine by mass spectrometry-based targeted proteomics. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms222312791>

- Gravel, S., Chiasson, J. L., Turgeon, J., Grangeon, A., & Michaud, V. (2019). Modulation of CYP450 Activities in Patients With Type 2 Diabetes. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 106(6), 1280–1289. <https://doi.org/10.1002/cpt.1496>
- Greco, D., Kotronen, A., Westerbacka, J., Puig, O., Arkkila, P., Kiviluoto, T., Laitinen, S., Kolak, M., Fisher, R. M., Hamsten, A., Auvinen, P., Yki-Järvinen, H., & Gene, Y.-J. H. (2008). Gene expression in human NAFLD. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal Liver Physiology*, 294(5), 1281–1287. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00074.2008>
- Gripon, P., Rumin, S., Urban, S., le Seyec, J., Glaise, D., Cannie, I., Guyomard, C., Lucas, J., Trepo, C., & Guguen-Guillouzo, C. (2002). Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24), 15655–15660. <https://doi.org/10.1073/pnas.232137699>
- Grygiel-Górniak, B. (2014). Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: Nutritional and clinical implications - A review. *Nutrition Journal*, 13(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-13-17>
- Guengerich, F. P. (2020). Cytochrome P450 2E1 and its roles in disease. *Chemico-Biological Interactions*, 322. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109056>
- Guengerich, F. P., Waterman, M. R., & Egli, M. (2016). Recent Structural Insights into Cytochrome P450 Function. *Trends in Pharmacology*, 37(8), 625–640. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.05.006>
- Guillouzo, A., Corlu, A., Aninat, C., Glaise, D., Morel, F., & Guguen-Guillouzo, C. (2007). The human hepatoma HepaRG cells: A highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chemico-Biological Interactions*, 168(1), 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.12.003>
- Gujral, J. S., Knight, T. R., Farhood, A., Lynn Bajt, M., & Jaeschke, H. (2002). Mode of Cell Death after Acetaminophen Overdose in Mice: Apoptosis or Oncotic Necrosis? *Toxicological Sciences*, 67, 322–328. <https://doi.org/10.1093/toxsci/67.2.322>
- Hamaguchi, M., Kojima, T., Ohbora, A., Takeda, N., Fukui, M., & Kato, T. (2012). Aging is a risk factor of nonalcoholic fatty liver disease in premenopausal women. *World Journal of Gastroenterology*, 18(3), 237–243. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i3.237>

- Han, S., Ray, J. W., Pathak, P., Sweet, D. R., Zhang, R., Gao, H., Jain, N., Koritzinsky, E. H., Matoba, K., Xu, W., Chan, E. R., Simon, D. I., & Jain, M. K. (2019). KLF15 regulates endobiotic and xenobiotic metabolism. *Nature Metabolism*, 1(4), 422–430. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0054-7>
- Hanawa, N., Shinohara, M., Saberi, B., Gaarde, W. A., Han, D., & Kaplowitz, N. (2008). Role of JNK Translocation to Mitochondria Leading to Inhibition of Mitochondria Bioenergetics in Acetaminophen-induced Liver Injury. *Journal of Biological Chemistry*, 283(20), 13565–13577. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708916200>
- Hannemann, F., Bichet, A., Ewen, K. M., & Bernhardt, R. (2007). Cytochrome P450 systems-biological variations of electron transport chains. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1770(3), 330–344. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.07.017>
- Haouzi, D., Cohen, I., Vieira, H. L. A., Poncet, D., Boya, P., Castedo, M., Vadrot, N., Belzacq, A.-S., Fau, D., Brenner, C., Feldmann, G., & Kroemer, G. (2002). Mitochondrial permeability transition as a novel principle of hepatorenal toxicity in vivo. *Apoptosis*, 7(5), 395–405. <https://doi.org/10.1023/a:1020026923038>
- Hardwick, R. N., Fisher, C. D., Canet, M. J., Lake, A. D., & Cherrington, N. J. (2010). Diversity in antioxidant response enzymes in progressive stages of human nonalcoholic fatty liver disease. *Drug Metabolism and Disposition*, 38(12), 2293–2301. <https://doi.org/10.1124/dmd.110.035006>
- Harjumäki, R., Pridgeon, C. S., & Ingelman-Sundberg, M. (2021). CYP2E1 in alcoholic and non-alcoholic liver injury. Roles of ROS, reactive intermediates and lipid overload. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms22158221>
- Harvison, P. J., Guengerich, F. P., Rashed, M. S., & Nelson, S. D. (1988). Cytochrome P-450 isozyme selectivity in the oxidation of acetaminophen. *Chemical Research in Toxicology*, 1(1), 47–52. <https://doi.org/10.1021/tx00001a009>
- Hatting, M., Tavares, C. D. J., Sharabi, K., Rines, A. K., & Puigserver, P. (2018). Insulin regulation of gluconeogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1411(1), 21–35. <https://doi.org/10.1111/nyas.13435>
- Hazai, E., Vereczkey, L., & Monostory, K. (2002). Reduction of Toxic Metabolite Formation of Acetaminophen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 291(4), 1089–1094. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6541>

- Hecketsweiler, B., & Hecketsweiler, P. (2006). *Voyage en biochimie* (E. Masson, Ed.; 3e edition). Elsevier.
- Higushi, N., Kato, M., Shundo, Y., Tajiri, H., Tanaka, M., Yamashita, N., Kohjima, M., Kotoh, K., Nakamuta, M., Takayanagi, R., & Enjoji, M. (2008). Liver X receptor in cooperation with SREBP-1c is a major lipid synthesis regulator in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology Research*, 38, 1122–1129. <https://doi.org/10.1111/j.1872-034X.2008.00382.x>
- Hillgartner, F. B., Salati, L. M., & Goodridge, A. G. (1995). Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis. *Physiological Reviews*, 75(1), 47–76. <https://doi.org/10.1152/physrev.1995.75.1.47>
- Högestätt, E. D., Jönsson, B. A. G., Ermund, A., Andersson, D. A., Björk, H., Alexander, J. P., Cravatt, B. F., Basbaum, A. I., & Zygmunt, P. M. (2005). Conversion of Acetaminophen to the Bioactive N-Acylphenolamine AM404 via Fatty Acid Amide Hydrolase-dependent Arachidonic Acid Conjugation in the Nervous System. *Journal of Biological Chemistry*, 280(36), 31405–31412. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501489200>
- Hohmann, N., Schröder, F., Moreira, B., Teng, H., Burhenne, J., Bruckner, T., Mueller, S., Haefeli, W., & Seitz, H. K. (2022). Clomethiazole inhibits cytochrome P450 2E1 and improves alcoholic liver disease. *Gut*, 71(4), 842–844. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2021-324727>
- Houten, S. M., Violante, S., Ventura, F. v., & Wanders, R. J. A. (2016). The Biochemistry and Physiology of Mitochondrial Fatty Acid β -Oxidation and Its Genetic Disorders. *Annual Review of Physiology*, 78(1), 23–44. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105045>
- Hukkanen, J., Pelkonen, O., Hakkola, J., & Raunio, H. (2002). Expression and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 (CYP) enzymes in human lung. *Critical Reviews in Toxicology*, 32(5), 391–411. <https://doi.org/10.1080/20024091064273>
- Huo, Y., Yin, S., Yan, M., Win, S., Aung Than, T., Aghajan, M., Hu, H., & Kaplowitz, N. (2017). Protective role of p53 in acetaminophen hepatotoxicity. *Free Radical Biology and Medicine*, 106, 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.028>
- Hur, K. Y., So, J.-S., Ruda, V., Frank-Kamenetsky, M., Fitzgerald, K., Koteliansky, V., Iwawaki, T., Glimcher, L. H., & Lee, A.-H. (2012). IRE1 α activation protects mice against acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Journal of Experimental Medicine*, 209(2), 307–318. <https://doi.org/10.1084/jem.20111298>

- Ipsen, D. H., Lykkesfeldt, J., & Tveden-Nyborg, P. (2018). Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(18), 3313–3327. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2860-6>
- Isse, F. A., El-Sherbeni, A. A., & El-Kadi, A. O. S. (2022). The multifaceted role of cytochrome P450-Derived arachidonic acid metabolites in diabetes and diabetic cardiomyopathy. *Drug Metabolism Reviews*, 54(2), 141–160. <https://doi.org/10.1080/03602532.2022.2051045>
- Ito, T., Asakura, K., Tougou, K., Fukuda, T., Kubota, R., Nonen, S., Fujio, Y., & Azuma, J. (2007). Regulation of cytochrome P450 2E1 under hypertonic environment through TonEBP in human hepatocytes. *Molecular Pharmacology*, 72(1), 173–181. <https://doi.org/10.1124/mol.106.033480>
- Ito, Y., Abril, E. R., Bethea, N. W., McCuskey, M. K., & McCuskey, R. S. (2006). Dietary steatotic liver attenuates acetaminophen hepatotoxicity in mice. *Microcirculation*, 13(1), 19–27. <https://doi.org/10.1080/10739680500383423>
- Jaeschke, H., Akakpo, J. Y., Umbaugh, D. S., & Ramachandran, A. (2020). Novel Therapeutic Approaches Against Acetaminophen-induced Liver Injury and Acute Liver Failure. *Toxicological Sciences*, 174(2), 159–167. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfaa002>
- Jaeschke, H., Duan, L., Akakpo, J. Y., Farhood, A., & Ramachandran, A. (2018). The role of apoptosis in acetaminophen hepatotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 118, 709–718. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.06.025>
- Jaeschke, H., & Ramachandran, A. (2020a). Mechanisms and pathophysiological significance of sterile inflammation during acetaminophen hepatotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 138, 111240. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111240>
- Jaeschke, H., & Ramachandran, A. (2020b). Acetaminophen-induced apoptosis: Facts versus fiction. *Journal of Clinical and Translational Research*, 6(2), 36–47.
- Jakobsson, A., Westerberg, R., & Jacobsson, A. (2006). Fatty acid elongases in mammals: Their regulation and roles in metabolism. *Progress in Lipid Research*, 45(3), 237–249. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2006.01.004>
- Jensen, N. J., Wodschow, H. Z., Nilsson, M., & Rungby, J. (2020). Effects of ketone bodies on brain metabolism and function in neurodegenerative diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms21228767>

- Jetter, A., & Kullak-Ublick, G. A. (2020). Drugs and hepatic transporters: A review. *Pharmacological Research*, 154. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.04.018>
- Jian, T., Ao, X., Wu, Y. X., Lv, H., Ma, L., Zhao, L., Tong, B., Ren, B., Chen, J., & Li, W. (2017). Total sesquiterpene glycosides from Loquat (*Eriobotrya japonica*) leaf alleviate high-fat diet induced non-alcoholic fatty liver disease through cytochrome P450 2E1 inhibition. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 91, 229–237. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.04.056>
- Jimenez-Lopez, J. M., & Cederbaum, A. I. (2005). CYP2E1-dependent oxidative stress and toxicity: Role in ethanol-induced liver injury. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 1(4), 671–685. <https://doi.org/10.1517/17425255.1.4.671>
- Jin, M., Ande, A., Kumar, A., & Kumar, S. (2013). Regulation of cytochrome P450 2e1 expression by ethanol: role of oxidative stress-mediated pkc/jnk/sp1 pathway. *Cell Death & Disease*, 4(3), e554–e554. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.78>
- Johnston, J. B., Ouellet, H., Podust, L. M., & Ortiz de Montellano, P. R. (2011). Structural control of cytochrome P450-catalyzed ω -hydroxylation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 507(1), 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.08.011>
- Julve, J., Martín-Campos, J. M., Escolà-Gil, J. C., & Blanco-Vaca, F. (2016). Chylomicrons: Advances in biology, pathology, laboratory testing, and therapeutics. *Clinica Chimica Acta*, 455, 134–148. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.02.004>
- Jump, D. B. (2008). N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *Current Opinion in Lipidology*, 19(3), 242–247. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e3282ffaf6a>
- Jump, D. B., Botolin, D., Wang, Y., Xu, J., Christian, B., & Demeure, O. (2005). Fatty Acid Regulation of Hepatic Gene Transcription. *The Journal of Nutrition*, 135(11), 2503–2506. <https://doi.org/10.1093/jn/135.11.2503>
- Jung, D. (1985). Disposition of acetaminophen in protein-calorie malnutrition. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 232(1), 178–182.
- Junker, A. E., Glud, L., Holst, J. J., Knop, F. K., & Vilsbøll, T. (2016). Diabetic and nondiabetic patients with nonalcoholic fatty liver disease have an impaired incretin effect and fasting hyperglucagonaemia. *Journal of Internal Medicine*, 279(5), 485–493. <https://doi.org/10.1111/joim.12462>

- Kakimoto, P. A., & Kowaltowski, A. J. (2016). Effects of high fat diets on rodent liver bioenergetics and oxidative imbalance. *Redox Biology*, 8, 216–225. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.01.009>
- Kalapos, M. P. (2003). On the mammalian acetone metabolism: From chemistry to clinical implications. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1621(2), 122–139. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(03\)00051-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(03)00051-5)
- Kalsi, S. S., Dargan, P. I., Waring, W. S., & Wood, D. M. (2011). A review of the evidence concerning hepatic glutathione depletion and susceptibility to hepatotoxicity after paracetamol overdose. *Open Access Emergency Medicine*, 3, 87–96. <https://doi.org/10.2147/OAEM.S24963>
- Kamada, Y., Matsumoto, H., Tamura, S., Fukushima, J., Kiso, S., Fukui, K., Igura, T., Maeda, N., Kihara, S., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., Shimomura, I., & Hayashi, N. (2007). Hypoadiponectinemia accelerates hepatic tumor formation in a nonalcoholic steatohepatitis mouse model. *Journal of Hepatology*, 47(4), 556–564. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.03.020>
- Kanabus, M., Heales, S. J., & Rahman, S. (2013). Development of pharmacological strategies for mitochondrial disorders. *British Journal of Pharmacology*, 171, 1798–1817. <https://doi.org/10.1111/bph.2014.171.issue-8>
- Kangani, C. O., Kelley, D. E., & DeLany, J. P. (2008). New method for GC/FID and GC–C-IRMS analysis of plasma free fatty acid concentration and isotopic enrichment. *Journal of Chromatography B*, 873(1), 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.08.009>
- Kanuri, G., & Bergheim, I. (2013). In vitro and in vivo models of Non Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 11963–11980. <https://doi.org/10.3390/ijms140611963>
- Kawai, T., Autieri, M. v., & Scalia, R. (2021). Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 320(3), C375–C391. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00379.2020>
- Kawano, Y., & Cohen, D. E. (2013). Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Gastroenterology*, 48(4), 434–441. <https://doi.org/10.1007/s00535-013-0758-5>

- Kazankov, K., Jørgensen, S. M. D., Thomsen, K. L., Møller, H. J., Vilstrup, H., George, J., Schuppan, D., & Grønbaek, H. (2019). The role of macrophages in nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 16(3), 145–159. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0082-x>
- Kersten, S., & Stienstra, R. (2017). The role and regulation of the peroxisome proliferator activated receptor alpha in human liver. *Biochimie*, 136, 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.12.019>
- Khan, R. S., Bril, F., Cusi, K., & Newsome, P. N. (2019). Modulation of Insulin Resistance in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology*, 70(2), 711–724. <https://doi.org/10.1002/hep.30429>
- Khemawoot, P., Yokogawa, K., Shimada, T., & Miyamoto, K. ichi. (2007). Obesity-induced increase of CYP2E1 activity and its effect on disposition kinetics of chlorzoxazone in Zucker rats. *Biochemical Pharmacology*, 73(1), 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.09.006>
- Kienesberger, P. C., Oberer, M., Lass, A., & Zechner, R. (2009). Mammalian patatin domain containing proteins : a family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions. *Journal of Lipid Research*, 63–68. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800082-JLR200>
- Kitto, L. J., & Henderson, N. C. (2021). Hepatic Stellate Cell Regulation of Liver Regeneration and Repair. *Hepatology Communications*, 5(3), 358–370. <https://doi.org/10.1002/hep4.1628>
- Klaunig, J. E., Li, X., & Wang, Z. (2018). Role of xenobiotics in the induction and progression of fatty liver disease. *Toxicology Research*, 7(4), 664–680. <https://doi.org/10.1039/C7TX00326A>
- Knebel, B., Haas, J., Hartwig, S., Jacob, S., Köllmer, C., Nitzgen, U., Muller-Wieland, D., & Kotzka, J. (2012). Liver-specific expression of transcriptionally active srebp-1c is associated with fatty liver and increased visceral fat mass. *PLoS ONE*, 7(2), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031812>
- Knockaert, L., Fromenty, B., & Robin, M. A. (2011). Mechanisms of mitochondrial targeting of cytochrome P450 2E1: Physiopathological role in liver injury and obesity. *FEBS Journal*, 278(22), 4252–4260. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08357.x>
- Kohjima, M., Enjoji, M., Higuchi, N., Kato, M., Kotoh, K., Yoshimoto, T., Fujino, T., Yada, M., Yada, R., Harada, N., Takayanagi, R., & Nakamuta, M. (2007). Re-evaluation of fatty acid

metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *International Journal of Molecular Medicine*, 20(3), 351–358. <https://doi.org/10.3892/ijmm.20.3.351>

Kolb, H., Kempf, K., Röhling, M., Lenzen-Schulte, M., Schloot, N. C., & Martin, S. (2021). Ketone bodies: from enemy to friend and guardian angel. *BMC Medicine*, 19(1), 313. <https://doi.org/10.1186/s12916-021-02185-0>

Koliaki, C., Szendroedi, J., Kaul, K., Jelenik, T., Nowotny, P., Jankowiak, F., Herder, C., Carstensen, M., Krausch, M., Knoefel, W. T., Schlensak, M., & Roden, M. (2015). Adaptation of Hepatic Mitochondrial Function in Humans with Non-Alcoholic Fatty Liver Is Lost in Steatohepatitis. *Cell Metabolism*, 21(5), 739–746. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.04.004>

Kolodziejczyk, A. A., Zheng, D., Shibolet, O., & Elinav, E. (2019). The role of the microbiome in NAFLD and NASH. *EMBO Molecular Medicine*, 11(2), 1–13. <https://doi.org/10.15252/emmm.201809302>

Kon, K., Ikejima, K., Okumura, K., Aoyama, T., Arai, K., Takei, Y., Lemasters, J. J., & Sato, N. (2007). Role of apoptosis in acetaminophen hepatotoxicity. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 22, 49–52. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2007.04962.x>

Kon, K., Ikejima, K., Okumura, K., Arai, K., Aoyama, T., & Watanabe, S. (2010). Diabetic KK-A y mice are highly susceptible to oxidative hepatocellular damage induced by acetaminophen. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 299, 329–337. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00361.2009>.-Despite

Koonen, D. P., Jacobs, R. L., Febbraio, M., Young, M. E., Soltys, C.-L., Ong, H., Vance, D. E., & Dyck, J. R. (2007). Increased Hepatic CD36 Expression Contributes to Dyslipidemia Associated With Diet-Induced Obesity. *Diabetes*, 56(12), 2863–2871. <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/56/12/2863.long>

Koop, D. R., & Tierney, D. J. (1990). Multiple mechanisms in the regulation of ethanol-inducible cytochrome P450IIE1. *BioEssays*, 12(9), 429–435. <https://doi.org/10.1002/bies.950120906>

Kotronen, A., Seppälä-Lindroos, A., Vehkavaara, S., Bergholm, R., Frayn, K. N., Fielding, B. A., & Yki-Järvinen, H. (2009). Liver fat and lipid oxidation in humans. *Liver International*, 29(9), 1439–1446. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2009.02076.x>

Kozlitina, J., Smagris, E., Stender, S., Nordestgaard, B. G., Heather, H., Tybjærg-hansen, A., Vogt, T. F., Hobbs, H. H., & Jonathan, C. (2014). Exome-wide association study identifies a TM6SF2

variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nature Genetics*, 46(4), 352–356. <https://doi.org/10.1038/ng.2901>

Krammer, J., Digel, M., Ehehalt, F., Stremmel, W., Füllekrug, J., Ehehalt, R., & Ehehalt, M. R. (2011). Overexpression of CD36 and Acyl-CoA Synthetases FATP2, FATP4 and ACSL1 Increases Fatty Acid Uptake in Human Hepatoma Cells. *International Journal of Medical Sciences*, 8(7), 599–614. <https://doi.org/10.7150/ijms.8.599>

Kravchenko, L. v., Tutel'yan, V. A., Trusov, N. v., Guseva, G. v., & Aksenov, I. v. (2014). Effect of Polyunsaturated Fatty Acids ω -3 on the Induction of Activity and Expression of CYP1A1 and CYP1A2 Genes in the Liver of Rats under the Influence of Indole-3-Carbinol. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 156(3), 327–331. <https://doi.org/10.1007/s10517-014-2341-3>

Kuban, W., & Daniel, W. A. (2021). Cytochrome P450 expression and regulation in the brain. *Drug Metabolism Reviews*, 53(1), 1–29. <https://doi.org/10.1080/03602532.2020.1858856>

Kučera, O., Roušar, T., Staňková, P., Haňáčková, L., Lotková, H., Podhola, M., & Červinková, Z. (2012). Susceptibility of rat non-alcoholic fatty liver to the acute toxic effect of acetaminophen. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 27(2), 323–330. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2011.06807.x>

Kuzgun, G., Başaran, R., Arıoğlu İnan, E., & Can Eke, B. (2020). Effects of insulin treatment on hepatic CYP1A1 and CYP2E1 activities and lipid peroxidation levels in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, 19(2), 1157–1164. <https://doi.org/10.1007/s40200-020-00616-y>

Labbe, G., Pessayre, D., & Fromenty, B. (2008). Drug-induced liver injury through mitochondrial dysfunction: Mechanisms and detection during preclinical safety studies. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 22(4), 335–353. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2008.00608.x>

Laethem, R. M., Balazy, M., Falck, J. R., Laethem, C. L., & Koop, D. R. (1993). Formation of 19(S)-, 19(R)-, and 18(R)-hydroxyeicosatetraenoic acids by alcohol-inducible cytochrome P450 2E1. *Journal of Biological Chemistry*, 268(17), 12912–12918. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)31472-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)31472-8)

Laffel, L. (1999). Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 15(6), 412–426. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-7560\(199911/12\)15:6<412::AID-DMRR72>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-7560(199911/12)15:6<412::AID-DMRR72>3.0.CO;2-8)

- Lake, A. D., Chaput, A. L., Novak, P., Cherrington, N. J., & Smith, C. L. (2016). Transcription factor binding site enrichment analysis predicts drivers of altered gene expression in nonalcoholic steatohepatitis. *Biochemical Pharmacology*, 122, 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.11.006>
- Lambert, J. E., Ramos-Roman, M. A., Browning, J. D., & Parks, E. J. (2014). Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 146(3), 726–735. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.11.049>
- Landau, B. R., Wahren, J., Chandramouli, V., Schumann, W. C., Ekberg, K., & Kalhan, S. C. (1996). Contributions of gluconeogenesis to glucose production in the fasted state. *Journal of Clinical Investigation*, 98(2), 378–385. <https://doi.org/10.1172/JCI118803>
- Lawson, J. A., Fisher, M. A., Simmons, C. A., Farhood, A., & Jaeschke, H. (1999). Inhibition of Fas Receptor (CD95)-Induced Hepatic Caspase Activation and Apoptosis by Acetaminophen in Mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 156(3), 179–186. <https://doi.org/10.1006/taap.1999.8635>
- Le Guillou, D., Bucher, S., Begriche, K., Hoët, D., Lombès, A., Labbe, G., & Fromenty, B. (2018). Drug-Induced Alterations of Mitochondrial DNA Homeostasis in Steatotic and Nonsteatotic HepaRG Cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 365(3), 711–726. <https://doi.org/10.1124/jpet.117.246751>
- Leclercq, I. A. (2004). Antioxidant defence mechanisms: new players in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis? *Clinical Science*, 106(3), 235–237. <https://doi.org/10.1042/CS20030368>
- Leclercq, I. A., Farrell, G. C., Field, J., Bell, D. R., Gonzalez, F. J., & Robertson, G. R. (2000). CYP2E1 and CYP3A4 as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *The Journal of Clinical Investigation*, 105(8), 1067–1075. <https://doi.org/10.1172/JCI8814>
- Leclercq, I. A., Field, J., Enriquez, A., Farrell, G. C., & Robertson, G. R. (2000). Constitutive and inducible expression of hepatic CYP2E1 in leptin-deficient ob/ob mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 268(2), 337–344. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2125>

- Leclercq, I. A., Lebrun, V. A., Stärkel, P., & Horsmans, Y. J. (2007). Intrahepatic insulin resistance in a murine model of steatohepatitis: Effect of PPAR γ agonist pioglitazone. *Laboratory Investigation*, 87(1), 56–65. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700489>
- Lee, Y. J., Ko, E. H., Kim, J. E., Kim, E., Lee, H., Choi, H., Yu, J. H., Kim, H. J., Seong, J. K., Kim, K. S., & Kim, J. W. (2012). Nuclear receptor PPAR γ -regulated monoacylglycerol O-acyltransferase 1 (MGAT1) expression is responsible for the lipid accumulation in diet-induced hepatic steatosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(34), 13656–13661. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203218109>
- Leeming, M. G., Gamon, L. F., Wille, U., Donald, W. A., & O’Hair, R. A. J. (2015). What Are the Potential Sites of Protein Arylation by N-Acetyl-p -benzoquinone Imine (NAPQI)? *Chemical Research in Toxicology*, 28(11), 2224–2233. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00373>
- Leise, M. D., Poterucha, J. J., & Talwalkar, J. A. (2014). Drug-Induced Liver Injury. *Mayo Clinic Proceedings*, 89(1), 95–106. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2013.09.016>
- Leung, T. M., & Nieto, N. (2013). CYP2E1 and oxidant stress in alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*, 58(2), 395–398. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.08.018>
- Li, X., Yang, Y., Zhang, B., Lin, X., Fu, X., An, Y., Zou, Y., Wang, J. X., Wang, Z., & Yu, T. (2022). Lactate metabolism in human health and disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01151-3>
- Lieber, C. S., Cao, Q., DeCarli, L. M., Leo, M. A., Mak, K. M., Ponomarenko, A., Ren, C., & Wang, X. (2007). Role of Medium-Chain Triglycerides in the Alcohol-Mediated Cytochrome P450 2E1. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 10, 1660–1668.
- Lin, Q., Kang, X., Li, X., Wang, T., Liu, F., Jia, J., Jin, Z., & Xue, Y. (2019). NF- κ B-mediated regulation of rat CYP2E1 by two independent signaling pathways. *PLoS ONE*, 14(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225531>
- Listenberger, L. L., Han, X., Lewis, S. E., Cases, S., Farese, R. v, Ory, D. S., & Schaffer, J. E. (2003). Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(6), 3077–3082. <https://doi.org/10.1073/pnas.0630588100>
- Liu, J., Kong, D., Ai, D., Xu, A., Yu, W., Peng, Z., Peng, J., Wang, Z., Liu, R., Li, W., Hai, C., Zhang, X., & Wang, X. (2022). Insulin resistance enhances binge ethanol-induced liver injury

through promoting oxidative stress and up-regulation CYP2E1. *Life Sciences*, 303. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120681>

Liu, X., Cooper, D. E., Cluntun, A. A., Warmoes, M. O., Zhao, S., Reid, M. A., Liu, J., Lund, P. J., Lopes, M., Garcia, B. A., Wellen, E., Kirsch, D. G., & Locasale, J. W. (2018). Acetate production from glucose and coupling to mitochondrial metabolism in mammals. *Cell*, 175(2), 502–513. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.040>.Acetate

Loeper, J., Descatoire, V., Maurice, M., Beaune, P., Feldmann, G., Larrey, D., & Pessayre, D. (1989). Presence of functional cytochrome P-450 on isolated rat hepatocyte plasma membrane. *Hepatology*, 11(5), 850–858.

Loomba, R., Friedman, S. L., & Shulman, G. I. (2021). Mechanisms and disease consequences of nonalcoholic fatty liver disease. *Cell*, 184(10), 2537–2564. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.015>

Loomba, R., Seguritan, V., Li, W., Long, T., Klitgord, N., Bhatt, A., Dulai, P. S., Caussy, C., Bettencourt, R., Highlander, S., Jones, M., Sirlin, C., Schnabl, B., Brinkac, L., Schork, N., Chen, C.-H., Brenner, D., Biggs, W., Yooseph, S., ... Nelson, K. E. (2017). Gut microbiome based metagenomic signature for non-invasive detection of advanced fibrosis in human nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Metabolism*, 25(2), 1054–1062. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.04.001>.Gut

Louvet, A., Carolle, L., Wandji, N., Lemaître, E., Khaldi, M., Lafforgue, C., Artru, F., Quesnel, B., Lassailly, G., Dharancy, S., & Mathurin, P. (2021). Acute Liver Injury With Therapeutic Doses of Acetaminophen: A Prospective Study. *Hepatology*, 73(5), 1945–1955. <https://doi.org/10.1002/hep.31678/supinfo>

Lu, S., Wang, Y., & Liu, J. (2022). Tumor necrosis factor- α signaling in nonalcoholic steatohepatitis and targeted therapies. *Journal of Genetics and Genomics*, 49(4), 269–278. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2021.09.009>

Lu, Y., & Cederbaum, A. I. (2008). CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(5), 723–738. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.11.004>

Lua, Y.-H., Ong, W.-W., Wong, H.-K., & Chew, C.-H. (2020). Ethanol-induced CYP2E1 Expression is Reduced by Lauric Acid via PI3K Pathway in HepG2 Cells. *Tropical Life Sciences Research*, 85(3), 63–75. <https://doi.org/10.21315/tlsr2020.31.3.5>

- Lucas, D., Farez, C., Bardou, L., Vaisse, J., Attali, J., & Valensi, P. (1998). Cytochrome P450 2E1 activity in diabetic and obese patients as assessed by chlorzoxazone hydroxylation. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 12(5), 553–558. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.1998.tb00985.x>
- Luo, N., Li, J., Wei, Y., Lu, J., & Dong, R. (2021). Hepatic Stellate Cell: A Double-Edged Sword in the Liver. *Physiological Research*, 70(6), 821–829. <https://doi.org/10.33549/physiolres.934755>
- Luukkonen, P. K., Zhou, Y., A, N. H. P., Dwivedi, O. P., Hyötyläinen, T., Ali, A., Juuti, A., Leivonen, M., Tukiainen, T., Ahonen, L., Scott, E., Palmer, J. M., Arola, J., Orho-melander, M., Vikman, P., Anstee, Q. M., Groop, L., Yki-järvinen, H., Olkkonen, V. M., & Orešic, M. (2017). Impaired hepatic lipid synthesis from polyunsaturated fatty acids in TM6SF2 E167K variant carriers with NAFLD. *Journal of Hepathology*, 67(1), 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.02.014>
- Mahli, A., Thasler, W. E., Patsenker, E., Müller, S., Stickel, F., Müller, M., Seitz, H. K., Cederbaum, A. I., & Hellerbrand, C. (2015). Identification of cytochrome CYP2E1 as critical mediator of synergistic effects of alcohol and cellular lipid accumulation in hepatocytes in vitro. *Oncotarget*, 6(39), 41464–41478. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6203>
- Mantena, S. K., Vaughn, D. P., Andringa, K. K., Eccleston, H. B., King, A. L., Abrams, G. A., Doeller, J. E., Kraus, D. W., Darley-USmar, V. M., & Bailey, S. M. (2009). High fat diet induces dysregulation of hepatic oxygen gradients and mitochondrial function in vivo. *Biochemical Journal*, 417(1), 183–193. <https://doi.org/10.1042/BJ20080868>
- Marchesini, G., Avagnina, S., Barantani, E. G., Ciccarone, A. M., Corira, F., Dall’Aglia, E., Dalle Grave, R., Morpurgo, P. S., Tomasi, F., & Vitacolonna, E. (2005). Aminotransferase and gamma-glutamyltranspeptidase levels in obesity are associated with insulin resistance and the metabolic syndrome. *Journal of Endocrinological Investigation*, 28(4), 333–339. <https://doi.org/10.1007/BF03347199>
- Mari, M., & Cederbaum, A. I. (2000). CYP2E1 overexpression in HepG2 cells induces glutathione synthesis by transcriptional activation of γ -glutamylcysteine synthetase. *Journal of Biological Chemistry*, 275(20), 15563–15571. <https://doi.org/10.1074/jbc.M907022199>
- Marin, J. J. G., Macias, R. I. R., Briz, O., Banales, J. M., & Monte, M. J. (2016). Bile Acids in Physiology, Pathology and Pharmacology. *Current Drug Metabolism*, 17(1), 4–29. <https://doi.org/10.2174/1389200216666151103115454>

- Marušić, M., Paić, M., Knobloch, M., & Liberati Pršo, A. M. (2021). NAFLD, Insulin Resistance, and Diabetes Mellitus Type 2. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2021/6613827>
- Mashek, D. G. (2013). Hepatic fatty acid trafficking: Multiple forks in the road. *Advances in Nutrition*, 4(6), 697–710. <https://doi.org/10.3945/an.113.004648>
- Massart, J., Begriche, K., Buron, N., Porceddu, M., Borgne-Sanchez, A., & Fromenty, B. (2013). Drug-Induced Inhibition of Mitochondrial Fatty Acid Oxidation and Steatosis. *Current Pathobiology Reports*, 1(3), 147–157. <https://doi.org/10.1007/s40139-013-0022-y>
- Massart, J., Begriche, K., & Fromenty, B. (2021). Cytochrome P450 2E1 should not be neglected for acetaminophen-induced liver injury in metabolic diseases with altered insulin levels or glucose homeostasis. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 45(1). <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2020.05.018>
- Massart, J., Begriche, K., Hartman, J. H., & From. (2022). Role of mitochondrial cytochrome P450 2E1 in healthy and diseased liver. *Cells*, 11(2), 1–14. <https://doi.org/10.3390/cells11020288>
- Masubuchi, Y., Suda, C., & Horie, T. (2005). Involvement of mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced liver injury in mice. *Journal of Hepatology*, 42(1), 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2004.09.015>
- Maurice, J., & Manousou, P. (2018). Non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical Medicine, Journal of the Royal College of Physicians of London*, 18(3), 245–250. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.18-3-245>
- McGill, M. R., & Hinson, J. A. (2020). The development and hepatotoxicity of acetaminophen: reviewing over a century of progress. *Drug Metabolism Reviews*, 52(4), 472–500. <https://doi.org/10.1080/03602532.2020.1832112>
- McGill, M. R., & Jaeschke, H. (2013). Metabolism and disposition of acetaminophen: Recent advances in relation to hepatotoxicity and diagnosis. *Pharmaceutical Research*, 30(9), 2174–2187. <https://doi.org/10.1007/s11095-013-1007-6>
- McGill, M. R., Lebofsky, M., Norris, H. R. K., Slawson, M. H., Bajt, M. L., Xie, Y., Williams, C. D., Wilkins, D. G., Rollins, D. E., & Jaeschke, H. (2013). Plasma and liver acetaminophen-protein adduct levels in mice after acetaminophen treatment: Dose-response, mechanisms, and

clinical implications. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 269(3), 240–249. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.03.026>

McGill, M. R., Yan, H. M., Ramachandran, A., Murray, G. J., Rollins, D. E., & Jaeschke, H. (2011). HepaRG cells: A human model to study mechanisms of acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology*, 53(3), 974–982. <https://doi.org/10.1002/hep.24132>

McMillian, M. K., Grant, E. R., Zhong, Z., Parker, J. B., Li, L., Zivin, R. A., Burczynski, M. E., & Johnson, M. D. (2001). Nile Red Binding to HepG2 Cells: An Improved Assay for In Vitro Studies of Hepatosteatosis. *In Vitro & Molecular Toxicology*, 14(3), 177–190. <https://doi.org/10.1089/109793301753407948>

Mehlem, A., Hagberg, C. E., Muhl, L., Eriksson, U., & Falkevall, A. (2013). Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease. *Nature Protocols*, 8(6), 1149–1154. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.055>

Meijnikman, A. S., Davids, M., Herrema, H., Aydin, O., Tremaroli, V., Rios-Morales, M., Levels, H., Bruin, S., de Brauw, M., Verheij, J., Kemper, M., Holleboom, A. G., Tushuizen, M. E., Schwartz, T. W., Nielsen, J., Brandjes, D., Dirinck, E., Weyler, J., Verrijken, A., ... Nieuwdorp, M. (2022). Microbiome-derived ethanol in nonalcoholic fatty liver disease. *Nature Medicine*, 28(10), 2100–2106. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-02016-6>

Michaut, A., le Guillou, D., Moreau, C., Bucher, S., McGill, M. R., Martinais, S., Gicquel, T., Morel, I., Robin, M.-A., Jaeschke, H., & Fromenty, B. (2016). A cellular model to study drug-induced liver injury in nonalcoholic fatty liver disease: application to acetaminophen. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 292, 40–55. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.12.020>

Michaut, A., Moreau, C., Robin, M. A., & Fromenty, B. (2014). Acetaminophen-induced liver injury in obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Liver International*, 34(7), e171–e179. <https://doi.org/10.1111/liv.12514>

Minato, T., Tsutsumi, M., Tsuchishima, M., Hayashi, N., Saito, T., Matsue, Y., Toshikuni, N., Arisawa, T., & George, J. (2014). Binge alcohol consumption aggravates oxidative stress and promotes pathogenesis of NASH from obesity-induced simple steatosis. *Molecular Medicine*, 20(1), 490–502. <https://doi.org/10.2119/molmed.2014.00048>

Miquilena-Colina, M. E., Lima-Cabello, E., Sánchez-Campos, S., García-Mediavilla, M. V., Fernández-Bermejo, M., Lozano-Rodríguez, T., Vargas-Castrillón, J., Buqué, X., Ochoa, B., Aspichueta, P., González-Gallego, J., & García-Monzón, C. (2011). Hepatic fatty acid

translocase CD36 upregulation is associated with insulin resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *Gut*, 60(10), 1394–1402. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.222844>

Mithieux, G., & Gautier-Stein, A. (2014). Intestinal glucose metabolism revisited. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 105(3), 295–301. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2014.04.008>

Mitsuyoshi, H., Yasui, K., Harano, Y., Endo, M., Tsuji, K., Minami, M., Itoh, Y., Okanoue, T., & Yoshikawa, T. (2009). Analysis of hepatic genes involved in the metabolism of fatty acids and iron in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology Research*, 39(4), 366–373. <https://doi.org/10.1111/j.1872-034X.2008.00464.x>

Mittendorfer, B., Yoshino, M., Patterson, B. W., & Klein, S. (2016). VLDL triglyceride kinetics in lean, overweight, and obese men and women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 101(11), 4151–4160. <https://doi.org/10.1210/jc.2016-1500>

Mofrad, P., Contos, M. J., Haque, M., Sargeant, C., Fisher, R. A., Luketic, V. A., Sterling, R. K., Shiffman, M. L., Stravitz, R. T., & Sanyal, A. J. (2003). Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. *Hepatology*, 37(6), 1286–1292. <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50229>

Mohri, T., Nakajima, M., Fukami, T., Takamiya, M., Aoki, Y., & Yokoi, T. (2010). Human CYP2E1 is regulated by miR-378. *Biochemical Pharmacology*, 79(7), 1045–1052. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.11.015>

Morgan, E. T., Koop, D. R., & Coon, M. J. (1983). Comparison of six rabbit liver cytochrome P-450 isozymes in formation of a reactive metabolite of acetaminophen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 112(1), 8–13. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(83\)91789-8](https://doi.org/10.1016/0006-291X(83)91789-8)

Morigny, P., Houssier, M., Mouisel, E., & Langin, D. (2016). Adipocyte lipolysis and insulin resistance. *Biochimie*, 125, 259–266. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.10.024>

Musso, O., Aninat, C., Loyer, P., & Corlu, A. (2020). Structure et fonctions des hépatocytes. *EMC - Hépatologie*, 0(0). [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S1155-1976\(20\)55956-1](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S1155-1976(20)55956-1)

- Myers, R. P., & Shaheen, A. A. M. (2009). Hepatitis C, alcohol abuse, and unintentional overdoses are risk factors for acetaminophen-related hepatotoxicity. *Hepatology*, 49(4), 1399–1400. <https://doi.org/10.1002/hep.22798>
- Nakai, K., Tanaka, H., Hanada, K., Ogata, H., Suzuki, F., Kumada, H., Miyajima, A., Ishida, S., Sunouchi, M., Habano, W., Kamikawa, Y., Kubota, K., Kita, J., Ozawa, S., & Ohno, Y. (2008). Decreased expression of cytochromes P450 1A2, 2E1, and 3A4 and drug transporters Na⁺-taurocholate-cotransporting polypeptide, organic cation transporter 1, and organic anion-transporting peptide-C correlates with the progression of liver fibrosis in chron. *Drug Metabolism and Disposition*, 36(9), 1786–1793. <https://doi.org/10.1124/dmd.107.020073>
- Nakamuta, M., Kohjima, M., Morizono, S., Kotoh, K., Yoshimoto, T., Miyagi, I., & Enjoji, M. (2005). Evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *International Journal of Molecular Medicine*, 16(4), 163–635. <https://doi.org/10.3892/ijmm.16.4.631>
- Nascimento, a F., Ip, B. C., Luvizotto, R. a, Seitz, H. K., & Wang, X. D. (2013). Aggravation of nonalcoholic steatohepatitis by moderate alcohol consumption is associated with decreased SIRT1 activity in rats. *Hepatobiliary Surgery and Nutrition*, 2(5), 252–259. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2304-3881.2013.07.05>
- Nebert, D. W., Wikvall, K., & Miller, W. L. (2013). Human cytochromes P450 in health and disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1612). <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0431>
- Nguyen, G. C., Sam, J., & Thuluvath, P. J. (2008). Hepatitis C is a predictor of acute liver injury among hospitalizations for acetaminophen overdose in the United States: A nationwide analysis. *Hepatology*, 48(4), 1336–1341. <https://doi.org/10.1002/hep.22536>
- Nguyen, T. T. P., Kim, D. Y., Lee, Y. G., Lee, Y. S., Truong, X. T., Lee, J. H., Song, D. K., Kwon, T. K., Park, S. H., Jung, C. H., Moon, C., Osborne, T. F., Im, S. S., & Jeon, T. Il. (2021). SREBP-1c impairs ULK1 sulphydration-mediated autophagic flux to promote hepatic steatosis in high-fat-diet-fed mice. *Molecular Cell*, 81(18), 3820-3832.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.06.003>
- Niemelä, O., Parkkila, S., Juvonen, R. O., Viitala, K., Gelboin, H. v., & Pasanen, M. (2000). Cytochromes P450 2A6, 2E1, and 3A and production of protein-aldehyde adducts in the liver

of patients with alcoholic and non-alcoholic liver diseases. *Journal of Hepatology*, 33(6), 893–901. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(00\)80120-8](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(00)80120-8)

Novak, R. F., & Woodcroft, K. J. (2000). The Alcohol-inducible form of Cytochrome P450 (CYP 2E1): Role in Toxicology and Regulation of Expression. *Archives of Pharmacal Research*, 23(4), 267–282. <https://doi.org/10.1007/BF02975435>

Oesch-Bartlomowicz, B., & Oesch, F. (2008). Phosphorylation of xenobiotic-metabolizing cytochromes P450. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392(6), 1085–1092. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2315-2>

Oesch-Bartlomowicz, B., Padma, P. R., Becker, R., Richter, B., Hengstler, J. G., Freeman, J. E., Wolf, C. R., & Oesch, F. (1998). Differential modulation of CYP2E1 activity by cAMP-dependent protein kinase upon ser129 replacement. *Experimental Cell Research*, 242(1), 294–302. <https://doi.org/10.1006/excr.1998.4120>

Ohashi, N., & Kohno, T. (2020). Analgesic Effect of Acetaminophen: A Review of Known and Novel Mechanisms of Action. *Frontiers in Pharmacology*, 11(November), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.580289>

Omura, T. (2006). Mitochondrial P450s. *Chemico-Biological Interactions*, 163(1–2), 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.06.008>

Omura, T., & Sato, R. (1962). A new cytochrome in liver microsomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 237(4), 1375–1376. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)60338-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)60338-2)

Orellana, M., Rodrigo, R., Varela, N., Araya, J., Poniachik, J., Csendes, A., Smok, G., & Videla, L. A. (2006). Relationship between in vivo chlorzoxazone hydroxylation, hepatic cytochrome P450 2E1 content and liver injury in obese non-alcoholic fatty liver disease patients. *Hepatology Research*, 34(1), 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.hepres.2005.10.001>

Osabe, M., Sugatani, J., Fukuyama, T., Ikushiro, S. I., Ikari, A., & Miwa, M. (2008). Expression of hepatic UDP-glucuronosyltransferase 1A1 and 1A6 correlated with increased expression of the nuclear constitutive androstane receptor and peroxisome proliferator-activated receptor α in male rats fed a high-fat and high-sucrose diet. *Drug Metabolism and Disposition*, 36(2), 294–302. <https://doi.org/10.1124/dmd.107.017731>

- Ota, T., Gayet, C., & Ginsberg, H. N. (2008). Inhibition of apolipoprotein B100 secretion by lipid-induced hepatic endoplasmic reticulum stress in rodents. *Journal of Clinical Investigation*, 118(1), 316–332. <https://doi.org/10.1172/JCI32752>
- Ouchi, R., Togo, S., Kimura, M., Shinozawa, T., Koido, M., Koike, H., Thompson, W., Karns, R. A., Mayhew, C. N., McGrath, P. S., McCauley, H. A., Zhang, R. R., Lewis, K., Hakozaki, S., Ferguson, A., Saiki, N., Yoneyama, Y., Takeuchi, I., Mabuchi, Y., ... Takebe, T. (2019). Modeling Steatohepatitis in Humans with Pluripotent Stem Cell-Derived Organoids. *Cell Metabolism*, 30(2), 374–384.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.05.007>
- Ozawa, M., Kubo, T., Lee, S. H., & Oe, T. (2019). LC-MS analyses of N-acetyl-p-benzoquinone-imine-adducts of glutathione, cysteine, N-acetylcysteine, and albumin in a plasma sample: A case study from a patient with a rare acetaminophen-induced acute swelling rash. *The Journal of Toxicological Sciences*, 44(8), 559–563. <https://doi.org/10.2131/jts.44.559>
- Pacheco, A., & Postic, C. (2020). Role of hepatokines in inter-organ dialogue in physiology and pathophysiology. *Medecine Des Maladies Metaboliques*, 14(4), 345–352. <https://doi.org/10.1016/j.mmm.2020.04.008>
- Pafili, K., & Roden, M. (2021). Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) from pathogenesis to treatment concepts in humans. *Molecular Metabolism*, 50, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101122>
- Pakravan, N., Waring, W. S., Sharma, S., Ludlam, C., Megson, I., & Bateman, D. N. (2008). Risk factors and mechanisms of anaphylactoid reactions to acetylcysteine in acetaminophen overdose. *Clinical Toxicology*, 46(8), 697–702. <https://doi.org/10.1080/15563650802245497>
- Pardo, V., González-Rodríguez, Á., Muntané, J., Kozma, S. C., & Valverde, Á. M. (2015). Role of hepatocyte S6K1 in palmitic acid-induced endoplasmic reticulum stress, lipotoxicity, insulin resistance and in oleic acid-induced protection. *Food and Chemical Toxicology*, 80, 298–309. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.03.029>
- Park, J., Zhao, Y., Zhang, F., Zhang, S., Kwong, A. C., Zhang, Y., Hoffmann, H. H., Bushweller, L., Wu, X., Ashbrook, A. W., Stefanovic, B., Chen, S., Branch, A. D., Mason, C. E., Jung, J. U., Rice, C. M., & Wu, X. (2022). IL-6/STAT3 axis dictates the PNPLA3-mediated susceptibility to non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.08.022>

- Parks, E. J. (2002). Changes in fat synthesis influenced by dietary macronutrient content. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 61, 281–286. <https://doi.org/10.1079/PNS2002148>
- Parks, E. J., Skokan, L. E., Timlin, M. T., & Dingfelder, C. S. (2008). Dietary Sugars Stimulate Fatty Acid Synthesis in Adults. *The Journal of Nutrition*, 138(6), 1039–1046. <https://doi.org/10.1093/jn/138.6.1039>
- Pawar, A., & Jump, D. B. (2003). Unsaturated Fatty Acid Regulation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor α Activity in Rat Primary Hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 278(38), 35931–35939. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306238200>
- Pawella, L. M., Hashani, M., Eiteneuer, E., Renner, M., Bartenschlager, R., Schirmacher, P., & Straub, B. K. (2014). Perilipin discerns chronic from acute hepatocellular steatosis. *Journal of Hepatology*, 60(3), 633–642. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.11.007>
- Pedersen, J. S., Rygg, M. O., Kristiansen, V. B., Olsen, B. H., Serizawa, R. R., Holst, J. J., Madsbad, S., Gluud, L. L., Bendtsen, F., Jacob, N., & Albrechtsen, W. (2020). Nonalcoholic Fatty Liver Disease Impairs the Liver-Alpha Cell Axis Independent of Hepatic Inflammation and Fibrosis. *Hepatology Communications*, 4(11), 1610–1623. <https://doi.org/10.1002/hep4.1562/supinfo>
- Pessayre, D. (2007). Role of mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 22, S20–S27. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2006.04640.x>
- Pessayre, D., Berson, A., Fromenty, B., & Mansouri, A. (2001). Mitochondria in steatohepatitis. *Seminars in Liver Disease*, 21(1), 57–69. <https://doi.org/10.1055/s-2001-12929>
- Pessayre, D., & Fromenty, B. (2005). NASH: a mitochondrial disease. *Journal of Hepatology*, 42, 928–940. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2005.03.004>
- Pessayre, D., Wandscheer, J.-C., Cobert, B., Level, R., Degoit, C., Batt, A.-M., Martins, N., & Benhamou, J. P. (1980). Additive effects of inducers and fasting on acetaminophen hepatotoxicity. *Biochemical Pharmacology*, 29, 2219–2223. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(80\)90201-4](https://doi.org/10.1016/0006-2952(80)90201-4)
- Petersen, M. C., Vatner, D., & Shulman, G. I. (2017). Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(10), 572–587. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.80>

- Piccinin, E., Ducheix, S., Peres, C., Arconzo, M., Vegliante, M. C., Ferretta, A., Bellafante, E., Villani, G., & Moschetta, A. (2019). PGC-1 β Induces Susceptibility To Acetaminophen-Driven Acute Liver Failure. *Scientific Reports*, 9(1), 16821. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53015-6>
- Plewka, D., Plewka, A., Szczepanik, T., Morek, M., Bogunia, E., Wittek, P., & Kijonka, C. (2014). Expression of selected cytochrome P450 isoforms and of cooperating enzymes in colorectal tissues in selected pathological conditions. *Pathology Research and Practice*, 210(4), 242–249. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2013.12.010>
- Postic, C., & Girard, J. (2008). Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: Lessons from genetically engineered mice. *Journal of Clinical Investigation*, 118(3), 829–838. <https://doi.org/10.1172/JCI34275>
- Povsic, M., Wong, O. Y., Perry, R., & Bottomley, J. (2019). A Structured Literature Review of the Epidemiology and Disease Burden of Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH). *Advances in Therapy*, 36(7), 1574–1594. <https://doi.org/10.1007/s12325-019-00960-3>
- Powell, E. E., Wong, V. W. S., & Rinella, M. (2021). Non-alcoholic fatty liver disease. *The Lancet*, 397(10290), 2212–2224. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32511-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32511-3)
- Projean, D., Dautrey, S., Vu, H. K., Groblewski, T., Brazier, J. L., & Ducharme, J. (2005). Selective downregulation of hepatic cytochrome P450 expression and activity in a rat model of inflammatory pain. *Pharmaceutical Research*, 22(1), 62–70. <https://doi.org/10.1007/s11095-004-9010-6>
- Promptila, N., Wittayalertpanya, S., & Komolmit, P. (2008). Hepatic cytochrome P450 2E1 activity in nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 91(5), 733–738. <https://doi.org/10.1007/s11095-004-9010-6>
- Puri, P., Wiest, M. M., Cheung, O., Mirshahi, F., Sargeant, C., Min, H.-K., Contos, M. J., Sterling, R. K., Fuchs, M., Zhou, H., Watkins, S. M., & Sanyal, A. J. (2009). The Plasma Lipidomic Signature of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology*, 50(6), 1827–1838. <https://doi.org/10.1002/hep.23229>
- Quesnot, N., Bucher, S., Fromenty, B., & Robin, M. A. (2014). Modulation of metabolizing enzymes by bisphenol A in human and animal models. *Chemical Research in Toxicology*, 27(9), 1463–1473. <https://doi.org/10.1021/tx500087p>

- Quesnot, N., Bucher, S., Gade, C., Vlach, M., Vene, E., Valença, S., Gicquel, T., Holst, H., Robin, M.-A., & Loyer, P. (2018). Production of chlorzoxazone glucuronides via cytochrome P4502E1 dependent and independent pathways in human hepatocytes. *Archives of Toxicology*, 92(10), pp. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2300-2>
- Rada, P., González-Rodríguez, Á., García-Monzón, C., & Valverde, Á. M. (2020). Understanding lipotoxicity in NAFLD pathogenesis: is CD36 a key driver? *Cell Death and Disease*, 11(9). <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03003-w>
- Radosevich, J. J., Patanwala, A. E., & Erstad, B. L. (2016). Hepatotoxicity in Obese Versus Nonobese Patients With Acetaminophen Poisoning Who Are Treated With Intravenous N-Acetylcysteine. *American Journal of Therapeutics*, 23(3), e714–e719. <https://doi.org/10.1097/01.mjt.0000434043.62372.00>
- Ramachandran, A., & Jaeschke, H. (2019a). Acetaminophen Hepatotoxicity. *Seminars in Liver Disease*, 39(2), 221–234. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1679919>
- Ramachandran, A., & Jaeschke, H. (2019b). Acetaminophen Hepatotoxicity - A Mitochondrial Perspective. *Advances in Pharmacology*, 85, 195–219. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2019.01.007>.Acetaminophen
- Ramachandran, A., & Jaeschke, H. (2020). A mitochondrial journey though acetaminophen hepatotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 140. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111282.A>
- Raucy, J. L., Lasker, J., Kraner, J. C., Salazar, D. E., Lieber, C. S., & Corcoran, G. B. (1991). Induction of cytochrome P450IIE1 in the obese overfed rat. *Molecular Pharmacology*, 39(3), 275–280. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh126>
- Raucy, J. L., Lasker, J., Ozaki, K., & Zoleta, V. (2004). Regulation of CYP2E1 by Ethanol and Palmitic Acid and CYP4A11 by Clofibrate in Primary Cultures of Human Hepatocytes. *Toxicological Sciences*, 79, 233–241. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh126>
- Ren, L. P., Chan, S. M. H., Zeng, X. Y., Laybutt, D. R., Iseli, T. J., Sun, R. Q., Kraegen, E. W., Cooney, G. J., Turner, N., & Ye, J. M. (2012). Differing endoplasmic reticulum stress response to excess lipogenesis versus lipid oversupply in relation to hepatic steatosis and insulin resistance. *PLoS ONE*, 7(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030816>

- Rhyu, J., & Yu, R. (2021). Newly discovered endocrine functions of the liver. *World Journal of Hepatology*, 13(11), 1611–1628. <https://doi.org/10.4254/wjh.v13.i11.1611>
- Rives, C., Fougerat, A., Ellero-Simatos, S., Loiseau, N., Guillou, H., Gamet-Payrastre, L., & Wahli, W. (2020). Oxidative stress in NAFLD: Role of nutrients and food contaminants. *Biomolecules*, 10(12), 1–69. <https://doi.org/10.3390/biom10121702>
- Roberts, D. J., & Hall, R. I. (2013). Drug absorption, distribution, metabolism and excretion considerations in critically ill adults. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 9(9), 1067–1084. <https://doi.org/10.1517/17425255.2013.799137>
- Romeo, S., Kozlitina, J., Xing, C., Pertsemlidis, A., Cox, D., Pennacchio, L. A., Boerwinkle, E., Cohen, J. C., & Hobbs, H. H. (2008). Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nature Genetics*, 40(12), 1461–1465. <https://doi.org/10.1038/ng.257>
- Ross, C., & Zolfagharin, R. (2011). Cytochrome P450s in the Regulation of Cellular Retinoic Acid Metabolism. *Annual Review of Nutrition*, 31, 65–87. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-072610-145127>. Cytochrome
- Roth, A. D., & Lee, M. Y. (2017). Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury (IDILI): Potential Mechanisms and Predictive Assays. *BioMed Research International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9176937>
- Rui, L. (2014). Energy Metabolism in the Liver. *Physiology & Behavior*, 4(1), 177–197. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130024>. Energy
- Rumack, B. H., & Matthew, H. (1975). Acetaminophen Poisoning and Toxicity. *Pediatrics for the Clinician*, 55(6), 871–876.
- Rutherford, A., Davern, T., Hay, J. E., Murray, N. G., Hassanein, T., Lee, W. M., & Chung, R. T. (2006). Influence of High Body Mass Index on Outcome in Acute Liver Failure. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 4(12), 1544–1549. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2006.07.014>
- Ryan, P. M., Bourdi, M., Korrapati, M. C., Proctor, W. R., Vasquez, R. A., Yee, S. B., Quinn, T. D., Chakraborty, M., & Pohl, L. R. (2012). Endogenous interleukin-4 regulates glutathione synthesis following acetaminophen-induced liver injury in mice. *Chemical Research in Toxicology*, 25(1), 83–93. <https://doi.org/10.1021/tx2003992>

- Sacerdoti, D., Gatta, A., & McGiff, J. C. (2003). Role of cytochrome P450-dependent arachidonic acid metabolites in liver physiology and pathophysiology. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 72(1–2), 51–71. [https://doi.org/10.1016/S1098-8823\(03\)00077-7](https://doi.org/10.1016/S1098-8823(03)00077-7)
- Saito, C., Lemasters, J. J., & Jaeschke, H. (2010). c-Jun N-terminal kinase modulates oxidant stress and peroxynitrite formation independent of inducible nitric oxide synthase in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 246(1–2), 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.04.015>
- Sakurai, Y., Kubota, N., Yamauchi, T., & Kadowaki, T. (2021). Role of insulin resistance in MAFLD. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 1–26. <https://doi.org/10.3390/ijms22084156>
- Salhab, H., Naughton, D. P., & Barker, J. (2020). Validation of an HPLC Method for the Simultaneous Quantification of Metabolic Reaction Products Catalyzed by CYP2E1 Enzyme Activity: Inhibitory Effect of Cytochrome P450 Enzyme CYP2E1 by Salicylic Acid in Rat Liver Microsomes. *Molecules*, 25(4), 1–18. <https://doi.org/10.3390/molecules25040932>
- Sangwung, P., Petersen, K. F., Shulman, G. I., & Knowles, J. W. (2020). Mitochondrial Dysfunction, Insulin Resistance, and Potential Genetic Implications. *Endocrinology*, 161(4). <https://doi.org/10.1210/endocr/bqaa017>
- Sanyal, A. J., Campbell–Sargent, C., Mirshahi, F., Rizzo, W. B., Contos, M. J., Sterling, R. K., Luketic, V. A., Shiffman, M. L., & Clore, J. N. (2001). Nonalcoholic steatohepatitis: Association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology*, 120(5), 1183–1192. <https://doi.org/10.1053/gast.2001.23256>
- Sargsyan, A., & Herman, M. A. (2019). Regulation of Glucose Production in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *Current Diabetes Reports*, 19(9). <https://doi.org/10.1007/s11892-019-1195-5>
- Sato, C., & Lieber, C. S. (1981). Mechanism of the Preventive Effect of Ethanol on Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 218(3), 811–815.
- Savic, D., Hodson, L., Neubauer, S., & Pavlides, M. (2020). The importance of the fatty acid transporter L-carnitine in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Nutrients*, 12(8), 1–17. <https://doi.org/10.3390/nu12082178>

- Schiodt, F. V., Ott, P., Christensen, E., & Bondesen, S. (2002). The value of plasma acetaminophen half-life in antidote-treated acetaminophen overdosage. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 71(4), 221–225.
- Schlaepfer, I. R., & Joshi, M. (2020). CPT1A-mediated Fat Oxidation, Mechanisms, and Therapeutic Potential. *Endocrinology*, 161(2), 1–14. <https://doi.org/10.1210/endo/bqz046>
- Schneider, K. M., Elfers, C., Ghallab, A., Schneider, C. V., Galvez, E. J. C., Mohs, A., Gui, W., Candels, L. S., Wirtz, T. H., Zuehlke, S., Spitteller, M., Myllys, M., Roulet, A., Ouzerdine, A., Lelouvier, B., Kilic, K., Liao, L., Nier, A., Latz, E., ... Trautwein, C. (2021). Intestinal Dysbiosis Amplifies Acetaminophen-Induced Acute Liver Injury. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 11(4), 909–933. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2020.11.002>
- Schuppan, D., Surabattula, R., & Wang, X. Y. (2018). Determinants of fibrosis progression and regression in NASH. *Journal of Hepatology*, 68(2), 238–250. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.11.012>
- Sekine, S., Lan, B. Y.-A., Bedolli, M., Feng, S., & Hebrok, M. (2006). Liver-specific loss of β-catenin blocks glutamine synthesis pathway activity and cytochrome P450 expression in mice. *Hepatology*, 43(4), 817–825. <https://doi.org/10.1002/hep.21131>
- Seliskar, M., & Rozman, D. (2007). Mammalian cytochromes P450-Importance of tissue specificity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770(3), 458–466. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.09.016>
- Sharma, M., Gadang, V., & Jaeschke, A. (2012). Critical Role for Mixed-Lineage Kinase 3 in Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity. *Molecular Pharmacology*, 82(5), 1001–1007. <https://doi.org/10.1124/mol.112.079863>
- Sheka, A. C., Adeyi, O., Thompson, J., Hameed, B., Crawford, P. A., & Ikramuddin, S. (2020). Nonalcoholic Steatohepatitis. *Journal of the American Medical Association*, 323(12), 1175–1183. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.2298>
- Shetty, S., Lalor, P. F., & Adams, D. H. (2018). Liver sinusoidal endothelial cells — gatekeepers of hepatic immunity. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 15(9), 555–567. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0020-y>

- Shi, C., Xue, W., Han, B., Yang, F., Yin, Y., & Hu, C. (2019). Acetaminophen aggravates fat accumulation in NAFLD by inhibiting autophagy via the AMPK/mTOR pathway. *European Journal of Pharmacology*, 850, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.02.005>
- Shi, Y. W., Yang, R. X., & Fan, J. G. (2021). Chronic hepatitis b infection with concomitant hepatic steatosis: Current evidence and opinion. *World Journal of Gastroenterology*, 27(26), 3971–3983. <https://doi.org/10.3748/WJG.V27.I26.3971>
- Shimano, H., & Sato, R. (2017). SREBP-regulated lipid metabolism: Convergent physiology-divergent pathophysiology. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(12), 710–730. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.91>
- Shimomura, I., Matsuda, M., Hammer, R. E., Bashmakov, Y., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (2000). Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Molecular Cell*, 6(1), 77–86. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(05\)00010-9](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(05)00010-9)
- Shinohara, M., Ybanez, M. D., Win, S., Than, T. A., Jain, S., Gaarde, W. A., Han, D., & Kaplowitz, N. (2010). Silencing Glycogen Synthase Kinase-3 β Inhibits Acetaminophen Hepatotoxicity and Attenuates JNK Activation and Loss of Glutamate Cysteine Ligase and Myeloid Cell Leukemia Sequence 1. *Journal of Biological Chemistry*, 285(11), 8244–8255. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.054999>
- Sidorik, L., Kyyamova, R., Bobyk, V., Kapustian, L., Rozhko, O., Vigontina, O., Ryabenko, D., Danko, I., Maksymchuk, O., Kovalenko, V. N., Filonenko, V. v., & Chaschin, N. A. (2005). Molecular chaperone, HSP60, and cytochrome P450 2E1 co-expression in dilated cardiomyopathy. *Cell Biology International*, 29(1), 51–55. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2004.11.011>
- Sinclair, J., Jeffery, E., Wrighton, S., Kostrubsky, V., Szakacs, J., Wood, S., & Sinclair, P. (1998). Alcohol-mediated increases in acetaminophen hepatotoxicity: role of CYP2E and CYP3A. *Biochemical Pharmacology*, 55(10), 1557–1565. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(97\)00656-4](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(97)00656-4)
- Singh, V., & Ubaid, S. (2020). Role of Silent Information Regulator 1 (SIRT1) in regulating oxidative stress and inflammation. *Inflammation*, 43, 1589–1598. <https://doi.org/10.1007/s10753-020-01242-9>

- Söderberg, C., Marmur, J., Eckes, K., Glaumann, H., Sällberg, M., Frelin, L., Rosenberg, P., Stål, P., & Hultcrantz, R. (2011). Microvesicular fat, inter cellular adhesion molecule-1 and regulatory T-lymphocytes are of importance for the inflammatory process in livers with non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of Pathology, Microbiology and Immunology (APMIS)*, 119(7), 412–420. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2011.02746.x>
- Søndergaard, E., Sørensen, L. P., Rahbek, I., Gormsen, L. C., Christiansen, J. S., & Nielsen, S. (2012). Postprandial VLDL-triacylglycerol secretion is not suppressed in obese type 2 diabetic men. *Diabetologia*, 55(10), 2733–2740. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2624-z>
- Song, B.-J., Veechs, R. L., Park, S. S., Gelboing, H. v, & Gonzalezs, F. J. (1989). Induction of Rat Hepatic N-Nitrosodimethylamine Demethylase by Acetone Is Due to Protein Stabilization. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(6), 3568–3572.
- Sookoian, S., & Pirola, C. J. (2011). Meta-analysis of the influence of I148M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 53(6), 1883–1894. <https://doi.org/10.1002/hep.24283>
- Spruss, A., Kanuri, G., Uebel, K., Bischoff, S., & Bergheim, I. (2011). Role of the inducible nitric oxide synthase in the onset of fructose-induced steatosis in mice. *Antioxidants and Redox Signaling*, 14(11), 2121–2135.
- Stephenson, K., Kennedy, L., Hargrove, L., Demieville, J., Thomson, J., Alpini, G., & Francis, H. (2017). Updates on Dietary Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Current Studies and Insights. *Gene Expression*, 18(1), 5–17. <https://doi.org/10.3727/105221617x15093707969658>
- Stevison, F., Jing, J., Tripathy, S., & Isoherranen, N. (2015). Role of Retinoic Acid-Metabolizing Cytochrome P450s, CYP26, in Inflammation and Cancer. *Advances in Pharmacology*, 74, 373–412. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2015.04.006>
- Stiborová, M., Indra, R., Moserová, M., Frei, E., Schmeiser, H. H., Kopka, K., Philips, D. H., & Arlt, V. M. (2016). NADH:Cytochrome b5 Reductase and Cytochrome b5 Can Act as Sole Electron Donors to Human Cytochrome P450 1A1-Mediated Oxidation and DNA Adduct Formation by Benzo[a]pyrene. *Chemical Research in Toxicology*, 29(8), 1325–1334. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.6b00143>
- Stresser, D. M., Perloff, E. S., Mason, A. K., Blanchard, A. P., Dehal, S. S., Creegan, T. P., Singh, R., & Gangl, E. T. (2016). Selective time-And NADPH-Dependent inhibition of human

- CYP2E1 by clomethiazole. *Drug Metabolism and Disposition*, 44(8), 1424–1430. <https://doi.org/10.1124/dmd.116.070193>
- Sung, M., Kim, I., Park, M., Whang, Y., & Lee, M. (2004). Differential Effects of Dietary Fatty Acids on the Regulation of CYP2E1 and Protein Kinase C in Human Hepatoma HepG2. *Journal of Medicinal Food*, 7(2), 197–203. <https://doi.org/10.1089/1096620041224157>
- Svegliati-Baroni, G., Pierantonelli, I., Torquato, P., Marinelli, R., Ferreri, C., Chatgililoglu, C., Bartolini, D., & Galli, F. (2019). Lipidomic biomarkers and mechanisms of lipotoxicity in non-alcoholic fatty liver disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 144, 293–309. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.029>
- Tandra, S., Yeh, M. M., Brunt, E. M., Vuppalanchi, R., Cummings, O. W., Ünalp-Arida, A., Wilson, L. A., & Chalasani, N. (2011). Presence and significance of microvesicular steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*, 55(3), 654–659. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.11.021>
- Thareja, G., Evans, A. M., Wood, S. D., Stephan, N., Zaghlool, S., Halama, A., Kastenmüller, G., Belkadi, A., Albagha, O. M. E., & Suhre, K. (2022). Ratios of Acetaminophen Metabolites Identify New Loci of Pharmacogenetic Relevance in a Genome-Wide Association Study. *Metabolites*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/metabo12060496>
- Thorens, B. (2015). GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. *Diabetologia*, 58(2), 221–232. <https://doi.org/10.1007/s00125-014-3451-1>
- Tien, E. S., & Negishi, M. (2006). Nuclear receptors CAR and PXR in the regulation of hepatic metabolism. *Xenobiotica*, 36(10–11), 1152–1163. <https://doi.org/10.1080/00498250600861827>
- Tilg, H., Adolph, T. E., & Moschen, A. R. (2021). Multiple Parallel Hits Hypothesis in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Revisited After a Decade. *Hepatology*, 73(2), 833–842. <https://doi.org/10.1002/hep.31518>
- Tilg, H., & Moschen, A. R. (2010). Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*, 52(5), 1836–1846. <https://doi.org/10.1002/hep.24001>
- Tomasi, M. L., Ramani, K., Ryoo, M., Cossu, C., Floris, A., Murray, B. J., Iglesias-Ara, A., Spissu, Y., & Mavila, N. (2018). SUMOylation regulates cytochrome P450 2E1 expression and activity

in alcoholic liver disease. *FASEB Journal*, 32(6), 3278–3288.
<https://doi.org/10.1096/fj.201701124R>

- Toselli, F., De Waziers, I., Dutheil, M., Vincent, M., Wilce, P. A., Dodd, P. R., Beaune, P., Lorient, M. A., & Gillam, E. M. J. (2015). Gene expression profiling of cytochromes P450, ABC transporters and their principal transcription factors in the amygdala and prefrontal cortex of alcoholics, smokers and drug-free controls by qRT-PCR. *Xenobiotica*, 45(12), 1129–1137. <https://doi.org/10.3109/00498254.2015.1040102>
- Trak-Smayra, V., Massart, J., Nasser, S., & Jebara, V. (2011). Pathology of the liver in obese and diabetic ob / ob and db / db mice fed a standard or high-calorie diet. *International Journal of Experimental Pathology*, 92, 413–421. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2011.00793.x>
- Trefts, E., Gannon, M., & Wasserman, D. H. (2017). The liver. *Current Biology*, 27(21), R1147–R1151. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.019>
- Turola, E., Petta, S., Vanni, E., Milosa, F., Valenti, L., Critelli, R., Miele, L., Maccio, L., Calvaruso, V., Fracanzani, A. L., Bianchini, M., Raos, N., Bugianesi, E., Mercorella, S., di Giovanni, M., Craxì, A., Fargion, S., Grieco, A., Cammà, C., ... Villa, E. (2015). Ovarian senescence increases liver fibrosis in humans and zebrafish with steatosis. *Disease Models and Mechanisms*, 8(9), 1037–1046. <https://doi.org/10.1242/dmm.019950>
- Uzi, D., Barda, L., Scaiewicz, V., Mills, M., Mueller, T., Gonzalez-Rodriguez, A., Valverde, A. M., Iwawaki, T., Nahmias, Y., Xavier, R., Chung, R. T., Tirosh, B., & Shibolet, O. (2013). CHOP is a critical regulator of acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Journal of Hepatology*, 59(3), 495–503. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.04.024>
- Van Herck, M. A., Vonghia, L., & Francque, S. M. (2017). Animal models of nonalcoholic fatty liver disease—a starter’s guide. *Nutrients*, 9(10), 1–13. <https://doi.org/10.3390/nu9101072>
- Van Rongen, A., Väitalo, P. A. J., Peeters, M. Y. M., Boerma, D., Huisman, F. W., van Ramshorst, B., van Dongen, E. P. A., van den Anker, J. N., & Knibbe, C. A. J. (2016). Morbidly Obese Patients Exhibit Increased CYP2E1-Mediated Oxidation of Acetaminophen. *Clinical Pharmacokinetics*, 55(7), 833–847. <https://doi.org/10.1007/s40262-015-0357-0>
- Varga, T., Czimmerer, Z., & Nagy, L. (2011). PPARs are unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1812(8), 1007–1022. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.02.014>

- Vergani, L. (2017). Fatty Acids and Effects on In Vitro and In Vivo Models of Liver Steatosis. *Current Medicinal Chemistry*, 26(19), 3439–3456. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170518101334>
- Videla, L. A., Rodrigo, R., Orellana, M., Fernandez, V., Tapia, G., Quinones, L., Varela, N., Contreras, J., Lazarte, R., Csendes, A., Rojas, J., Maluenda, F., Burdiles, P., Diaz, J. C., Smok, G., Thielemann, L., & Poniachik, J. (2004). Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. *Clinical Science*, 106(3), 261–268. <https://doi.org/10.1042/CS20030285>
- Volynets, V., Küper, M. A., Strahl, S., Maier, I. B., Spruss, A., Wagnerberger, S., Königsrainer, A., Bischoff, S. C., & Bergheim, I. (2012). Nutrition, intestinal permeability, and blood ethanol levels are altered in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Digestive Diseases and Sciences*, 57(7), 1932–1941. <https://doi.org/10.1007/s10620-012-2112-9>
- Volzke, H., Schwarz, S., Baumeister, S., Wallaschofski, H., Schwahn, C., Grabe, H. J., Kohlmann, T., John, U., & Doren, M. (2006). Menopausal status and hepatic steatosis in a general female population. *Gut*, 56(4), 594–595. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.115345>
- Wagenknecht, L. E., Palmer, N. D., Bowden, D. W., Rotter, J. I., Norris, M., Ziegler, J., Chen, Y. I., Haffner, S., Scherzinger, A., & Carl, D. (2011). Association of PNPLA3 with non-alcoholic fatty liver disease in a minority cohort: the Insulin Resistance Atherosclerosis Family Study. *Liver International*, 31(3), 412–416. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2010.02444>
- Wahlang, B., Beier, J. I., Clair, H., Bellis-Jones, H., Falkner, K. C., McClain, C. J., & Cave, M. C. (2013). Toxicant-associated steatohepatitis. *Physiology & Behavior*, 41(2), 343–360. <https://doi.org/10.1177/0192623312468517>
- Wahlang, B., Jin, J., Beier, J. I., Hardesty, J. E., Daly, E. F., Schnegelberger, R. D., Falkner, K. C., Prough, R. A., & Kirpich, I. A. (2019). Mechanisms of environmental contributions to fatty liver disease. *Current Environmental Health Rep*, 6(3), 80–94. <https://doi.org/10.1007/s40572-019-00232>
- Wang, C., Li, H., Meng, Q., Du, Y., Xiao, F., Zhang, Q., Yu, J., Li, K., Chen, S., Huang, Z., Liu, B., & Guo, F. (2014). ATF4 deficiency protects hepatocytes from oxidative stress via inhibiting CYP2E1 expression. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 18(1), 80–90. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12166>

- Wang, J., Hu, Y., Nekvindova, J., Ingelman-Sundberg, M., & Neve, E. P. A. (2010). IL-4-mediated transcriptional regulation of human CYP2E1 by two independent signaling pathways. *Biochemical Pharmacology*, 80(10), 1592–1600. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.08.005>
- Wang, P., Shao, X., Bao, Y., Zhu, J., Chen, L., Zhang, L., Ma, X., & Zhong, X. bo. (2020). Impact of obese levels on the hepatic expression of nuclear receptors and drug-metabolizing enzymes in adult and offspring mice. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 10(1), 171–185. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.10.009>
- Wang, Y. Q., Guan, S., Acharya, P., Koop, D. R., Liu, Y., Liao, M., Burlingame, A. L., & Correia, M. A. (2011). Ubiquitin-dependent proteasomal degradation of human liver cytochrome P450 2E1: Identification of sites targeted for phosphorylation and ubiquitination. *Journal of Biological Chemistry*, 286(11), 9443–9456. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.176685>
- Wang, Y., Seitz, H. K., & Wang, X. D. (2010). Moderate alcohol consumption aggravates high-fat diet induced steatohepatitis in rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 34(3), 567–573. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2009.01122.x>
- Wang, Z., Hall, S. D., Maya, J. F., Li, L., Asghar, A., & Gorski, J. C. (2003). Diabetes mellitus increases the in vivo activity of cytochrome P450 2E1 in humans. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 55(1), 77–85. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.2003.01731.x>
- Wang, Z., Li, Q. qing, Huang, C. ke, Dong, Y. yan, Lang, L. ping, Sun, W., Qian, J. chang, & Zhang, X. dan. (2023). Determination of CYP450 activities in diabetes mellitus rats by a UHPLC-MS/MS method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 224. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.115191>
- Waring, W. S., Stephen, A. F., Malkowska, A. M., & Robinson, O. D. G. (2008). Acute Ethanol Coingestion Confers a Lower Risk of Hepatotoxicity after Deliberate Acetaminophen Overdose. *Academic Emergency Medicine*, 15(1), 54–58. <https://doi.org/10.1111/j.1553-2712.2007.00019.x>
- Watelet, J., Laurent, V., Bressenot, A., Bronowicki, J. P., Larrey, D., & Peyrin-Biroulet, L. (2007). Toxicity of chronic paracetamol ingestion. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 26(11–12), 1543–1544. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03503.x>
- Watkins, P. B., Kaplowitz, N., Slattery, J. T., Colonese, C. R., Colucci, S. v., Stewart, P. W., & Harris, S. C. (2006). Aminotransferase elevations in healthy adults receiving 4 grams of

- acetaminophen daily: A randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association*, 296(1), 87–93. <https://doi.org/10.1001/jama.296.1.87>
- Wei, Y., Wang, D., Gentile, C. L., & Pagliassotti, M. J. (2009). Reduced endoplasmic reticulum luminal calcium links saturated fatty acid-mediated endoplasmic reticulum stress and cell death in liver cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 331(1–2), 31–40. <https://doi.org/10.1007/s11010-009-0142-1>
- Weltman, M. D., Farrell, G. C., Ingelman-Sundberg, M., & Liddle, C. (1998). Hepatic cytochrome P450 2E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 27(1), 128–133.
- Weltman, M. D., Farrell, G. C., & Liddle, C. (1996). Increased Hepatocyte CYP2E1 Expression in a Rat Nutritional Model of Hepatic Steatosis With Inflammation. In *GASTROENTEROLOGY* (Vol. 111).
- Wendel, A. A., Lewin, T. M., & Coleman, R. A. (2009). Glycerol-3-phosphate acyltransferases: Rate limiting enzymes of triacylglycerol biosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791(6), 501–506. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2008.10.010>
- Westerink, W. M. A., & Schoonen, W. G. E. J. (2007). Phase II enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicology in Vitro*, 21(8), 1592–1602. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.06.017>
- Wiercinska, P., & Squires, E. J. (2010). Chlorzoxazone metabolism by porcine cytochrome P450 enzymes and the effect of cytochrome b5. *Drug Metabolism and Disposition*, 38(5), 857–862. <https://doi.org/10.1124/dmd.109.030528>
- Williams, C. D., Stengel, J., Asike, M. I., Torres, D. M., Shaw, J., Contreras, M., Landt, C. L., & Harrison, S. A. (2011). Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: A prospective study. *Gastroenterology*, 140(1), 124–131. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.09.038>
- Win, S., Than, T. A., Han, D., Petrovic, L. M., & Kaplowitz, N. (2011). c-Jun N-terminal Kinase (JNK)-dependent Acute Liver Injury from Acetaminophen or Tumor Necrosis Factor (TNF) Requires Mitochondrial Sab Protein Expression in Mice. *Journal of Biological Chemistry*, 286(40), 35071–35078. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.276089>

- Win, S., Than, T. A., Min, R. W. M., Aghajan, M., & Kaplowitz, N. (2016). c-Jun N-terminal kinase mediates mouse liver injury through a novel Sab (SH3BP5)-dependent pathway leading to inactivation of intramitochondrial Src. *Hepatology*, 63(6), 1987–2003. <https://doi.org/10.1002/hep.28486>
- Wiśniewski, J. R., Vildhede, A., Norén, A., & Artursson, P. (2016). In-depth quantitative analysis and comparison of the human hepatocyte and hepatoma cell line HepG2 proteomes. *Journal of Proteomics*, 136, 234–247. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.01.016>
- Witt, L., Suzuki, Y., Hohmann, N., Mikus, G., Haefeli, W. E., & Burhenne, J. (2016). Ultrasensitive quantification of the CYP2E1 probe chlorzoxazone and its main metabolite 6-hydroxychlorzoxazone in human plasma using ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry after chlorzoxazone microdosing. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1027, 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.05.049>
- Wobser, H., Dorn, C., Weiss, T. S., Amann, T., Bollheimer, C., Büttner, R., Schölmerich, J., & Hellerbrand, C. (2009). Lipid accumulation in hepatocytes induces fibrogenic activation of hepatic stellate cells. *Cell Research*, 19(8), 996–1005. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.73>
- Wolfrum, C., & Stoffel, M. (2006). Coactivation of Foxa2 through Pgc-1 β promotes liver fatty acid oxidation and triglyceride/VLDL secretion. *Cell Metabolism*, 3(2), 99–110. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.01.001>
- Woodcroft, K. J., Hafner, M. S., & Novak, R. F. (2002). Insulin signaling in the transcriptional and posttranscriptional regulation of CYP2E1 expression. *Hepatology*, 35(2), 263–273. <https://doi.org/10.1053/jhep.2002.30691>
- Woodcroft, K. J., & Novak, R. F. (1999). The role of phosphatidylinositol 3-kinase, Src kinase, and protein kinase A signaling pathways in insulin and glucagon regulation of CYP2E1 expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 266(2), 304–307. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1817>
- Yaghi, C., & Assaf, A. (2017). Acetaminophen Toxicity at Therapeutic Doses. *Internal Medicine Review*, 3(11), 1. <https://doi.org/10.18103/imr.v3i10.581>
- Yamaguchi, K., Yang, L., McCall, S., Huang, J., Xing, X. Y., Pandey, S. K., Bhanot, S., Monia, B. P., Li, Y. X., & Diehl, A. M. (2007). Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis

but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 45(6), 1366–1374. <https://doi.org/10.1002/hep.21655>

Yang, Y., Chen, M., Loux, T. J., & Harmon, C. M. (2007). Regulation of FAT/CD36 mRNA gene expression by long chain fatty acids in the differentiated 3T3-L1 cells. *Pediatric Surgery International*, 23(7), 675–683. <https://doi.org/10.1007/s00383-007-1942-6>

Ye, Q., Wang, X., Wang, Q., Xia, M., Zhu, Y., Lian, F., & Ling, W. (2013). Cytochrome P450 2E1 inhibitor, chlormethiazole, decreases lipopolysaccharide-induced inflammation in rat Kupffer cells with ethanol treatment. *Hepatology Research*, 43, 1115–1123. <https://doi.org/10.1111/hepr.12063>

Yoo, K. S., Lim, W. T., & Choi, H. S. (2016). Biology of cholangiocytes: From bench to bedside. *Gut and Liver*, 10(5), 687–698. <https://doi.org/10.5009/gnl16033>

Younossi, Z., & Henry, L. (2016). Contribution of Alcoholic and Nonalcoholic Fatty Liver Disease to the Burden of Liver-Related Morbidity and Mortality. *Gastroenterology*, 150(8), 1778–1785. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.03.005>

Younossi, Z. M., Golabi, P., de Avila, L., Paik, J. M., Srishord, M., Fukui, N., Qiu, Y., Burns, L., Afendy, A., & Nader, F. (2019). The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Hepatology*, 71(4), 793–801. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.06.021>

Younossi, Z. M., Koenig, A. B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L., & Wymer, M. (2016). Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*, 64(1), 73–84. <https://doi.org/10.1002/hep.28431>

Younossi, Z. M., Tampi, R., Priyadarshini, M., Nader, F., Younossi, I. M., & Racila, A. (2019). Burden of Illness and Economic Model for Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis in the United States. *Hepatology*, 69(2), 564–572. <https://doi.org/10.1002/hep.30254>

Zanger, U. M., & Schwab, M. (2013). Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology and Therapeutics*, 138(1), 103–141. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007>

Zara, V., Assalve, G., & Ferramosca, A. (2022). Multiple roles played by the mitochondrial citrate carrier in cellular metabolism and physiology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 79(8), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04466-0>

- Zeilinger, K., Freyer, N., Damm, G., Seehofer, D., & Knöspel, F. (2016). Cell sources for in vitro human liver cell culture models. *Experimental Biology and Medicine*, 241(15), 1684–1698. <https://doi.org/10.1177/1535370216657448>
- Zhan, S. S., Jiang, J. X., Wu, J., Halsted, C., Friedman, S. L., Zern, M. A., & Torok, N. J. (2006). Phagocytosis of apoptotic bodies by hepatic stellate cells induces NADPH oxidase and is associated with liver fibrosis in vivo. *Hepatology*, 43(3), 435–443. <https://doi.org/10.1002/hep.21093>
- Zhao, M., Ma, J., Li, M., Zhang, Y., Jiang, B., Zhao, X., Huai, C., Shen, L., Zhang, N., He, L., & Qin, S. (2021). Cytochrome p450 enzymes and drug metabolism in humans. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms222312808>
- Zhou, J.-H., Cai, J.-J., She, Z.-G., & Li, H.-L. (2019). Noninvasive evaluation of nonalcoholic fatty liver disease: Current evidence and practice. *World Journal of Gastroenterology*, 25(11), 1307–1326. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i11.1307>
- Zhu, L., Baker, S. S., Gill, C., Liu, W., Alkhouri, R., Baker, R. D., & Gill, S. R. (2013). Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: A connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology*, 57(2), 601–609. <https://doi.org/10.1002/hep.26093>
- Zhu, L., Baker, S. S., Liu, W., Tao, M.-H., Patel, R., Nowak, N. J., & Baker, R. D. (2011). Lipid in the livers of adolescents with nonalcoholic steatohepatitis: combined effects of pathways on steatosis. *Metabolism*, 60(7), 1001–1011. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2010.10.003>

ANNEXES

Annexe n°1 : Tableaux de littérature

Annexe 1.1

Tableau répertoriant les modifications d'expression et/ou d'activité du CYP2E1 chez des patients atteints de NAFLD.

Annexe 1.2

Tableau répertoriant les modifications d'expression et/ou d'activité du CYP2E1 *in vivo* chez des animaux nourris avec un régime HFD.

Annexe 1.3

Tableau répertoriant les modifications d'expression et/ou d'activité du CYP2E1 *in vitro* dans des modèles cellulaires hépatiques.

ANNEXE 1.1

Reference	Particularities	CYP2E1 mRNA expression	CYP2E1 protein expression	CYP2E1 activity
O'Shea <i>et al.</i> , 1994	Obese vs healthy	Not measured	Not measured	↗
Weltman <i>et al.</i> , 1998	NASH vs healthy	Not measured	↗	Not measured
Niemela <i>et al.</i> , 2000	Alcoholic vs non-alcoholic, with fatty liver or hepatitis	Not measured	↗	Not measured
Emery <i>et al.</i> , 2003	Morbide obese at difference stades of NAFLD vs healthy	Not measured	Not measured	↗
Chalasani <i>et al.</i> , 2003	NASH (nondiabetics) vs healthy	↗ peripheral lymphocyte CYP2E1 expression	Not measured	↗
Videla <i>et al.</i> , 2004	Steatosis vs NASH vs healthy	Not measured	↗ in NASH patients	↗ in NASH patients
Nakamuta <i>et al.</i> , 2005	NAFLD vs healthy	↘	Not measured	Not measured
Orellana <i>et al.</i> , 2006	Steatosis vs NASH vs healthy	Not measured	Not measured	↗
Donato <i>et al.</i> , 2006	Steatosis vs healthy	Not measured	Not measured	No significant variations
Kohjima <i>et al.</i> , 2007	NAFLD vs healthy	↗	Not measured	Not measured
Promptila <i>et al.</i> , 2008	NAFLD vs healthy	Not measured	Not measured	No significant variations
Fisher <i>et al.</i> , 2009	Steatosis vs NASH vs healthy (microsomes)	↘	↘	No significant variations
Baker <i>et al.</i> , 2010	NASH vs healthy	↗	Not measured	Not measured
Aljomah <i>et al.</i> , 2015	Steatosis vs NASH vs healthy	↗ in steatosis and NASH patients	Not measured	Not measured

ANNEXE 1.2

Reference	Murine model	Type of diet	Diet conditions	Duration	Fat quantity	Evaluation of NAFLD	CYP2E1 RNA expression	CYP2E1 protein expression	CYP2E1 activity
Raucy <i>et al.</i> , 1991	Male Sprague-Dawley rats	High fat diet	Diet <i>ad libitum</i>	52 weeks	60% of weight	Not measured	Not measured	Not measured	↗
Leclercq <i>et al.</i> , 2000	C57BL/6 mice	Methionine and choline deficient diet	Diet <i>ad libitum</i>	10 weeks		Hematoxylin-eosin and Sirius red staining	↗	↗	↗
Lieber <i>et al.</i> , 2004	Male Sprague-Dawley rats		Diet <i>ad libitum</i> or restricted	3 weeks	71% of kcal	Hematoxylin-eosin staining	↗	Not measured	Not measured
Zou <i>et al.</i> , 2006	Male Sprague-Dawley rats	High fat emulsion	Rats orally treated with the high fatty emulsion (10mL/kg) once per day	6 weeks	77% of kcal	Hematoxylin-eosin and Oil Red O staining	Not measured	↗	Not measured
Ito <i>et al.</i> , 2006	Male C57BL/6 mice	High fat diet	Diet <i>ad libitum</i>	16 months	41% of kcal	Hematoxylin-eosin staining	No significant variations	Not measured	Not measured
Yoshinari <i>et al.</i> , 2006	Male ICR mice	High fat diet	Diet <i>ad libitum</i>	5 weeks	36% of kcal		No significant variations	↗	
		High fat diet		40 days	32% of kcal	Not measured	No significant variations	No significant variations	Not measured
Sugatani <i>et al.</i> , 2006	Male Wistar rats	High fat diet	Diet <i>ad libitum</i>	9 weeks 13 weeks	23.9% of kcal	Hematoxylin-eosin staining	Not measured	No significant variations	Not measured

Khemawoot <i>et al.</i> , 2007	Male Zucker rats	High fat diet	Diet <i>ad libitum</i>	12 months	8.6% (w/w) fat	Not measured	↗	↗	No significant variations
Leclercq <i>et al.</i> , 2007	Female C57BL/6J mice	Methionine and choline deficient diet	Diet <i>ad libitum</i>	4 weeks		Hematoxylin-eosin staining	↗	Not measured	Not measured
Osabe <i>et al.</i> , 2008	Male and female Wistar rats	High fat and high sucrose diet	Diet <i>ad libitum</i>	2, 4, 8 weeks	23.6% of kcal	Liver triglycerides, cholesterol and free-fatty acids quantification	No significant variations	No significant variations	Not measured
		High fat diet			65.4% of kcal		↗	↗	
Begrache <i>et al.</i> , 2008	Male C57BL/6J mice	High fat high sucrose diet	Diet <i>ad libitum</i>	6 weeks	36% fat	Hematoxylin-eosin and Oil Red O staining	↗	No significant variations	Not measured
Baumgardner <i>et al.</i> , 2008	Male Sprague-Dawley rats	High fat diet	Diet : intragastric cannula	21 days	70% of kcal	Hematoxylin-eosin and Oil Red O staining + scores of NASH	Not measured	↗	Not measured
Mantena <i>et al.</i> , 2009	Male C57BL/6 mice	High fat diet	Diet <i>ad libitum</i>	8 weeks	71% of kcal	Hematoxylin-eosin staining	Not measured	↗	Not measured
				16 weeks					
Ghose <i>et al.</i> , 2012	Male CD1 mice	High fat diet	Diet <i>ad libitum</i>	14 weeks	60% of kcal	Not measured	No significant variations	Not measured	Not measured
Abdelmegeed <i>et al.</i> , 2012	Male WT and CYP2E1 null mice	High fat diet	Diet <i>ad libitum</i>	10 weeks	60% of kcal	Hematoxylin-eosin staining + scores of steatosis and NASH	Not measured	↗	↗

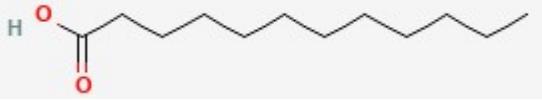
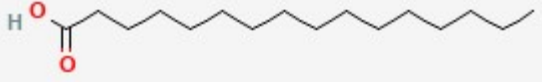
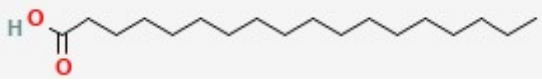
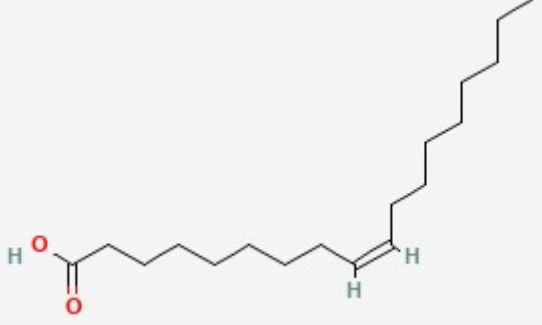
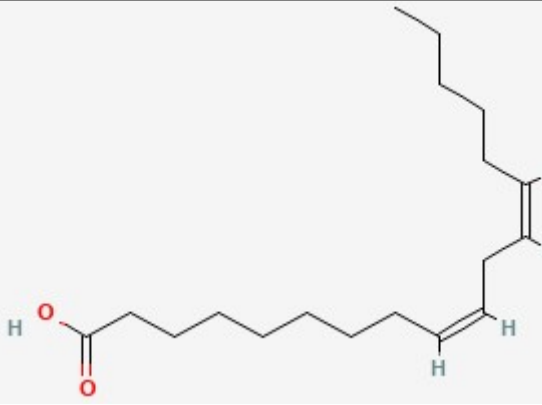
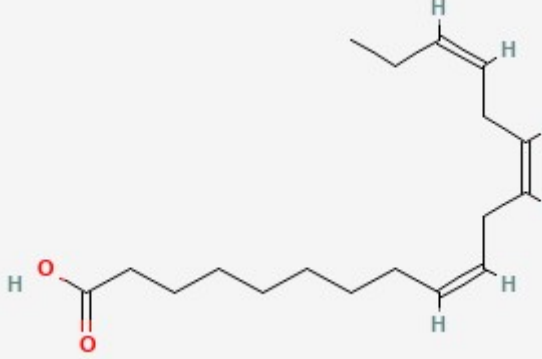
Jian <i>et al.</i> , 2017	Male ICR mice	High fat diet	Diet <i>ad libitum</i>	4 weeks	Not precised	Hematoxylin-eosin staining	↗	↗	Not measured
Porras et al., 2017	Male C57BL/6J mice	High fat diet	Diet <i>ad libitum</i>	16 weeks	60% of kcal	Hematoxylin-eosin staining	↗	Not measured	Not measured
Li <i>et al.</i> , 2020	Male C57BL/6J mice	High fat diet	Diet <i>ad libitum</i>	16 weeks	60% kcal	Not measured	↘	Not measured	Not measured
Wang <i>et al.</i> , 2020	Male and female C57Bl/6 mice	High fat diet	Diet <i>ad libitum</i>	4 weeks	66% of kcal	Not measured	No significant variations	Not measured	Not measured
				8 weeks			↗		No significant variations
				18 weeks			No significant variations		Not measured

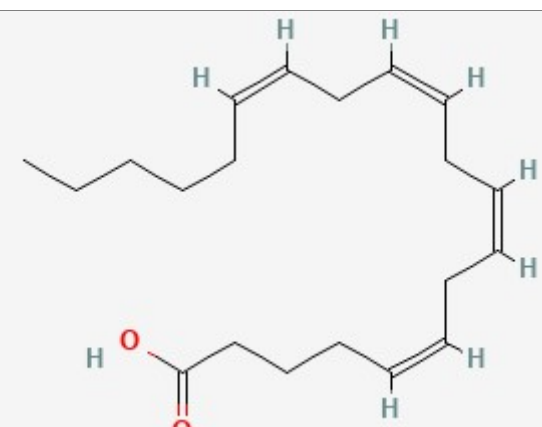
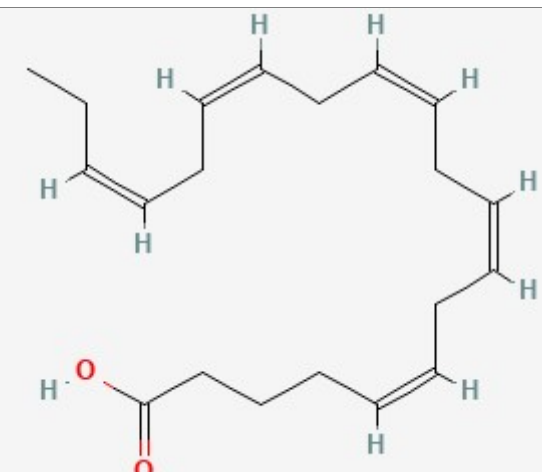
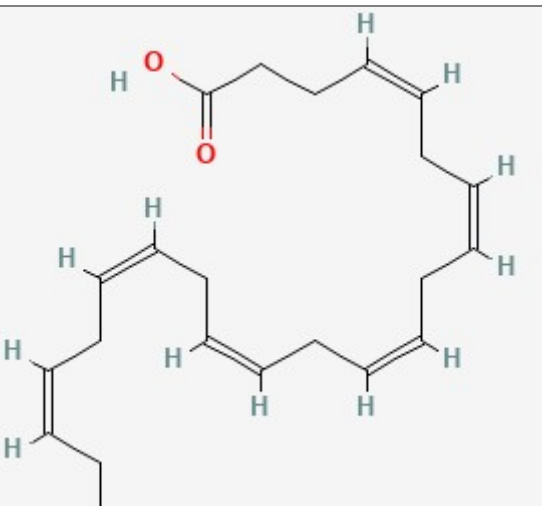
ANNEXE 1.3

Reference	Experimental model	Culture conditions	FA treatment	Duration	Concentration	Evaluation of steatosis	CYP2E1 RNA expression	CYP2E1 protein expression	CYP2E1 activity
Raucy et al., 2004	Primary human hepatocytes	10 ⁻⁶ M insulin FA in BSA	C16 :0	48h	200µM	Not measured	↗	Not measured	Not measured
Sung et al., 2004	HepG2	Without insulin	C16:0	12h	20µM	FA composition of HepG2 cells after treatment	Not measured	↗	Not measured
			C18:1					↗	
			C18:2					↗	
			C18:3					No significant variations	
			DHA					No significant variations	
Donato <i>et al.</i> , 2007	Hepatocyte cultures prepared from selective liver human biopsies without steatosis.	0.06µg/mL insulin	Mixture of C18:1 and C16:0 (2:1)	14h	0.5mM	Nile Red staining	No significant variations	Not measured	No significant variations
					1mM		↘		↘
					2mM		Not measured		↘
Anthérieu et al. 2011	HepaRG	2% DMSO 5µg/mL insulin	C18:1	24h	250µM	Oil red O staining	No significant variations	Not measured	Not measured
					500µM		No significant variations	Not measured	
				48h	500µM		Not measured	No significant variations	
				14 days	250µM		↗ (+58% of control)	Not measured	

500μM							↗ (+89% of control)	↗ (+50% of control)	
Aljomah <i>et al.</i> , 2015	HepG2	DMEM medium	C18:1	24h	2mM	Oil red o staining	No significant variations	No significant variations	Not measured
Mahli <i>et al.</i> , 2015	Primary human hepatocytes		C18:1	24h	0.2mM	TG (biochemistry kit) Oil red o	No significant variations	No significant variations	No significant variations
Michaut et al., 2016	HepaRG	William's E medium	C18:0		100μM	Oil red O staining	No significant variations	Not measured	↗
		2% DMSO 5μg/mL insulin	C18:1			Triglycerides quantification	No significant variations		No significant variations
Liu <i>et al.</i> , 2019	HepG2	FA in methanol	C18:1	24h	0.5mM	TG	Not measured	↗	Not measured
Lua <i>et al.</i> , 2019	HepG2	MEM	C12:0	24h	20μM	Not measured	↘	Not measured	Not measured

Annexe n°2 : Noms, formules et structures des acides gras utilisés

Nom	Formule	Structure
Acide laurique (LAU)	C12:0	
Acide palmitique (PA)	C16:0	
Acide stéarique (SA)	C18:0	
Acide oléique (OA)	C18:1 (n-9)	
Acide linoléique (LA)	C18:2 (n-6)	
Acide α-linolénique (ALA)	C18:3 (n-3)	

Acide arachidonique (ARA)	C20:4 (n-6)	
Acide eicosapentaénoïque (EPA)	C20:5 (n-3)	
Acide docosahexaénoïque (DHA)	C22:6 (n-3)	

Source : PubChem

Annexe n°3 : Revue de littérature

Begrache, K., Penhoat, C., Bernabeu-Gentey, P., Massart, J., & Fromenty, B. (2023). **Acetaminophen-induced hepatotoxicity in obesity and nonalcoholic fatty liver disease: a critical review.** *Livers*, 3(33), 33–53. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/livers3010003>

Review

Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Critical Review

Karima Begriche, Clémence Penhoat, Pénélope Bernabeu-Gentey, Julie Massart  and Bernard Fromenty *

INSERM, Univ Rennes, INRAE, Institut NUMECAN (Nutrition Metabolisms and Cancer) UMR_A 1341, UMR_S 1241, F-35000 Rennes, France

* Correspondence: bernard.fromenty@inserm.fr; Tel.: +33-2-23-23-30-44

Abstract: The epidemic of obesity, type 2 diabetes and nonalcoholic liver disease (NAFLD) favors drug consumption, which augments the risk of adverse events including liver injury. For more than 30 years, a series of experimental and clinical investigations reported or suggested that the common pain reliever acetaminophen (APAP) could be more hepatotoxic in obesity and related metabolic diseases, at least after an overdose. Nonetheless, several investigations did not reproduce these data. This discrepancy might come from the extent of obesity and steatosis, accumulation of specific lipid species, mitochondrial dysfunction and diabetes-related parameters such as ketonemia and hyperglycemia. Among these factors, some of them seem pivotal for the induction of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1), which favors the conversion of APAP to the toxic metabolite N-acetyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI). In contrast, other factors might explain why obesity and NAFLD are not always associated with more frequent or more severe APAP-induced acute hepatotoxicity, such as increased volume of distribution in the body, higher hepatic glucuronidation and reduced CYP3A4 activity. Accordingly, the occurrence and outcome of APAP-induced liver injury in an obese individual with NAFLD would depend on a delicate balance between metabolic factors that augment the generation of NAPQI and others that can mitigate hepatotoxicity.

Keywords: acetaminophen; drug-induced liver injury; obesity; nonalcoholic fatty liver disease; steatosis; nonalcoholic steatohepatitis; diabetes; cytochrome P450 2E1; fatty acids; mitochondria



Citation: Begriche, K.; Penhoat, C.; Bernabeu-Gentey, P.; Massart, J.; Fromenty, B.

Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Critical Review. *Livers* **2023**, *3*, 33–53. <https://doi.org/10.3390/livers3010003>

Academic Editor: James Luyendyk

Received: 12 December 2022

Revised: 22 December 2022

Accepted: 9 January 2023

Published: 12 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The epidemic of obesity is associated with a steady rise in drug consumption in order to treat several associated diseases such as type 2 diabetes mellitus (T2DM), hypertension, atherosclerosis, dyslipidemia and osteoarthritis [1,2]. In addition, numerous drugs are currently being developed in order to specifically treat nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), which is frequently associated with obesity and overweight [3,4]. This implies increased polypharmacy among obese patients, which can augment the risk of adverse events including drug-induced liver injury (DILI) [5,6]. In line with this, recent investigations reported a higher frequency of DILI in patients with NAFLD [7,8]. More specifically, the common pain reliever acetaminophen (APAP) is one of the identified drugs that could be more hepatotoxic in obesity and NAFLD, at least after an overdose [9]. The present article reviews the clinical and experimental investigations published on APAP-induced liver injury in the context of these metabolic diseases and also discusses the possible reasons that might explain why some studies are discrepant from others. Because our previous review on this matter was published in 2014 [9], many recent investigations are now discussed in this updated review.

2. APAP Hepatotoxicity

2.1. General Overview

APAP, also referred to as paracetamol, is one of the most widely prescribed drugs for the management of pain and hyperthermia. The current maximum recommended

dosage of APAP is 4 g/day in adults even though the Food and Drug Administration (FDA) advises doses below 3.25 g/day for chronic use [10]. Although therapeutic doses of APAP can induce hepatic cytolysis in some patients [11,12], most cases of severe APAP-induced acute liver injury occur after accidental or intentional overdoses [13,14]. Actually, APAP is deemed to have a narrow therapeutic margin since as little as 7.5 g/day might be hazardous [15]. Currently, administration of N-acetylcysteine (NAC) is the only approved therapy to treat APAP overdose-induced liver injury in patients [10,14]. The rationale of NAC administration is to restore hepatic levels of glutathione (GSH), a major endogenous antioxidant limiting the noxious effects of the APAP toxic metabolite N-acetyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI) (Figure 1) [16,17]. Notably, repeated or long-term intake of APAP at therapeutic doses can occasionally cause acute hepatic cytolysis of different severities [11,12] but also chronic liver injury such as granulomatous hepatitis and cirrhosis [18–20].

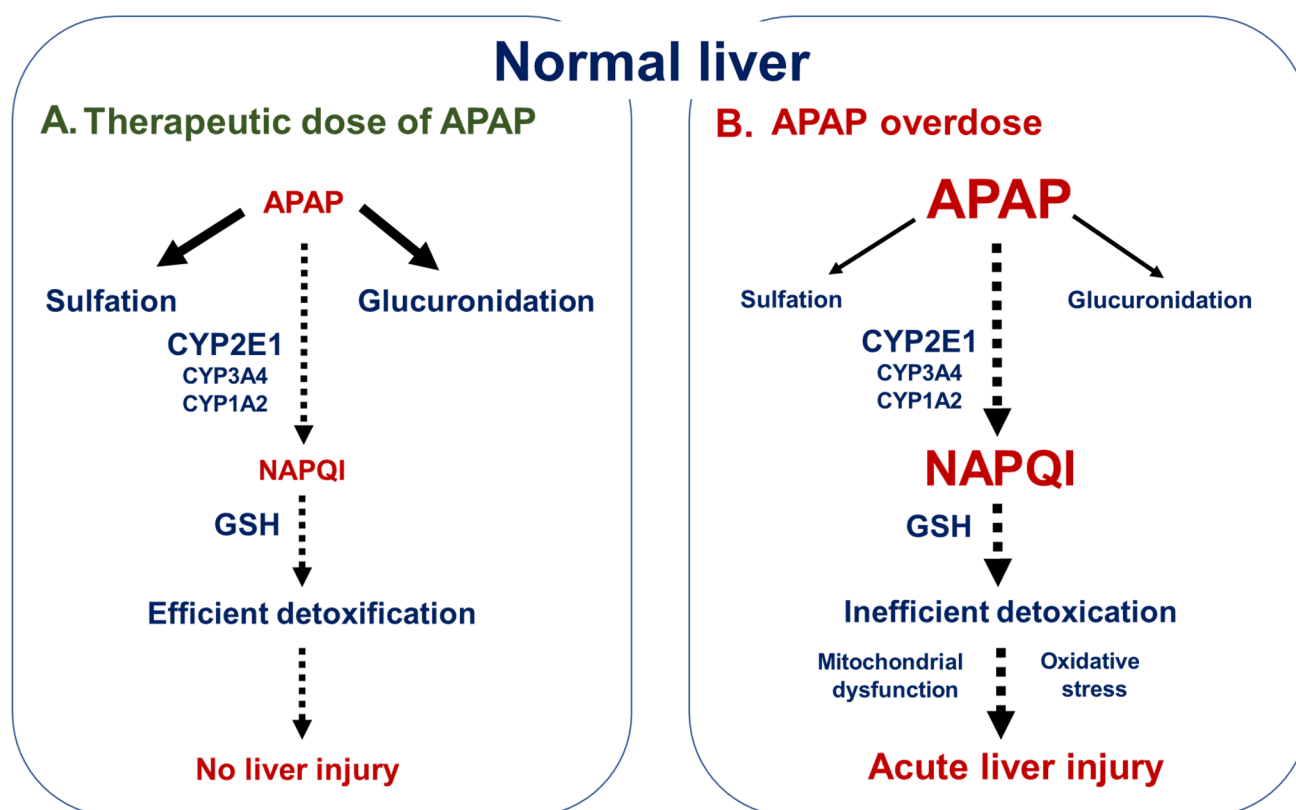


Figure 1. Biotransformation and toxicity of APAP in normal liver. (A). For therapeutic dose, APAP is mainly detoxified through sulfation and glucuronidation, while a small proportion is metabolized to N-acetyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI) via the cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) and to a lesser extent CYP3A4 and CYP1A2. In normal liver, the low amounts of NAPQI are efficiently detoxified by glutathione (GSH), a major antioxidant molecule present in different cellular compartments including mitochondria. (B). After APAP overdoses, the sulfation and glucuronidation pathways are overwhelmed and more APAP undergoes CYP-dependent oxidation to NAPQI. However, GSH concentrations in hepatocytes are not sufficient to allow the efficient detoxification of NAPQI, which then induces major mitochondrial dysfunction, oxidative stress and acute liver injury. More information is provided in the text.

A key player in APAP liver injury is cytochrome P450 2E1 (CYP2E1), an enzyme that catalyzes the oxidation of APAP to NAPQI (Figure 1) [10,21,22]. Indeed, NAPQI is a highly reactive metabolite inducing severe mitochondrial dysfunction, overproduction of reactive oxygen species (ROS), and c-jun N-terminal kinase (JNK) activation, eventually leading to ATP depletion and massive hepatocellular necrosis [17,22,23]. Importantly, mitochondrial CYP2E1 could play a major role in APAP-induced cytotoxicity [24,25]. Finally, CYP3A4

(referred to as CYP3A2 in rats and CYP3A11 in mice) and CYP1A2 might also play a role in the conversion of APAP to NAPQI (Figure 1), although to a lesser extent than CYP2E1 in normal physiological conditions [26,27].

2.2. Predisposing Factors

Except for APAP ingested dose, APAP-induced hepatotoxicity could be favored by different factors such as chronic alcohol abuse, severe or chronic liver diseases, prolonged fasting and malnutrition, older age, and some comedications such as antituberculosis and antiepileptic drugs [12,16,28,29]. Importantly, increased activity of hepatic CYP2E1 (and possibly other CYPs) seems to be a common mechanism whereby chronic alcohol abuse, prolonged fasting and some comedications favor APAP-induced liver injury [16,30]. As discussed in this review, obesity, NAFLD and both types 1 and 2 diabetes could also predispose to APAP liver injury, at least in part, due to higher hepatic CYP2E1 activity [9,10,13]. Finally, the risk of APAP hepatotoxicity could be modulated by polymorphisms in different genes [16], such as *UGT1A* encoding UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A, which plays a pivotal role in APAP glucuronidation and detoxification (Figure 1) [28,31].

3. APAP Hepatotoxicity in NAFLD

3.1. Main Features of NAFLD

Because of the epidemic of obesity and T2DM, NAFLD is now the most frequent chronic liver disease worldwide with a global prevalence of 25% [32]. NAFLD comprises a large spectrum of histologic changes including simple fatty liver, nonalcoholic steatohepatitis (NASH), advanced fibrosis and cirrhosis [33], which can evolve into hepatocellular carcinoma (HCC) [34]. It is estimated that simple fatty liver progresses to NASH in about 10 to 20% of the patients [35]. NASH itself is defined by the presence of steatosis (mostly macrovacuolar), some necrosis and apoptosis, hepatocellular ballooning and lobular inflammation [33]. Of note, the presence of microvesicular steatosis has been associated with histological markers of NASH severity [36]. Although the mechanisms of progression of fatty liver to NASH in some patients are not fully understood, mitochondrial dysfunction, oxidative stress and lipid peroxidation are deemed to play a primary role in the occurrence of cell death and inflammation [37–39].

3.2. Clinical Investigations on Acute APAP Hepatotoxicity in Obesity and NAFLD

There is some clinical evidence that obesity and NAFLD can predispose to APAP hepatotoxicity in the setting of APAP overdose (Table 1). Two large retrospective studies reported that APAP-induced acute liver injury was more frequent in NAFLD patients [40,41]. In these studies, patients with pre-existing NAFLD hospitalized for APAP overdose had a four- to sevenfold higher prevalence of acute liver injury as compared to those without NAFLD [40,41]. In another study, APAP-induced acute liver injury was more frequent in overweight or obese patients, but NAFLD presence was not investigated [42]. Obesity might also favor APAP hepatotoxicity when this analgesic and antipyretic drug is taken at therapeutic doses. Indeed, mild to moderate hepatic cytolysis, as evidenced by increased plasma transaminases (ALT and AST), was reported in some morbidly obese patients but not in nonobese individuals after receiving 4–5 g of intravenous APAP [43].

In contrast to these studies, the occurrence of APAP-induced acute liver injury was reported to be similar, or even lower, in obese patients compared to nonobese individuals (Table 1) [44,45]. However, one of these studies showed that obese patients had significantly poorer clinical outcomes after acute liver failure [44]. The discrepancies between the aforementioned studies might arise from several factors including the degree of obesity, the existence of NASH and advanced fibrosis and the presence of insulin resistance and T2DM. Indeed, these factors could alter APAP absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME) but also basal antioxidant defenses and mitochondrial function, as discussed in Section 4.

Table 1. Summary of the clinical studies (ordered by increasing year) carried out on APAP-induced acute liver injury in obesity and NAFLD.

Authors, Year [References]	Design of the Study	Presence of NAFLD	Hepatic CYP2E1 Activity	APAP Overdose	APAP-Induced Acute Liver Injury
Rutherford et al., 2006 [44]	Prospective	Not reported in this study ¹	Not reported in this study	Yes	Lower incidence (but poorer outcomes) in obese patients
Nguyen et al., 2008 [40]	Retrospective	Yes	Not reported in this study	Yes	Higher prevalence in patients with NAFLD
Myers and Shaheen, 2009 [41]	Retrospective	Yes	Not reported in this study	Yes	Higher prevalence in patients with NAFLD
Radosevich et al., 2016 [45]	Retrospective	Not reported in this study ¹	Not reported in this study	Yes	Equal prevalence between obese and nonobese patients
Van Rongen et al., 2016 [43]	Prospective	Not reported in this study ¹	Increased	No (4 to 5 g)	Increased plasma ALT and AST in morbidly obese patients but not in nonobese individuals
Chomchai and Chomchai, 2018 [42]	Retrospective	Not reported in this study ¹	Not reported in this study	Yes	Higher prevalence in overweight and obese patients

¹ There is now ample evidence that obesity is strongly associated with NAFLD (reviewed in [32,35]).

3.3. Rodent Studies on Acute APAP Hepatotoxicity in Obesity and NAFLD

APAP-induced acute hepatotoxicity has also been investigated in different rodent models of obesity and NAFLD (Table 2). However, while several investigations reported greater APAP hepatotoxicity in obese rodents [9,46–53], others showed no difference or even lower APAP-induced liver injury compared to lean rodents [9,46,54–57]. In addition to some factors mentioned in the previous section, discrepancies between these experimental investigations might be due to differences in the rodent model (rats vs. mice), the origin of obesity (genetic vs. diet-induced) and the composition of the hypercaloric diet, as discussed in Section 4.

In some aforementioned investigations, APAP not only caused more severe hepatic cytolysis in obese mice (as evidenced by increased ALT and AST) but also worsened liver fat accumulation through a mechanism that might involve inhibition of autophagy and exacerbation of oxidative stress [52,53]. Interestingly, aggravation of steatosis was also observed in ob/ob mice acutely intoxicated with APAP although this was not associated with higher plasma transaminases and more severe hepatic necrosis [49]. In NAFLD, distinct mechanisms might thus be involved in APAP-induced hepatic cytolysis and worsening of steatosis, respectively.

Table 2. Summary of the rodent studies (ordered by increasing year) carried out on APAP-induced hepatotoxicity in obesity and NAFLD.

Authors, Year [References]	Rodent Models of Obesity and NAFLD	Presence of NAFLD	Hepatic CYP2E1 Activity	Dose of APAP	APAP-Induced Hepatotoxicity
Corcoran and Wong, 1987 [47]	Male Sprague–Dawley rats fed a high-fat diet for 24 weeks	Not reported in this study ¹	Not reported in this study	710 mg/kg (i.p.)	Higher hepatotoxicity after 48 h, compared to rats fed a standard diet
Blouin et al., 1987 [58]	Male obese Zucker fa/fa rats	Not reported in this study ²	Not reported in this study ²	1300 mg (p.o.)	Similar hepatotoxicity after 48 h, compared to lean rats

Table 2. Cont.

Authors, Year [References]	Rodent Models of Obesity and NAFLD	Presence of NAFLD	Hepatic CYP2E1 Activity	Dose of APAP	APAP-Induced Hepatotoxicity
Tuntaterdtum et al., 1993 [54].	Male obese Zucker fa/fa rats	Not reported in this study ²	Not reported in this study ²	3000 mg/kg (p.o.)	Lower hepatotoxicity after 48 h, compared to lean rats
Ito et al., 2006 [55]	Male C57Bl/6 mice fed a Western-style diet for 16 weeks	Yes	Not reported in this study	300 mg/kg (p.o.)	Lower hepatotoxicity after 6 h, compared to mice fed a standard diet
	Male ob/ob mice	Not reported in this study ³	Not reported in this study ³	300 mg/kg (p.o.)	Lower hepatotoxicity after 6 h, compared to wild-type mice
Donthamsetty et al., 2008 [59]	Male Swiss Webster mice fed a MCD diet for 1 month ⁴	Yes	Unchanged	360 mg/kg (i.p.)	Higher hepatotoxicity from 6 to 48 h after overdose, compared to mice fed a standard diet
Kon et al., 2010 [48]	Male KK-A ^y mice	Yes	Not reported in this study ⁵	300 or 600 mg/kg (p.o.)	Higher hepatotoxicity after 6 h, compared to wild-type mice
Kucera et al., 2012 [50]	Male Sprague-Dawley rats fed a high-fat diet for 6 weeks	Yes	Not reported in this study	1 g/kg (p.o.)	Higher hepatotoxicity after 24 and 48 h, compared to rats fed a standard diet
Aubert et al., 2012 [49]	Female db/db mice	Yes	Increased	500 mg/kg (p.o.)	Higher hepatotoxicity after 8 h, compared to wild-type mice
	Female ob/ob mice	Yes	Unchanged	500 mg/kg (p.o.)	Similar hepatotoxicity after 8 h, compared to wild-type mice
Kim et al., 2017 [56]	Male C57Bl/6 mice fed a fast food diet for 14 weeks	Yes	Not reported in this study (but higher CYP2E1 protein levels)	200 mg/kg (i.p.)	Lower hepatotoxicity compared to wild-type mice (timing not specified)
Piccinin et al., 2019 [51]	Male FVB/N mice fed a high-fat diet for 1 month	Yes	Not reported in this study	300 mg/kg (i.p.)	Higher hepatotoxicity after 6 h, compared to wild-type mice
Shi et al., 2019 [52]	Male C57Bl/6 mice fed a high-fat diet for 8 weeks	Yes	Not reported in this study	50, 100 or 200 mg/kg (p.o.)	Significant hepatotoxicity after 24 h but no comparison with wild-type mice
Wang et al., 2021 [53]	Male C57Bl/6J mice fed a high-fat diet for 8 weeks	Yes	Not reported in this study	100 mg/kg (p.o.)	Significant hepatotoxicity after 24 h but no comparison with wild-type mice
Ghallab et al., 2021 [57]	Male C57Bl/6N mice fed a Western diet for 48 to 50 weeks	Yes	Not reported in this study (but lower CYP2E1 immunostaining)	300 mg/kg (i.p.)	Lower hepatotoxicity compared to wild-type mice (timing not specified)

¹ Numerous investigations in rodents including rats showed that long-term feeding of high-fat diets consistently induces NAFLD (reviewed in [60–62]). ² Other studies showed that male obese and insulin resistant Zucker fa/fa rats present moderate fatty liver [63,64] but reduced CYP2E1 activity [63,65]. ³ Other investigations showed that male obese and diabetic ob/ob mice present major fatty liver [66,67], with unchanged [49] or reduced [68] CYP2E1 activity. ⁴ Methionine and choline-deficient (MCD) diet is known to induce NASH, which is however associated with reduced body weight and blood glycemia [9,60]. ⁵ Previous studies showed that hepatic CYP2E1 mRNA expression [69] and activity [70] are unchanged in KK-A^y mice.

3.4. *In Vitro Studies on Acute APAP Hepatotoxicity in Models of Fatty Acid Exposure and NAFLD*

Several *in vitro* studies investigated APAP acute cytotoxicity in different models of fatty acid exposure and NAFLD. Two studies were carried out in hepatocytes isolated from rats fed different types of lipids. The first study reported that liver slices from rats fed a diet rich in butter (which mainly contains saturated fatty acids) were significantly more sensitive to APAP cytotoxicity than those from rats fed a diet enriched in polyunsaturated fatty acids (PUFAs) [71]. Unfortunately, lipid accumulation was not evaluated in this study nor were included liver slices from rats fed a standard diet. Nevertheless, this study suggests that exposure to long-chain saturated fatty acids could be more detrimental than to polyunsaturated linoleic acid (C18:2) and arachidonic acid (C20:4) [71]. In the second study, steatotic primary hepatocytes isolated from rats fed a diet enriched in corn oil (which mainly contains PUFAs) were more sensitive to APAP cytotoxicity than those from rats fed a standard diet [72]. The role of n-3 PUFAs (also referred to as ω -3 PUFAs) in APAP hepatotoxicity is discussed in Section 4.2.5.

Two other studies were performed in hepatocyte cell lines incubated with different fatty acids. In the first study, carried out in L02 liver cells, the investigations showed that a 24 h exposure to the monounsaturated oleic acid (C18:1) exacerbated APAP cytotoxicity whereas different medium chain fatty acids did not cause this effect [73]. Unfortunately, this study did not determine whether these different fatty acids induced steatosis in L02 liver cells. Other investigations performed in differentiated HepaRG cells incubated 7 days with stearic acid (C18:0) or oleic acid (which both induced steatosis) showed that only stearate supplementation induced greater APAP-induced cytotoxicity, which was blunted by the CYP2E1 inhibitor chlormethiazole [74]. The apparent discrepancy between these two studies could be due to the cell lines and the duration of oleic acid exposure. Nonetheless, these *in vitro* investigations clearly indicate that exposure to some fatty acids could favor APAP hepatotoxicity. Although this might be due to their propensity to induce CYP2E1, other possible mechanisms cannot be excluded, as briefly discussed in Section 4.1.3.

Finally, *in vitro* investigations also reported that APAP worsened lipid deposition in steatotic L02 cells [52,53], thus confirming *in vivo* results in diet-induced and genetically obese mice [49,52,53]. However, steatosis in L02 cells was induced by cotreating the cells with oleic acid and ethanol, which does not reflect pure NAFLD. Nevertheless, these investigations suggest that acute APAP could aggravate steatosis through a direct effect on hepatocytes and not via extrahepatic pathways such as fat mobilization from adipose tissue [75,76].

3.5. *Investigations on Chronic APAP Hepatotoxicity in Obesity and NAFLD*

Repeated or chronic intake of therapeutic doses of APAP can sporadically cause different types of liver injury, as previously mentioned [18–20]. Unfortunately, there are no clinical studies investigating the occurrence of repeated or chronic APAP hepatotoxicity in obesity and NAFLD. In rodents, a 13-week treatment with APAP was less hepatotoxic in leptin receptor-deficient obese (fa/fa) Zucker rats than in lean rats [77]. According to the authors, this might be explained by lower hepatic CYP2E1 expression in obese Zucker rats [77]. This is in line with previous studies showing downregulation of hepatic CYP2E1 in obese Zucker rats [63,68] and lower acute APAP hepatotoxicity in obese Zucker rats compared with their lean littermates [54]. The role of the adipokine leptin in CYP2E1 expression is briefly discussed in Section 4.2.2. In another study, a 35-day treatment with APAP caused more severe hepatic cytolysis in spontaneously diabetic torii (SDT) rats as compared to nondiabetic rats [78]. While SDT rats are not obese, this study did not investigate fatty liver [78]. APAP hepatotoxicity in type 1 diabetes is discussed in Section 6.

4. Factors Modulating APAP Hepatotoxicity in Obesity and NAFLD

From the abovementioned studies carried out in humans and rodents, it appears that obesity and NAFLD do not always increase the risk or the severity of APAP-induced liver

injury. Hence, while several factors would favor APAP hepatotoxicity in these metabolic diseases, others might limit APAP toxicity.

4.1. Factors That Could Favor APAP Hepatotoxicity in Obesity and NAFLD

4.1.1. CYP2E1 Induction

Hepatic CYP2E1 induction could be a major mechanism associated with greater APAP hepatotoxicity observed in most clinical and experimental studies (Figure 2A), although other explanations can be considered as discussed below. Indeed, higher CYP2E1 activity is expected to cause an overproduction of NAPQI and deeper GSH depletion, thus leading to more severe mitochondrial dysfunction and oxidative stress [9,13,79]. In line with this hypothesis, the study by van Rongen et al. reported higher CYP2E1 activity in morbidly obese patients, which was associated with mild to moderate hepatic cytolysis after administration of 4–5 g of APAP [43]. However, CYP2E1 activity was not determined in the other investigations reporting a higher risk of APAP-induced liver injury in patients with obesity and NAFLD [40–42]. Experimentally, investigations in ob/ob and db/db obese mice showed that APAP hepatotoxicity correlated with hepatic CYP2E1 activity but not with liver fat accumulation [49]. Unfortunately, most other rodent studies showing higher APAP hepatotoxicity in obese animals did not investigate CYP2E1 expression, or activity [47,48,50–53].

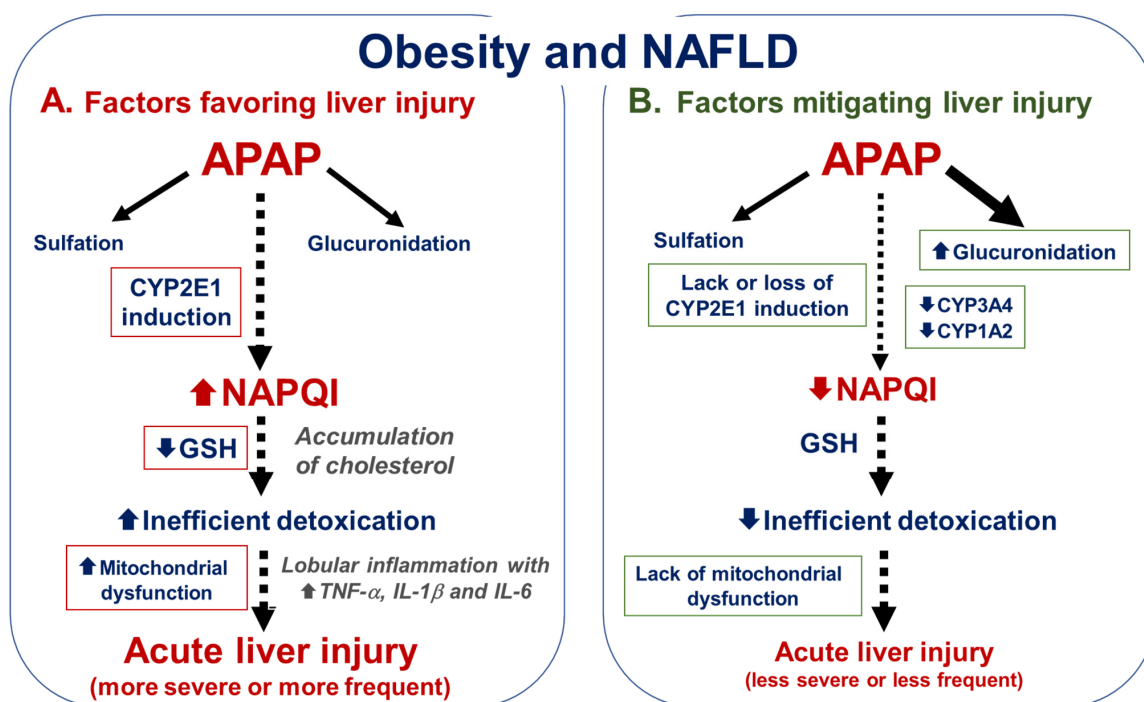


Figure 2. Hepatotoxicity of APAP in obesity and NAFLD. **(A).** Different factors in obesity and NAFLD could favor liver injury induced by APAP overdose, for instance by increasing cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) activity, reducing basal concentrations of glutathione (GSH) and promoting preexisting mitochondrial dysfunction. In addition, the accumulation of cholesterol could sensitize the liver to APAP-induced hepatotoxicity by favoring mitochondrial GSH depletion. Lobular inflammation might also favor APAP hepatotoxicity via several cytokines such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-6. **(B).** On the contrary, some factors in obesity and NAFLD could mitigate APAP-induced liver injury, for instance by increasing APAP glucuronidation and reducing CYP3A4 and CYP1A2 activity. Moreover, CYP2E1 induction could be absent or lost in some metabolic and pathological conditions. The absence of preexisting mitochondrial dysfunction in some patients might also mitigate APAP-induced hepatotoxicity. Consequently, obese people with one or several of these mitigating factors might not have a higher risk of severe APAP-induced liver injury. More information is provided in the text.

In a study carried out in mice fed a fast food diet enriched in saturated fatty acids, cholesterol and fructose, less severe APAP liver injury was observed despite enhanced hepatic CYP2E1 protein expression but CYP2E1 activity was not measured [56]. Adaptive responses in different antioxidant and anti-inflammatory pathways might explain this protective effect in this mouse model of obesity [56]. Conversely, higher APAP hepatotoxicity was observed in a mouse model of NASH despite unchanged CYP2E1 activity [59]. Although the reasons for the lack of CYP2E1 induction are unclear, it should be underlined that NASH was induced in this work with a methionine and choline-deficient (MCD) diet [59], which significantly reduces body weight and blood glycemia and does not cause systemic insulin resistance [9,60]. Hence, this peculiar metabolic profile might have removed some cues that otherwise might have led to CYP2E1 induction, as discussed in Section 4.2.2.

Hepatic CYP2E1 induction is a salient feature of obesity and NAFLD. Indeed, many clinical investigations consistently reported higher hepatic CYP2E1 expression and activity in patients with these metabolic diseases [9,43,80–85]. Hepatic CYP2E1 induction has also been found in many studies performed in different rodent models of obesity and NAFLD [49,57,82,86–91], although there are some exceptions as mentioned in Section 4.2.2.

Hepatic CYP2E1 induction in obese patients would not only cause more frequent or more severe APAP hepatotoxicity but may also favor the transition of fatty liver to NASH [82,89,92–94]. In steatotic hepatocytes, ROS overproduction secondary to CYP2E1 induction is indeed deemed to cause lipid peroxidation and the generation of noxious reactive aldehydes such as malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxynonenal (4-HNE), which then promote necroinflammation and fibrosis [82,92–95]. Accordingly, the key role of CYP2E1 in NASH pathophysiology makes CYP2E1 inhibition or downregulation a promising therapeutic strategy in NAFLD [92,96,97].

The mechanisms of CYP2E1 induction in NAFLD are poorly understood. Accumulation of some fatty acids such as palmitic acid (C16:0) and stearic acid (C18:0) might play a role [74,98,99]. In keeping with the role of some fatty acids or lipids, a recent interventional study in healthy individuals showed that a short-term regular diet supplemented with whipped cream induced hepatic steatosis and significantly enhanced CYP2E1 activity [100]. Other mechanisms might involve hyperleptinemia, hyperglucagonemia and insulin resistance [10,25,82]. The exact downstream signaling pathways involved in CYP2E1 induction in NAFLD are still unknown.

4.1.2. Low Basal Levels of GSH

Low basal levels of liver GSH might also favor APAP hepatotoxicity in NAFLD as this is expected to hasten and even promote the profound GSH depletion taking place after APAP overdose (Figure 2A). Consequently, less NAPQI can be detoxified by hepatic GSH thus allowing the APAP reactive metabolite to covalently bind to different proteins and other cellular components, especially in mitochondria [16,17,23]. Significant reduction of basal levels of liver GSH has been reported in NAFLD, either in patients [101,102] or in some rodent models [103,104]. However, other animal investigations did not find any significant decrease in hepatic GSH content [49,50,105,106], although this was sometimes associated with higher levels of oxidized GSH (GSSG) [105].

The mechanisms that can cause low basal levels of liver GSH in NAFLD might be complex. Several factors might be involved including the extent of ROS overproduction via mitochondrial dysfunction, reduced synthesis of GSH and impairment of other antioxidant defenses, which can occur during the progression of NAFLD [37,105,107,108].

4.1.3. Extent of Steatosis and Accumulation of Deleterious Fatty Acids and Lipid Species

Investigations in genetically obese mice intoxicated with APAP showed that higher basal levels of hepatic triglycerides did not cause more severe APAP-induced hepatic cytolysis [49]. Hence, the extent of steatosis per se does not seem to favor APAP hepatotoxicity in NAFLD. In contrast, the accumulation of some fatty acids might specifically

favor liver injury. For instance, palmitic and stearic acids could be particularly harmful by promoting hepatic CYP2E1 induction [74,98,99], as previously mentioned. Furthermore, studies carried out in transgenic fat-1 mice, which endogenously convert n-6 PUFAs to n-3 PUFAs, showed that male animals were more susceptible to APAP-induced acute liver injury, possibly via a JNK-dependent mechanism and downregulation of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) [109,110].

Cholesterol accumulation might also favor APAP hepatotoxicity in NAFLD (Figure 2A). Indeed, investigations in mice fed a high-cholesterol diet for 4 weeks showed more severe APAP-induced acute liver injury, possibly through the Toll-like receptor 9 (TLR9)/inflammasome pathway [111]. Interestingly, mitochondrial free cholesterol loading leads to mitochondrial GSH depletion in hepatocytes [112], which could promote mitochondrial dysfunction and cell death [113]. In contrast, CYP2E1 might not be involved because hepatic CYP2E1 expression and activity were reduced in rats fed a high-cholesterol diet for 11 weeks [114].

4.1.4. Mitochondrial Dysfunction

NAFLD is associated with complex mitochondrial alterations. In simple fatty liver, mitochondrial oxidative metabolism is stimulated, most probably as an adaptation to the increased levels of different substrates including fatty acids [37,38,108,115]. However, this adaptation can be lost in NASH, which is associated with reduced expression and activity of different mitochondrial respiratory complexes [37,38,108,115–117]. Accordingly, NASH-associated mitochondrial dysfunction might favor APAP hepatotoxicity (Figure 2A) since respiratory chain impairment is pivotal in APAP-induced liver injury [118–120]. However, there are currently no available data to confirm this hypothesis but different rodent models reproducing NAFLD progression can be useful for this [60,61,121].

4.1.5. Presence of Lobular Inflammation

Simple fatty liver can progress in some patients to NASH which is characterized by lobular inflammation, hepatocellular ballooning and the presence of some necrotic hepatocytes and apoptotic bodies, as previously mentioned. These pathological lesions are due at least in part to the overproduction of several proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-6 [122,123], which could sensitize the liver to APAP-induced hepatotoxicity (Figure 2A). Interestingly, APAP-induced acute liver injury is exacerbated in Nlrp6^{-/-} mice [124], a well-established mouse model of intestinal dysbiosis associated with enhanced gut–liver inflammatory responses [125]. However, it remains to be determined whether obesity- and NAFLD-associated gut dysbiosis [126,127] could play a role in higher APAP hepatotoxicity in these metabolic diseases. Other investigations showed that hepatic inflammation favors liver injury induced by different drugs and chemicals [128–130].

4.2. Factors That Could Mitigate APAP Hepatotoxicity in Obesity and NAFLD

4.2.1. Alteration in APAP Absorption and Distribution

Only a few clinical studies dealt with the impact of obesity on gastrointestinal absorption of APAP and its whole-body distribution. To our knowledge, only one study reported a lower absorption rate of APAP in obese subjects, which was associated with a decrease in the maximum plasma concentrations of the pain reliever [131]. Regarding whole-body distribution, two studies reported higher APAP volume of distribution (Vd) in obese subjects [43,132]. However, all these investigations were carried out in morbidly obese persons and further investigations would be needed to confirm these data for body mass index (BMI) below 40 kg/m². Nevertheless, decreased APAP gastrointestinal absorption and higher Vd could favor lower APAP plasma and liver concentrations, at least in some obese patients [9].

4.2.2. Lack of CYP2E1 Induction or CYP2E1 Downregulation

Although hepatic CYP2E1 activity is frequently increased in NAFLD (see Section 4.1.1), some investigations reported a lack of CYP2E1 induction, which might not allow NAPQI overproduction (Figure 2B). Indeed, several clinical studies showed that some obese patients had CYP2E1 activity in the range of nonobese individuals [43,46,85,133]. Experimentally, hepatic CYP2E1 expression and activity are not increased in obese leptin-deficient ob/ob mice and leptin receptor-deficient fa/fa Zucker rats [49,68,134]. Although this might suggest that the leptin signaling pathway is needed for CYP2E1 induction in obesity and NAFLD, hepatic CYP2E1 activity is enhanced in leptin receptor-deficient db/db mice, especially in females [49]. The very high glycemia and ketonemia in these mice [49,66] might play a role in CYP2E1 induction in this context of severe diabetes [10]. Because many endogenous molecules, hormones and cytokines are deemed to regulate hepatic CYP2E1 expression and activity, sometimes with opposite effects [10,82,135–137], it is possible that CYP2E1 induction might not always occur in obesity and NAFLD.

Another possibility could be the loss of CYP2E1 induction during NAFLD progression (Figure 2B). Indeed, recent investigations suggested that CYP2E1 induction seems to wane when NASH progresses toward advanced fibrosis [57], in line with clinical data reporting a significant reduction of CYP2E1 expression with the progression of liver fibrosis [138,139]. Increased production of proinflammatory cytokines including TNF- α might play a role in this progressive decline of CYP2E1 expression [135,139]. In contrast, the profibrotic cytokine transforming growth factor-beta (TGF- β) does not seem to be involved in fibrosis-associated CYP2E1 downregulation [140,141].

4.2.3. Reduced CYP3A4 and CYP1A2 Activity

CYP3A4 (also referred to as CYP3A) and CYP1A2 are also involved in APAP bio-transformation to NAPQI, although to a lesser extent than CYP2E1 [26,27]. Many clinical and experimental studies consistently reported lower hepatic expression and activity of CYP3A4 in obesity and NAFLD [83,142–150]. Hence, lower CYP3A4 activity in obesity and NAFLD might reduce the generation of NAPQI after an APAP overdose (Figure 2B).

Several clinical studies on CYP1A2 activity reported little or no change in obesity [83,147,149]. Interestingly, investigations in patients with NAFLD reported that CYP1A2 expression and activity were unaltered in fatty liver but significantly reduced in NASH [151,152]. These data seem to be in line with the investigations carried out in obese patients since NASH occurs only in a minority of those people [35]. In rodent models of NAFLD, CYP1A2 expression and activity were significantly decreased in most investigations [153–158], but increased or unchanged in some others [143,159]. Like CYP3A4, lower CYP1A2 activity in NAFLD might also reduce the generation of NAPQI after an APAP overdose (Figure 2B).

4.2.4. Increased APAP Glucuronidation

Clinical and experimental investigations consistently reported increased APAP glucuronidation in obesity and NAFLD [9,43,49,83,160,161], which is expected to reduce the extent of APAP bioactivation to NAPQI (Figure 2B). Of note, UGT1A6 and UGT1A9 are the main UGT isoforms involved in APAP glucuronidation in humans [162] but only UGT1A9 protein expression tended to be increased in patients with obesity-related fatty liver [163].

4.2.5. Exposure and Accumulation of Protective Fatty Acids

Two studies carried out in female transgenic fat-1 mice (which endogenously convert n-6 PUFAs to n-3 PUFAs) showed significant protection against APAP-induced acute liver injury [109,164]. In the study by Liu et al., the opposite effect was observed in male mice and this gender difference was attributed to estrogens [109]. Of note, the expression of hepatic CYP2E1 in female mice was unchanged in one study [164], whereas CYP2E1 was not investigated in the second one [109]. Other investigations in rats showed that dietary supplementation with the n-3 polyunsaturated eicosapentaenoic and docosahex-

aenoic acids (EPA and DHA) protected against acute APAP liver injury [165]. According to the authors, the hepatoprotective effect of n-3 PUFAs against APAP liver injury might be mediated via their anti-inflammatory and antioxidant properties [164,165]. Another study in rats fed a diet with 20% fish oil (i.e., rich in n-3 PUFAs) also reported protection against APAP-induced acute liver injury, which was deemed to be related to higher APAP glucuronidation [166]. Interestingly, n-3 PUFAs reduced hepatic CYP2E1 activity in insulinopenic diabetic rats [167] but their protective effect against APAP hepatotoxicity was not investigated in this study.

5. APAP-Induced Liver Injury after Bariatric Surgery

Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy are surgical procedures increasingly used for the treatment of morbid obesity and comorbidities including NAFLD [168,169]. A retrospective study suggested that weight loss surgery may predispose to acute liver failure after APAP overdose and this was independent of alcohol abuse and the use of APAP–narcotic combination drugs [170]. More recently, a case of fulminant hepatitis was observed after laparoscopic sleeve gastrectomy in a young woman who received therapeutic doses of APAP [171]. In addition to malnutrition and vitamin deficiency, the authors pointed to other possible risk factors including rapid weight loss, which might have aggravated preexisting fatty liver [171]. Notably, although CYP2E1 activity in obese patients decreases after bariatric surgery it remains higher than in healthy volunteers [133,172]. Thus, increased CYP2E1 activity might favor APAP-induced liver injury in obese patients even after such surgery. However, beyond CYP2E1 activity, other metabolic parameters most probably explain the profound alterations of APAP bioavailability observed after weight loss surgery [173,174]. Hence, further investigations would be needed to determine the mechanisms whereby bariatric surgery might predispose to APAP hepatotoxicity.

6. APAP-Hepatotoxicity in Type 1 Diabetes Mellitus

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is a chronic autoimmune disease caused by insulin deficiency and leading to severe hyperglycemia [175]. Importantly, the pathogenesis of T1DM significantly differs from that of obesity-related T2DM [176,177]. Nonetheless, T1DM seems to be frequently associated with fatty liver, which can progress to steatohepatitis and cirrhosis in some patients [178,179]. Some clinical investigations disclosed that diabetes increases the risk and the severity of DILI but these studies did not specify whether there was a difference between T1DM and T2DM [180–182]. Moreover, these investigations did not provide specific information on APAP.

T1DM can be induced in rats and mice by single or repeated injections of streptozotocin, a pancreatic β -cell poison [10,183]. Using this experimental model, a recent study reported that APAP-induced acute liver injury was exacerbated in diabetic mice possibly via a hyperglycemia-induced proinflammatory response in liver Kupffer cells [184]. Although not investigated in this study, it is possible that CYP2E1 induction might also have played a role in liver injury aggravation [10]. Indeed, numerous studies (but not all—see below) showed that streptozotocin-induced diabetes is associated with higher hepatic CYP2E1 protein expression and activity [10,167,185–188].

Contrasting with the study by Wang et al. [184], several investigations in streptozotocin-treated rodents showed that T1DM protected against APAP-induced acute hepatotoxicity [189–191]. The exact reasons for these discrepancies are unknown although higher APAP glucuronidation and improved liver repair in diabetic animals might play a role [189–191]. However, it is worth mentioning that hepatic CYP2E1 activity was not increased in these studies, thus contrasting with many other investigations reporting CYP2E1 induction in streptozotocin-treated rodents [10,167,185–188]. Further studies would be needed in order to determine why hepatic CYP2E1 induction is not always observed in streptozotocin-induced experimental diabetes. The extent of insulinopenia, ketonemia and hyperglycemia might be pivotal [10], in addition to other metabolic factors already discussed in this review.

7. Conclusions

Although obesity and NAFLD appear to increase the risk or the severity of APAP-induced acute liver injury, this relationship has not always been reported. As discussed in previous reviews [9,13,46] and this one, we propose that the occurrence and outcome of APAP-induced liver injury in these metabolic diseases might depend on a subtle balance between metabolic factors that can be protective for the liver and others that favor the generation of NAPQI (Figure 2). Hence, further investigations are needed in order to understand why some obese individuals could be at risk for APAP-induced hepatotoxicity and why some others are not. Although the absence of hepatic CYP2E1 induction might explain the lack of increased risk, other mechanisms might be involved including reduced APAP gastrointestinal absorption, enhanced Vd, higher hepatic glucuronidation and lower hepatic CYP3A4 activity (Figure 2B). In contrast, robust CYP2E1 induction, lobular inflammation, low basal concentrations of hepatic GSH and NASH-associated mitochondrial dysfunction might favor APAP hepatotoxicity in obesity and NAFLD (Figure 2A). While some of these factors are difficult to investigate in patients, many rodent models can be useful for mechanistic purposes [60,61,121]. Of note, these rodent models of obesity and NAFLD could also be valuable in order to determine whether repeated or chronic administration of APAP at therapeutic doses can cause more severe liver injury.

From a clinical viewpoint, physicians are encouraged to carry out regular monitoring of liver function in obese patients treated with chronic APAP administration, in particular in patients with pre-existing NAFLD. Finally, it should be underlined that chronic ethanol consumption constantly causes hepatic CYP2E1 induction while recent investigations reported that alcohol consumption and obesity (or metabolic syndrome) can synergistically augment the risk and severity of steatohepatitis, cirrhosis and HCC [192–194]. Hence, further investigations would be required to determine whether obese people who regularly consume alcohol have an even higher risk of APAP-induced hepatotoxicity.

Finally, a major issue for the future is to better prevent liver failure and mortality after APAP overdose, irrespective of the patient's body weight. Although NAC is the only approved antidote to treat APAP-induced liver injury [10,14], other therapeutic compounds are currently being developed to inhibit CYP2E1 activity (fomepizole), or to prevent mitochondrial oxidative stress (MitoTEMPO) and peroxynitrite formation (calmangafodipir) [195]. Numerous phytochemicals with efficient antioxidant properties might also be promising antidotes [196]. As for NAC, these compounds might be able to protect against APAP-induced necrosis [17,197] and other possible types of cell death including necroptosis and apoptosis [198,199]. Furthermore, targeting autophagy, mitophagy and mitochondrial biogenesis could also be promising therapeutic strategies [22,195,200].

Author Contributions: Conceptualization, K.B., J.M. and B.F.; writing—original draft preparation, B.F.; writing—review and editing, K.B., C.P., P.B.-G. and J.M.; visualization, K.B., J.M. and B.F.; supervision, B.F.; project administration, B.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We are grateful to the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) for its constant support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Barrett, L.A.; Xing, A.; Sheffler, J.; Steidley, E.; Adam, T.J.; Zhang, R.; He, Z. Assessing the Use of Prescription Drugs and Dietary Supplements in Obese Respondents in the National Health and Nutrition Examination Survey. *PLoS ONE* **2022**, *17*, e0269241. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Pulipati, V.P.; Pannain, S. Pharmacotherapy of Obesity in Complex Diseases. *Clin. Obes.* **2022**, *12*, e12497. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Chew, N.W.S.; Ng, C.H.; Truong, E.; Noureddin, M.; Kowdley, K.V. Nonalcoholic Steatohepatitis Drug Development Pipeline: An Update. *Semin. Liver Dis.* **2022**, *42*, 379–400. [\[CrossRef\]](#)
- Negi, C.K.; Babica, P.; Bajard, L.; Bienertova-Vasku, J.; Tarantino, G. Insights into the Molecular Targets and Emerging Pharmacotherapeutic Interventions for Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Metabolism* **2022**, *126*, 154925. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Scott, I.A.; Hilmer, S.N.; Reeve, E.; Potter, K.; Le Couteur, D.; Rigby, D.; Gnjdic, D.; Del Mar, C.B.; Roughead, E.E.; Page, A.; et al. Reducing Inappropriate Polypharmacy: The Process of Deprescribing. *JAMA Intern. Med.* **2015**, *175*, 827–834. [\[CrossRef\]](#)
- Suzuki, A.; Yuen, N.A.; Ilic, K.; Miller, R.T.; Reese, M.J.; Brown, H.R.; Ambroso, J.I.; Falls, J.G.; Hunt, C.M. Comedications Alter Drug-Induced Liver Injury Reporting Frequency: Data Mining in the WHO Vigibase™. *Regul. Toxicol. Pharm.* **2015**, *72*, 481–490. [\[CrossRef\]](#)
- Lammert, C.; Imler, T.; Teal, E.; Chalasani, N. Patients With Chronic Liver Disease Suggestive of Nonalcoholic Fatty Liver Disease May Be at Higher Risk for Drug-Induced Liver Injury. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2019**, *17*, 2814–2815. [\[CrossRef\]](#)
- Hwang, S.; Won, S.; Lee, S. Nonalcoholic Fatty Liver Disease for the Incidence of Drug-Induced Liver Injury. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2022**, *20*, 964–965. [\[CrossRef\]](#)
- Michaut, A.; Moreau, C.; Robin, M.-A.; Fromenty, B. Acetaminophen-Induced Liver Injury in Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Liver Int.* **2014**, *34*, e171–e179. [\[CrossRef\]](#)
- Massart, J.; Begriche, K.; Fromenty, B. Cytochrome P450 2E1 Should Not Be Neglected for Acetaminophen-Induced Liver Injury in Metabolic Diseases with Altered Insulin Levels or Glucose Homeostasis. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* **2021**, *45*, 101470. [\[CrossRef\]](#)
- Borlak, J.; Chatterji, B.; Londhe, K.B.; Watkins, P.B. Serum Acute Phase Reactants Hallmark Healthy Individuals at Risk for Acetaminophen-Induced Liver Injury. *Genome Med.* **2013**, *5*, 86. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Louvet, A.; Ntandja Wandji, L.C.; Lemaître, E.; Khaldi, M.; Lafforgue, C.; Artru, F.; Quesnel, B.; Lassailly, G.; Dharancy, S.; Mathurin, P. Acute Liver Injury With Therapeutic Doses of Acetaminophen: A Prospective Study. *Hepatology* **2021**, *73*, 1945–1955. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Massart, J.; Begriche, K.; Moreau, C.; Fromenty, B. Role of Nonalcoholic Fatty Liver Disease as Risk Factor for Drug-Induced Hepatotoxicity. *J. Clin. Transl. Res.* **2017**, *3*, 212–232. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Licata, M.; Minisalle, M.G.; Stankeviciute, S.; Sanabria-Cabrera, J.; Lucena, M.M.; Andrade, R.J.; Almasio, P.L. N-Acetylcysteine for Preventing Acetaminophen-Induced Liver Injury: A Comprehensive Review. *Front. Pharm.* **2022**, *13*, 828565. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Larson, A.M.; Polson, J.; Fontana, R.J.; Davern, T.J.; Lalani, E.; Hynan, L.S.; Reisch, J.S.; Schiodt, F.V.; Ostapowicz, G.; Shakil, A.O.; et al. Acetaminophen-Induced Acute Liver Failure: Results of a United States Multicenter, Prospective Study. *Hepatology* **2005**, *42*, 1364–1372. [\[CrossRef\]](#)
- Yoon, E.; Babar, A.; Choudhary, M.; Kutner, M.; Pyrsopoulos, N. Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity: A Comprehensive Update. *J. Clin. Transl. Hepatol.* **2016**, *4*, 131–142. [\[CrossRef\]](#)
- Ramachandran, A.; Jaeschke, H. A Mitochondrial Journey through Acetaminophen Hepatotoxicity. *Food Chem. Toxicol.* **2020**, *140*, 111282. [\[CrossRef\]](#)
- Biour, M.; Ben Salem, C.; Chazouillères, O.; Grangé, J.-D.; Serfaty, L.; Poupon, R. Drug-induced liver injury; fourteenth updated edition of the bibliographic database of liver injuries and related drugs. *Gastroenterol. Clin. Biol.* **2004**, *28*, 720–759. [\[CrossRef\]](#)
- Watelet, J.; Laurent, V.; Bressenot, A.; Bronowicki, J.-P.; Larrey, D.; Peyrin-Biroulet, L. Toxicity of Chronic Paracetamol Ingestion. *Aliment. Pharm.* **2007**, *26*, 1543–1544. [\[CrossRef\]](#)
- Yaghi, C.; Assaf, A. Acetaminophen Toxicity at Therapeutic Doses. *Intern. Med. Rev.* **2017**, *3*, 1–13.
- McGill, M.R.; Hinson, J.A. The Development and Hepatotoxicity of Acetaminophen: Reviewing over a Century of Progress. *Drug Metab. Rev.* **2020**, *52*, 472–500. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Jaeschke, H. Acetaminophen Hepatotoxicity: Not as Simple as One Might Think! Introductory Comments on the Special Issue-Recent Advances in Acetaminophen Hepatotoxicity. *Livers* **2022**, *2*, 105–107. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Fernandez-Checa, J.C.; Bagnaninchi, P.; Ye, H.; Sancho-Bru, P.; Falcon-Perez, J.M.; Royo, F.; Garcia-Ruiz, C.; Konu, O.; Miranda, J.; Lunov, O.; et al. Advanced Preclinical Models for Evaluation of Drug-Induced Liver Injury—Consensus Statement by the European Drug-Induced Liver Injury Network [PRO-EURO-DILI-NET]. *J. Hepatol.* **2021**, *75*, 935–959. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Knockaert, L.; Descatoire, V.; Vadrot, N.; Fromenty, B.; Robin, M.-A. Mitochondrial CYP2E1 Is Sufficient to Mediate Oxidative Stress and Cytotoxicity Induced by Ethanol and Acetaminophen. *Toxicol. Vitro.* **2011**, *25*, 475–484. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Massart, J.; Begriche, K.; Hartman, J.H.; Fromenty, B. Role of Mitochondrial Cytochrome P450 2E1 in Healthy and Diseased Liver. *Cells* **2022**, *11*, 288. [\[CrossRef\]](#)

26. Brackett, C.C.; Bloch, J.D. Phenytoin as a Possible Cause of Acetaminophen Hepatotoxicity: Case Report and Review of the Literature. *Pharmacotherapy* **2000**, *20*, 229–233. [\[CrossRef\]](#)
27. McGill, M.R.; Jaeschke, H. Metabolism and Disposition of Acetaminophen: Recent Advances in Relation to Hepatotoxicity and Diagnosis. *Pharm. Res.* **2013**, *30*, 2174–2187. [\[CrossRef\]](#)
28. Caparrotta, T.M.; Antoine, D.J.; Dear, J.W. Are Some People at Increased Risk of Paracetamol-Induced Liver Injury? A Critical Review of the Literature. *Eur. J. Clin. Pharm.* **2018**, *74*, 147–160. [\[CrossRef\]](#)
29. Hidaka, N.; Kaji, Y.; Takatori, S.; Tanaka, A.; Matsuoka, I.; Tanaka, M. Risk Factors for Acetaminophen-Induced Liver Injury: A Single-Center Study from Japan. *Clin. Ther.* **2020**, *42*, 704–710. [\[CrossRef\]](#)
30. Tsuchiya, Y.; Sakai, H.; Hirata, A.; Yanai, T. Effects of Food Restriction on the Expression of Genes Related to Acetaminophen-Induced Liver Toxicity in Rats. *J. Toxicol. Pathol.* **2018**, *31*, 267–274. [\[CrossRef\]](#)
31. Court, M.H.; Freytsis, M.; Wang, X.; Peter, I.; Guillemette, C.; Hazarika, S.; Duan, S.X.; Greenblatt, D.J.; Lee, W.M. Acute Liver Failure Study Group The UDP-Glucuronosyltransferase (UGT) 1A Polymorphism c.2042C>G (Rs8330) Is Associated with Increased Human Liver Acetaminophen Glucuronidation, Increased UGT1A Exon 5a/5b Splice Variant mRNA Ratio, and Decreased Risk of Unintentional Acetaminophen-Induced Acute Liver Failure. *J. Pharm. Exp.* **2013**, *345*, 297–307. [\[CrossRef\]](#)
32. Henry, L.; Paik, J.; Younossi, Z.M. Review Article: The Epidemiologic Burden of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease across the World. *Aliment. Pharm.* **2022**, *56*, 942–956. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Brunt, E.M.; Kleiner, D.E.; Carpenter, D.H.; Rinella, M.; Harrison, S.A.; Loomba, R.; Younossi, Z.; Neuschwander-Tetri, B.A.; Sanyal, A.J. American Association for the Study of Liver Diseases NASH Task Force NAFLD: Reporting Histologic Findings in Clinical Practice. *Hepatology* **2021**, *73*, 2028–2038. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Ahmad, M.I.; Khan, M.U.; Kodali, S.; Shetty, A.; Bell, S.M.; Victor, D. Hepatocellular Carcinoma Due to Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Current Concepts and Future Challenges. *J. Hepatocell. Carcinoma* **2022**, *9*, 477–496. [\[CrossRef\]](#)
35. Koch, L.K.; Yeh, M.M. Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD): Diagnosis, Pitfalls, and Staging. *Ann. Diagn. Pathol.* **2018**, *37*, 83–90. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Tandra, S.; Yeh, M.M.; Brunt, E.M.; Vuppalanchi, R.; Cummings, O.W.; Ünalp-Arida, A.; Wilson, L.A.; Chalasani, N. Presence and Significance of Microvesicular Steatosis in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J. Hepatol.* **2011**, *55*, 654–659. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Begriche, K.; Massart, J.; Robin, M.-A.; Bonnet, F.; Fromenty, B. Mitochondrial Adaptations and Dysfunctions in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology* **2013**, *58*, 1497–1507. [\[CrossRef\]](#)
38. Sunny, N.E.; Bril, F.; Cusi, K. Mitochondrial Adaptation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Novel Mechanisms and Treatment Strategies. *Trends Endocrinol. Metab.* **2017**, *28*, 250–260. [\[CrossRef\]](#)
39. Pafili, K.; Roden, M. Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) from Pathogenesis to Treatment Concepts in Humans. *Mol. Metab.* **2021**, *50*, 101122. [\[CrossRef\]](#)
40. Nguyen, G.C.; Sam, J.; Thuluvath, P.J. Hepatitis C Is a Predictor of Acute Liver Injury among Hospitalizations for Acetaminophen Overdose in the United States: A Nationwide Analysis. *Hepatology* **2008**, *48*, 1336–1341. [\[CrossRef\]](#)
41. Myers, R.P.; Shaheen, A.A.M. Hepatitis C, Alcohol Abuse, and Unintentional Overdoses Are Risk Factors for Acetaminophen-Related Hepatotoxicity. *Hepatology* **2009**, *49*, 1399–1400. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Chomchai, S.; Chomchai, C. Being Overweight or Obese as a Risk Factor for Acute Liver Injury Secondary to Acute Acetaminophen Overdose. *Pharm. Drug Saf.* **2018**, *27*, 19–24. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. van Rongen, A.; Väitalo, P.A.J.; Peeters, M.Y.M.; Boerma, D.; Huisman, F.W.; van Ramshorst, B.; van Dongen, E.P.A.; van den Anker, J.N.; Knibbe, C.A.J. Morbidly Obese Patients Exhibit Increased CYP2E1-Mediated Oxidation of Acetaminophen. *Clin. Pharm.* **2016**, *55*, 833–847. [\[CrossRef\]](#)
44. Rutherford, A.; Davern, T.; Hay, J.E.; Murray, N.G.; Hassanein, T.; Lee, W.M.; Chung, R.T. Acute Liver Failure Study Group Influence of High Body Mass Index on Outcome in Acute Liver Failure. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2006**, *4*, 1544–1549. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Radosevich, J.J.; Patanwala, A.E.; Erstad, B.L. Hepatotoxicity in Obese Versus Nonobese Patients With Acetaminophen Poisoning Who Are Treated With Intravenous N-Acetylcysteine. *Am. J. Ther.* **2016**, *23*, e714–e719. [\[CrossRef\]](#)
46. Allard, J.; Le Guillou, D.; Begriche, K.; Fromenty, B. Drug-Induced Liver Injury in Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Adv. Pharm.* **2019**, *85*, 75–107. [\[CrossRef\]](#)
47. Corcoran, G.B.; Wong, B.K. Obesity as a Risk Factor in Drug-Induced Organ Injury: Increased Liver and Kidney Damage by Acetaminophen in the Obese Overfed Rat. *J. Pharm. Exp. Ther.* **1987**, *241*, 921–927.
48. Kon, K.; Ikejima, K.; Okumura, K.; Arai, K.; Aoyama, T.; Watanabe, S. Diabetic KK-A(y) Mice Are Highly Susceptible to Oxidative Hepatocellular Damage Induced by Acetaminophen. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2010**, *299*, G329–G337. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
49. Aubert, J.; Begriche, K.; Delannoy, M.; Morel, I.; Pajaud, J.; Ribault, C.; Lepage, S.; McGill, M.R.; Lucas-Clerc, C.; Turlin, B.; et al. Differences in Early Acetaminophen Hepatotoxicity between Obese Ob/Ob and Db/Db Mice. *J. Pharm. Exp. Ther.* **2012**, *342*, 676–687. [\[CrossRef\]](#)
50. Kučera, O.; Roušar, T.; Staňková, P.; Haňáčková, L.; Lotková, H.; Podhola, M.; Cervinková, Z. Susceptibility of Rat Non-Alcoholic Fatty Liver to the Acute Toxic Effect of Acetaminophen. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2012**, *27*, 323–330. [\[CrossRef\]](#)

51. Piccinin, E.; Ducheix, S.; Peres, C.; Arconzo, M.; Vegliante, M.C.; Ferretta, A.; Bellafante, E.; Villani, G.; Moschetta, A. PGC-1 β Induces Susceptibility To Acetaminophen-Driven Acute Liver Failure. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 16821. [\[CrossRef\]](#)
52. Shi, C.; Xue, W.; Han, B.; Yang, F.; Yin, Y.; Hu, C. Acetaminophen Aggravates Fat Accumulation in NAFLD by Inhibiting Autophagy via the AMPK/MTOR Pathway. *Eur. J. Pharm.* **2019**, *850*, 15–22. [\[CrossRef\]](#)
53. Wang, J.; Jiang, W.; Xin, J.; Xue, W.; Shi, C.; Wen, J.; Huang, Y.; Hu, C. Caveolin-1 Alleviates Acetaminophen-Induced Fat Accumulation in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease by Enhancing Hepatic Antioxidant Ability via Activating AMPK Pathway. *Front. Pharm.* **2021**, *12*, 717276. [\[CrossRef\]](#)
54. Tuntatertdum, S.; Chaudhary, I.P.; Cibull, M.; Robertson, L.W.; Blouin, R.A. Acetaminophen Hepatotoxicity: Influence of Phenobarbital and Beta-Naphthoflavone Treatment in Obese and Lean Zucker Rats. *Toxicol. Appl. Pharm.* **1993**, *123*, 219–225. [\[CrossRef\]](#)
55. Ito, Y.; Abril, E.R.; Bethea, N.W.; McCuskey, M.K.; McCuskey, R.S. Dietary Steatotic Liver Attenuates Acetaminophen Hepatotoxicity in Mice. *Microcirculation* **2006**, *13*, 19–27. [\[CrossRef\]](#)
56. Kim, T.H.; Choi, D.; Kim, J.Y.; Lee, J.H.; Koo, S.-H. Fast Food Diet-Induced Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Exerts Early Protective Effect against Acetaminophen Intoxication in Mice. *BMC Gastroenterol.* **2017**, *17*, 124. [\[CrossRef\]](#)
57. Ghallab, A.; Myllys, M.; Friebe, A.; Duda, J.; Edlund, K.; Halilbasic, E.; Vucur, M.; Hobloss, Z.; Brackhagen, L.; Begher-Tibbe, B.; et al. Spatio-Temporal Multiscale Analysis of Western Diet-Fed Mice Reveals a Translationally Relevant Sequence of Events during NAFLD Progression. *Cells* **2021**, *10*, 2516. [\[CrossRef\]](#)
58. Blouin, R.A.; Dickson, P.; McNamara, P.J.; Cibull, M.; McClain, C. Phenobarbital induction and acetaminophen hepatotoxicity: Resistance in the obese Zucker rodent. *J. Pharm. Exp. Ther.* **1987**, *243*, 270–285.
59. Donthamsetty, S.; Bhawe, V.S.; Mitra, M.S.; Latendresse, J.R.; Mehendale, H.M. Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) Mice Are Protected from Higher Hepatotoxicity of Acetaminophen upon Induction of PPAR α with Clofibrate. *Toxicol. Appl. Pharm.* **2008**, *230*, 327–337. [\[CrossRef\]](#)
60. Jahn, D.; Kircher, S.; Hermanns, H.M.; Geier, A. Animal Models of NAFLD from a Hepatologist's Point of View. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2019**, *1865*, 943–953. [\[CrossRef\]](#)
61. Radhakrishnan, S.; Yeung, S.F.; Ke, J.-Y.; Antunes, M.M.; Pellizzon, M.A. Considerations When Choosing High-Fat, High-Fructose, and High-Cholesterol Diets to Induce Experimental Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Laboratory Animal Models. *Curr. Dev. Nutr.* **2021**, *5*, nzab138. [\[CrossRef\]](#)
62. Carreres, L.; Jilkova, Z.M.; Vial, G.; Marche, P.N.; Decaens, T.; Lerat, H. Modeling Diet-Induced NAFLD and NASH in Rats: A Comprehensive Review. *Biomedicines* **2021**, *9*, 378. [\[CrossRef\]](#)
63. Carmiel-Haggai, M.; Cederbaum, A.I.; Nieto, N. Binge Ethanol Exposure Increases Liver Injury in Obese Rats. *Gastroenterology* **2003**, *125*, 1818–1833. [\[CrossRef\]](#)
64. Cipriani, S.; Mencarelli, A.; Palladino, G.; Fiorucci, S. FXR activation reverses insulin resistance and lipid abnormalities and protects against liver steatosis in Zucker (fa/fa) obese rats. *J. Lipid Res.* **2010**, *51*, 771–784. [\[CrossRef\]](#)
65. Zaluzny, L.; Farrell, G.C.; Murray, M. Effect of genetic obesity and experimental diabetes on hepatic microsomal mixed function oxidase activities. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **1990**, *5*, 256–263. [\[CrossRef\]](#)
66. Trak-Smayra, V.; Paradis, V.; Massart, J.; Nasser, S.; Jebara, V.; Fromenty, B. 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.* **2011**, *92*, 413–421. [\[CrossRef\]](#)
67. Robin, M.A.; Demeilliers, C.; Sutton, A.; Paradis, V.; Maisonneuve, C.; Dubois, S.; Poirel, O.; Lettéron, P.; Pessayre, D.; Fromenty, B. Alcohol increases tumor necrosis factor α and decreases nuclear factor- κ B to activate hepatic apoptosis in genetically obese mice. *Hepatology* **2005**, *42*, 1280–1290. [\[CrossRef\]](#)
68. Enriquez, A.; Leclercq, I.; Farrell, G.C.; Robertson, G. Altered Expression of Hepatic CYP2E1 and CYP4A in Obese, Diabetic Ob/Ob Mice, and Fa/Fa Zucker Rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *255*, 300–306. [\[CrossRef\]](#)
69. Okumura, K.; Ikejima, K.; Kon, K.; Abe, W.; Yamashina, S.; Enomoto, N.; Takei, Y.; Sato, N. Exacerbation of dietary steatohepatitis and fibrosis in obese, diabetic KK-A(y) mice. *Hepatol. Res.* **2006**, *36*, 217–228. [\[CrossRef\]](#)
70. Teraoka, N.; Mutoh, M.; Takasu, S.; Ueno, T.; Nakano, K.; Takahashi, M.; Imai, T.; Masuda, S.; Sugimura, T.; Wakabayashi, K. High susceptibility to azoxymethane-induced colorectal carcinogenesis in obese KK-Ay mice. *Int. J. Cancer* **2011**, *129*, 528–535. [\[CrossRef\]](#)
71. McDanell, R.E.; Beales, D.; Henderson, L.; Sethi, J.K. Effect of Dietary Fat on the in Vitro Hepatotoxicity of Paracetamol. *Biochem. Pharm.* **1992**, *44*, 1303–1306. [\[CrossRef\]](#)
72. Ku  era, O.; Al-Dury, S.; Lotková, H.; Rou  ar, T.; Rychtmoc, D.;   ervinkov  , Z. Steatotic Rat Hepatocytes in Primary Culture Are More Susceptible to the Acute Toxic Effect of Acetaminophen. *Physiol. Res.* **2012**, *61*, S93–S101. [\[CrossRef\]](#)
73. Yang, J.; Peng, T.; Huang, J.; Zhang, G.; Xia, J.; Ma, M.; Deng, D.; Gong, D.; Zeng, Z. Effects of Medium- and Long-Chain Fatty Acids on Acetaminophen- or Rifampicin-Induced Hepatocellular Injury. *Food Sci. Nutr.* **2020**, *8*, 3590–3601. [\[CrossRef\]](#)
74. Michaut, A.; Le Guillou, D.; Moreau, C.; Bucher, S.; McGill, M.R.; Martinais, S.; Gicquel, T.; Morel, I.; Robin, M.-A.; Jaeschke, H.; et al. A Cellular Model to Study Drug-Induced Liver Injury in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Application to Acetaminophen. *Toxicol. Appl. Pharm.* **2016**, *292*, 40–55. [\[CrossRef\]](#)
75. Hubel, E.; Fishman, S.; Holopainen, M.; K  kel  , R.; Shaffer, O.; Houry, I.; Zvibel, I.; Shibolet, O. Repetitive Amiodarone Administration Causes Liver Damage via Adipose Tissue ER Stress-Dependent Lipolysis, Leading to Hepatotoxic Free Fatty Acid Accumulation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2021**, *321*, G298–G307. [\[CrossRef\]](#)

76. Mathur, M.; Yeh, Y.-T.; Arya, R.K.; Jiang, L.; Pornour, M.; Chen, W.; Ma, Y.; Gao, B.; He, L.; Ying, Z.; et al. Adipose Lipolysis Is Important for Ethanol to Induce Fatty Liver in the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism Murine Model of Chronic and Binge Ethanol Feeding. *Hepatology* **2022**. [\[CrossRef\]](#)
77. Toyoda, T.; Cho, Y.-M.; Akagi, J.-I.; Mizuta, Y.; Matsushita, K.; Nishikawa, A.; Imaida, K.; Ogawa, K. A 13-Week Subchronic Toxicity Study of Acetaminophen Using an Obese Rat Model. *J. Toxicol. Sci.* **2018**, *43*, 423–433. [\[CrossRef\]](#)
78. Kondo, K.; Yamada, N.; Suzuki, Y.; Hashimoto, T.; Toyoda, K.; Takahashi, T.; Kobayashi, A.; Sugai, S.; Yoshinari, K. Enhancement of Acetaminophen-Induced Chronic Hepatotoxicity in Spontaneously Diabetic Torii (SDT) Rats. *J. Toxicol. Sci.* **2020**, *45*, 245–260. [\[CrossRef\]](#)
79. Arconzo, M.; Piccinin, E.; Moschetta, A. Increased Risk of Acute Liver Failure by Pain Killer Drugs in NAFLD: Focus on Nuclear Receptors and Their Coactivators. *Dig. Liver Dis.* **2021**, *53*, 26–34. [\[CrossRef\]](#)
80. Chalasani, N.; Gorski, J.C.; Asghar, M.S.; Asghar, A.; Foresman, B.; Hall, S.D.; Crabb, D.W. Hepatic Cytochrome P450 2E1 Activity in Nondiabetic Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology* **2003**, *37*, 544–550. [\[CrossRef\]](#)
81. Chtioui, H.; Semela, D.; Ledermann, M.; Zimmermann, A.; Dufour, J.-F. Expression and Activity of the Cytochrome P450 2E1 in Patients with Nonalcoholic Steatosis and Steatohepatitis. *Liver Int.* **2007**, *27*, 764–771. [\[CrossRef\]](#)
82. Aubert, J.; Begriche, K.; Knockaert, L.; Robin, M.A.; Fromenty, B. Increased Expression of Cytochrome P450 2E1 in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Mechanisms and Pathophysiological Role. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* **2011**, *35*, 630–637. [\[CrossRef\]](#)
83. Brill, M.J.E.; Diepstraten, J.; van Rongen, A.; van Kralingen, S.; van den Anker, J.N.; Knibbe, C.A.J. Impact of Obesity on Drug Metabolism and Elimination in Adults and Children. *Clin. Pharm.* **2012**, *51*, 277–304. [\[CrossRef\]](#)
84. Aljomah, G.; Baker, S.S.; Liu, W.; Kozielski, R.; Oluwole, J.; Lupu, B.; Baker, R.D.; Zhu, L. Induction of CYP2E1 in Non-Alcoholic Fatty Liver Diseases. *Exp. Mol. Pathol.* **2015**, *99*, 677–681. [\[CrossRef\]](#)
85. Gade, C.; Dalhoff, K.; Petersen, T.S.; Riis, T.; Schmeltz, C.; Chabanova, E.; Christensen, H.R.; Mikus, G.; Burhenne, J.; Holm, J.C.; et al. Higher Chlorzoxazone Clearance in Obese Children Compared with Nonobese Peers. *Br. J. Clin. Pharm.* **2018**, *84*, 1738–1747. [\[CrossRef\]](#)
86. Raucy, J.L.; Lasker, J.M.; Kraner, J.C.; Salazar, D.E.; Lieber, C.S.; Corcoran, G.B. Induction of Cytochrome P450IIE1 in the Obese Overfed Rat. *Mol. Pharm.* **1991**, *39*, 275–280.
87. Baumgardner, J.N.; Shankar, K.; Hennings, L.; Badger, T.M.; Ronis, M.J.J. A New Model for Nonalcoholic Steatohepatitis in the Rat Utilizing Total Enteral Nutrition to Overfeed a High-Polyunsaturated Fat Diet. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2008**, *294*, G27–G38. [\[CrossRef\]](#)
88. Begriche, K.; Lett eron, P.; Abbey-Toby, A.; Vadrot, N.; Robin, M.-A.; Bado, A.; Pessayre, D.; Fromenty, B. Partial Leptin Deficiency Favors Diet-Induced Obesity and Related Metabolic Disorders in Mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2008**, *294*, E939–E951. [\[CrossRef\]](#)
89. Abdelmegeed, M.A.; Banerjee, A.; Yoo, S.-H.; Jang, S.; Gonzalez, F.J.; Song, B.-J. Critical Role of Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in the Development of High Fat-Induced Non-Alcoholic Steatohepatitis. *J. Hepatol.* **2012**, *57*, 860–866. [\[CrossRef\]](#)
90. Lai, Y.-S.; Lee, W.-C.; Lin, Y.-E.; Ho, C.-T.; Lu, K.-H.; Lin, S.-H.; Panyod, S.; Chu, Y.-L.; Sheen, L.-Y. Ginger Essential Oil Ameliorates Hepatic Injury and Lipid Accumulation in High Fat Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 2062–2071. [\[CrossRef\]](#)
91. Liu, W.; Shang, J.; Deng, Y.; Han, X.; Chen, Y.; Wang, S.; Yang, R.; Dong, F.; Shang, H. Network Pharmacology Analysis on Mechanism of Jian Pi Qing Gan Yin Decoction Ameliorating High Fat Diet-Induced Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Validated in Vivo. *J. Ethnopharmacol.* **2022**, *295*, 115382. [\[CrossRef\]](#)
92. Seth, R.K.; Das, S.; Pourhoseini, S.; Dattaroy, D.; Igwe, S.; Ray, J.B.; Fan, D.; Michelotti, G.A.; Diehl, A.M.; Chatterjee, S. M1 Polarization Bias and Subsequent Nonalcoholic Steatohepatitis Progression Is Attenuated by Nitric Oxide Donor DETA NONOate via Inhibition of CYP2E1-Induced Oxidative Stress in Obese Mice. *J. Pharm. Exp. Ther.* **2015**, *352*, 77–89. [\[CrossRef\]](#)
93. Correia, M.A.; Kwon, D. Why Hepatic CYP2E1-Elevation by Itself Is Insufficient for Inciting NAFLD/NASH: Inferences from Two Genetic Knockout Mouse Models. *Biology* **2020**, *9*, 419. [\[CrossRef\]](#)
94. Leclercq, I.A.; Farrell, G.C.; Field, J.; Bell, D.R.; Gonzalez, F.J.; Robertson, G.R. CYP2E1 and CYP4A as Microsomal Catalysts of Lipid Peroxides in Murine Nonalcoholic Steatohepatitis. *J. Clin. Invest.* **2000**, *105*, 1067–1075. [\[CrossRef\]](#)
95. Abdelmegeed, M.A.; Choi, Y.; Godlewski, G.; Ha, S.-K.; Banerjee, A.; Jang, S.; Song, B.-J. Cytochrome P450-2E1 Promotes Fast Food-Mediated Hepatic Fibrosis. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 39764. [\[CrossRef\]](#)
96. Leung, T.-M.; Nieto, N. CYP2E1 and Oxidant Stress in Alcoholic and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *J. Hepatol.* **2013**, *58*, 395–398. [\[CrossRef\]](#)
97. Wang, K.; Tan, W.; Liu, X.; Deng, L.; Huang, L.; Wang, X.; Gao, X. New Insight and Potential Therapy for NAFLD: CYP2E1 and Flavonoids. *Biomed. Pharm.* **2021**, *137*, 111326. [\[CrossRef\]](#)
98. Raucy, J.L.; Lasker, J.; Ozaki, K.; Zoleta, V. Regulation of CYP2E1 by Ethanol and Palmitic Acid and CYP4A11 by Clofibrate in Primary Cultures of Human Hepatocytes. *Toxicol. Sci.* **2004**, *79*, 233–241. [\[CrossRef\]](#)
99. Zhou, Z.; Qi, J.; Lim, C.W.; Kim, J.-W.; Kim, B. Dual TBK1/IKK  Inhibitor Amlexanox Mitigates Palmitic Acid-Induced Hepatotoxicity and Lipopapoptosis in Vitro. *Toxicology* **2020**, *444*, 152579. [\[CrossRef\]](#)

100. Achterbergh, R.; Lammers, L.A.; Klumpen, H.-J.; Mathôt, R.A.A.; Romijn, J.A. Short-Term High-Fat Diet Alters Acetaminophen Metabolism in Healthy Individuals. *Ther. Drug Monit.* **2022**, *44*, 797–804. [\[CrossRef\]](#)
101. Videla, L.A.; Rodrigo, R.; Orellana, M.; Fernandez, V.; Tapia, G.; Quiñones, L.; Varela, N.; Contreras, J.; Lazarte, R.; Csendes, A.; et al. Oxidative Stress-Related Parameters in the Liver of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Patients. *Clin. Sci.* **2004**, *106*, 261–268. [\[CrossRef\]](#)
102. Hardwick, R.N.; Fisher, C.D.; Canet, M.J.; Lake, A.D.; Cherrington, N.J. Diversity in Antioxidant Response Enzymes in Progressive Stages of Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Drug Metab. Dispos.* **2010**, *38*, 2293–2301. [\[CrossRef\]](#)
103. Lin, Z.; Cai, F.; Lin, N.; Ye, J.; Zheng, Q.; Ding, G. Effects of Glutamine on Oxidative Stress and Nuclear Factor-KB Expression in the Livers of Rats with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Exp. Ther. Med.* **2014**, *7*, 365–370. [\[CrossRef\]](#)
104. Wang, G.; Wu, B.; Zhang, L.; Jin, X.; Wang, K.; Xu, W.; Zhang, B.; Wang, H. The Protective Effects of Trelagliptin on High-Fat Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2021**, *35*, e22696. [\[CrossRef\]](#)
105. Li, L.; Zhang, G.-F.; Lee, K.; Lopez, R.; Previs, S.F.; Willard, B.; McCullough, A.; Kasumov, T. A Western Diet Induced NAFLD in LDLR(-/-) Mice Is Associated with Reduced Hepatic Glutathione Synthesis. *Free Radic. Biol. Med.* **2016**, *96*, 13–21. [\[CrossRef\]](#)
106. Staňková, P.; Kučera, O.; Peterová, E.; Lotková, H.; Maseko, T.E.; Nožičková, K.; Červinková, Z. Adaptation of Mitochondrial Substrate Flux in a Mouse Model of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1101. [\[CrossRef\]](#)
107. Smirne, C.; Croce, E.; Di Benedetto, D.; Cantaluppi, V.; Comi, C.; Sainaghi, P.P.; Minisini, R.; Grossini, E.; Pirisi, M. Oxidative Stress in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Livers* **2022**, *2*, 30–76. [\[CrossRef\]](#)
108. Fromenty, B.; Roden, M. Mitochondrial Alterations in Fatty Liver Diseases. *J. Hepatol.* **2022**, Oct 7, 22, S0168–S8278. [\[CrossRef\]](#)
109. Liu, Y.; Chen, Y.; Xie, X.; Yin, A.; Yin, Y.; Liu, Y.; Dong, L.; Zhu, Z.; Zhou, J.; Zeng, Q.; et al. Gender Difference on the Effect of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Acetaminophen-Induced Acute Liver Failure. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2020**, *2020*, 8096847. [\[CrossRef\]](#)
110. Liu, Y.; Lin, J.; Chen, Y.; Li, Z.; Zhou, J.; Lu, X.; Chen, Z.; Zuo, D. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Inhibit IL-11/STAT3 Signaling in Hepatocytes during Acetaminophen Hepatotoxicity. *Int. J. Mol. Med.* **2021**, *48*, 190. [\[CrossRef\]](#)
111. Teratani, T.; Tomita, K.; Suzuki, T.; Furuhashi, H.; Irie, R.; Hida, S.; Okada, Y.; Kurihara, C.; Ebinuma, H.; Nakamoto, N.; et al. Free Cholesterol Accumulation in Liver Sinusoidal Endothelial Cells Exacerbates Acetaminophen Hepatotoxicity via TLR9 Signaling. *J. Hepatol.* **2017**, *67*, 780–790. [\[CrossRef\]](#)
112. Marí, M.; Caballero, F.; Colell, A.; Morales, A.; Caballeria, J.; Fernandez, A.; Enrich, C.; Fernandez-Checa, J.C.; García-Ruiz, C. Mitochondrial Free Cholesterol Loading Sensitizes to TNF- and Fas-Mediated Steatohepatitis. *Cell Metab.* **2006**, *4*, 185–198. [\[CrossRef\]](#)
113. Ribas, V.; García-Ruiz, C.; Fernández-Checa, J.C. Glutathione and Mitochondria. *Front. Pharm.* **2014**, *5*, 151. [\[CrossRef\]](#)
114. Xu, Y.; Lu, J.; Guo, Y.; Zhang, Y.; Liu, J.; Huang, S.; Zhang, Y.; Gao, L.; Wang, X. Hypercholesterolemia Reduces the Expression and Function of Hepatic Drug Metabolizing Enzymes and Transporters in Rats. *Toxicol. Lett.* **2022**, *364*, 1–11. [\[CrossRef\]](#)
115. Karkucinska-Wieckowska, A.; Simoes, I.C.M.; Kalinowski, P.; Lebiecinska-Arciszewska, M.; Zieniewicz, K.; Milkiewicz, P.; Górska-Ponikowska, M.; Pinton, P.; Malik, A.N.; Krawczyk, M.; et al. Mitochondria, Oxidative Stress and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Complex Relationship. *Eur. J. Clin. Invest.* **2022**, *52*, e13622. [\[CrossRef\]](#)
116. Pérez-Carreras, M.; Del Hoyo, P.; Martín, M.A.; Rubio, J.C.; Martín, A.; Castellano, G.; Colina, F.; Arenas, J.; Solis-Herruzo, J.A. Defective Hepatic Mitochondrial Respiratory Chain in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology* **2003**, *38*, 999–1007. [\[CrossRef\]](#)
117. Koliaki, C.; Szendroedi, J.; Kaul, K.; Jelenik, T.; Nowotny, P.; Jankowiak, F.; Herder, C.; Carstensen, M.; Krausch, M.; Knoefel, W.T.; et al. Adaptation of Hepatic Mitochondrial Function in Humans with Non-Alcoholic Fatty Liver Is Lost in Steatohepatitis. *Cell Metab.* **2015**, *21*, 739–746. [\[CrossRef\]](#)
118. Ramsay, R.R.; Rashed, M.S.; Nelson, S.D. In Vitro Effects of Acetaminophen Metabolites and Analogs on the Respiration of Mouse Liver Mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **1989**, *273*, 449–457. [\[CrossRef\]](#)
119. Chrøis, K.M.; Larsen, S.; Pedersen, J.S.; Rygg, M.O.; Boilsen, A.E.B.; Bendtsen, F.; Dela, F. Acetaminophen Toxicity Induces Mitochondrial Complex I Inhibition in Human Liver Tissue. *Basic Clin. Pharm. Toxicol.* **2020**, *126*, 86–91. [\[CrossRef\]](#)
120. Fromenty, B. Alteration of Mitochondrial DNA Homeostasis in Drug-Induced Liver Injury. *Food Chem. Toxicol.* **2020**, *135*, 110916. [\[CrossRef\]](#)
121. Farrell, G.; Schattenberg, J.M.; Leclercq, I.; Yeh, M.M.; Goldin, R.; Teoh, N.; Schuppan, D. Mouse Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: Toward Optimization of Their Relevance to Human Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology* **2019**, *69*, 2241–2257. [\[CrossRef\]](#)
122. Schuster, S.; Cabrera, D.; Arrese, M.; Feldstein, A.E. Triggering and Resolution of Inflammation in NASH. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2018**, *15*, 349–364. [\[CrossRef\]](#)
123. Kazankov, K.; Jørgensen, S.M.D.; Thomsen, K.L.; Møller, H.J.; Vilstrup, H.; George, J.; Schuppan, D.; Grønbaek, H. The Role of Macrophages in Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2019**, *16*, 145–159. [\[CrossRef\]](#)
124. Schneider, K.M.; Elfers, C.; Ghallab, A.; Schneider, C.V.; Galvez, E.J.C.; Mohs, A.; Gui, W.; Candels, L.S.; Wirtz, T.H.; Zuehlke, S.; et al. Intestinal Dysbiosis Amplifies Acetaminophen-Induced Acute Liver Injury. *Cell Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **2021**, *11*, 909–933. [\[CrossRef\]](#)

125. Levy, M.; Shapiro, H.; Thaiss, C.A.; Elinav, E. NLRP6: A Multifaceted Innate Immune Sensor. *Trends Immunol.* **2017**, *38*, 248–260. [\[CrossRef\]](#)
126. Aron-Wisniewsky, J.; Vigliotti, C.; Witjes, J.; Le, P.; Holleboom, A.G.; Verheij, J.; Nieuwdorp, M.; Clément, K. Gut Microbiota and Human NAFLD: Disentangling Microbial Signatures from Metabolic Disorders. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2020**, *17*, 279–297. [\[CrossRef\]](#)
127. Breton, J.; Galmiche, M.; Déchelotte, P. Dysbiotic Gut Bacteria in Obesity: An Overview of the Metabolic Mechanisms and Therapeutic Perspectives of Next-Generation Probiotics. *Microorganisms* **2022**, *10*, 452. [\[CrossRef\]](#)
128. Sneed, R.A.; Grimes, S.D.; Schultze, A.E.; Brown, A.P.; Ganey, P.E. Bacterial Endotoxin Enhances the Hepatotoxicity of Allyl Alcohol. *Toxicol. Appl. Pharm.* **1997**, *144*, 77–87. [\[CrossRef\]](#)
129. Shaw, P.J.; Ganey, P.E.; Roth, R.A. Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury and the Role of Inflammatory Stress with an Emphasis on an Animal Model of Trovafloxacin Hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.* **2010**, *118*, 7–18. [\[CrossRef\]](#)
130. Wu, W.; Zhao, L.; Yang, P.; Zhou, W.; Li, B.; Moorhead, J.F.; Varghese, Z.; Ruan, X.Z.; Chen, Y. Inflammatory Stress Sensitizes the Liver to Atorvastatin-Induced Injury in ApoE^{-/-} Mice. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0159512. [\[CrossRef\]](#)
131. Lee, W.H.; Kramer, W.G.; Granville, G.E. The Effect of Obesity on Acetaminophen Pharmacokinetics in Man. *J. Clin. Pharm.* **1981**, *21*, 284–287. [\[CrossRef\]](#)
132. Abernethy, D.R.; Divoll, M.; Greenblatt, D.J.; Ameer, B. Obesity, Sex, and Acetaminophen Disposition. *Clin. Pharm. Ther.* **1982**, *31*, 783–790. [\[CrossRef\]](#)
133. Emery, M.G.; Fisher, J.M.; Chien, J.Y.; Kharasch, E.D.; Dellinger, E.P.; Kowdley, K.V.; Thummel, K.E. CYP2E1 Activity before and after Weight Loss in Morbidly Obese Subjects with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology* **2003**, *38*, 428–435. [\[CrossRef\]](#)
134. Leclercq, I.A.; Field, J.; Enriquez, A.; Farrell, G.C.; Robertson, G.R. Constitutive and Inducible Expression of Hepatic CYP2E1 in Leptin-Deficient Ob/Ob Mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *268*, 337–344. [\[CrossRef\]](#)
135. Abdel-Razzak, Z.; Loyer, P.; Fautrel, A.; Gautier, J.C.; Corcos, L.; Turlin, B.; Beaune, P.; Guillouzo, A. Cytokines Down-Regulate Expression of Major Cytochrome P-450 Enzymes in Adult Human Hepatocytes in Primary Culture. *Mol. Pharm.* **1993**, *44*, 707–715.
136. Wang, J.; Hu, Y.; Nekvindova, J.; Ingelman-Sundberg, M.; Neve, E.P.A. IL-4-Mediated Transcriptional Regulation of Human CYP2E1 by Two Independent Signaling Pathways. *Biochem. Pharm.* **2010**, *80*, 1592–1600. [\[CrossRef\]](#)
137. Lin, Q.; Kang, X.; Li, X.; Wang, T.; Liu, F.; Jia, J.; Jin, Z.; Xue, Y. NF- κ B-Mediated Regulation of Rat CYP2E1 by Two Independent Signaling Pathways. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0225531. [\[CrossRef\]](#)
138. Drozdziak, M.; Lapczuk-Romanska, J.; Wenzel, C.; Szelag-Pieniek, S.; Post, M.; Skalski, Ł.; Kurzawski, M.; Oswald, S. Gene Expression and Protein Abundance of Hepatic Drug Metabolizing Enzymes in Liver Pathology. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1334. [\[CrossRef\]](#)
139. Nakai, K.; Tanaka, H.; Hanada, K.; Ogata, H.; Suzuki, F.; Kumada, H.; Miyajima, A.; Ishida, S.; Sunouchi, M.; Habano, W.; et al. Decreased Expression of Cytochromes P450 1A2, 2E1, and 3A4 and Drug Transporters Na⁺-Taurocholate-Cotransporting Polypeptide, Organic Cation Transporter 1, and Organic Anion-Transporting Peptide-C Correlates with the Progression of Liver Fibrosis in Chronic Hepatitis C Patients. *Drug Metab. Dispos.* **2008**, *36*, 1786–1793. [\[CrossRef\]](#)
140. Müller, G.F.; Döhr, O.; El-Bahay, C.; Kahl, R.; Abel, J. Effect of Transforming Growth Factor- β 1 on Cytochrome P450 Expression: Inhibition of CYP1 mRNA and Protein Expression in Primary Rat Hepatocytes. *Arch. Toxicol.* **2000**, *74*, 145–152. [\[CrossRef\]](#)
141. Ciuculan, L.; Ehnert, S.; Ilkavets, I.; Weng, H.-L.; Gaitantzi, H.; Tsukamoto, H.; Ueberham, E.; Meindl-Beinker, N.M.; Singer, M.V.; Breitkopf, K.; et al. TGF- β Enhances Alcohol Dependent Hepatocyte Damage via down-Regulation of Alcohol Dehydrogenase I. *J. Hepatol.* **2010**, *52*, 407–416. [\[CrossRef\]](#)
142. Kolwankar, D.; Vuppalanchi, R.; Ethell, B.; Jones, D.R.; Wrighton, S.A.; Hall, S.D.; Chalasani, N. Association between Nonalcoholic Hepatic Steatosis and Hepatic Cytochrome P-450 3A Activity. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2007**, *5*, 388–393. [\[CrossRef\]](#)
143. Chiba, T.; Noji, K.; Shinozaki, S.; Suzuki, S.; Umegaki, K.; Shimokado, K. Diet-Induced Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Affects Expression of Major Cytochrome P450 Genes in a Mouse Model. *J. Pharm. Pharm.* **2016**, *68*, 1567–1576. [\[CrossRef\]](#)
144. Woolsey, S.J.; Mansell, S.E.; Kim, R.B.; Tirona, R.G.; Beaton, M.D. CYP3A Activity and Expression in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Drug Metab. Dispos.* **2015**, *43*, 1484–1490. [\[CrossRef\]](#)
145. Cobbina, E.; Akhlaghi, F. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)—Pathogenesis, Classification, and Effect on Drug Metabolizing Enzymes and Transporters. *Drug Metab. Rev.* **2017**, *49*, 197–211. [\[CrossRef\]](#)
146. Jamwal, R.; de la Monte, S.M.; Ogasawara, K.; Adusumalli, S.; Barlock, B.B.; Akhlaghi, F. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Diabetes Are Associated with Decreased CYP3A4 Protein Expression and Activity in Human Liver. *Mol. Pharm.* **2018**, *15*, 2621–2632. [\[CrossRef\]](#)
147. Smit, C.; De Hoogd, S.; Brüggemann, R.J.M.; Knibbe, C.A.J. Obesity and Drug Pharmacology: A Review of the Influence of Obesity on Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Parameters. *Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2018**, *14*, 275–285. [\[CrossRef\]](#)
148. Zeng, H.; Lin, Y.; Gong, J.; Lin, S.; Gao, J.; Li, C.; Feng, Z.; Zhang, H.; Zhang, J.; Li, Y.; et al. CYP3A Suppression during Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease Is Independent of PXR Regulation. *Chem. Biol. Interact.* **2019**, *308*, 185–193. [\[CrossRef\]](#)
149. Krogstad, V.; Peric, A.; Robertsen, I.; Kringen, M.K.; Vistnes, M.; Hjelmæsæth, J.; Sandbu, R.; Johnson, L.K.; Angeles, P.C.; Jansson-Löfmark, R.; et al. Correlation of Body Weight and Composition With Hepatic Activities of Cytochrome P450 Enzymes. *J. Pharm. Sci.* **2021**, *110*, 432–437. [\[CrossRef\]](#)

150. Wiese, M.D.; Meakin, A.S.; Varcoe, T.J.; Darby, J.R.T.; Sarr, O.; Kiser, P.; Bradshaw, E.L.; Regnault, T.R.H.; Morrison, J.L. Hepatic Cytochrome P450 Function Is Reduced by Life-Long Western Diet Consumption in Guinea Pig Independent of Birth Weight. *Life Sci.* **2021**, *287*, 120133. [\[CrossRef\]](#)
151. Fisher, C.D.; Lickteig, A.J.; Augustine, L.M.; Ranger-Moore, J.; Jackson, J.P.; Ferguson, S.S.; Cherrington, N.J. Hepatic Cytochrome P450 Enzyme Alterations in Humans with Progressive Stages of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Drug Metab. Dispos.* **2009**, *37*, 2087–2094. [\[CrossRef\]](#)
152. Lake, A.D.; Novak, P.; Fisher, C.D.; Jackson, J.P.; Hardwick, R.N.; Billheimer, D.D.; Klimecki, W.T.; Cherrington, N.J. Analysis of Global and Absorption, Distribution, Metabolism, and Elimination Gene Expression in the Progressive Stages of Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Drug Metab. Dispos.* **2011**, *39*, 1954–1960. [\[CrossRef\]](#)
153. Li, H.; Clarke, J.D.; Dzierlenga, A.L.; Bear, J.; Goedken, M.J.; Cherrington, N.J. In Vivo Cytochrome P450 Activity Alterations in Diabetic Nonalcoholic Steatohepatitis Mice. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2017**, *31*, e21840. [\[CrossRef\]](#)
154. Hou, C.; Feng, W.; Wei, S.; Wang, Y.; Xu, X.; Wei, J.; Ma, Z.; Du, Y.; Guo, J.; He, Y.; et al. Bioinformatics Analysis of Key Differentially Expressed Genes in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Mice Models. *Gene Expr.* **2018**, *19*, 25–35. [\[CrossRef\]](#)
155. Gabbia, D.; Roverso, M.; Guido, M.; Sacchi, D.; Scaffidi, M.; Carrara, M.; Orso, G.; Russo, F.P.; Floreani, A.; Bogialli, S.; et al. Western Diet-Induced Metabolic Alterations Affect Circulating Markers of Liver Function before the Development of Steatosis. *Nutrients* **2019**, *11*, 1602. [\[CrossRef\]](#)
156. Al Nebaihi, H.M.; Al Batran, R.; Ussher, J.R.; Maayah, Z.H.; El-Kadi, A.O.S.; Brocks, D.R. Dietary-Induced Obesity, Hepatic Cytochrome P450, and Lidocaine Metabolism: Comparative Effects of High-Fat Diets in Mice and Rats and Reversibility of Effects With Normalization of Diet. *J. Pharm. Sci.* **2020**, *109*, 1199–1210. [\[CrossRef\]](#)
157. Wu, J.; Lou, Y.-G.; Yang, X.; Wang, R.; Zhang, R.; Aa, J.-Y.; Wang, G.-J.; Xie, Y. Silybin Regulates P450s Activity by Attenuating Endoplasmic Reticulum Stress in Mouse Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Acta Pharm. Sin.* **2022**, *44*, 133–144. [\[CrossRef\]](#)
158. Xiang, L.; Jiao, Y.; Qian, Y.; Li, Y.; Mao, F.; Lu, Y. Comparison of Hepatic Gene Expression Profiles between Three Mouse Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Genes Dis.* **2022**, *9*, 201–215. [\[CrossRef\]](#)
159. Wahlang, B.; Song, M.; Beier, J.I.; Cameron Falkner, K.; Al-Eryani, L.; Clair, H.B.; Prough, R.A.; Osborne, T.S.; Malarkey, D.E.; States, J.C.; et al. Evaluation of Aroclor 1260 Exposure in a Mouse Model of Diet-Induced Obesity and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Toxicol. Appl. Pharm.* **2014**, *279*, 380–390. [\[CrossRef\]](#)
160. Abernethy, D.R.; Greenblatt, D.J.; Divoll, M.; Shader, R.I. Enhanced Glucuronide Conjugation of Drugs in Obesity: Studies of Lorazepam, Oxazepam, and Acetaminophen. *J. Lab. Clin. Med.* **1983**, *101*, 873–880.
161. Barshop, N.J.; Capparelli, E.V.; Sirlin, C.B.; Schwimmer, J.B.; Lavine, J.E. Acetaminophen Pharmacokinetics in Children with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2011**, *52*, 198–202. [\[CrossRef\]](#)
162. Mazaleuskaya, L.L.; Sangkuhl, K.; Thorn, C.F.; FitzGerald, G.A.; Altman, R.B.; Klein, T.E. PharmGKB Summary: Pathways of Acetaminophen Metabolism at the Therapeutic versus Toxic Doses. *Pharm. Genom.* **2015**, *25*, 416–426. [\[CrossRef\]](#)
163. Hardwick, R.N.; Ferreira, D.W.; More, V.R.; Lake, A.D.; Lu, Z.; Manautou, J.E.; Slitt, A.L.; Cherrington, N.J. Altered UDP-Glucuronosyltransferase and Sulfotransferase Expression and Function during Progressive Stages of Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Drug Metab. Dispos.* **2013**, *41*, 554–561. [\[CrossRef\]](#)
164. Feng, R.; Wang, Y.; Liu, C.; Yan, C.; Zhang, H.; Su, H.; Kang, J.X.; Shang, C.-Z.; Wan, J.-B. Acetaminophen-Induced Liver Injury Is Attenuated in Transgenic Fat-1 Mice Endogenously Synthesizing Long-Chain n-3 Fatty Acids. *Biochem. Pharm.* **2018**, *154*, 75–88. [\[CrossRef\]](#)
165. Eraky, S.M.; Abo El-Magd, N.F. Omega-3 Fatty Acids Protect against Acetaminophen-Induced Hepatic and Renal Toxicity in Rats through HO-1-Nrf2-BACH1 Pathway. *Arch. Biochem. Biophys.* **2020**, *687*, 108387. [\[CrossRef\]](#)
166. Speck, R.F.; Lauterburg, B.H. Fish Oil Protects Mice against Acetaminophen Hepatotoxicity in Vivo. *Hepatology* **1991**, *13*, 557–561. [\[CrossRef\]](#)
167. Maksymchuk, O.; Shysh, A.; Stroy, D. Treatment with Omega-3 PUFAs Does Not Increase the Risk of CYP2E1-Dependent Oxidative Stress and Diabetic Liver Pathology. *Front. Endocrinol.* **2022**, *13*, 1004564. [\[CrossRef\]](#)
168. Jain, P.; Hejjaji, V.; Thomas, M.B.; Garcia, R.A.; Kennedy, K.F.; Goyal, A.; Sperling, L.; Das, S.R.; Hafida, S.; Enriquez, J.R.; et al. Use of Primary Bariatric Surgery among Patients with Obesity and Diabetes. Insights from the Diabetes Collaborative Registry. *Int. J. Obes.* **2022**, *46*, 2163–2167. [\[CrossRef\]](#)
169. Zhou, H.; Luo, P.; Li, P.; Wang, G.; Yi, X.; Fu, Z.; Sun, X.; Cui, B.; Zhu, L.; Zhu, S. Bariatric Surgery Improves Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Systematic Review and Meta-Analysis. *Obes. Surg.* **2022**, *32*, 1872–1883. [\[CrossRef\]](#)
170. Holt, E.W.; DeMartini, S.; Davern, T.J. Acute Liver Failure Due to Acetaminophen Poisoning in Patients With Prior Weight Loss Surgery: A Case Series. *J. Clin. Gastroenterol.* **2015**, *49*, 790–793. [\[CrossRef\]](#)
171. Abusabeib, A.; El Ansari, W.; Alobaidan, J.; Elhag, W. First Case Report of Fulminant Hepatitis After Laparoscopic Sleeve Gastrectomy Associated with Concomitant Maximal Therapeutic Dose of Acetaminophen Use, Protein Calorie Malnutrition, and Vitamins A and D, Selenium, and Glutathione Deficiencies. *Obes. Surg.* **2021**, *31*, 899–903. [\[CrossRef\]](#)
172. Puris, E.; Pasanen, M.; Ranta, V.-P.; Gynther, M.; Petsalo, A.; Käkälä, P.; Männistö, V.; Pihlajamäki, J. Laparoscopic Roux-En-Y Gastric Bypass Surgery Influenced Pharmacokinetics of Several Drugs given as a Cocktail with the Highest Impact Observed for CYP1A2, CYP2C8 and CYP2E1 Substrates. *Basic. Clin. Pharm. Toxicol.* **2019**, *125*, 123–132. [\[CrossRef\]](#)

173. Porat, D.; Markovic, M.; Zur, M.; Fine-Shamir, N.; Azran, C.; Shaked, G.; Czeiger, D.; Vaynshtein, J.; Replyanski, I.; Sebbag, G.; et al. Increased Paracetamol Bioavailability after Sleeve Gastrectomy: A Crossover Pre- vs. Post-Operative Clinical Trial. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 1949. [\[CrossRef\]](#)
174. Chen, K.-F.; Chan, L.-N.; Senn, T.D.; Oelschlager, B.K.; Flum, D.R.; Shen, D.D.; Horn, J.R.; Lin, Y.S. The Impact of Proximal Roux-En-Y Gastric Bypass Surgery on Acetaminophen Absorption and Metabolism. *Pharmacotherapy* **2020**, *40*, 191–203. [\[CrossRef\]](#)
175. Katsarou, A.; Gudbjörnsdóttir, S.; Rawshani, A.; Dabelea, D.; Bonifacio, E.; Anderson, B.J.; Jacobsen, L.M.; Schatz, D.A.; Lernmark, Å. Type 1 Diabetes Mellitus. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2017**, *3*, 17016. [\[CrossRef\]](#)
176. Zaccardi, F.; Webb, D.R.; Yates, T.; Davies, M.J. Pathophysiology of Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus: A 90-Year Perspective. *Postgrad. Med. J.* **2016**, *92*, 63–69. [\[CrossRef\]](#)
177. Eizirik, D.L.; Pasquali, L.; Cnop, M. Pancreatic β -Cells in Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus: Different Pathways to Failure. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2020**, *16*, 349–362. [\[CrossRef\]](#)
178. de Vries, M.; Westerink, J.; Kaasjager, K.H.A.H.; de Valk, H.W. Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) in Patients With Type 1 Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2020**, *105*, 3842–3853. [\[CrossRef\]](#)
179. Mertens, J.; De Block, C.; Spinhoven, M.; Driessen, A.; Francque, S.M.; Kwanten, W.J. Hepatopathy Associated With Type 1 Diabetes: Distinguishing Non-Alcoholic Fatty Liver Disease From Glycogenic Hepatopathy. *Front. Pharm.* **2021**, *12*, 768576. [\[CrossRef\]](#)
180. El-Serag, H.B.; Everhart, J.E. Diabetes Increases the Risk of Acute Hepatic Failure. *Gastroenterology* **2002**, *122*, 1822–1828. [\[CrossRef\]](#)
181. Chalasani, N.; Fontana, R.J.; Bonkovsky, H.L.; Watkins, P.B.; Davern, T.; Serrano, J.; Yang, H.; Rochon, J. Drug Induced Liver Injury Network (DILIN) Causes, Clinical Features, and Outcomes from a Prospective Study of Drug-Induced Liver Injury in the United States. *Gastroenterology* **2008**, *135*, 1924–1934, 1934.e1–4. [\[CrossRef\]](#)
182. Lu, R.-J.; Zhang, Y.; Tang, F.-L.; Zheng, Z.-W.; Fan, Z.-D.; Zhu, S.-M.; Qian, X.-F.; Liu, N.-N. Clinical Characteristics of Drug-Induced Liver Injury and Related Risk Factors. *Exp. Ther. Med.* **2016**, *12*, 2606–2616. [\[CrossRef\]](#)
183. Deeds, M.C.; Anderson, J.M.; Armstrong, A.S.; Gastineau, D.A.; Hiddinga, H.J.; Jahangir, A.; Eberhardt, N.L.; Kudva, Y.C. Single Dose Streptozotocin-Induced Diabetes: Considerations for Study Design in Islet Transplantation Models. *Lab. Anim.* **2011**, *45*, 131–140. [\[CrossRef\]](#)
184. Wang, Q.; Wei, S.; Zhou, H.; Shen, G.; Gan, X.; Zhou, S.; Qiu, J.; Shi, C.; Lu, L. Hyperglycemia Exacerbates Acetaminophen-Induced Acute Liver Injury by Promoting Liver-Resident Macrophage Proinflammatory Response via AMPK/PI3K/AKT-Mediated Oxidative Stress. *Cell Death Discov.* **2019**, *5*, 119. [\[CrossRef\]](#)
185. Wu, D.; Cederbaum, A.I. Combined Effects of Streptozotocin-Induced Diabetes plus 4-Methylpyrazole Treatment on Rat Liver Cytochrome P450E1. *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *302*, 175–182. [\[CrossRef\]](#)
186. Raza, H.; Prabhu, S.K.; Robin, M.-A.; Avadhani, N.G. Elevated Mitochondrial Cytochrome P450 2E1 and Glutathione S-Transferase A4-4 in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats: Tissue-Specific Variations and Roles in Oxidative Stress. *Diabetes* **2004**, *53*, 185–194. [\[CrossRef\]](#)
187. Sindhu, R.K.; Koo, J.R.; Sindhu, K.K.; Ehdaie, A.; Farmand, F.; Roberts, C.K. Differential Regulation of Hepatic Cytochrome P450 Monooxygenases in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Free Radic. Res.* **2006**, *40*, 921–928. [\[CrossRef\]](#)
188. Maksymchuk, O.; Shysh, A.; Rosohatska, I.; Chashchyn, M. Quercetin Prevents Type 1 Diabetic Liver Damage through Inhibition of CYP2E1. *Pharmacol. Rep.* **2017**, *69*, 1386–1392. [\[CrossRef\]](#)
189. Price, V.F.; Jollow, D.J. Increased Resistance of Diabetic Rats to Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity. *J. Pharm. Exp. Ther.* **1982**, *220*, 504–513.
190. Shankar, K.; Vaidya, V.S.; Apte, U.M.; Manautou, J.E.; Ronis, M.J.J.; Bucci, T.J.; Mehendale, H.M. Type 1 Diabetic Mice Are Protected from Acetaminophen Hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.* **2003**, *73*, 220–234. [\[CrossRef\]](#)
191. Shankar, K.; Vaidya, V.S.; Corton, J.C.; Bucci, T.J.; Liu, J.; Waalkes, M.P.; Mehendale, H.M. Activation of PPAR-Alpha in Streptozotocin-Induced Diabetes Is Essential for Resistance against Acetaminophen Toxicity. *FASEB J.* **2003**, *17*, 1748–1750. [\[CrossRef\]](#)
192. Boyle, M.; Masson, S.; Anstee, Q.M. The Bidirectional Impacts of Alcohol Consumption and the Metabolic Syndrome: Cofactors for Progressive Fatty Liver Disease. *J. Hepatol.* **2018**, *68*, 251–267. [\[CrossRef\]](#)
193. Di Ciaula, A.; Bonfrate, L.; Krawczyk, M.; Frühbeck, G.; Portincasa, P. Synergistic and Detrimental Effects of Alcohol Intake on Progression of Liver Steatosis. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 2636. [\[CrossRef\]](#)
194. Massart, J.; Begriche, K.; Corlu, A.; Fromenty, B. Xenobiotic-Induced Aggravation of Metabolic-Associated Fatty Liver Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1062. [\[CrossRef\]](#)
195. Akakpo, J.Y.; Ramachandran, A.; Jaeschke, H. Novel strategies for the treatment of acetaminophen hepatotoxicity. *Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2020**, *16*, 1039–1050. [\[CrossRef\]](#)
196. Subramanya, S.B.; Venkataraman, B.; Meeran, M.F.N.; Goyal, S.N.; Patil, C.R.; Ojha, S. Therapeutic Potential of Plants and Plant Derived Phytochemicals against Acetaminophen-Induced Liver Injury. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3776. [\[CrossRef\]](#)
197. Jaeschke, H.; Adelusi, O.B.; Ramachandran, A. Ferroptosis and Acetaminophen Hepatotoxicity: Are We Going Down Another Rabbit Hole? *Gene Expr.* **2021**, *20*, 169–178. [\[CrossRef\]](#)
198. Liao, Y.; Yang, Y.; Wang, X.; Wei, M.; Guo, Q.; Zhao, L. Oroxyloside ameliorates acetaminophen-induced hepatotoxicity by inhibiting JNK related apoptosis and necroptosis. *J. Ethnopharmacol.* **2020**, *258*, 112917. [\[CrossRef\]](#)

199. Hwang, K.A.; Hwang, Y.; Hwang, H.J.; Park, N. Hepatoprotective Effects of Radish (*Raphanus sativus* L.) on Acetaminophen-Induced Liver Damage via Inhibiting Oxidative Stress and Apoptosis. *Nutrients* **2022**, *14*, 5082. [[CrossRef](#)]
200. Du, K.; Ramachandran, A.; McGill, M.R.; Mansouri, A.; Asselah, T.; Farhood, A.; Woolbright, B.L.; Ding, W.X.; Jaeschke, H. Induction of mitochondrial biogenesis protects against acetaminophen hepatotoxicity. *Food Chem. Toxicol.* **2017**, *108*, 339–350.

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

LISTE DES COMMUNICATIONS

POSTER

Journée recherche du campus santé, le 22 janvier 2020 à Rennes.

Role of fatty acids in hepatic cytochrome P450 2E1 induction: involvement in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) related to obesity.

Clémence PENHOAT, Cassandra RAYER, Matthieu FRANC, Bernard FROMENTY, Karima BEGRICHE.

COMMUNICATION ORALE ET POSTER

VIII^e colloque de Génomique Fonctionnelle du Foie (GFF, the Liver Week), du 26 au 28 février 2020 à Rennes.

Role of fatty acids in hepatic cytochrome P450 2E1 induction: involvement in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) related to obesity.

Clémence PENHOAT, Cassandra RAYER, Matthieu FRANC, Bernard FROMENTY, Karima BEGRICHE.

E-POSTER

Journées Francophones de Nutrition (live), du 25 au 27 novembre 2020 en distanciel.

Rôle des acides gras dans l'induction du cytochrome P450 2E1 hépatique : implication dans l'étiologie de la stéatohépatite non-alcoolique (NASH) liée à l'obésité.

Clémence PENHOAT, Julie MASSART, Grégory PINON, Bernard FROMENTY, Karima BEGRICHE.

COMMUNICATION ORALE

7^e rencontres NAM2S (Nutrition Alimentation, Métabolisme, Sport, Santé), le 07 décembre 2021 à Rennes.

Role of fatty acids in hepatic cytochrome P450 2E1 induction: involvement in fatty liver progression.

Clémence PENHOAT, Julie MASSART, Bernard FROMENTY, Karima BEGRICHE.

COMMUNICATION ORALE

Journées scientifiques de l'école doctorale biologie-santé (ED-BS), les 09 et 10 décembre 2021 à Brest.

Role of fatty acids in hepatic cytochrome P450 2E1 induction: involvement in fatty liver progression.

Clémence PENHOAT, Julie MASSART, Bernard FROMENTY, Karima BEGRICHE.

Prix de la meilleure communication orale.

E-POSTER

Journée recherche du campus santé, le 19 janvier 2022 en distanciel.

Role of fatty acids in hepatic cytochrome P450 2E1 induction: involvement in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) related to obesity and in acetaminophen toxicity.

Clémence PENHOAT, Julie MASSART, Bernard FROMENTY, Karima BEGRICHE.

E-POSTER

Journées Francophones de Nutrition, du 16 au 18 novembre 2022 à Toulouse.

Rôle des acides gras dans l'induction du cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) hépatique : implication dans l'étiologie de la stéatohépatite non-alcoolique (NASH) liée à l'obésité et dans l'hépatotoxicité du paracétamol.

Clémence PENHOAT, Julie MASSART, Bernard FROMENTY, Karima BEGRICHE.

COMMUNICATION ORALE ET POSTER

8^e rencontres NAM2S (Nutrition Alimentation, Métabolisme, Sport, Santé), le 29 novembre 2022 à Rennes.

Rôle des acides gras dans l'induction du cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) hépatique : implication dans l'étiologie de la stéatohépatite non-alcoolique (NASH) liée à l'obésité et dans l'hépatotoxicité du paracétamol.

Clémence PENHOAT, Julie MASSART, Bernard FROMENTY, Karima BEGRICHE.

POSTER

Journée recherche du campus santé, le 18 janvier 2023 à Rennes.

Role of fatty acids in hepatic cytochrome P450 2E1 induction: involvement in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) related to obesity and in acetaminophen toxicity.

Clémence PENHOAT, Julie MASSART, Bernard FROMENTY, Karima BEGRICHE.

Role of fatty acids in hepatic cytochrome P450 2 E1 induction: involvement in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) related to obesity.

Clémence PENHOAT¹, Cassandra RAYER¹, Matthieu FRANC¹, Bernard FROMENTY¹, Karima BEGRICHE¹

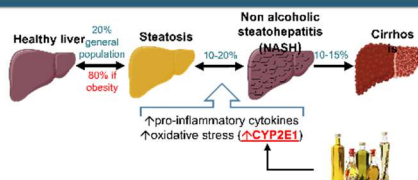
¹ University of Rennes 1 - NuMeCan Institute (INSERM U1241) – RENNES, France

INTRODUCTION

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), which encompasses a large spectrum of liver lesions, is a major health concern because of the high incidence of obesity. This is why numerous studies are still underway to better understand the pathophysiology of steatosis and non-alcoholic steatohepatitis (NASH) by seeking in particular mechanisms involved in the worsening of steatosis to NASH. Some studies have highlighted the role of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) induction. By promoting the occurrence of an oxidative stress, CYP2E1 could actively participate in the aggravation of NAFLD. Some studies have suggested that CYP2E1 induction during obesity could be secondary to different factors including fatty acids (FAs). From a previous screening work on different classes of FAs, we found that palmitic, stearic and linoleic FAs could significantly increase the activity of CYP2E1 in a context of lipid overload.

The present study aims to evaluate the impact of these three inducing CYP2E1 FAs on:

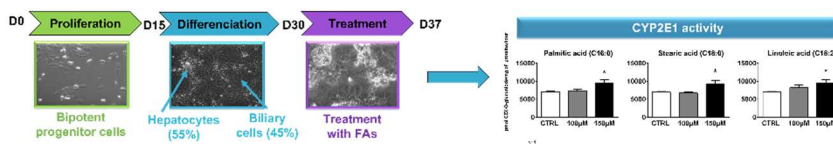
- 1) Hepatic lipid metabolism
- 2) Oxidative stress and mitochondrial function



MATERIALS AND METHODS

Experiments were carried out in HepaRG cells, a human hepatocarcinoma cell line. Differentiated HepaRG cells contain both hepatocytes and biliary cells.

To assess the impact of palmitic, stearic and linoleic FAs on hepatic metabolism, HepaRG cells were treated or not with these different FAs for 1 week at 100µM and 150µM.



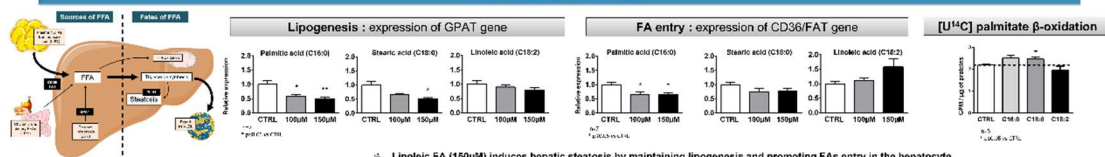
RESULTS

STEATOSIS QUANTIFICATION



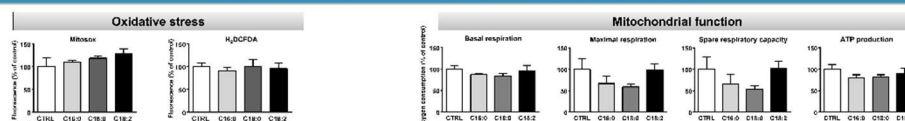
- 1. Linoleic FA (150µM) promotes hepatocellular triglycerides accumulation and occurrence of hepatic steatosis.
- 2. Palmitic and stearic FAs do not induce hepatic steatosis.

LIPID METABOLISM



- 1. Linoleic FA (150µM) induces hepatic steatosis by maintaining lipogenesis and promoting FAs entry in the hepatocyte.
- 2. Palmitic and stearic FAs (150µM) promote both reduced lipogenesis and increased mitochondrial β-oxidation which prevent in part the hepatocellular lipid accumulation

OXIDATIVE STRESS AND MITOCHONDRIAL FUNCTION

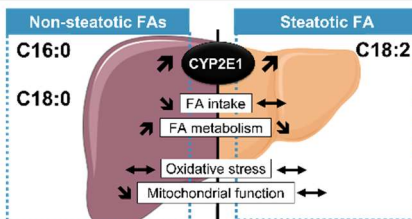


- 1. Palmitic, stearic or linoleic FAs do not increase the levels of reactive oxygen species (ROS)
- 2. Palmitic and stearic FAs promote altered maximal respiration and spare respiratory capacity

CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

From a previous screening work, we showed that only some FAs are able to induce CYP2E1 activity. Using the HepaRG cell line, we have identified palmitic, stearic and linoleic FAs as three FAs promoting the induction of hepatic CYP2E1. Interestingly, the mechanism of induction of this cytochrome is complex and does not only rely on the steatosis context but rather to the action of some specific FAs. Indeed, we have demonstrated that palmitic and stearic FAs can both induce CYP2E1 in the absence of hepatic steatosis.

In our experimental conditions, CYP2E1 induction does not promote ROS production and occurrence of oxidative stress. However, CYP2E1 induction under a palmitic or stearic FA treatment is associated with mitochondrial dysfunction whereas a treatment with linoleic acid has no effect.



Considering all these results, this study needs further investigations to better understand the causes and consequences of CYP2E1 induction in the aggravation of steatosis to NASH. In particular, molecular mechanisms involved in the induction of CYP2E1 will be investigated. Investigations on cellular stress will be deepened by evaluating other kinds of stress such as endoplasmic reticulum stress and by seeking the antioxidant defense state in the HepaRG cells. Regarding the deleterious effects of both palmitic and stearic FAs on mitochondrial function, it will be interesting to understand why these two FAs have such effects in comparison to linoleic acid. Finally, these *in vitro* investigations can be completed by an *in vivo* study where mice will be fed a hyperlipidic diet enriched with a FA inducing CYP2E1 to determine the impact of this diet on NASH occurrence and associated metabolic disorders.

E-poster présenté aux Journées Francophones de Nutrition (live), du 25 au 27 novembre 2020 en distanciel.

RÔLE DES ACIDES GRAS DANS L'INDUCTION DU CYTOCHROME P450 2E1 (CYP2E1) HÉPATIQUE:
Implication dans l'étiologie de la stéatohépatite non alcoolique (NASH) liée à l'obésité.

Clémence PENHOAT
Institut NuMeCan (INSERM U1241)

UNIVERSITÉ DE RENNES 1

numecan
nutrition • métabolisme • cancer

Directeur de thèse : Dr Bernard FROMENTY
Co-encadrante : Dr Karima BEGRICHE

InsERM

25-27 novembre 2020 – Journées Francophones de Nutrition – Live

P067

Culture cellulaire
HepaRG : une lignée cellulaire dérivée d'un hépatocarcinome humain

Cellules différenciées (30 jours)

Cellules biliaires

Hépatocytes

1 semaine de traitement

C12:0 (acide laurique)
C16:0 (acide palmitique)
C18:0 (acide stéarique)
C18:1 (acide oléique)

C18:2 (acide linoléique)
C18:3 (acide linoléique)
C20:4 (acide arachidonique, ARA)
C20:5 (acide eicosapentaénoïque, EPA)
C22:6 (acide docosahexaénoïque, DHA)

100 et 150µM

Clémence PENHOAT – P067

② Evaluer leur impact sur le métabolisme lipidique hépatique et sur le stress cellulaire

Expression du gène CD36/FAT

Acide palmitique (C16:0)

Acide linoléique (C18:2)

Acide stéarique (C18:0)

Acide oléique (C18:1)

Acide arachidonique (C20:4)

Acide eicosapentaénoïque (C20:5)

Acide docosahexaénoïque (C22:6)

Dosage de l'apolipoprotéine B

Acide palmitique (C16:0)

Acide linoléique (C18:2)

Acide stéarique (C18:0)

Acide oléique (C18:1)

Acide arachidonique (C20:4)

Acide eicosapentaénoïque (C20:5)

Acide docosahexaénoïque (C22:6)

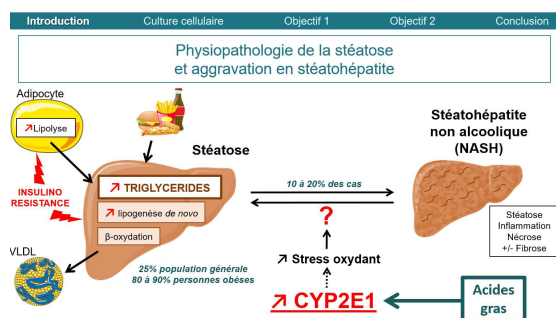
Stress cellulaire

Pas de stress oxydant (sondes Mitoxos et H₂DCFDA)

Expression de gènes impliqués dans la réponse antioxydante pour C16:0 et C18:0

Pas de stress du réticulum endoplasmique (expression des gènes eIF2, XBP1, ATF6)

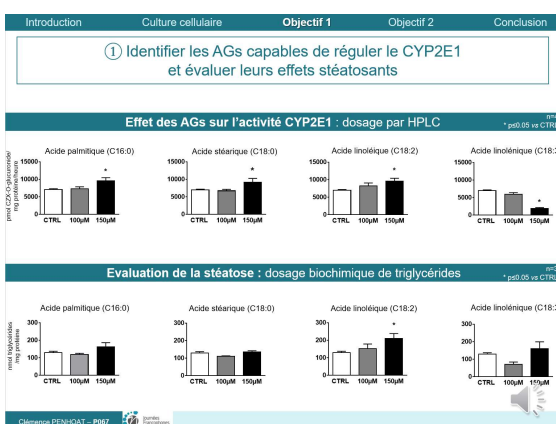
Clémence PENHOAT – P067



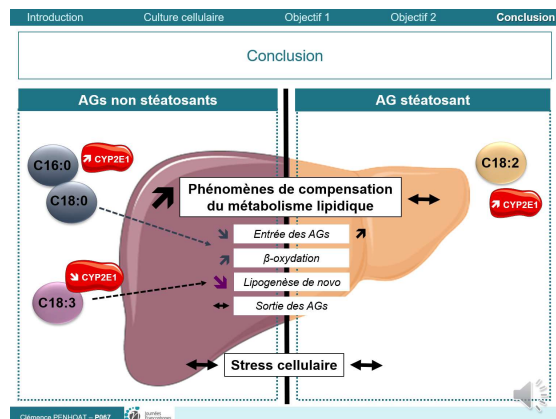
OBJECTIFS DE L'ETUDE :
① Identifier les acides gras (AG) capables de réguler l'expression et l'activité du CYP2E1
② Evaluer leur impact sur le métabolisme lipidique hépatique et le stress cellulaire

Clémence PENHOAT – P067

Sources : Begriche et al., 2006 ; McClain et al., 2007 ; Akhouri et al., 2009 ; Ferramossa et al., 2014 ; Fan JG et al., 2017 ; Hall Z et al., 2017.



Clémence PENHOAT – P067



Clémence PENHOAT – P067

Merci pour
votre attention

P067

numecan
nutrition • métabolisme • cancer

Karima Begriche
Bernard Fromenty
Grégory Pinon
Julie Massart
Cassandra Rayer
Mathieu Franc
Sophie Martinais

AGRO
CAMPUS
QUEST

Philippe Legrand
Vincent Rioux
Daniel Catheline

SFN
Société Française de Nutrition

Journées
Francophones
de Nutrition

JFN Live
Connectons
nos savoirs

14

Role of fatty acids in hepatic cytochrome P450 2E1 induction: involvement in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) related to obesity and in acetaminophen toxicity.

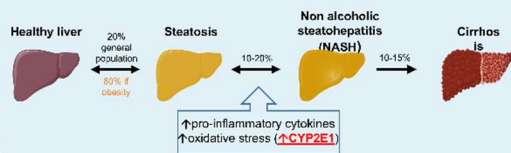
Clémence PENHOAT¹, Julie MASSART¹, Bernard FROMENTY¹, Karima BEGRICHE¹

¹ University of Rennes 1 - NuMeCan Institute (INSERM U1241) – RENNES, France
clemence.penhoat@etudiant.univ-rennes1.fr - karima.begrache@univ-rennes1.fr

INTRODUCTION

Steatosis is characterized by an excessive hepatic triglyceride (TG) accumulation. Although benign, it can progress to nonalcoholic steatohepatitis (NASH), a liver injury with inflammation, fibrosis and necrosis of the hepatocytes. Nevertheless, mechanisms implied in the aggravation of steatosis to NASH are not fully elucidated. Several reports highlighted the role of hepatic cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) induction, which promotes an oxidative stress when activated. Interestingly, several studies reported that CYP2E1 induction in lipid overload context could be due to the action of different metabolic factors including some fatty acids (FAs).

Besides its role in the worsening of steatosis to NASH, CYP2E1 is also implied in acetaminophen (APAP) hepatotoxicity. Its toxicity has already been reported in therapeutic doses, and could be due to CYP2E1 induction.



MATERIALS AND METHODS

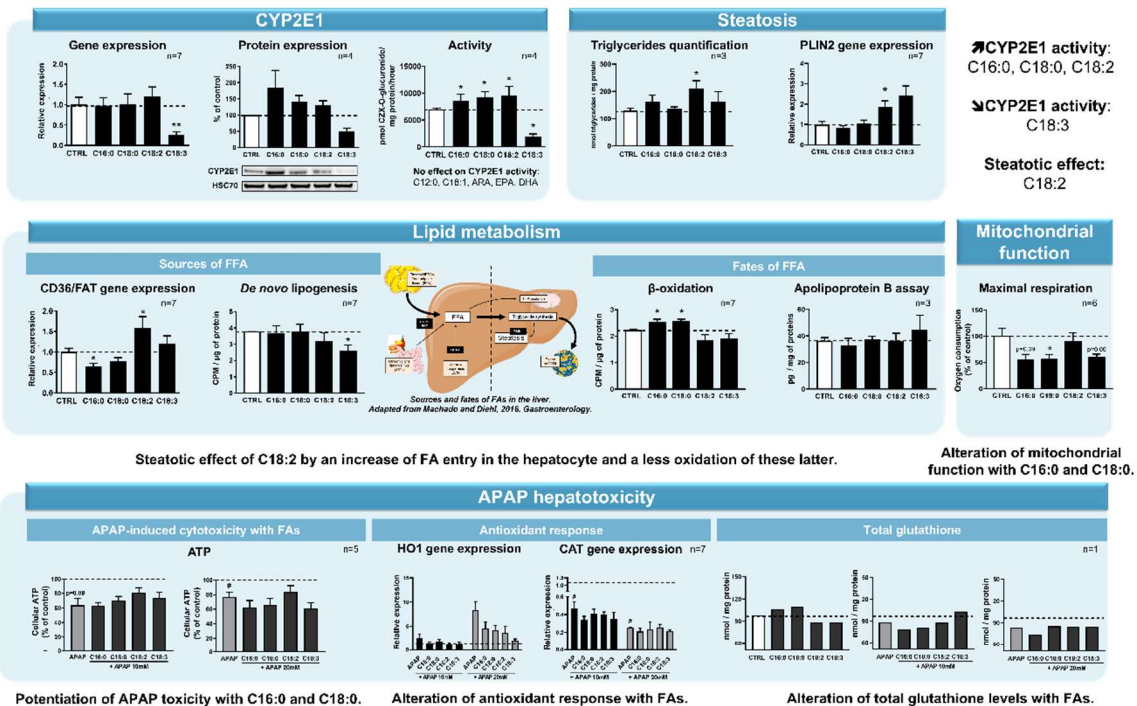
For our experiments, we used the human hepatocarcinoma cell line HepaRG. After 30 days of culture, these cells were treated during 7 days with different FAs differing from each other by their chain length and insaturation numbers. These FAs were used at 150 μM, corresponding to physiological concentrations.

APAP toxicity was assessed with or without FA treatment. HepaRG cells were exposed at 10 or 20 mM of APAP during the 24 last hours of FA treatment.

To determine CYP2E1 inducers FAs, gene and protein expression of CYP2E1 were measured as well as its activity by HPLC. Then, steatosis was measured by triglyceride quantification and gene expression. The possible mechanisms of steatosis induction were studied by different approaches, including qPCR, radiolabeled methods and ELISA assay. APAP-induced hepatotoxicity with FAs was assessed by measuring cell viability and toxicity, oxidative stress and total glutathione.



RESULTS

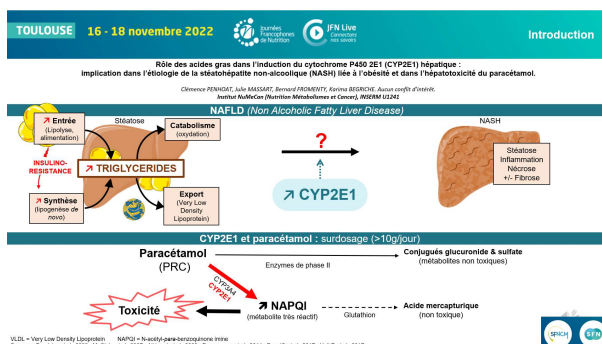


CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

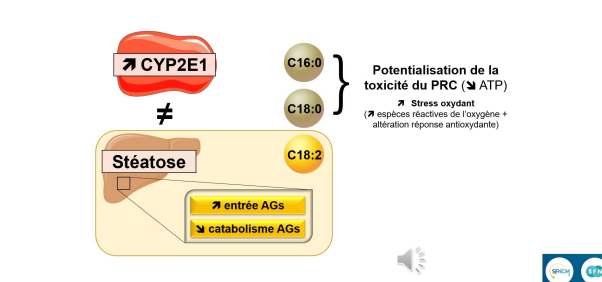
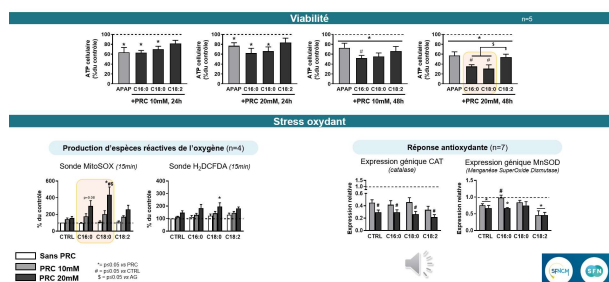
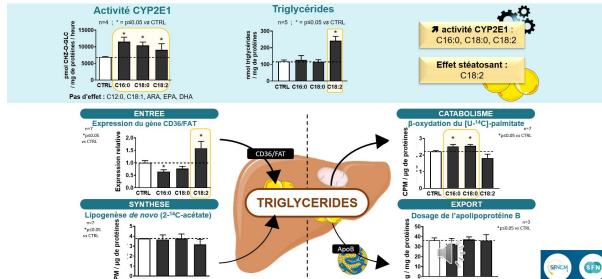
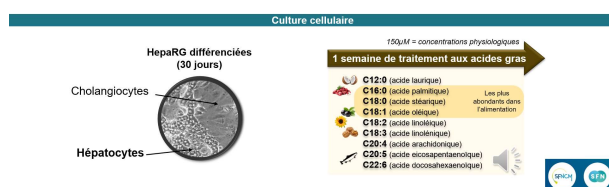
Using HepaRG cell line, we identified C16:0, C18:0 and C18:2 as inducers of CYP2E1 activity. Interestingly, C18:3 decreased CYP2E1 activity. Regarding steatosis, only C18:2 promoted a significant TG accumulation. By the study of lipid metabolism after FA treatment, we highlighted that steatotic effect of C18:2 was due to an increase of FA entry in the hepatocyte (↑ CD36/FAT gene expression) and a less oxidation of these latter. In our experimental conditions, CYP2E1 induction under C16:0 and C18:0 treatment was associated with mitochondrial dysfunction, measured by Seahorse technology. Last, APAP toxicity was assessed in association with FA treatment. Only saturated FAs potentiated APAP cytotoxicity by measuring ATP. Given their importance in APAP toxicity, antioxidant response and total glutathione levels were quantified. Interestingly, we observed that antioxidant response was altered after APAP treatment associated with FAs. Concerning glutathione, our firsts data suggests that CYP2E1-inducers FAs alters glutathione levels whereas C18:3 tends to restore it to control.

Our study allowed to identify three CYP2E1 inducers FAs. These latter could play a key function in the worsening of steatosis to NASH by promoting an altered hepatic lipid metabolism and a mitochondrial dysfunction. By inducing CYP2E1, these FAs could also potentiate APAP hepatotoxicity.

E-poster présenté aux Journées Francophones de Nutrition, du 16 au 18 novembre 2022 à Toulouse.



- 1 Identifier les AGs induisant le CYP2E1, évaluer leurs effets stéatogènes et leur impact sur le métabolisme lipidique hépatique
- 2 Evaluer leur impact sur la cytotoxicité du paracétamol (PRC)



Merci pour votre attention

PO09_164

Karima BEGRICHE
Bernard FROMENTY
Julie MASSART
Vincent RIOUX
Grégory FINON
Catherine RIBAUT
Pénélope BERNABEU-GENTÉY

numecan

Inserm



RÔLE DES ACIDES GRAS DANS L'INDUCTION DU CYTOCHROME P450 2E1 (CYP2E1) HÉPATIQUE:

Implication dans l'étiologie de la stéatohépatite non-alcoolique (NASH) liée à l'obésité et dans l'hépatotoxicité du paracétamol.

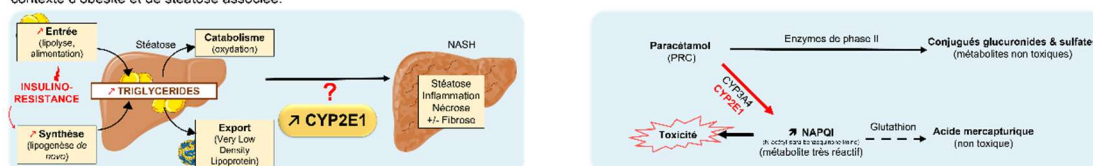
Clémence PENHOAT¹, Julie MASSART¹, Bernard FROMENTY¹, Karima BEGRICHE¹

¹ Université de Rennes 1 – Institut NuMeCan (INSERM U1241) – RENNES, France

clemence.penhoat@etudiant.univ-rennes1.fr - karima.begrice@univ-rennes1.fr

INTRODUCTION

La stéatose hépatique est caractérisée par une accumulation excessive de triglycérides dans le foie et touche près d'un quart de la population mondiale. Elle peut progressivement évoluer vers une stéatohépatite non-alcoolique (NASH), une lésion potentiellement plus grave. Plusieurs études ont mis en évidence que le cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) pourrait être impliqué dans les mécanismes de transition de la stéatose vers la NASH. Des travaux ont rapporté le rôle de certains acides gras (AGs) parmi les facteurs métaboliques susceptibles d'induire le CYP2E1 dans un contexte dysmétabolique. Outre son rôle potentiel dans l'aggravation de la stéatose en NASH, le CYP2E1 est impliqué dans la toxicité hépatique du paracétamol (PRC) observée généralement après un surdosage. Ainsi, le PRC pourrait être plus toxique dans un contexte d'obésité et de stéatose associée.

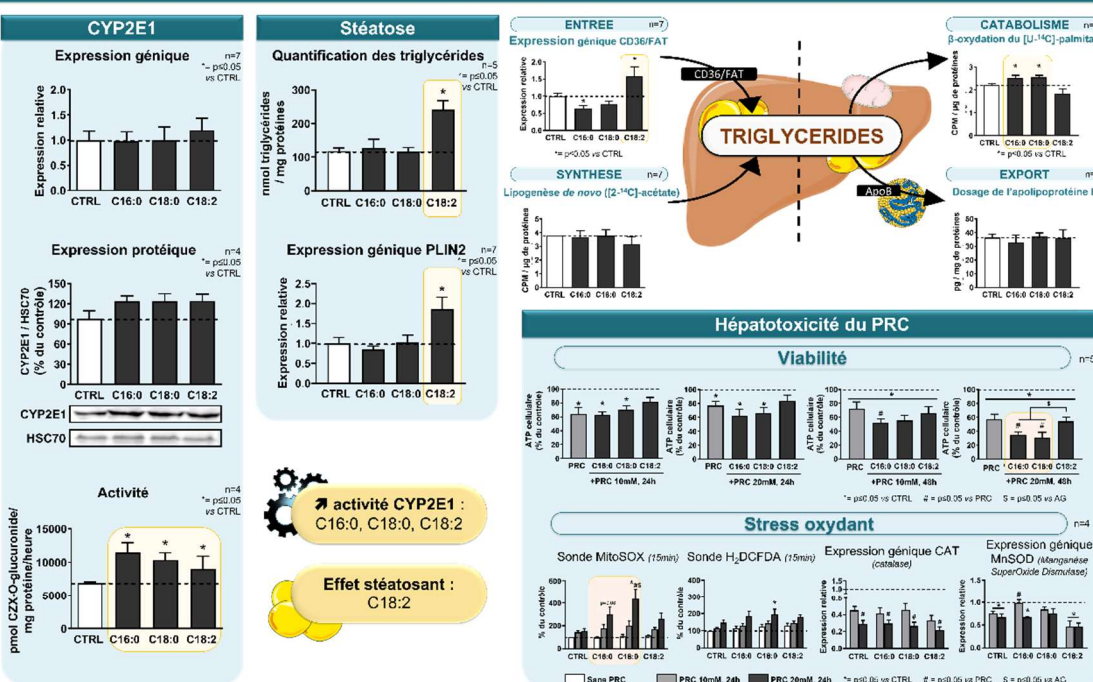


MATÉRIELS ET MÉTHODES

Afin d'identifier l'impact des AGs sur l'induction du CYP2E1, la stéatose et la toxicité du PRC, la lignée d'hépatocarcinome humain HepaRG a été utilisée. Ces cellules ont été traitées pendant une semaine par neuf AGs différents (150 µM). Un traitement au PRC (10 ou 20 mM) pendant les 24 dernières heures a également été réalisé.



RÉSULTATS



CONCLUSIONS

Nos investigations ont conduit à l'identification de trois AGs inducteurs du CYP2E1 (acides palmitique C16:0, stéarique C18:0 et linoléique C18:2). De façon intéressante, l'induction du CYP2E1 n'est pas forcément corrélée à une stéatose puisque seul le C18:2 est stéatosant dans nos conditions expérimentales. En effet, le métabolisme lipidique hépatocytaire s'effectue de manière différente selon les AGs. De plus, une potentialisation de la toxicité du PRC avec les AGs C16:0 et C18:0 a été mise en évidence lorsque les cellules ont été traitées pendant 48h par ce médicament à la concentration de 20 mM.

Dans le modèle cellulaire HepaRG, nous avons montré que l'induction du CYP2E1 par les acides gras palmitique et stéarique est indépendante de l'accumulation des triglycérides intracellulaires. De plus, nos résultats indiquent une toxicité du PRC plus importante lorsque les cellules sont traitées par ces deux acides gras. De façon intéressante, le traitement par l'acide linoléique ne potentialise pas la toxicité du PRC, suggérant qu'une stéatose pré-existante prévient en partie les effets hépatotoxiques de ce médicament.

19

ROLE OF FATTY ACIDS IN HEPATIC CYTOCHROME P450 2E1 (CYP2E1) INDUCTION:

Involvement in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) related to obesity and in acetaminophen toxicity

Clémence PENHOAT¹, Julie MASSART¹, Bernard FROMENTY¹, Karima BEGRICHE¹

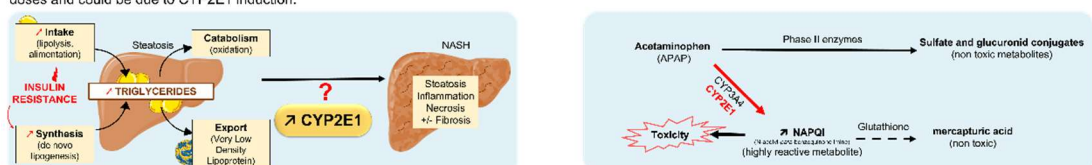
¹ Rennes 1 university – NuMeCan institute (INSERM U1241) – RENNES, France

clemence.penhoat@etudiant.univ-rennes1.fr - karima.begrice@univ-rennes1.fr

INTRODUCTION

Steatosis is characterized by an excessive hepatic triglyceride (TG) accumulation. Although benign, it can progress to nonalcoholic steatohepatitis (NASH), a liver injury with inflammation, fibrosis and necrosis of the hepatocytes. Nevertheless, mechanisms implied in the aggravation of steatosis to NASH are not fully elucidated. Several reports highlighted the role of hepatic cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) induction, which promotes an oxidative stress when activated. Interestingly, several studies reported that CYP2E1 induction in lipid overload context could be due to the action of different metabolic factors including some fatty acids (FAs).

Besides its role in the worsening of steatosis to NASH, CYP2E1 is also implied in acetaminophen (APAP) hepatotoxicity. Its toxicity has already been reported in therapeutic doses and could be due to CYP2E1 induction.



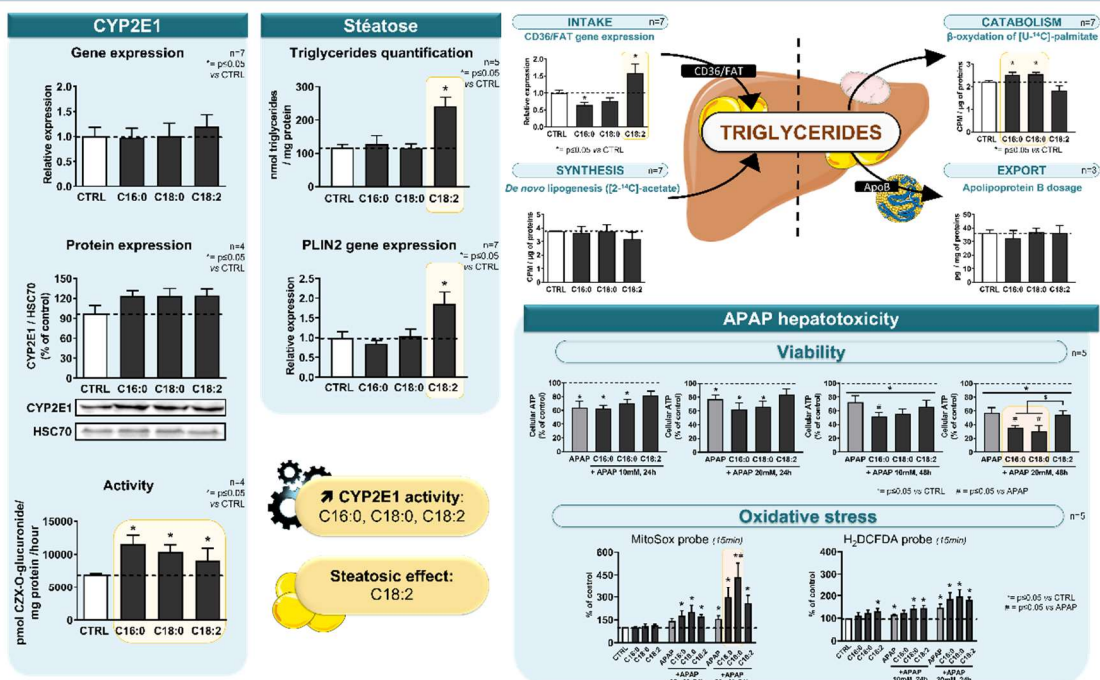
MATERIALS & METHODS

For our experiments, the human hepatocarcinoma cell line HepaRG was used. Cells were treated during one week with nine different FAs. These FAs were used at 150μM, corresponding to physiological concentrations.

APAP toxicity was assessed with or without FA treatment. HepaRG cells were exposed at 10 or 20mM of APAP during the 24 hours of FA treatment.



RESULTS



CONCLUSIONS

Using HepaRG cell line, we identified C16:0, C18:0 and C18:2 as inducers of CYP2E1 activity. Regarding steatosis, only C18:2 promoted a significant TG accumulation. By the study of lipid metabolism after FA treatment, we highlighted that steatotic effect of C18:2 was due to an increase of FA entry in the hepatocyte (* CD36/ FAT gene expression) and a less oxidation of these latter. APAP toxicity was assessed in association with FA treatment. Only saturated FAs potentiated APAP cytotoxicity by measuring ATP. Given their importance in APAP toxicity, reactive oxygen species were quantified. Interestingly, we observed that saturated FAs promotes oxidative stress by increasing reactive oxygen species production. Other experiments as NAPQI-adducts and glutathione quantification would be necessary in order to better understand the mechanism of toxicity by which these FAs potentiate APAP hepatotoxicity.

Our study allowed to identify three CYP2E1 inducers FAs. These latter could play a key function in the worsening of steatosis to NASH by promoting an altered hepatic lipid metabolism. These FAs could also potentiate APAP hepatotoxicity by inducing CYP2E1 and by promoting oxidative stress.

Titre : Rôle des acides gras dans l'induction du cytochrome P450 2E1 (CYP 2E1) hépatique : implication dans la stéatohépatite non alcoolique (NASH) et dans l'hépatotoxicité du paracétamol.

Mots clés : CYP2E1, NAFLD, paracétamol, acides gras.

Résumé :

Les maladies hépatiques d'origine dysmétabolique représentent aujourd'hui un véritable enjeu de santé publique. Parmi elles, la stéatose (NAFL, *Non Alcoholic Fatty Liver*) est caractérisée par une accumulation excessive de lipides dans le foie et peut progressivement évoluer vers une stéatohépatite non alcoolique (NASH, *non alcoholic steatohepatitis*), qui est une lésion plus grave. Plusieurs études ont mis en évidence que le cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) a la particularité de générer des espèces réactives de l'oxygène (EROs) qui sont sources d'un stress oxydant propice à l'aggravation de la NAFL en NASH. Des travaux ont rapporté le rôle de certains acides gras parmi les facteurs métaboliques susceptibles d'activer le CYP2E1, en particulier dans un contexte d'obésité et/ou de NAFLD. Outre son rôle potentiel dans l'aggravation de la NAFL en NASH, le CYP2E1 est impliqué dans la toxicité

hépatique du paracétamol, observée généralement après un surdosage (>10 g/j) intentionnel ou non, et plus rarement au cours de traitements à des doses pharmacologiques (3-4 g/j). Ainsi, le paracétamol pourrait être plus toxique dans un contexte de NAFLD et d'obésité. Notre travail a permis de montrer que tous les acides gras n'ont pas le même impact sur le CYP2E1 et sur la stéatose, dans le modèle cellulaire HepaRG. Dans nos conditions expérimentales, l'induction du CYP2E1 n'est pas non plus forcément corrélée à l'apparition d'une NAFL. Des investigations sur le métabolisme lipidique ont permis de comprendre les mécanismes sous-jacents au développement de cette NAFL. Notre étude a également permis d'identifier certains acides gras comme des facteurs de potentialisation de l'hépatotoxicité induite par le paracétamol, bien que les mécanismes sous-jacents ne soient pas encore totalement élucidés.

Title : Role of different fatty acids on hepatic cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) induction : involvement in non alcoholic steatohepatitis (NASH) and in acetaminophen hepatotoxicity.

Keywords : CYP2E1, NAFLD, acetaminophen, fatty acids.

Abstract :

Non-alcoholic fatty liver diseases are a major public health concern today. Among them, *Non Alcoholic Fatty Liver* (NAFL) is characterized by an excessive hepatic lipid accumulation and can progress into *Nonalcoholic Steatohepatitis* (NASH), a more serious lesion. Several studies have shown that cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) plays a role in the progression of NAFL to NASH by generating reactive oxygen species that promotes oxidative stress. Studies have reported the role of some fatty acids as metabolic factors that can activate CYP2E1, particularly in the context of obesity and/or NAFLD. In addition to its potential role in the aggravation of NAFL to NASH, CYP2E1 is involved in the acetaminophen-induced hepatotoxicity, which is typically observed after an overdose (<10g/day) and more rarely during pharmacological doses treatments (3-4g/day).

This suggests that acetaminophen may be more toxic in the presence of NAFLD or obesity. Our work has shown that not all fatty acids have the same impact on CYP2E1 and steatosis, in the HepaRG cell model. In our experimental conditions, CYP2E1 induction is not necessarily correlated with NAFL development. Investigations into lipid metabolism allowed us to understand the underlying mechanisms in the development of this NAFL. Our study also identified certain fatty acids as factors that enhance acetaminophen hepatotoxicity, although the underlying mechanisms are not yet fully understood.