Xénobiotiques hépatotoxiques : études de métabolisme et mécanismes d'action

Brendan Le Daré

▶ **To cite this version:**

Brendan Le Daré. Xénobiotiques hépatotoxiques : études de métabolisme et mécanismes d'action. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2021. Français. NNT : 2021REN1B005 . tel-03267705

HAL Id: tel-03267705
https://theses.hal.science/tel-03267705

Submitted on 22 Jun 2021

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.

UNIVERSITÉ DE RENNES 1

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : *Sciences Pharmaceutiques*

Par
Brendan Le Daré

Xénobiotiques hépatotoxiques : Etudes de métabolisme et mécanismes d'action

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 09/02/2021
Unité de recherche : Equipe Stress Exogènes/Endogènes et Réponses Pathologiques dans les Maladies Hépato-gastro-intestinales (EXPRES), Institut NuMeCan (Nutrition, Métabolismes, Cancer), UMR 1241. Rennes, France

Rapporteurs avant soutenance :

Jean-Claude LECRON	PU-PH, CHU de Poitiers
Nathalie VERGNOLLE	DR, Université de Toulouse III

Composition du Jury :

Présidente :	Isabelle MOREL	PU-PH, Université de Rennes I
Examinateurs :	Stanislas GRASSIN-DELYLE	PU-PH, Université de Versailles Saint-Quentin
	Nathalie VERGNOLLE	DR, Université de Toulouse III
	Jean-Claude LECRON	PU-PH, CHU de Poitiers
Dir. de thèse :	Vincent LAGENTE	PU, Université de Rennes I
Co-dir. de thèse :	Thomas GICQUEL	MCU-PH, Université de Rennes I

« Peu importe à quelle point votre théorie est belle, peu importe à quel point vous êtes intelligent. Si cela n'est pas en accord avec l'expérience, c'est faux. »

Richard P. Feynman

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Vincent LAGENTE,

Qui me fait l'honneur de diriger cette thèse. Merci pour ton superbe encadrement depuis le Master 2, ta disponibilité, et tes nombreux conseils. Merci également pour tes qualités humaines et la confiance que tu m'as accordé au cours de ces dernières années, qui m'ont permis de m'épanouir dans ce travail.

A Monsieur le Docteur Thomas GICQUEL,

Qui me fait (l'immense) plaisir de codiriger cette thèse. Merci pour cet encadrement exceptionnel, tant au niveau de cette thèse d'Université que dans la construction de mon parcours professionnel et scientifique futur. Merci également pour ta disponibilité, tes idées inépuisables et la confiance que tu m'accordes. J'espère pouvoir poursuivre ce travail d'équipe aussi longtemps que possible.

A Madame le Professeur Isabelle MOREL,

Qui me fait l'honneur de présider cette thèse. Merci pour votre gentillesse, vos conseils, et votre disponibilité. Ce fût également un grand plaisir de passer un an et demi au laboratoire de Toxicologie du CHU de Rennes, au sein duquel j'ai énormément appris.

A Monsieur le Professeur Jean Claude LECRON de l'Université de Poitiers et à Madame le Docteur Nathalie VERGNOLLE de l'Université de Toulouse,

Pour votre disponibilité et l'honneur que vous m'accordez en tant que rapporteurs de ces travaux.

A Monsieur le Docteur Stanislas GRASSIN DELYLE,

Qui me fait l'honneur de venir de l'UFR de Versailles pour examiner ce travail (à nouveau). Merci pour votre disponibilité et l'intérêt que vous portez à ces travaux.

A Madame le Professeur Odile SERGENT et Monsieur le Docteur David GILOT,

Qui ont eu la gentillesse de faire partie de mon comité de suivi individuel de thèse. Merci pour vos idées, conseils et suivis sur le déroulement de ces trois années de travaux.

A Monsieur le Docteur Bruno CLEMENT,

De m'avoir accueilli au sein de l'institut de recherche NuMeCan, d'abord en tant qu'étudiant de Master 2, puis en tant que Doctorant. L'environnement bienveillant de ces laboratoires de recherche ont été propices aux travaux collaboratifs, aux échanges pertinents et intéressants auxquels j'ai eu la chance de participer.

A Messieurs les Docteurs Pierre-Jean Ferron, Bruno Clément, et Thomas Gicquel,

De m'avoir associé au projet PREVITOX.

A Monsieur le Docteur Bernard FROMENTY,

De m'avoir accueilli dans son équipe de recherche. C'est un immense plaisir et honneur que de pouvoir travailler avec des personnes aussi compétentes et humbles que toi. Merci pour tous ces échanges passionnants.

A Monsieur le Docteur Pascal LOYER,

Pour toutes les discussions intéressantes et enrichissantes ainsi que pour ta disponibilité.

A l'ensemble des membres de NuMeCan, et plus particulièrement Simon, Dounia, Julien, Pierre-Jean, Yoann, Yann, Tatiana, Manu, Kevin, Claudine, Aude, et Catherine, pour les nombreux très bons moments passés au laboratoire, votre gentillesse, votre disponibilité, vos collaborations, et votre pédagogie dans l'apprentissage des techniques laborantines.

A Madame le Docteur Françoise Le Devehat,

Qui m'a fait faire mes premiers pas dans le monde de la recherche. Merci pour ta gentillesse, tes conseils et ta disponibilité.

A Sophie et Pierre-Marie Allard,

Qui m'ont fait l'honneur de m'initier au réseau moléculaire.

A l'ensemble de mes collègues du laboratoire de Toxicologie,

Qui m'ont accompagné durant cette thèse.

A ma famille, la Pap, la Mam, Guilvic, Kristina, Lorine et Damien,

Même si ces quelques lignes sont très largement insuffisantes pour témoigner de ce que je vous dois. Merci d'être toujours disponibles et aussi parfaits. Merci de m'avoir toujours soutenu et encouragé dans tous mes choix. Vous connaissez la profonde affection que je vous porte. Ça y est, cette fois-ci les études (initiales) sont finies !

A Gaëlle,

Pour ton sourire inoxydable et ton énergie inépuisable. Merci pour ton soutien quotidien et tes idées de voyage. Mon seul souhait reste que tu continues de déformer toutes ces petites expressions françaises, et que tu continues de m'apprendre où se trouvent tous ces pays dont je n'ai jamais entendu parler... Mieux : continue de m'y emmener ! La vie à tes côtés est un régal, que cela puisse continuer autant que possible !

A mes amis de la fac de pharma de Rennes, de l'internat, de la colloc…

Qui espèrent que je finisse mes études avant la retraite. Et bien… je crois que l'on peut dire que je touche à la fin de ce premier chapitre estudiantin !

LISTE DES ABREVIATIONS

ABC	ATP-binding cassette
ADH	Alcool Déshydrogénase
AKR	Aldo-kéto réductases
ALAT	Alanine aminotransférases
ALDH	Aldéhyde Déshydrogénase
ARNPII	ARN polymérase de type II
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase-recruitment domain
ATP	Adénosine triphosphate
BCRP	Breast cancer resistance protein
BSEP	Bile salt export pump
BzATP	3'-O-(4-Benzoyl)benzoyl ATP
CAPS	Syndrome périodique associé à la cryopyrine
CARD	Caspase Activation and Recruitment Domain
CINCA	Syndrome chronique infantile neurologique, cutané et articulaire
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CRP	Protéine C réactive
CYP	Cytochrome P450
DAMPs	Danger associated molecular patterns = motifs moléculaires associés aux dangers
EGR-1	Early growth response-1
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
EPH	Epoxydes hydrolases
FAEE	Esters éthyliques d'acide gras
FCAS/FCU	Syndrome inflammatoire automatique froid familial
GABA	Acide gamma amino-butyrique
GM-CFU	Granulocyte/Macrophage Colony-Forming Units = progéniteur granulocytaire et macrophagique
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor = Facteur stimulant les granulocytes-macrophages
GSH	γ-L-Glutamyl-L-cystéinylglycine
GST	Glutathion S-transférases
IL	Interleukine
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	Leucine-rich repeat = répétition riche en lysine
MATE	Multidrug and toxin extrusion exchanger
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
MdMs	Monocyte-derived macrophages = Macrophages dérivés de monocytes
MDR	Multidrug-resistance proteins

MRP2	Multidrug-resistance-associated protein 2
MSU	Monosodium urate
MTT	3-[4-5-diméthylthiazol-2yl]-2,5-diphényltétrazolium bromide
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NAPQI	N-acétyl-p-benzoquinone imine
NLRP3	Nucleotide oligomerization domain receptors-like receptor pyrin domain containing
NOMID	Maladie systémique inflammatoire à début néo-natal
NQO	NAD(P)H quinone oxydoréductase
OAT	Organic Anion Transporter 3
OATP	Organic Anion Transporting Polypeptides
OCT	Organic Cation Transporters
P2XR	Purinergic 2X receptor
PAL	Phosphatase alcaline
PAMPs	Pathogen associated molecular patterns = motifs moléculaires associés aux pathogènes
PBS	Phosphate Buffer Salin = Tampon phosphate salin
PCR	Polymerase chain reaction = Réaction de chaine par polymérase
PgP	P-glycoprotein
PRRs	Pattern recognition receptors = récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires
PYD	Pyrin Domain
ROS	Reactive oxygen species = Espèces réactives de l'oxygène
RR	Risque relatif
SLC	Solute Carrier
SOD	Superoxide dismutase
SREBP-1c	Sterol regulatory element binding protein-1C
SULT	**S**ulfotransférases
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TLRs	Toll-like receptors
TNF-α	Tumor Necrosis Factor α
TRX	Thioredoxin
UGT	Uridine-diphosphate-glucuronosyltransférases
VLDL	Very low density lipoprotein

AVANT-PROPOS

Les poisons ont toujours fasciné les Hommes. Pendant des millénaires, des substances toxiques ont été utilisées pour la chasse, ou la réalisation de nombreux crimes. Le moyen-âge marque dans ce contexte une période symbolique, au cours de laquelle les nombreux empoisonnements étaient perçus comme des actes diaboliques. Au cours du temps, les expérimentations ont permis de prendre conscience qu'une même substance pouvait être à la fois remède ou toxique, faisant reculer l'obscurantisme et donnant naissance à la Toxicologie.

Les laboratoires de Toxicologie constituent à ce jour des observatoires précieux dans l'étude des poisons. Le versant hospitalier permet l'analyse de leur composante clinico-biologique, quand le versant recherche permet de décortiquer de manière précise leurs mécanismes d'action. Ces deux versants sont ainsi indispensables et indissociables dans la progression des connaissances. D'une part « lab », et d'autre part « oratoire », ces lieux permettent l'acquisition des connaissances d'une part et la propagation de ces dernières d'autre part.

L'alcool et les amanitines sont deux xénobiotiques hépatotoxiques fréquemment rencontrés en laboratoire de toxicologie hospitalier. L'alcool est ubiquitaire de par son intégration dans le mode de vie occidental, et est très largement étudié. Il est ainsi connu comme facteur de risque de nombreuses pathologies. Cependant, l'importante progression des connaissances dans le domaine de l'immunologie ces dernières années ouvre le champ de l'immunotoxicologie, au sein duquel l'alcool réserve encore de belles découvertes. Les amanitines, puissantes toxines de champignons, sont responsable d'intoxications mortelles chaque année, et constitue toujours un challenge en terme de prise en charge médicale. Mis en regard du nombre croissant d'intoxications ces dernières années, l'absence de traitement de haute efficacité constitue un intérêt majeur dans la recherche de traitements alternatifs.

Pour ces deux substances, une meilleure compréhension de leurs mécanismes toxiques constitue l'approche la plus prometteuse quant à la découverte de nouvelles approches thérapeutiques.

LISTE DES PUBLICATIONS

& DES COMMUNICATIONS

Articles publiés dans le cadre de la thèse de l'Université de Rennes 1 : (Thèse réalisée d'octobre 2017 à Octobre 2020)

Le Daré B, Victoni T, Bodin A, Vlach M, Vene E, Loyer P, Lagente V, Gicquel T. Ethanol upregulates the P2X7 purinergic receptor in human macrophages. Fundam Clin Pharmacol. 2019 Feb;33(1):63-74. (Article n°1)

Le Daré B, Allard S, Bouvet R, Baert A, Allard PM, Morel I, Gicquel T. A case of fatal acebutolol poisoning: an illustration of the potential of molecular networking.Int J Legal Med. 2020 Jan;134(1):251-256. (Article n°2)

Le Daré B, Ferron P-J, Allard P-M, Clément B, Morel I, Gicquel T. New insights into quetiapine metabolism using molecular networking (*Soumis à Scientific Report le 22/06/2020*). (Article n°3)

Le Daré B, Gicquel T. Therapeutic Applications of Ethanol: A Review. J Pharm Pharm Sci. 11 oct 2019;22:525‑35. doi: 10.18433/jpps30572 (Annexe n°1)

Le Daré B, Lagente V, Gicquel T. Ethanol and its metabolites: update on toxicity, benefits, and focus on immunomodulatory effects. Drug Metab Rev. 2 oct 2019;51(4):545‑61. doi: 10.1080/03602532.2019.1679169 (Annexe n°2)

Hugbart C, Verres Y, Le Daré B, Bucher S, Vène E, Bodin A, Lagente V, Fromenty B, Bouvet R, Morel I, Loyer P, Gicquel T. Non-oxidative ethanol metabolism in human hepatic cells in vitro: Involvement of uridine diphospho-glucuronosyltransferase 1A9 in ethylglucuronide production. Toxicol In Vitro. 2020 Apr 10;66:104842. (Annexe n°3)

Allard S, Le Daré B, Allard P-M, Morel I, Gicquel T. Comparative molecular networking analysis of a Rauwolfia plant powder and biological matrices in a fatal ingestion case. Forensic Toxicol [Internet]. 18 avr 2020 [cité 20 avr 2020]; Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/s11419-020-00531-0 (Annexe n°4)

Le Daré B, Gicquel T. Ethanol et inflammation : « l'alcool éteint l'homme pour ranimer la bête » (*Soumis à Medecine/Sciences le 22/06/20*)

Le Daré B, Gicquel T. Les amanitines : du poison dans l'assiette ! (*Soumis à Medecine/Sciences le 16/07/20*)

Le Daré B, Gicquel T. Il était une fois l'hépatotoxicité… (*Soumis à Medecine/Sciences le 17/07/20*)

Brevet d'application n°20 315 083.4 déposé le 31 Mars 2020 intitulé: «New method to treat the hepatotoxicity induced by amanitins» en collaboration avec la société Hémarina®.

Articles publiés dans le cadre de projets de recherche hospitaliers : (Internat en pharmacie hospitalière : novembre 2014 à Octobre 2020)

Le Daré B, Morel I, Gicquel T. Méthamphétamine : où en est-on 100 ans après sa découverte ? Presse Med. 2020 May. doi: 10.1016/j.lpmfor.2020.04.014

Le Daré B, Gicquel T, Baert A, Morel I, Bouvet R. Self-inflicted neck wounds under influence of lysergic acid diethylamide: a case report and literature review. Medicine. 2020;99(27):e20868

Le Daré B, Triquet L, Degremont A, Charbonnel H, Default A, Osmont MN, Picard S, Gentilhomme G, Bellissant E, Scailteux LM, Polard E. Pitch perception modification due to antiepileptics: A literature and pharmacovigilance databases review. Therapie. 2020 Feb 22. doi: 10.1016/j.therap.2020.02.017

Le Daré B, Adeline Degremont, Elisabeth Polard, Isabelle Morel, Arnaud Biraben, Thomas Gicquel. Clinical and biological assessment of lamotrigine and levetiracetam plasma assays at the Rennes University Hospital. Rev Neurol (Paris). 2020 Mar 13. doi: 10.1016/j.neurol.2019.11.006.

Richeval C, Gicquel T, Hugbart C, Le Daré B, Allorge D, Morel I, Gaulier JM. In vitro Characterization of NPS Metabolites Produced by Human Liver Microsomes and the HepaRG Cell Line Using Liquid Chromatographyhigh Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS) Analysis: Application to Furanyl Fentanyl. Curr Pharm Biotechnol. 2017;18(10):806-814.

Tassel C, Le Daré B, Morel I, Gicquel T. [Xenon: From rare gaz to doping product]. Presse Med. 2016 Apr;45(4 Pt 1):422-30.

Le Daré B, Jehannin A, Lanoe F, Philippe F, Tassel C, Abondo M, Marie N.[Treatment management of sexual offenders]. Ann Pharm Fr. 2015 Jul;73(4):257-65.

Communications orales dans le cadre de la thèse de l'Université de Rennes 1:

Le Daré B, Victoni T, Bodin A, Vlach M, Vene E, Loyer P, Lagente V, Gicquel T. Effets des xénobiotiques sur la voie P2X7R-NLRP3 dans un modèle de macrophages humains. Journée des doctorants de l'institut NuMeCan, Rennes, 21/03/2019.

Posters dans le cadre de la thèse de l'Université de Rennes 1:

Le Daré B, Victoni T, Loyer P, Tanve O, Vlach M, Bodin A, Lagente V, Gicquel T. Ethanol inhibited IL-1β production and induced purinergic receptors expression in human monocyte-derived macrophages. Journée recherche du Campus Santé de l'université de Rennes 1 du 17/01/2018.

Gicquel T, Allard S, Le Daré B, Baert A, Bouvet R, Morel I. Homicide-suicide par intoxication à l'acébutolol : une approche multimatrice par réseau moléculaire. 26ème congrès annuel de la société Française de Toxicologie Analytique – Marseille, 5-8 juin 2018

Le Daré B, Ferron P-J, Allard S, Morel I, Gicquel T. Molecular network as a new tool in metabolism study: the example of the antipsychotic quetiapine. 10ème Journée Recherche Campus Santé. Chimie, Biologie, Mathématiques et Physique : la recherche fondamentale au service de Médicament et de la Santé - Rennes, 22/01/2020.

Le Daré B, Ferron P-M, Morel I, Gicquel T. Quetiapine metabolism exploration in HepaRG cells and patients using molecular networking. 8ème colloque de génomique fonctionnelle du foie – Rennes, 26-28 février 2020.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 15

I. LA FONCTION HEPATIQUE 16

A. Le foie, généralités 16

B. Le foie, un organe du système immunitaire 18

1. Cellules impliquées 19

2. Cytokines pro-inflammatoires 21

3. Les inflammasomes 23

4. L'inflammasome NLRP3 25

a) Activation de l'inflammasome NLRP3 26

b) Pathologies associées 30

c) L'inflammasome NLRP3 comme cible thérapeutique 31

5. Récepteurs purinergiques 32

a) Classification 32

b) Les récepteurs P2 33

c) Pathologies associées 37

d) Les récepteurs purinergiques P2 comme cible thérapeutique 38

6. Modulation de l'axe P2XR-NLRP3 par les xénobiotiques 40

C. Le foie, une cible privilégiée des xénobiotiques toxiques 41

1. Absorption et distribution 41

2. Le métabolisme des xénobiotiques 42

a) La phase 0 43

b) La phase I 44

c) La phase II 48

d) La phase III 50

3. Toxicodynamique des xénobiotiques hépatotoxiques 51

a) Classification des hépatotoxicités induites par les xénobiotiques 52

b) Hépatotoxicités intrinsèques 53

c) Hépatotoxicité idiosyncrasique 57

d) Autres mécanismes d'hépatotoxicité 61

e) Facteurs favorisants des hépatotoxicités 61

II. LES XÉNOBIOTIQUES HÉPATOTOXIQUES 62

A. L'éthanol 64

1. Propriétés et origine 64

a) Fermentation 64

b) Procédés industriels 65

2. Consommation 65

3. Toxicocinétique 67

a) Absorption et distribution 67

b) Métabolisme 68

c) Elimination 70

4. Toxicité 70

a) Vue d'ensemble de la toxicité de l'éthanol 70

b) Pathologies hépatiques liées à l'éthanol 71

B. **Les amanitines 77**

1. Propriétés et origine 77

2. Consommation 80

3. Toxicocinétique 81

a) Absorption et distribution 81

b) Métabolisme et élimination 81

4. Toxicité 82

a) Aspects cliniques 82

b) Toxicodynamique ... 83
5. Prise en charge du syndrome phalloïdien ... 85
III. CONTEXTE ET OBJECTIF ... **86**
TRAVAUX PERSONNELS ... **88**
CHAPITRE 1 : ETUDE DE L'IMPLICATION DE L'IMMUNITE INNEE DANS LA TOXICITE DES XENOBIOTIQUES ... **89**
A. Contexte scientifique ... 90
B. 1ère étude : Etude des effets de l'éthanol sur la voie P2X7R-NLRP3 ... 91
C. Résultats complémentaires ... 92
1. Ethanol sur la lignée THP-1 ... 92
2. Paracétamol et NLRP3 ... 96
3. Amanitines et NLRP3 ... 97
4. Métabolisme de l'éthanol ... 98
5. Conclusion ... 99
CHAPITRE 2 : EVALUATION DE L'INTERET DU RESEAU MOLECULAIRE DANS L'ETUDE DU METABOLISME DES XENOBIOTIQUES ... **100**
A. Contexte scientifique ... 101
B. 2ème étude : Evaluation de l'intérêt du réseau moléculaire dans l'étude du métabolisme de xénobiotiques *in vivo* ... 103
C. 3ème étude : Evaluation de l'intérêt du réseau moléculaire dans l'étude du métabolisme de xénobiotiques *in vitro* ... 104
D. Résultats complémentaires ... 129
E. Conclusion ... 131
CHAPITRE 3 : ETUDE DU METABOLISME ET DE LA TOXICITE DES AMANITINES ... **132**
A. Contexte scientifique ... 133
B. 4ème étude : étude du métabolisme et de la toxicité des amanitines ... 134
1. Matériels et méthodes ... 134
a) Réactifs ... 134
b) Mise au point du dosage des amanitines par LC-MS/MS ... 134
c) Cultures cellulaires et traitements ... 136
d) Viabilité cellulaire ... 137
e) Mesure du stress oxydant ... 138
f) Analyses statistiques ... 138
2. Résultats ... 139
a) Choix du modèle cellulaire d'étude des amanitines ... 139
b) Etude du métabolisme des amanitines ... 140
c) Etude des mécanismes de toxicité des amanitines ... 143
C. Conclusion ... 144
DISCUSSION GENERALE ... **145**
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES ... **155**
BIBLIOGRAPHIE ... **158**
ANNEXES ... **181**

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1

Le Daré B, Gicquel T. Therapeutic Applications of Ethanol: A Review. J Pharm Pharm Sci. 11 oct 2019;22:525‑35. doi: 10.18433/jpps30572.

ANNEXE 2

Le Daré B, Lagente V, Gicquel T. Ethanol and its metabolites: update on toxicity, benefits, and focus on immunomodulatory effects. Drug Metab Rev. 2 oct 2019;51(4):545‑61. doi: 10.1080/03602532.2019.1679169.

ANNEXE 3

Hugbart C, Verres Y, Le Daré B, Bucher S, Vène E, Bodin A, et al. Non-oxidative ethanol metabolism in human hepatic cells in vitro: Involvement of uridine diphospho-glucuronosyltransferase 1A9 in ethylglucuronide production. Toxicol In Vitro. août 2020;66:104842.

ANNEXE 4

Allard S, Le Daré B, Allard P-M, Morel I, Gicquel T. Comparative molecular networking analysis of a Rauwolfia plant powder and biological matrices in a fatal ingestion case. Forensic Toxicol [Internet]. 18 avr 2020 [cité 20 avr 2020]; Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/s11419-020-00531-0

TABLE DES FIGURES

Figure 1: Anatomie générale du foie. 17
Figure 2 : Système porte et vascularisation veineuse d'entrée hépatique.. 18
Figure 3 : Origine et différenciation des macrophages selon les tissus de destination 19
Figure 4 : Représentation de la localisation des populations cellulaires au sein du foie. 21
Figure 5 : Classification des inflammasomes de la famille de NLR 24
Figure 6 : Structure de l'inflammasome NLRP3 25
Figure 7 : Structure d'assemblage de l'inflammasome NLRP3 25
Figure 8 : Pré-activation de l'inflammasome NLRP3 par des agonistes des TLRs 27
Figure 9 : Mécanismes moléculaires régulant l'activation de l'inflammasome NLRP3 29
Figure 10 : Classification des récepteurs purinergiques 32
Figure 11 : Représentation schématique du récepteur P2Y12 33
Figure 12 : Représentation schématique d'une sous unité d'un récepteur P2X 35
Figure 13 : Vue d'ensemble du métabolisme des xénobiotiques 43
Figure 14 : Vue d'ensemble des mécanismes d'excrétion du métabolisme de phase III. 50
Figure 15: Classification des hépatotoxicités par mécanisme d'action. 53
Figure 16 : Mécanismes généraux des hépatotoxicités idiosyncrasiques à médiation immune. 59
Figure 17 : Formule développée de l'éthanol 64
Figure 18 : Voies de métabolisation oxydative et non-oxydative de l'éthanol au sein des hépatocytes 68
Figure 19 : Evolution des hépatopathies alcooliques 71
Figure 20 : Mécanismes proposés d'induction de la lipogenèse hépatique par l'éthanol 72
Figure 21 : Principaux mécanismes impliqués dans l'activation des cellules de Küpffer par la consommation d'éthanol. 75
Figure 22 : Amanite phalloïde (*Amanita phalloides*). 78
Figure 23: Structure des amatoxines 79
Figure 24 :Mécanismes d'action toxique de l'α-amanitine. 84
Figure 25 : Sept heures d'exposition à l'éthanol inhibe la production d'IL-1β sur des macrophages THP-1 stimulés avec du LPS + BzATP.. 92
Figure 26 : Sept heures d'exposition à l'éthanol inhibe la production d'IL-1β sur des macrophages THP-1 stimulés avec du LPS + MSU. 93

Figure 27 : L'éthanol induit l'expression des récepteurs purinergiques P2X4 et P2X7 à la suite d'une stimulation par LPS + MSU dans le modèle THP-1. 94
Figure 28 : Une exposition de 113 h à l'éthanol stimule la production d'IL-1β sur des macrophages THP-1 stimulés avec du LPS + MSU. 95
Figure 29 : Une exposition à des concentrations croissantes de paracétamol ne stimule pas la sécrétion d'IL-1β. 96
Figure 30 : Une exposition à des concentrations croissantes d'α-amanitine stimule la sécrétion d'IL-1β par les macrophages dérivés de monocytes humains (MdMs). 97
Figure 31 : Visualisation du métabolisme *in vivo* de la réserpiline par réseau moléculaire. . 130
Figure 32 : Effet de l'α- et la β-amanitine sur la viabilité de différents modèles de cellules hépatiques 140
Figure 33 : Etude du métabolisme des amanitines *in vivo*. 141
Figure 34 : Etude du métabolisme des amanitines *in vitro*.. 142
Figure 35 : Mesure des ROS mitochondriaux induits par les amanitines.. 143

INTRODUCTION

I. La fonction hépatique

Le foie est un des organes les plus polyvalents et les plus complexes de l'organisme. En effet, il assure de nombreuses fonctions indispensables à la vie. Parmi celles-ci figurent l'homéostasie glucido-lipidique, la synthèse des acides aminés et des protéines sanguines, la production de bile et le métabolisme de substances endogènes ou de xénobiotiques. Par ailleurs, il est le siège de réactions immunitaires complexes. L'ensemble de ces fonctions suit une régulation fine, lui conférant une capacité d'adaptation aux nombreux éléments qu'il rencontre, qu'ils soient d'origine alimentaire ou non.

A. Le foie, généralités

Le foie est l'organe le plus important de la cavité abdominale, représentant environ 2 à 3% du poids du corps (Abdel-Misih et Bloomston 2010). Situé sous l'hémi-thorax droit et ainsi protégé par la cage thoracique, il est divisé en deux hémi-foie : le foie droit vascularisé par la branche porte droite et le foie gauche vascularisé par la branche porte gauche. La capsule de Glisson, mince capsule fibreuse, entoure son parenchyme.

D'un point de vue microscopique, cet organe est constitué d'unités fonctionnelles, appelées lobules, contenant chacune en son centre une artère, une veine porte, une ou des voies biliaires et, à sa périphérie, un drainage veineux par une veine hépatique ou une branche de veine hépatique ; ces éléments constituent la triade portale (Figure 1) (Lafortune et al. 2007).

La population cellulaire hépatique est principalement composée d'hépatocytes (60%) mais on y retrouve également des cellules endothéliales, des cellules de Küpffer (macrophages intrahépatiques), des cellules de l'épithélium biliaire (cholangiocytes), des cellules étoilées (de Ito), des cellules dendritiques et des lymphocytes intrahépatiques.

Ces cellules non parenchymateuses interagissent entre elles et avec les hépatocytes *via* des médiateurs solubles et par contact direct. Chaque type cellulaire joue un rôle spécifique, non seulement dans la physiologie hépatique mais également dans l'initiation et la chronicité des lésions de cet organe.

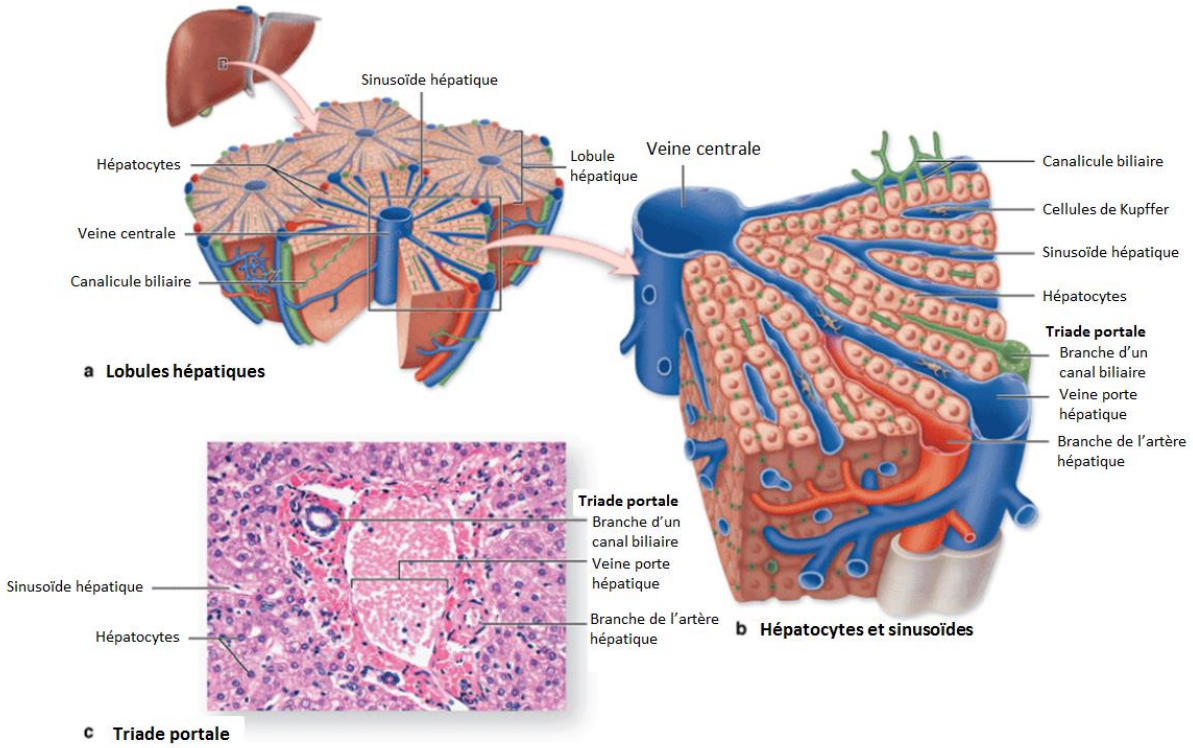


Figure 1: Anatomie générale du foie illustrant (a) les lobules hépatiques (b) la structure des hépatocytes et sinusoïdes hépatiques et (c) l'histologie de la triade portale (Stenvall et al. 2014).

Situé entre le système veineux gastro-intestinal et systémique, le foie reçoit 75% de son apport sanguin de l'intestin et de la rate *via* la veine porte (Figure 2). Ainsi, l'afflux sanguin provenant d'abord des veines mésentériques puis de la veine porte, passe directement dans le foie avant de rejoindre la circulation générale. Ce processus permet à toutes les molécules absorbées, d'origine alimentaire ou non, de subir un premier passage hépatique (Figure 2). Le foie peut ainsi assurer d'une part le déclenchement d'une réponse inflammatoire et/ou immunitaire en réponse à un danger provenant du tractus digestif, et d'autre part la détoxification des xénobiotiques.

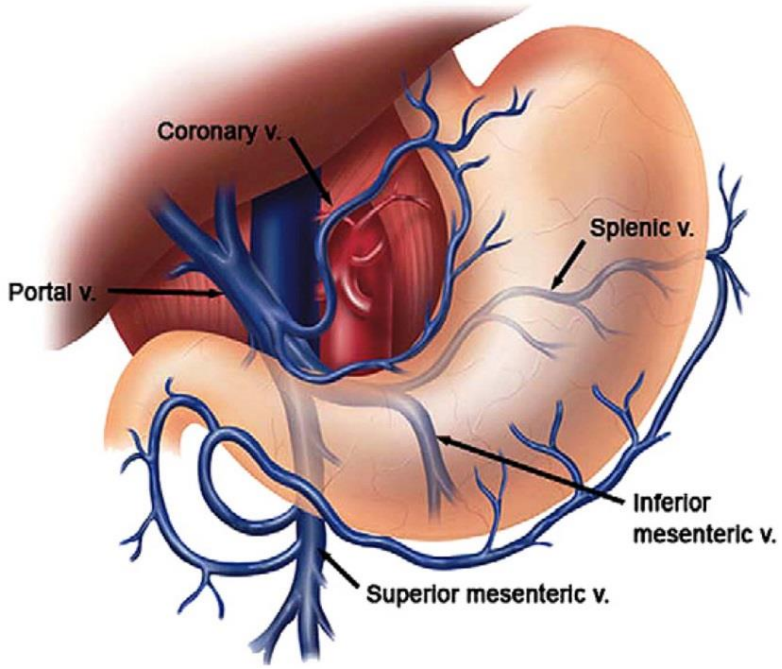


Figure 2 : Système porte et vascularisation veineuse d'entrée hépatique. Les molécules absorbées au niveau gastro-intestinal sont emmenées vers le foie par les veines mésentériques inférieures (inferior mesenteric V.) et supérieures (superior mesenteric v.), qui se rejoignent pour former la veine porte (Portal V.) (Abdel-Misih et Bloomston 2010).

B. Le foie, un organe du système immunitaire

Du fait de sa position particulière mentionnée ci-dessus, le foie est continuellement exposé aux antigènes alimentaires, à ceux provenant de la flore intestinale, ainsi qu'à d'éventuels micro-organismes pathogènes et autres xénobiotiques. Par conséquent, il est le siège de mécanismes immunitaires complexes, permettant le maintien d'une tolérance immunitaire envers les antigènes intestinaux, tout en étant capable de déployer une réponse efficace contre les agresseurs pathogènes (Lapierre et Alvarez 2007). Au sein de cette organisation, l'immunité innée joue un rôle prépondérant, orchestrant les premières étapes de la réponse immunitaire.

1. Cellules impliquées

L'immunité innée est un système de défense de l'organisme réagissant de manière immédiate contre les pathogènes et autres signaux de danger. Il s'oppose à l'immunité adaptative, qui permet une réponse plus tardive, ciblée et durable dans le temps, notamment par la synthèse d'anticorps spécifiques.

Les acteurs de la réponse immune innée sont nombreux. Cependant, les monocytes circulants et les macrophages tissulaires, appartenant au système phagocytaire, apparaissent comme des acteurs primordiaux. Les monocytes se développent à partir d'une cellule souche hématopoïétique dans la moelle osseuse. En réponse à divers signaux, dont le Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF), cette cellule progénitrice se différencie en précurseurs myéloïdes (appelés GM-CFU pour Granulocyte/Macrophage Colony-Forming Units), qui se différencient à leur tour en monoblastes, pro-monocytes et finalement en monocytes relâchés dans la circulation sanguine (Figure 3) (Mosser et Edwards 2008).

La migration des monocytes du sang vers les différents tissus, grâce à des adhérences à l'endothélium vasculaire, permet la différenciation en macrophages.

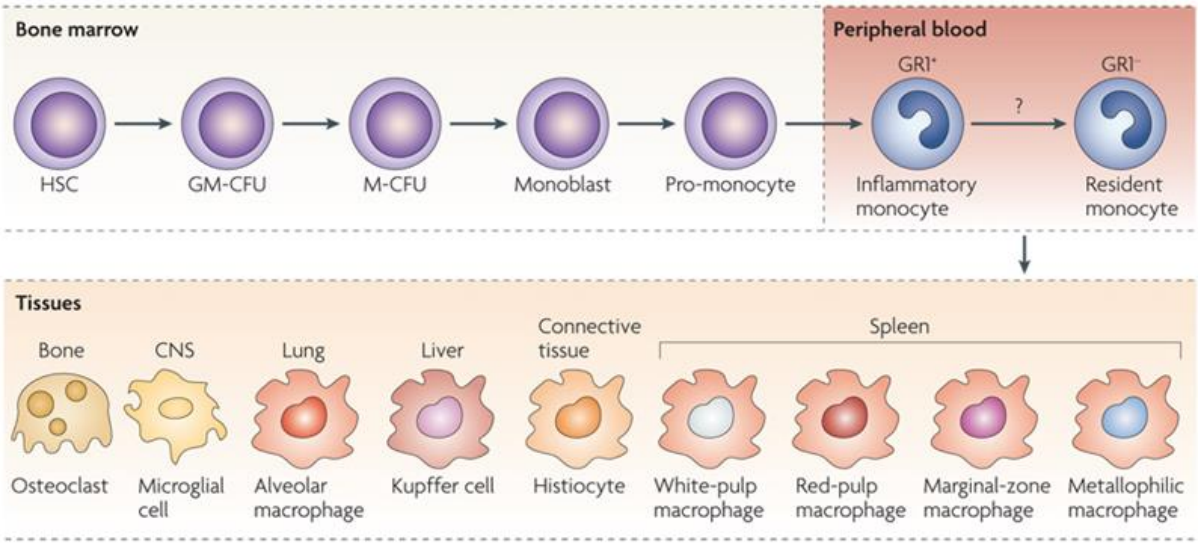


Figure 3 : Origine et différenciation des macrophages selon les tissus de destination (Mosser et Edwards 2008)

En fonction du tissu de résidence du macrophage et de la présence de médiateurs, les macrophages vont se différencier de manière spécifique. On différencie ainsi les ostéoclastes dans l'os, les cellules de la microglie dans le système nerveux central, les macrophages alvéolaires dans les poumons, les histiocytes dans le tissu conjonctif, les différents macrophages spléniques dans la rate et les cellules de Küpffer dans le foie.

Bien qu'un dogme ait longuement persisté quant à l'origine des macrophages par infiltration de monocytes, Jenkins et al. (2011) ont également montré que ces cellules étaient capables de proliférer rapidement au sein des tissus, notamment en réponse à des signaux inflammatoires de type Th-2 (Jenkins et al. 2011).

Les cellules de Küpffer, situées dans la lumière des sinusoïdes hépatiques (Figure 4), sont impliquées dans la réparation tissulaire, la phagocytose des pathogènes provenant du système porte, l'angiogenèse ou encore la résolution de l'inflammation (Dixon et al. 2013). Lors de leur activation, la réponse immunitaire innée est initiée, entrainant une augmentation de l'activité phagocytaire, et une production de cytokines pro-inflammatoires comme le Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α), l'interleukine-6 (IL-6), l'interleukine-1α (IL-1α) et l'interleukine-1β (IL-1β), ainsi qu'une faible production de cytokines anti-inflammatoire comme l'interleukine 10 (IL-10) (Mantovani et al. 2004).

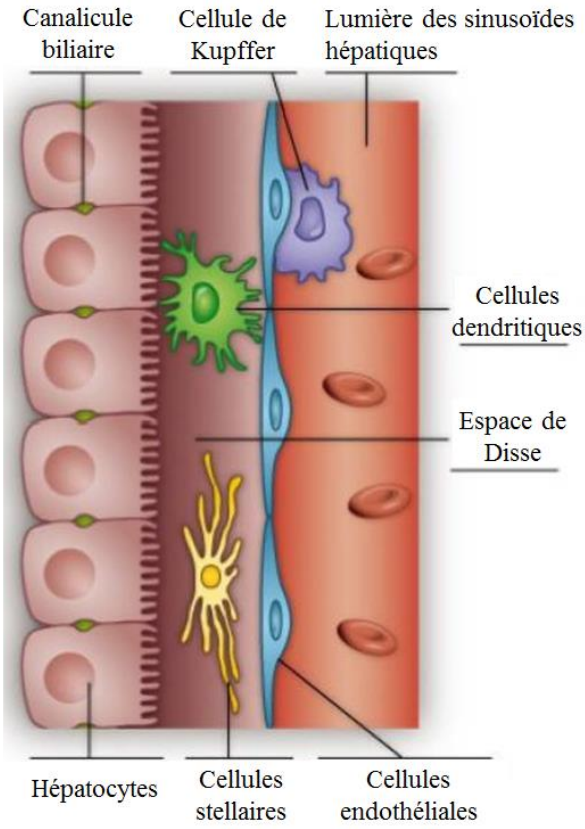


Figure 4 : Représentation de la localisation des populations cellulaires au sein du foie : cellules stellaires et cellules dendritiques situés dans l'espace de Disse, hépatocytes, canalicules biliaires, cellules endothéliales et cellules de Küpffer. Adapté de Bhatia et al. 2014.

2. Cytokines pro-inflammatoires

On appelle cytokines pro-inflammatoires les cytokines pouvant induire une réaction inflammatoire locale et systémique (Brouckaert et al. 1993). Ces dernières ayant un rôle important dans l'adhérence à l'endothélium, le chimiotactisme, la phagocytose et les phénomènes lytiques, elles nous intéressent particulièrement dans l'étude des macrophages. Comme mentionné précédemment, ces cellules phagocytaires sécrètent lors de leur activation des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, l'IL-1α et l'IL-1β (Mantovani et al. 2004).

L'IL-6 est une cytokine jouant des rôles multiples au niveau systémique, à savoir la thermorégulation, ou la production de protéines de la phase aigüe de l'inflammation par les hépatocytes comme la protéine C réactive (CRP), le fibrinogène, l'haptoglobine, ou la sérum amyloïde A (Castell et al. 1988). Lors de l'activation de l'immunité innée, la sécrétion rapide de ce pyrogène va ainsi induire une inflammation, permettant d'alarmer l'organisme et de déclencher l'élimination des pathogènes.

L'IL-1α est une cytokine pro-inflammatoire appartenant à la famille des alarmines. Elle est notamment impliquée dans les processus inflammatoires stériles comme la polyarthrite rhumatoïde ou le psoriasis (Rider et al. 2013). Bien que l'IL-1α se fixe sur le même récepteur que l'IL-1 β, leurs processus de production sont différents (Rabolli et al. 2014). En effet, contrairement à l'IL-1β qui nécessite l'implication de l'inflammasome NLRP3 pour son activation, l'IL-1α n'a pas besoin d'être clivée pour être active, même si son clivage par la calpaïne permet d'augmenter sa puissance (Dinarello 2011).

L'IL-1β est une puissante cytokine pro-inflammatoire majeure intervenant dans la réponse inflammatoire et immunitaire. Son implication est notamment retrouvée dans la réponse aux agents infectieux, les maladies dégénératives et la réparation tissulaire (Dinarello 2010). Cette cytokine est majoritairement produite par les monocytes ou les macrophages. La libération de cette cytokine dans l'espace extracellulaire est responsable de l'initiation et de l'amplification de multiples réponses immunitaires et inflammatoires (Dinarello 1996). En effet, par fixation sur les récepteurs IL-1R1, l'IL-1β induit, entre autre, la synthèse de chimiokines et de molécules d'adhérence par les cellules endothéliales, et la synthèse de CRP par les hépatocytes. En résulte un recrutement massif de leucocytes sur le lieu de l'inflammation et/ou le déclenchement d'une hyperthermie au niveau cérébral (Sims et Smith 2010; Garlanda et al. 2013). Parmi les mécanismes modulant l'activation des récepteurs IL-1R1 par ses agonistes, il est intéressant de citer l'IL-1RA, un antagoniste naturel de ces récepteurs permettant de freiner le déclenchement des réactions inflammatoires (Netea et al. 2015).

Du fait de son pouvoir pro-inflammatoire, la production d'IL-1β est très finement régulée afin de protéger l'organisme de ces propriétés. Ainsi, trois étapes de régulation sont décrites dans la littérature. La première étape correspond à la transcription de l'ARNm de la pro-IL-1β, et doit être stimulée par un signal pro-inflammatoire. La seconde étape nécessite le clivage de la

pro-IL-1β inactive en IL-1β active par la caspase-1. Enfin, la troisième étape correspondant à sa libération (Eder 2009). En 2003, la découverte des mécanismes d'activation de la caspase-1 mettent à jour l'inflammasome NLRP3, indispensable à l'activation de l'IL-1β.

3. Les inflammasomes

Les inflammasomes sont des complexes moléculaires intracytoplasmiques faisant partie des récepteurs de l'immunité innée, appelés Pattern Recognition Receptors (PRRs). Ils permettent la reconnaissance de composés d'origine pathogène, appelés « Pathogen associated molecular patterns » (PAMPs), ou des molécules de danger, appelés « Danger associated molecular patterns » (DAMPs).

Les inflammasomes sont majoritairement composés de trois éléments : une protéine senseur, une protéine adaptatrice « apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase-recruitment domain » (ASC) et une caspase pro-inflammatoire, la caspase 1 (Schroder et Tschopp 2010).

L'assemblage de ces inflammasomes en réponse à ces DAMPs et PAMPs permet l'activation de la caspase-1, pouvant alors cliver les pro-IL-1β et pro-IL-18 inactives en IL-1β et IL-18 actives. En plus d'activer la sécrétion rapide de ces interleukines, une hyper-activation des inflammasomes peut aussi déclencher une pyroptose, mort cellulaire permettant de freiner la réplication des pathogènes intracellulaires (Miao et al. 2011).

La famille des NOD-like receptor, pour « nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing receptor » (NLR), est une famille de protéines senseurs formant des inflammasomes (Ting et al. 2008). Vingt-deux gènes de ces NLRs ont été identifiés chez l'homme, permettant de les classer et de les nommer selon la structure de leurs domaines.

Tous les NLRs contiennent un domaine NACHT central et un domaine de répétition riche en leucine « leucine-rich repeat » (LRR) en C-terminal, à l'exception de NLRP10. Leur classification se fait alors par leurs domaines N-terminaux.

Ces derniers peuvent contenir un domaine CARD (Caspase Activation and Recruitment Domain), donnant naissance à la famille NLRC, ou un domaine PYD (Pyrin Domain), formant la famille NLRP (Figure 5). Les domaines CARD permettent le recrutement direct de la caspase-1 alors que les domaines PYD nécessitent une protéine adaptatrice ASC (de Zoete et al. 2014).

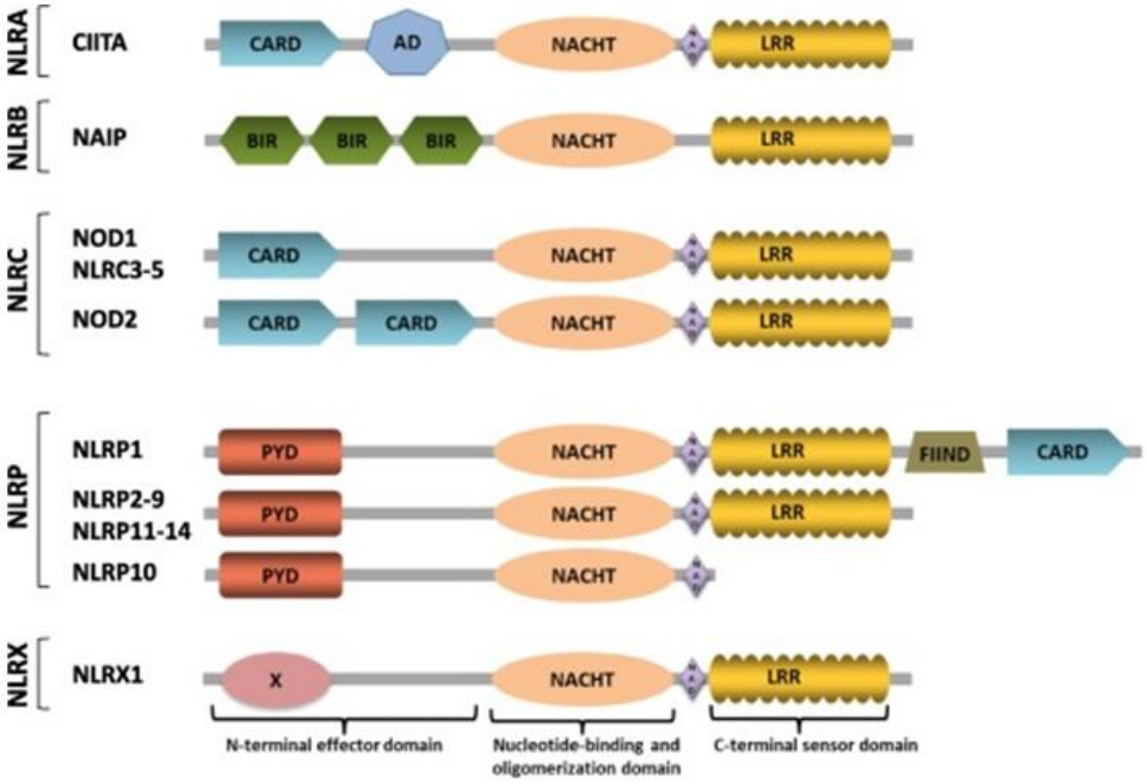


Figure 5 : Classification des inflammasomes de la famille de NLR (Awad et al. 2018)

En plus des NLRs, on retrouve les familles ALR pour « AIM2-like receptor » et RLR pour « RIG-I-like receptor » pouvant provoquer l'assemblage des inflammasomes (Ireton et Gale Jr. 2011; Schattgen et Fitzgerald 2011).

4. L'inflammasome NLRP3

Parmi les inflammasomes, la protéine NLRP3 est la plus étudiée. Comme sa nomenclature l'indique, cette protéine contient un domaine PYD, nécessitant l'intervention d'une protéine adaptatrice ASC pour activer la caspase-1 (Figure 6).

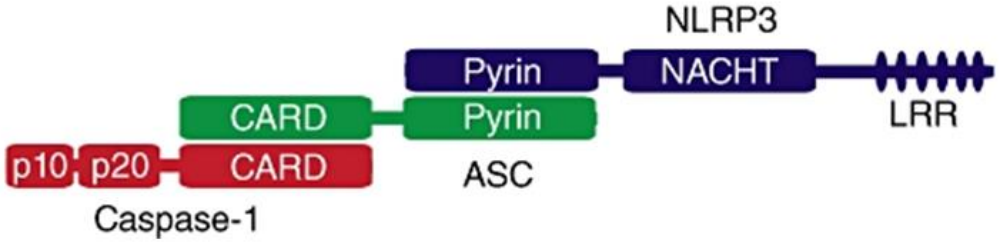


Figure 6 : Structure de l'inflammasome NLRP3 (Menu et Vince 2011)

Lors de son activation, l'inflammasome NLRP3 s'oligomérise grâce à des interactions entre les domaines NACHT, permettant la présentation de son domaine PYD au domaine PYD de la protéine ASC (Dinarello 2007). Cette dernière permet le recrutement et l'autocatalyse de la pro-caspase-1, *via* l'interaction de leurs domaines CARD respectifs. Cette oligomérisation est décrite comme une plateforme intra-cytoplasmique de haut poids moléculaire (Martinon et al. 2002) (Figure 7).

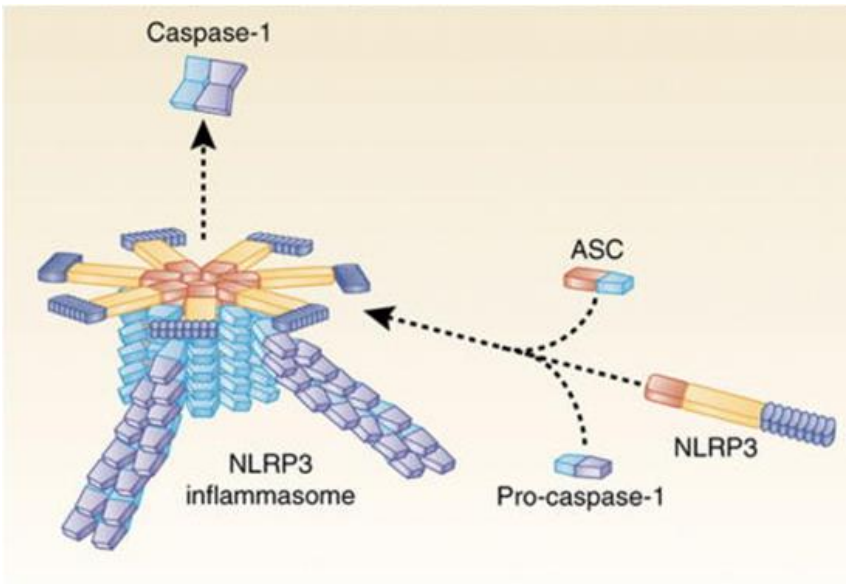


Figure 7 : Structure d'assemblage de l'inflammasome NLRP3 (Guo et al. 2015)

La caspase-1 est une cystéine protéase permettant le clivage de la pro-IL-1β inactive en IL-1β active. Cette cytokine peut alors être libérée dans l'espace extracellulaire (Cerretti et al. 1992; Thornberry et al. 1992). Une autre cytokine, la pro-IL-18, a également été décrite comme clivée par la caspase-1 (Gu et al. 1997).

a) Activation de l'inflammasome NLRP3

Pour être actif dans les macrophages, l'inflammasome NLRP3 nécessite deux signaux. Le premier signal, appelé pré-activation ou « priming », permet d'induire l'expression de la pro-IL-1β et de la protéine NLRP3. Le second signal permet l'assemblage du complexe inflammasome, capable d'activer la pro-IL-1β en IL-1β active.

a. Pré-activation de l'inflammasome NLRP3

La protéine NLRP3 est exprimée à faible niveau dans les cellules myéloïdes, mais son expression peut être induite par des agonistes des Toll-like receptors (TLRs), récepteurs de l'immunité innée présents au niveau de la membrane plasmique et des endosomes.

Le lipopolysaccharide (LPS), composant essentiel de la face externe de la membrane des bactéries à Gram négatif, ainsi que des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF-α, font partie de ces activateurs (Figure 8). Cependant, ce premier signal ne permet que d'augmenter la production de pro-IL1β et n'est pas suffisant pour activer la sécrétion d'IL-1β actif des macrophages.

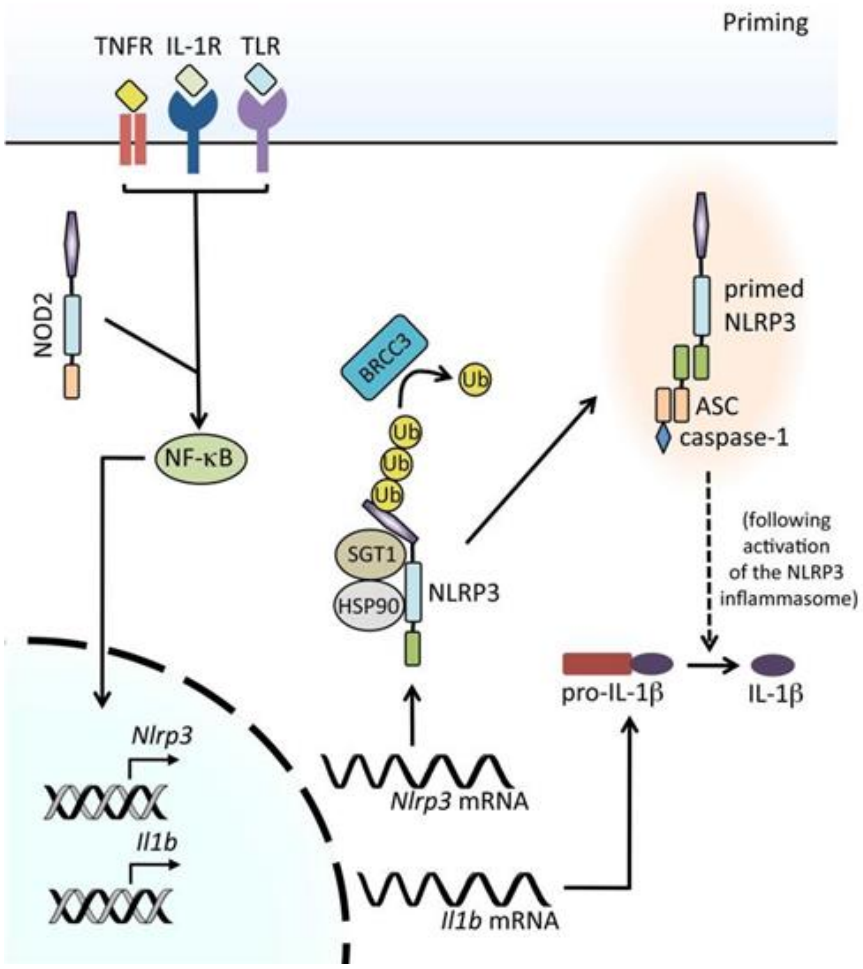


Figure 8 : Pré-activation de l'inflammasome NLRP3 par des agonistes des TLRs (Sutterwala et al. 2014)

b. Activation de l'inflammasome NLRP3

Le second signal permettant l'assemblage du complexe inflammasome NLRP3 peut être provoqué par de nombreux activateurs. Ces signaux incluent des PAMPs et toxines bactériennes (Mariathasan et al. 2006; Duncan et al. 2009; Shimada et al. 2011), virus (Allen et al. 2009), champignons (Gross et al. 2009) et protozoaires (Tiemi Shio et al. 2009) mais également de nombreux signaux de danger (DAMPs) comme l'ATP, la nigéricine, et les cristaux de cholestérol, de silice ou d'acide urique (Jo et al. 2016).

La diversité de ces signaux rend peu probable le fait que ces différents acteurs activent directement l'inflammasome NLRP3. Ainsi, l'état actuel des connaissances s'accorde sur le fait que ces différents signaux convergent vers des voies communes de signalisation.
Trois principaux modèles ont ainsi été proposés concernant l'activation de l'inflammasome NLRP3 : Le modèle du flux ionique, des espèces réactives de l'oxygène (ROS), et de la rupture lysosomale.

Dans le modèle du flux ionique, les variations de concentrations de divers cations, comme le K^+, le Ca^{2+} et le H^+, ont été proposés comme élément activateur de l'inflammasome NLRP3. Plusieurs activateurs ont en effet montré une induction de puissants flux ioniques. L'ATP extracellulaire active les récepteurs purinergiques P2X7 et provoque un efflux potassique (Franchi et al. 2007; Pétrilli et al. 2007) tandis que la nigéricine crée des pores potassiques dans la membrane cellulaire (Mariathasan et al. 2006). La protéine du virus de l'influenza M2 a été montrée comme provoquant un efflux d'ions H^+ de l'appareil de Golgi vers le cytosol (Ichinohe et al. 2010). Enfin, une forte concentration extracellulaire de Ca^{2+} provoque une augmentation des concentrations cytosoliques de Ca^{2+} et d'AMPc également responsable de l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Lee et al. 2012; Murakami et al. 2012; Rossol et al. 2012) (Figure 9). Cependant, les flux ioniques peuvent provoquer l'activation d'autres inflammasomes et ne constituent donc pas un signal spécifique de NLRP3 (Lamkanfi et Dixit 2012).

Le stress oxydant, sous la forme des ROS est fortement impliqué dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 du fait des nombreux acteurs responsable de leur formation, incluant l'ATP, les cristaux d'alun ou d'acide urique (Schroder et Tschopp 2010). Une étude suggère que des quantités accrues de ROS provoquent la fixation de la thioredoxin (TRX)-interacting protein à l'inflammasome NLRP3, provoquant son activation (Zhou et al. 2010). La source principale de ROS étant la mitochondrie, d'autres études rapportent que l'ADN mitochondrial oxydé et relargué lors d'un dysfonctionnement mitochondrial peut activer de manière directe l'inflammasome NLRP3 (Nakahira et al. 2011; Shimada et al. 2012). Par ailleurs, la cardiolipine mitochondriale, phospholipide de la paroi interne des mitochondries, a été démontrée comme activateur de l'inflammasome NLRP3 (Iyer et al. 2013). Cependant, l'état actuel des connaissances ne permet pas d'affirmer clairement la part mitochondriale ROS dépendant ou indépendant dans ce phénomène (Figure 9).

Dans le modèle de rupture lysosomale, la phagocytose de cristaux ou grosses particules comme les cristaux d'acide urique, d'alun, de silice, ou de β-amyloïde serait responsable d'une production de ROS, un efflux potassique, et une déstabilisation du phagosome associée à la rupture du lysosome (Pétrilli et al. 2007; Martinon et al. 2009). Le relargage du contenu du lysosome dans le cytoplasme, contenant des protéases lysosomales comme la cathepsine B, est associé à l'activation de la caspase-1 (Hornung et al. 2008) (Figure 9).

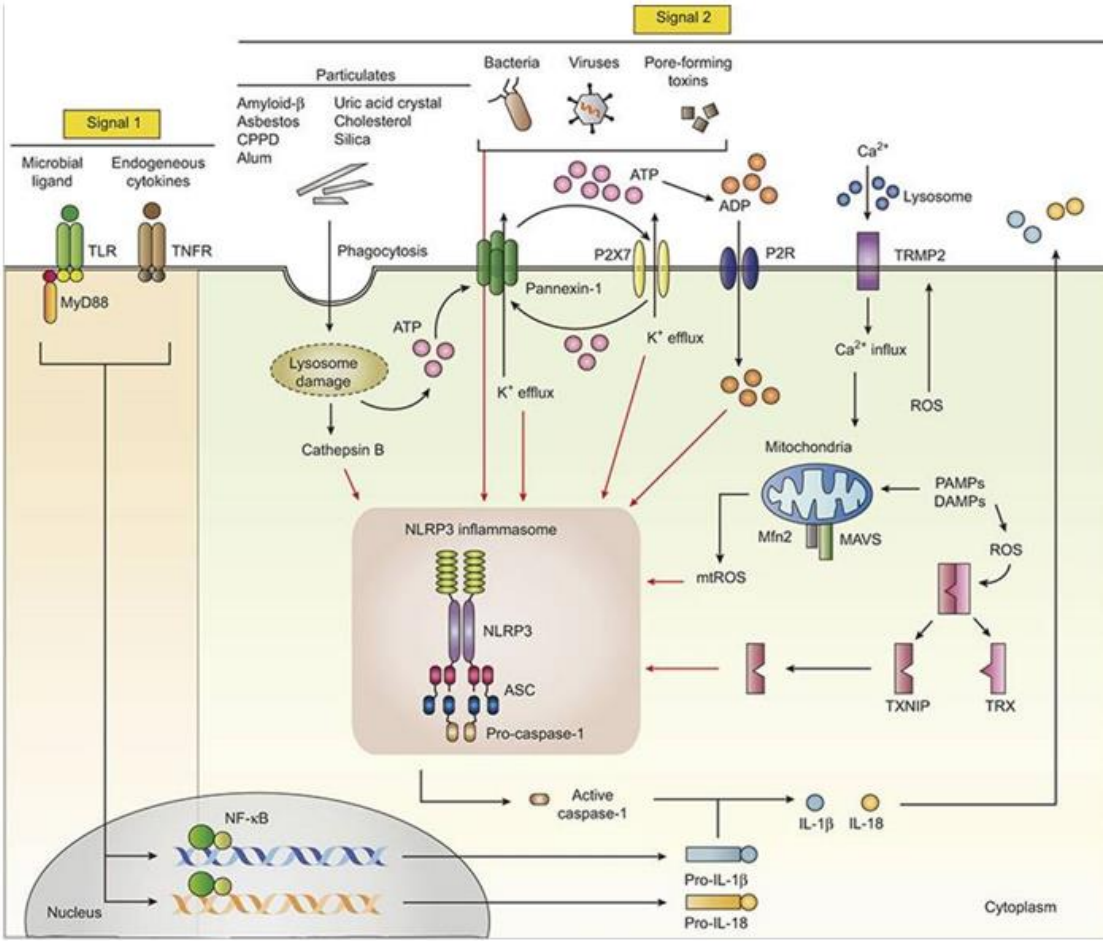


Figure 9 : Mécanismes moléculaires régulant l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Jo et al. 2016)

b) Pathologies associées

Au-delà de son rôle protecteur dans les réponses aux pathogènes, des mutations activatrices de l'inflammasome NLRP3 peuvent mener à des pathologies comme les syndromes périodiques associés à la cryopyrine (CAPS) (Hoffman et al. 2001). La protéine NLRP3 mutée résultante déclenche l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 et le clivage de la pro-IL-1β en réponse à des stimuli normalement insuffisants pour déclencher cette activation (Meng et al. 2009).

Ces CAPS regroupent le syndrome de Muckle-Wells, le syndrome inflammatoire automatique froid familial (FCAS/FCU) et le syndrome chronique infantile neurologique, cutané et articulaire (CINCA)/maladie systémique inflammatoire à début néo-natal (NOMID) (Aksentijevich et al. 2002).

Les traitements de fond actuellement sur le marché dans l'indication des CAPS regroupent notamment l'anakinra (KINERET®) et le canakinumab (ILARIS®), respectivement IL-1RA synthétique et anticorps monoclonal neutralisant l'IL-1β extracellulaire. Le traitement des crises repose quant à lui sur l'utilisation d'anti-inflammatoires non stéroïdiens et de corticoïdes dans le but de diminuer l'intensité des symptômes et la durée des crises (Kuemmerle-Deschner 2015).

De manière similaire, l'hyper-activation de l'inflammasome NLRP3 est impliquée dans de nombreuses pathologies comme l'athérosclérose, le diabète, la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique ou la goutte (Wen et al. 2011; Nurmi et al. 2013; de Zoete et al. 2014).

c) L'inflammasome NLRP3 comme cible thérapeutique

Considérant son implication dans les maladies inflammatoires, l'inflammasome NLRP3 est la cible d'inhibiteurs, actuellement en développement. Dans un modèle d'Alzheimer murin, l'administration de JC-124, un inhibiteur de l'inflammasome NLRP3, a montré une réduction des dépôts de β-amyloïde, encourageant le développement de cette cible comme traitement anti-Alzheimer (Yin et al. 2018).

L'inhibiteur CY-09 a montré des résultats très encourageants dans la prévention de la mortalité néonatale de modèles murins atteints de CAPS ainsi que dans le traitement des désordres métaboliques (résistance à l'insuline, méta-inflammation et hyperglycémie) de souris diabétiques (Jiang et al. 2017a). D'autres inhibiteurs ont également montré une réduction de l'inflammation colique et de la neuroinflammation (Perera et al. 2018; Xu et al. 2018).

De vieilles molécules comme la colchicine ou les statines se sont également révélées inhibitrices de l'inflammasome NLRP3, ouvrant de nouvelles perspectives d'indications thérapeutiques dans l'inhibition de l'inflammation associée à l'athérosclérose (Dalbeth et al. 2014; Stack et al. 2015; Wang et al. 2017; Martínez et al. 2018).

Récemment, des études de conception moléculaire structurelle ont montré que les analogues du benzène sulfonamide présentaient une activité inhibitrice de l'inflammasome NLRP3, encourageant leurs développements comme potentiels candidats médicaments (Fulp et al. 2018).

La recherche de nouvelles thérapeutiques anti-inflammatoires s'oriente également vers un blocage d'autres signaux d'activation de l'inflammasome NLRP3. Comme mentionné précédemment, les récepteurs purinergiques font partie des acteurs importants dans l'activation de cet inflammasome. Ainsi, l'exploration de la voie NLRP3-récepteurs purinergiques et le blocage de celle-ci ouvre des perspectives thérapeutiques encore balbutiantes.

5. Récepteurs purinergiques

Les récepteurs purinergiques sont des récepteurs aux nucléotides extracellulaires, situés au niveau membranaire de la cellule. Ils sont présents de manière ubiquitaires, même si chaque sous-type de ces récepteurs possède une localisation préférentielle (Surprenant et North 2009).

a) Classification

Les récepteurs purinergiques sont classés en deux familles selon des critères génétiques et pharmacologiques : Les récepteurs P1, qui sont sélectifs de l'adénosine, et les récepteurs P2, activés par les nucléotides, majoritairement ADP et ATP (Ralevic et Burnstock 1998). Une sous classification des récepteurs P2 sépare les récepteurs P2Y comme récepteurs métabotropes couplés à la protéine G, et les récepteurs P2X comme récepteurs canaux ionotropes (Figure 10) (Abbracchio et Burnstock 1994).

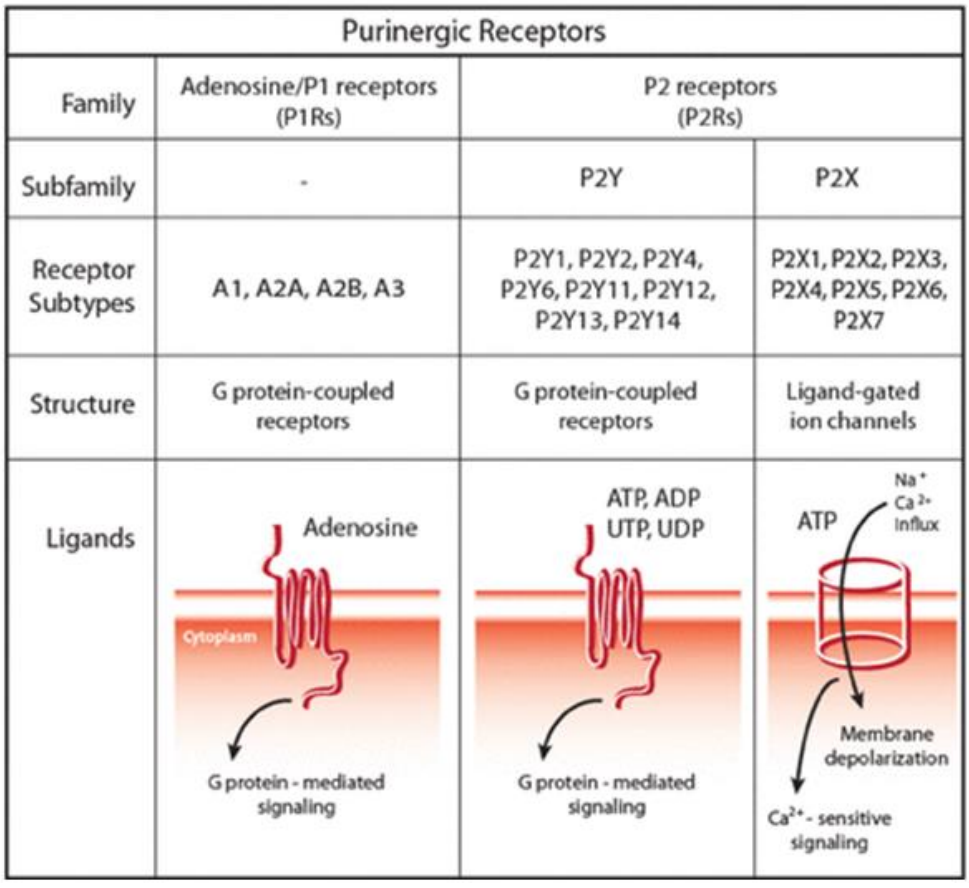


Figure 10 : Classification des récepteurs purinergiques (Rossi et al. 2012)

b) Les récepteurs P2

a. Les récepteurs P2Y

Les récepteurs P2Y sont divisés en 8 sous-types ($P2Y_{1\text{-}2\text{-}4\text{-}6\text{-}11\text{-}12\text{-}13\text{-}14}$), et sont tous couplés aux protéines G. Ces récepteurs peuvent être activés par de nombreux ligands nucléotidiques comme l'ATP, l'ADP, l'UTP, l'UDP ou l'UDP-glucose, et exercent des rôles très variés en fonction de leurs localisations cellulaires (Rossi et al. 2012).

Les récepteurs P2Y1 sont impliqués dans la vasodilatation et la prolifération des cellules endothéliales (Burnstock et al. 2012). Les récepteurs P2Y2 jouent quant à eux un rôle important dans la neuro-protection et l'activation de la réponse immunitaire innée (Weisman et al. 2012).

Par ailleurs, les récepteurs P2Y12 (Figure 11) exercent un rôle important dans l'activation plaquettaire, tandis que les récepteurs P2Y13 seraient impliqués dans la régulation du métabolisme du cholestérol et du glucose, dans l'homéostasie osseuse, la neuro-protection et la transmission de la douleur (Cunningham et al. 2013). Enfin, les récepteurs P2Y14, principalement présents dans le tissu adipeux, jouent un rôle dans les fonctions neuro-immunes et le chimiotactisme (Burnstock et al. 2012).

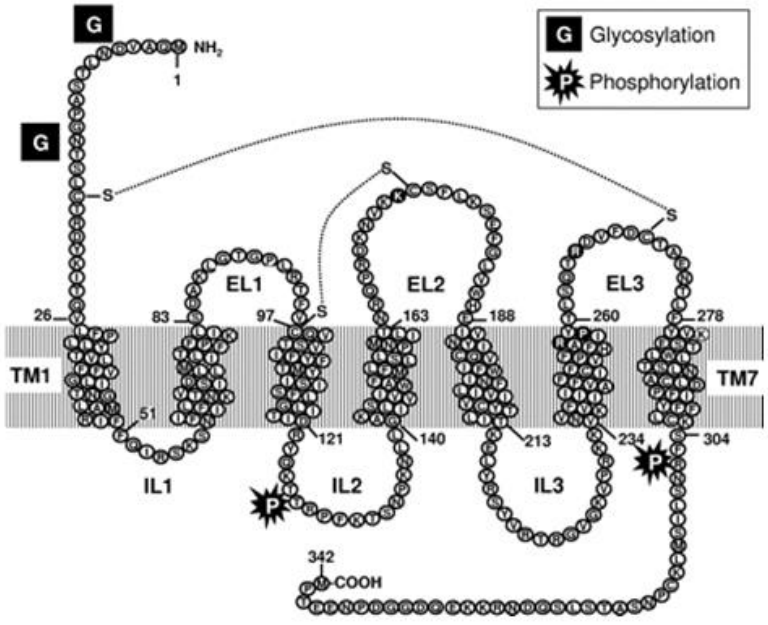


Figure 11 : Représentation schématique du récepteur P2Y12 (Cattaneo 2011)

b. Les récepteurs P2X

Les récepteurs purinergiques P2X sont des récepteurs canaux divisés en 7 sous-types ($P2X_{1-7}$), et dont l'ATP est le seul ligand physiologique (Rossi et al. 2012) (Figure 12). Ces sept sous types comprennent entre 379 et 595 acides aminés, partageant 35 à 54% d'homologie de séquence (Kaczmarek-Hájek et al. 2012).

Les récepteurs canaux P2X fonctionnels sont des homo-multimères ou hétéro-multimères formés par l'association d'au moins trois sous-unités (Burnstock et al. 2012). Ainsi, il a été montré par des études de co-immunoprécipitation que les récepteurs P2X4 et P2X7 pouvaient s'associer en hétéro-trimères (Nicke et al. 2005). Par ailleurs, au moins trois molécules d'ATP doivent se fixer sur la partie extracellulaire de ces récepteurs afin de les activer (Jarvis et Khakh 2009).

Lors d'une stimulation prolongée par l'agoniste, les P2R peuvent augmenter leur perméabilité par changement conformationnel et former un canal cationique non sélectif permettant le passage aux ions de grande taille (Khakh et al. 1999).

L'activation des récepteurs P2X peut être suivie d'une période réfractaire, ou de désensibilisation. Ainsi, un regroupement des récepteurs P2X est classiquement réalisé en fonction de l'affinité des agonistes et de la capacité de désensibilisation. Les récepteurs P2X7 sont les seuls à montrer une très faible désensibilisation et une faible affinité pour l'ATP (Burnstock et al. 2012).

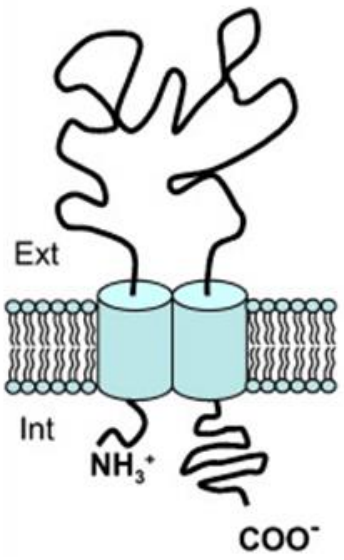


Figure 12 : Représentation schématique d'une sous unité d'un récepteur P2X (Schlichter 2008)

A l'instar des récepteurs P2Y, les PXR exercent des rôles très variés en fonction de leurs localisations cellulaires et de la nature des trimères formés. Le récepteur P2X1 est impliqué dans la contraction du muscle lisse, et l'activation plaquettaire tandis que P2X2R et P2X3R sont impliqués dans la signalisation de la douleur, et les neurotransmissions intestinales ou cérébrales (Kaczmarek-Hájek et al. 2012).

Parmi les P2XR, les récepteurs P2X1, P2X4 et P2X7 sont les plus exprimés chez les macrophages, et constituent donc des cibles privilégiées dans l'étude des récepteurs purinergiques dans cette population cellulaire (Gicquel et al. 2015). De plus, les deux récepteurs les plus impliqués dans l'immunité innée et la réponse inflammatoire sont les P2X4R et les P2X7R (Surprenant et North 2009).

L'objet du travail présenté dans le chapitre 1 de ce manuscrit étant porté sur les macrophages, seules les fonctions des récepteurs purinergiques exprimés chez cette population cellulaire seront présentées.

Dans la réponse inflammatoire, le récepteur P2X1 est principalement impliqué dans le chimiotactisme et la motilité cellulaire (Lecut et al. 2009). Par ailleurs, ce récepteur pouvant former des hétéromères avec les récepteurs P2X4, il devient particulièrement intéressant dans l'étude des récepteurs purinergiques au sein des populations cellulaires du système immunitaire (Nicke et al. 2005).

Comme mentionné précédemment, les récepteurs P2X4 peuvent se polymériser avec d'autres sous-unités de P2XR, donnant des homo ou hétéro-trimères (Guo et al. 2007; Burnstock et al. 2012). Après stimulation par l'ATP, le récepteur P2X4 forme un canal perméable aux ions Ca^{2+} et K^+. Du fait de la diminution de concentration intracellulaire de K^+ qu'il entraine, ainsi que l'activation de la sécrétion d'IL-1β, ce récepteur jouerait un rôle dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Seil et al. 2010). Une étude de Sakaki H et al. (2013) suggère d'ailleurs que le récepteur P2X4 est nécessaire pour la sécrétion d'IL-1β dépendante de P2X7R dans des cellules dendritiques de moelle osseuse de souris (Sakaki et al. 2013). Au sein des macrophages, P2X4R est principalement impliqué dans la modulation de l'inflammation bien qu'il soit impliqué dans les douleurs neuropathiques chroniques et le contrôle de la contraction cardiaque dans d'autres types cellulaires (Kaczmarek-Hájek et al. 2012; Suurväli et al. 2017).

Le récepteur P2X7 est le mieux décrit des récepteurs P2XR, notamment pour son rôle dans la régulation des réponses immunitaires innées et adaptatives. Ce récepteur est d'ailleurs retrouvé dans toutes les cellules du système immunitaire, notamment les macrophages (Burnstock et Knight 2018). De nombreuses fonctionnalités lui sont attribuées, comme l'inflammation au travers du relargage de cytokines pro-inflammatoires (Kaczmarek-Hájek et al. 2012; Rissiek et al. 2015), la prolifération cellulaire (Monif et al. 2010), la migration et l'invasion (Qiu et al. 2014), le métabolisme des phospholipides (Amoroso et al. 2012), l'autophagie (Young et al. 2015), et la mort cellulaire (Massicot et al. 2013).

A l'instar de P2X4R, l'activation de P2X7 peut aboutir à la formation d'homo ou hétéro-trimères, formant un canal ionique permettant le passage d'ions et de molécules à poids moléculaire élevé (Khakh et Alan North 2006). Cependant, P2X7R peut également activer de nombreuses voies de signalisation intracellulaire comme l'activation de plusieurs kinases ou la génération de stress oxydant (Bradford et Soltoff 2002; Cruz et al. 2007). La fixation d'ATP stimulerait ainsi un efflux rapide potassique et la production de ROS, aboutissant notamment à l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Cruz et al. 2007; Abderrazak et al. 2015; Seeland et al. 2015).

c) Pathologies associées

De manière globale, décortiquer le rôle des récepteurs purinergiques a permis de mettre en évidence leur implication dans le développement de certaines pathologies. Récemment, les récepteurs P2Y6 ont été reliés au développement de la fibrose pulmonaire (Müller et al. 2017) et P2X7R a été incriminé dans la maladie de Parkinson, l'hypertension artérielle pulmonaire, la fibrose pulmonaire, les allergies, le diabète de type 2, ou encore la neuro-inflammation (Parvathenani et al. 2003; Riteau et al. 2010; Burnstock et Novak 2013; Miras-Portugal et al. 2017; Yin et al. 2017; Xu et al. 2018) .

En cancérologie, l'implication des récepteurs P2X7R, en particulier leur surexpression, est incriminée dans la physiopathologie des cancers du côlon, pancréas, œsophage, sein et prostate (Adinolfi et al. 2012; Ghalali et al. 2014; Giannuzzo et al. 2015; Tan et al. 2015; Qian et al. 2017; Santos et al. 2017). Egalement, une forte expression des récepteurs P2X7 semble constituer un marqueur de mauvais pronostic dans le cancer colorectal (Qian et al. 2017).

De manière intéressante, le foie synthétise la majorité des nucléotides de l'organisme (ATP, ADP, UTP, UDP). Ces derniers constituent ainsi des molécules clés de signalisation reconnus par les hépatocytes et impactant les processus métaboliques tels la sécrétion biliaire ou le métabolisme glucidique. Ces composés sont finement régulés, notamment par l'intermédiaire d'ectonucléotidases (ecto-ADPases, ecto-ATPases, etc…) (Burnstock et al. 2014).

En toute logique, des perturbations de cette signalisation sont susceptibles de provoquer des états inflammatoires, des dommages vasculaires ou une altération des processus de régénération hépatique (Burnstock et al. 2014) (Vaughn et al, 2012). Ainsi, l'éthanol ou le fructose ont été rapportés comme inducteurs de la sécrétion d'adénosine, impactant le métabolisme des lipides et étant pourvoyeur de stéatose hépatique (Burnstock et al. 2014).

d) Les récepteurs purinergiques P2 comme cible thérapeutique

L'identification du rôle de chaque sous type de récepteur purinergique et leur implication dans des processus physiopathologiques a permis le développement de médicaments actuellement sur le marché. Le clopidogrel, le prasugrel, ou le ticagrelor, antagonistes des récepteurs P2Y12, indiqués notamment dans la prévention des évènements thromboemboliques en post syndrome coronarien aigü, en sont l'exemple parfait (Kupka et Sibbing 2018). Le diquafosol, agoniste des récepteurs P2Y2 commercialisé en Asie, est quant à lui utilisé dans le traitement du syndrome de l'œil sec (Nakamura et al. 2012). En parallèle des médicaments ayant obtenu leur Autorisation de Mise sur le Marché, beaucoup de molécules ciblant les récepteurs purinergiques sont actuellement en développement.

Dans le domaine de la neurologie, la découverte du rôle de l'inflammation et des lésions associées au niveau neuronal et glial dans les maladies neurodégénératives, a conduit à tester des antagonistes de récepteurs purinergiques. Ainsi, des antagonistes de P2X7R ont montré des résultats encourageants dans la maladie de Parkinson tandis que le blocage des récepteurs P2X7, P2Y4 et P2Y1 semble prometteur dans le traitement de la maladie d'Alzheimer (Cunha 2016; Fathalla et al. 2016; Guzman et Gerevich 2016; Harmse et al. 2016; Woods et al. 2016; Metzger et al. 2017). En parallèle, l'intérêt des récepteurs purinergiques dans l'étude des pathologies neurologiques a guidé le développement de radioligands ciblant notamment P2X7R (Zheng 2020). Les récepteurs P2X3 montrent quant à eux un intérêt grandissant dans le traitement des migraines, et des douleurs neuropathiques (Cantin et al. 2012; Yegutkin et al. 2016).

L'arsenal thérapeutique des maladies cardiovasculaires présente également de potentiels nouveaux candidats médicaments ciblant les récepteurs purinergiques. Le A740003, antagoniste de P2X7R, réduit de manière expérimentale les symptômes de myocardite auto-immunes (Zempo et al. 2015). De manière similaire, la modulation des récepteurs purinergiques est fortement étudiée dans les pathologies respiratoires comme l'asthme, la broncho-pneumopathie chronique obstructive, la toux chronique et la fibrose pulmonaire (Burnstock 2017). Aucun domaine ne semble donc délaisser l'étude des récepteurs purinergiques, notamment aux vues des recherches dans les troubles génito-urinaires de l'homme incluant les troubles érectiles (Gur et al. 2007).

L'intérêt majeur de ces antagonistes semble toutefois se dessiner dans les nouvelles thérapeutiques des pathologies inflammatoires. En gastro-entérologie, l'antagoniste A438079 de P2X7R a montré une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires et une atténuation des colites chez la souris (Wan et al. 2016). Par ailleurs, P2X7R est surexprimé dans la muqueuse inflammée des patients atteints de maladie de Crohn.

Fort de ce constat, il n'est pas étonnant que l'AZD9056, un autre anti-P2X7R, se soit révélé efficace dans l'obtention de rémissions et l'augmentation du taux de réponse de patients atteints de maladie de Crohn (Neves et al. 2014; Eser et al. 2015). Au-delà des molécules antagonistes classiques en pharmacologie, des biothérapies ciblant ces récepteurs commencent à être utilisées. Le mAb12D4, un anticorps anti-P2X3 et P2X2/3 semble présenter des résultats intéressants dans un modèle d'hypersensibilité viscérale (Shcherbatko et al. 2016).

Au niveau hépatique, les hépatocytes, les cellules stellaires, les cholangiocytes et les cellules de Küpffer expriment des récepteurs purinergiques sur leur membrane plasmatique, rendant intéressant la modulation de ces derniers, en particulier dans des situations pathologiques (Kruglov et al. 2007). Les récepteurs purinergiques ont été montrés comme impliqués dans la fibrose hépatique, ou encore la stéatose hépatique alcoolique (Vaughn et al. 2012; Chandrashekaran et al. 2016) (Jiang et al. 2017b).

Dranoff et al. (2007) ont montré qu'un traitement par un antagoniste des récepteurs P2R inhibait la prolifération des cellules stellaires et prévenait le développement de la fibrose hépatique (Dranoff et al. 2007). Plus récemment, l'inhibition de l'axe P2X7R-NLRP3 par des extraits de *Pleurotus citrinopileatus* ou l'A804598, un antagoniste de P2X7R, se sont révélés diminuer la stéatohépatite alcoolique dans un modèle murin (Li et al. 2018; Freire et al. 2019).

Enfin, le leucodin, un sesquiterpène extrait de l'*Artemisia capillaris*, a montré une activité inhibitrice de l'accumulation lipidique hépatique d'origine alcoolique, par inhibition de l'axe P2X7R-NLRP3 (Shang et al. 2018).

6. Modulation de l'axe P2XR-NLRP3 par les xénobiotiques

Comme nous l'avons vu, certains xénobiotiques sont susceptibles de moduler l'axe P2X7R-NLRP3 tant vers l'inhibition que la stimulation. Dans ce contexte, l'étude des xénobiotiques activateurs permet d'élargir notre compréhension sur les mécanismes physiopathologiques des maladies inflammatoires, là où l'étude des xénobiotiques inhibiteurs a pour but de développer de nouvelles thérapeutiques à ces pathologies. Au niveau hépatique, cette question semble d'ailleurs particulièrement pertinente, au vu de l'exposition perpétuelle de cet organe à ces molécules.

C. Le foie, une cible privilégiée des xénobiotiques toxiques

Le foie assure une grande partie du métabolisme des xénobiotiques du fait de son équipement enzymatique conséquent, sa localisation anatomique et sa vascularisation abondante. Ce processus, également appelé détoxification, a pour but de rendre les xénobiotiques plus hydrophiles, afin de faciliter leur élimination. Cependant, les différentes particularités hépatiques exposées précédemment en font également une cible privilégiée pour les composés toxiques, notamment dans le cas d'un métabolisme toxifiant.

Afin d'appréhender la toxicité des xénobiotiques de manière globale, il convient donc de prendre en compte ses données d'absorption, de distribution, et sa métabolisation. En effet, bien que la plupart des réactions de métabolisation conduise à la production d'un composé moins toxique que la molécule mère, il est relativement fréquent que cette modification conduise à un métabolite plus toxique. Le mode d'élimination et les organes de stockage des xénobiotiques et de leurs métabolites conditionnent également leur toxicité.

Enfin, l'étude complémentaire de la toxicodynamique des xénobiotiques ou de leurs métabolites, permettant de décortiquer les mécanismes d'action toxiques, permet d'appréhender la problématique toxicologique de ces substances de manière globale.

1. Absorption et distribution

L'absorption des xénobiotiques dépend de leur voie d'administration, qui influence leur biodisponibilité, c'est-à-dire la proportion d'une substance atteignant la circulation sanguine sous forme inchangée. Suite à une administration orale, les xénobiotiques doivent être absorbés à travers la lumière intestinale, où ils peuvent subir un métabolisme par les enzymes intestinales, avant d'atteindre la veine porte puis le foie.

Arrivés au niveau hépatique, les xénobiotiques peuvent alors subir un métabolisme de « premier passage », associé ou non à une excrétion biliaire avant d'entrer dans la circulation générale. A l'opposé, les administrations intraveineuses permettent l'entrée directe du xénobiotique au niveau systémique, et ne subissent donc pas d'effet de premier passage hépatique (Fan et de Lannoy 2014).

Une fois dans la circulation systémique, les concentrations plasmatiques des composés sont influencées par de multiples paramètres incluant leur volume de distribution dans l'espace extracellulaire, leur capacité à traverser les membranes cellulaires et barrières physiologiques, leur prise en charge par les transporteurs d'influx ou d'efflux, et leur liaison aux protéines plasmatiques ou organes de réserves (Smith et al. 2010; Fan et de Lannoy 2014). Dans la majorité des cas, le métabolisme constitue la voie majeure d'élimination des xénobiotiques.

2. Le métabolisme des xénobiotiques

Le métabolisme des xénobiotiques a tout d'abord un rôle protecteur vis-à-vis des xénobiotiques et est classiquement décrit en quatre phases, selon les enzymes utilisées. La phase 0 correspond à l'entrée des xénobiotiques dans la cellule, permettant sa prise en charge par divers systèmes enzymatiques. Les enzymes de phase I, ou de fonctionnalisation, permettent une oxydation, réduction ou hydrolyse d'une molécule afin de faciliter l'intervention des enzymes de phase II, ou de conjugaison, permettant de greffer des groupements polaires aux xénobiotiques. Enfin, les enzymes de phase III interviennent dans le transport de ces composés, permettant leur efflux à travers les membranes cellulaires (Omiecinski et al. 2011; Almazroo et al. 2017) (Figure 13).

Bien que certaines molécules mères soit directement hépatotoxiques, ce sont généralement les métabolites de ces composés qui conduisent à une hépatotoxicité. Ainsi, les facteurs altérant les capacités métaboliques ont été décrits comme pouvant augmenter la toxicité d'un composé, soit en réduisant sa conversion en composé non toxique, soit en augmentant sa conversion en métabolite toxique.

Dans certains cas, la saturation de voies métaboliques majeures peut mener à une augmentation du métabolisme par des voies mineures toxifiantes. Ces mécanismes expliquent en partie pourquoi certains médicaments comme le paracétamol sont non toxiques à dose thérapeutique mais deviennent toxiques lors d'une ingestion de fortes doses (James et al. 2003).

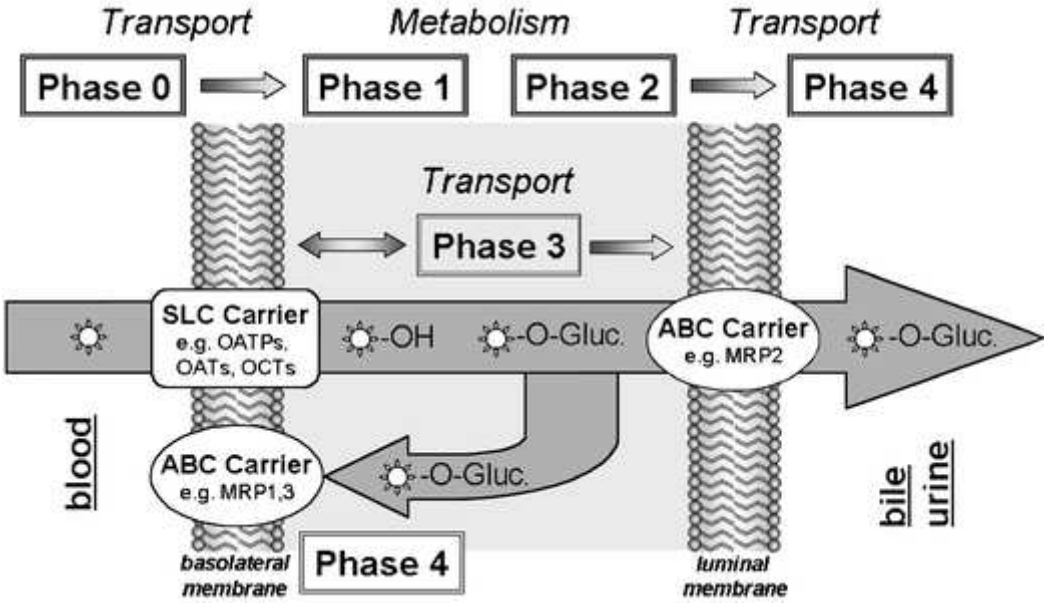


Figure 13 : Vue d'ensemble du métabolisme des xénobiotiques (Petzinger et Geyer 2006)

a) La phase 0

La phase 0 est primordiale dans la prise en charge d'un xénobiotique, puisqu'elle conditionne l'entrée de ce dernier au niveau intracellulaire. Bien que le transport de xénobiotique soit majoritairement hépatique, il est également retrouvé au niveau des reins, glandes surrénales et poumons. En particulier, les molécules chargées ou solubles dans l'eau doivent passer les barrières phospholipidiques membranaires, nécessitant l'action de transporteurs. Au cours de la phase 0, ces transporteurs d'influx appartiennent à la famille des *Solute Carrier* (SLC) (Petzinger et Geyer 2006; Döring et Petzinger 2014) (Figure 13). Les transporteurs SLC comptent 52 familles pour 395 transporteurs, et assurent l'entrée par diffusion facilitée par uniports ou secondairement actifs par symports dans l'hépatocyte. Les différents membres de cette famille se distinguent notamment par la nature des xénobiotiques transportés (Döring et

Petzinger 2014). Ainsi, la famille des *Organic Anion Transporting Polypeptides* (OATP) assure le transport d'anions organiques de haut poids moléculaires (> 300 g/mol) et certains cations comme les amanitines. L'O*rganic Anion Transporter* 3 (OAT3) assure quant à lui le transport d'anions organiques comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens. Enfin, les *Organic Cation Transporters* (OCT) assurent le transport de cations comme le tramadol.

Chaque organe exprimant des sous-types de transporteurs d'influx différents, une pré-sélection s'opère dans le ciblage des xénobiotiques pour certains organes. Dans le cas des amanitines, la prise en charge de ces toxines par les transporteurs OATP1B1 et OAPT1B3 rend le foie particulièrement ciblé, lui seul exprimant ces sous-types (Walton 2018).

b) La phase I

Le métabolisme de phase I est pris en charge par plusieurs systèmes enzymatiques comprenant des monooxygènases à cytochromes P450 (CYP), des monooxygénases flavine-dépendantes, des monoamines-oxydases, des cyclooxygénases, des dihydrodiol deshydrogénases, des aldo-kéto réductases (AKR), des époxydes hydrolases (EPH), des NAD(P)H quinone oxydoréductase (NQO), des alcool deshydrogénases (ADH), et des aldéhyde deshydrogénases (ALDH) (Evans et Relling 1999). Parmi ces différentes voies, la plus notable reste celle des CYP, intervenant dans la détoxification et la toxification de très nombreux composés. Les réactions de fonctionnalisation incluent des N- et O-dealkylation, hydroxylations aromatiques et aliphatiques, N- et S-oxydation et déaminations.

Les CYP sont des monooxygénases avec un hème-thiolate, de poids moléculaire entre 50 et 60 kD catalysant des biotransformations oxydatives. Ces protéines membranaires sont situées dans le réticulum endoplasmique, et utilisent le NADPH comme co-facteur donneur d'électrons. Les CYP sont encodés par la superfamille des gènes *CYP*, et classifiées en 18 familles et 44 sous-familles (Zanger et Schwab 2013). Le tableau 1 présente les trois principales familles de CYPs (1, 2 et 3) impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques.

Families	Subfamilies	Human gene products
CYP 1 FAMILY (ARYL HYDROCARBON HYDROXYLASES; XENOBIOTIC METABOLISM; INDUCIBLE)		
	CYP 1A	CYP1A1, CYP1A2
	CYP 1B	CYP1B1
CYP 2 FAMILY (XENOBIOTIC METABOLISM; CONSTITUTIVE AND XENOBIOTIC-INDUCIBLE)		
	CYP 2A	CYP2A6, CYP2A7, CYP2A13
	CYP 2B	CYP2B6
	CYP 2C	CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19
	CYP 2D	CYP2D6
	CYP 2E	CYP2E1
	CYP 2F	CYP2F1
	CYP 2J	CYP2J2
	CYP 2R	CYP2R1
	CYP 2S	CYP2S1
	CYP 2U	CYP2U1
	CYP 2W	CYP2W1
CYP 3 FAMILY (XENOBIOTIC AND STEROID METABOLISM; STEROID-INDUCIBLE)		
	CYP 3A	CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 (fetal CYP enzyme), CYP3A43

Tableau 1 : Représentation des trois familles de gènes impliquées dans la métabolisation des xénobiotiques (Testa et Clement 2015).

L'expression de chaque CYP est influencée par une combinaison de mécanismes et facteurs incluant le polymorphisme génétique, l'induction par les xénobiotiques, la régulation par les cytokines, hormones et états pathologiques, ainsi que l'âge ou le sexe (Zanger et Schwab 2013).

a. La famille des CYP2

La famille des CYP2 regroupe des isoformes très impliquées dans la métabolisation des xénobiotiques. De manière intéressante, les gènes appartenant à cette famille sont hautement polymorphiques, en particulier le CYP2A6, 2B6, 2C9, 2C19 et 2D6. Le CYP2E1, seul membre de la famille des CYP2E, présente une préférence pour des substrats de petits poids moléculaires, comme l'éthanol, le paracétamol, l'acétone ou l'halothane (Zanger et Schwab 2013). Il est par ailleurs inductible par nombre d'entre eux, notamment l'éthanol, par des régulations transcriptionnelles, traductionnelles et post-traductionnelles.

Ainsi, bien que l'alcool deshydrogénase (ADH) soit l'enzyme majoritaire du métabolisme de l'éthanol, le CYP2E1 joue un rôle plus important lors de fortes concentrations ou consommations chroniques due à son induction (Caro et Cederbaum 2004). A ce jour, il semblerait que la stabilisation de la protéine soit d'avantage impliquée dans l'augmentation de l'activité du CYP2E1 après une exposition à l'éthanol, plutôt qu'une augmentation de l'étape transcriptionnelle (Song 1995).

b. La famille des CYP3A

La sous-famille des CYP3 humains est probablement la plus impliquée dans le métabolisme des xénobiotiques, et comprend quatre membres : les CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 et CYP3A43.

Les niveaux d'expression du CYP3A4 varient jusqu'à un facteur de 60 entre des échantillons de microsomes hépatiques humains, notamment du fait de phénomènes d'inductions enzymatiques. Dans ce dernier cas, les niveaux de CYP3A peuvent atteindre 50% de la quantité totale des CYP hépatiques (Wrighton et al. 1996). Ces phénomènes d'induction enzymatiques sont bien décrits dans la littérature, et importent grandement du fait du risque d'interactions médicamenteuses associé. Parmi les principaux inducteurs présents en thérapeutique figurent les antiépileptiques de première génération (carbamazépine, phénobarbital, phénytoïne) et la rifampicine (Liu et al. 2007). A l'inverse, cet isoenzyme est également sujette aux inhibiteurs enzymatiques, également nombreux parmi les médicaments, regroupant notamment les macrolides, les antifongiques azolés, les inhibiteurs de protéase, l'amiodarone ou encore l'acide valproïque (Liu et al. 2007).

Le rôle des isoformes CYP3A5 et CYP3A7 est moins décrit dans la littérature. Cependant, il est rapporté que le CYP3A5 n'est retrouvé que dans 20 à 25% des microsomes hépatiques humains (Wrighton et al. 1996). En effet, sa localisation majoritairement extra-hépatique, à savoir rénale, pulmonaire, prostatique, sénologique et leucocytaire, suggère un rôle physiologique prépondérant dans ces organes (Lamba et al. 2002). Enfin, l'isoforme CYP3A7 est principalement présente dans le foie fœtal, son expression diminuant après la naissance, pour n'être que faiblement ou non exprimé chez l'adulte caucasien (Schuetz et al. 1994).

Enfin, le rôle du CYP3A43 reste peu caractérisé chez l'homme, mais aurait une significativité clinique du fait des variations génétiques (Wright et al. 2019). Ainsi, Bigos et al. (2011) ont montré son implication dans le métabolisme de l'olanzapine, l'expression d'un variant hautement actif expliquant des réponses cliniques diminuées (Bigos et al. 2011).

c. Les alcools deshydrogénases (ADH)

L'alcool deshydrogenase (ADH) cytosolique est l'enzyme majoritaire responsable du métabolisme oxydatif de phase I de l'éthanol, produisant de l'acétaldéhyde et du NADH (cf métabolisme de l'éthanol, page 68) (Cederbaum 2012). Cette enzyme est principalement exprimée par les hépatocytes, mais est également retrouvée dans le tractus gastro-intestinal, les poumons et les reins (Crabb 1995; Edenberg 2000). Chez l'homme, sept gènes (*ADH1* à *ADH7*) codent respectivement pour différentes sous-unités d'ADH (α, β1, β2, β3, γ1, γ2, π, χ, σ, et μ) (Cederbaum 2012). Ces sous-unités s'assemblent par paire pour former des isoenzymes classifiées en cinq classes (ADH classe I à ADH classe V), en fonction de leurs propriétés enzymatiques (Crabb 1995).

L'ADH de classe I (formée par les sous-unités encodées par les gènes *ADH1*, *ADH2* et *ADH3*) jour un rôle crucial dans le métabolisme de l'éthanol. Bien que des polymorphismes de l'ADH aient été décrits, ils ne semblent pas reliés à une pathologie particulière liée à l'éthanol. En revanche, certains génotypes d'ADH ont été associés à des différences dans les consommations d'alcool; les sujets ayant l'allèle de l'isoforme ADH2*2 (enzyme hautement active) présentent un risque diminué d'alcoolisme (Borràs et al, 2000). Quelques chercheurs ont également rapporté une élimination de l'éthanol plus lente à jeun, comparé à un état nourri, du fait d'une diminution des niveaux d'expression d'ADH (Cederbaum 2012).

d. Les aldéhydes deshydrogénases (ALDH)

Chez l'homme, la superfamille des enzymes aldéhyde deshydrogenase (ALDH) NAD+-dépendant est codée par 16 gènes. Les isoenzymes ALDH1 (cytosolique) et ALDH2 (mitochondriale) sont les principales impliquées dans le métabolisme de l'éthanol (Vasiliou et Pappa 2000).

Contrairement à l'ADH, les polymorphismes apparaissent ici comme ayant une grande influence sur l'activité des ALDH. L'allèle *ALDH2*1*, connu pour coder un variant très actif, est considéré protecteur contre les pathologies hépatiques liées à l'alcool, tandis que l'enzyme codée par l'allèle *ALDH2*2* est inactive (Cederbaum 2012). Egalement, la consommation chronique d'éthanol est connue pour diminuer l'activité de l'ALDH et donc augmenter les concentrations d'acétaldéhyde (Lin et al. 1984).

c) La phase II

Le métabolisme de phase II joue également un rôle important dans la biotransformation des substrats, qu'il s'agisse de substances endogènes ou de xénobiotiques. En effet, il permet l'ajout de groupements hydrophiles, par conjugaison, facilitant ainsi l'excrétion de ces substances Ces réactions incluent la glucuroconjugaison, la sulfoconjugaison, la méthylation, l'acétylation, ainsi que la conjugaison au glutathion ou aux acides aminés (Jancova et al. 2010).

a. Les uridine-diphosphate-glucuronosyltransférases (UGT)

Les glucuronidations par l'intermédiaire des uridine-diphosphate-glucuronosyltransférases (UGT) représentent la source majeure de détoxification de phase II chez les vertébrés. Chez l'homme, 40 à 70% des médicaments commercialisés sont sujets à des réactions de glucuronidations. Ces enzymes catalysent le transfert de l'acide D-glucuronique à partir de l'acide uridine 5'-diphospho (UDP)-glucuronique, formant des dérivés O-, N-, S-, ou C-glururonides (Wells et al. 2004).

Quatre familles d'UGT ont été identifiées chez l'homme : UGT1, UGT2 (divisé en sous-familles UGT2A et UGT2B), UGT3 et UGT8. Cependant, seules les UGT1 et UGT2 sont connues comme impliquées dans la glucuronidation des xénobiotiques. Parmi les 22 UGT retrouvées dans l'espèce humaine, la plupart sont largement distribuées dans l'organisme, bien que la localisation hépatique soit majoritaire (Meech et al. 2019).

b. Les sulfotransférases (SULT)

Les sulfotransférases (SULT) sont des enzymes cytosoliques catalysant le transfert d'un groupement sulfonate à partir d'un sulfate actif, le 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) sur un composé contenant un groupe hydroxyl ou amine (Suiko et al. 2017). Chez l'homme, quatre familles de SULT sont décrites : SULT1, SULT2, SULT4, SULT6. La famille des SULT1, compte huit membres (1A1, 1A2, 1A3/4, 1B1, 1C2, 1C3, 1C4, 1E1) et est considérée comme étant la plus impliquée dans le métabolisme des xénobiotiques, en particulier SULT1A1 et SULT1B1.

Egalement, les sulfatations jouent un rôle clé dans les voies endocrines, étant donné que les stéroïdes, stérols, hormones thyroïdiennes et catécholamines existent sous forme sulfoconjugués (Coughtrie 2016). Enfin, les SULT et les UGT métabolisent fréquemment les mêmes substrats, formant ainsi une coopération efficace dans la détoxification des xénobiotiques.

c. Les glutathion S-transférases (GST)

Les glutathion S-transférases (GST) sont des enzymes dimériques codées par trois familles de gènes (désignés transférases cytosoliques, microsomales et mitochondriales) protégeant l'organisme contre le stress oxydant ou encore certains xénobiotiques toxiques électrophiles. A cette fin, elles forment des conjugués avec le γ-L-Glutamyl-L-cystéinylglycine (GSH).

Les GST cytosoliques sont très largement distribuées dans l'organisme, et divisées en plusieurs familles selon leurs propriétés chimiques, physiques et structurelles (α, ζ, θ, μ, π, σ et ω). Elles réalisent la plupart de ces réactions de conjugaison et sont majoritairement localisées dans le foie, les poumons et les reins (Oakley 2011; Allocati et al. 2018). Egalement, de nombreux xénobiotiques, incluant le phénobarbital, la coumarine, ou la dexamethasone ont été rapportés comme inducteur des GST (Higgins et Hayes 2011).

d) La phase III

La phase III, introduite dans la communauté scientifique en 1992, correspondant à la phase d'excrétion des xénobiotiques ou de leurs métabolites. A cette fin, des transporteurs membranaires d'efflux sont empruntés, appartenant majoritairement à la famille des *ATP-binding cassette* (ABC) (Döring et Petzinger 2014). Au niveau hépatique, ces transporteurs ABC sont soit canaliculaires, soit baso-latéraux (Figure 14).

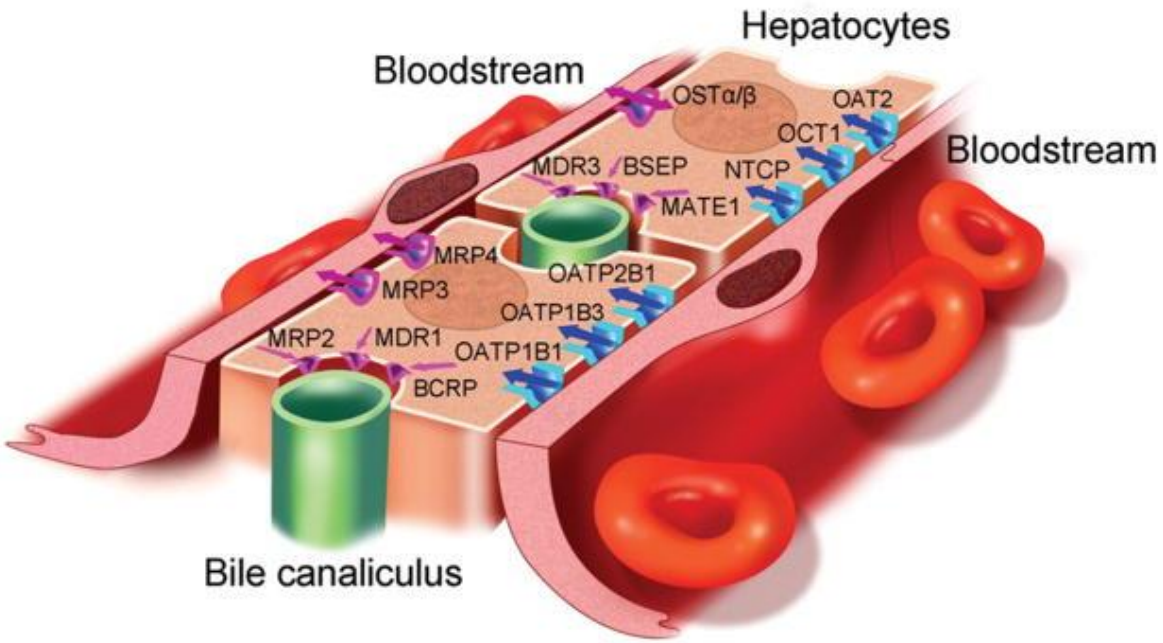


Figure 14 : Vue d'ensemble des mécanismes d'excrétion du métabolisme de phase III (Köck et Brouwer 2012).

Les transporteurs d'efflux canaliculaires assurent l'excrétion des xénobiotiques et/ou de leurs métabolites dans la bile, permettant une élimination dans les selles. Ces transporteurs appartiennent majoritairement à la superfamille des ABC ATP-dépendant, regroupant notamment la P-glycoprotein (*P-gp*) transportant des molécules amphiphiles cationiques comme certains anticancéreux, les MDR (*multidrug-resistance proteins*), la MRP2 (*multidrug-resistance-associated protein 2*) transportant les métabolites glucuro- et sulfoconjugués, la BCRP (*breast cancer resistance protein*) transportant des anticancéreux tels que l'irinotecan, la doxorubicine ou le méthotrexate, les MATE (*multidrug and toxin extrusion exchanger*) transportant des cations organiques comme la metformine, et les BSEP

(*bile salt export pump*) prenant en charge l'excrétion des acides biliaires (Köck et Brouwer 2012).

Les transporteurs d'efflux baso-latéraux assurent quant à eux l'excrétion des xénobiotiques et/ou de leurs métabolites dans le sang, permettant leur élimination urinaire secondaire. Parmi ces transporteurs, nous retrouvons le MRP3 transportant des anions organiques tels que les dérivés glucuro-conjugués, le MRP4 transportant notamment des antiviraux (ganciclovir, adefovir) et agents cardiovasculaires (diurétiques de l'anse, antagonistes de l'angiotensine 2), et le OSTα/β transportant des stéroïdes (Köck et Brouwer 2012).

Ainsi, une altération des enzymes du métabolisme de phase III peut également mener à une hépatotoxicité par accumulation intracellulaire du xénobiotique ou de son métabolite. A titre d'exemple, nous pouvons noter qu'un polymorphisme de MRP2 a été incriminé dans la toxicité hépatique induite par les herbes médicinales (Choi et al. 2007).

3. Toxicodynamique des xénobiotiques hépatotoxiques

Parallèlement à la toxicocinétique, qui permet de déterminer quelle quantité de composé toxique ou ses métabolites est susceptible d'atteindre sa cible, la toxicodynamie s'intéresse à l'interaction du xénobiotique avec sa cible, détaillant ses effets. Cependant, ces deux notions s'entremêlent, un effet toxique étant d'autant plus important que la forme toxique d'un xénobiotique est capable d'atteindre la cible, et que cette dernière est sensible à l'agent exogène.

Dans la littérature, les données sont nombreuses quant aux mécanismes d'hépatotoxicité induite par les xénobiotiques. Bien que ces derniers soit généralement spécifiques du toxique en cause, on distingue les hépatotoxicités intrinsèques d'une part et idiosyncrasiques d'autres part. La présente partie a pour but d'en détailler les mécanismes généraux.

a) Classification des hépatotoxicités induites par les xénobiotiques

Les hépatotoxicités peuvent être classées de différentes façons, selon la finalité qui en découle. Dans un but diagnostic, la classification clinique distingue ainsi des atteintes :

- Hépatocellulaires ou cytotoxiques, caractérisées par une augmentation de l'alanine aminotransférases (ALAT) supérieur à 2 fois la valeur limite haute de la normale (2N) ou un rapport ALAT/phosphatase alcaline (PAL) ≥ 5.
- Cholestatiques, caractérisées par une augmentation des PAL supérieure à 2N ou un rapport ALAT/PAL ≤ 2.
- Mixtes, caractérisées par une augmentation supérieure à 2N des ALAT et des PAL, et un rapport ALAT/PAL entre 2 et 5.

A cette classification s'ajoute les critères d'hépatotoxicités aigües si les anomalies des tests hépatiques sont inférieures à trois mois, et chroniques dans le cas contraire (Bénichou 1990).

La classification histologique, pouvant apporter des éléments quant à l'étiologie et la sévérité de l'atteinte hépatique inclut (Zhang et al. 2013):

- Des atteintes hépatocellulaires aigües ou chroniques
- Des atteintes cholestatiques aiguë ou chronique
- Des stéatoses et stéatohépatites
- Des granulomes
- Des zones de nécroses
- Des signes d'obstruction veineuse hépatique
- Un syndrome d'obstruction sinusoïdale
- Une phospholipidose ou surcharge lysosomale.
- Une péliose hépatique (dilation inhomogène des sinusoïdes hépatiques)

Enfin, la classification par mécanisme de toxicité sépare quant à elle (i) les hépatotoxicités intrinsèques, prédictibles et dose-dépendantes, comme le paracétamol et (ii) les hépatotoxicités idiosyncrasiques, imprédictibles, à médiation immune ou métabolique (Figure 15).

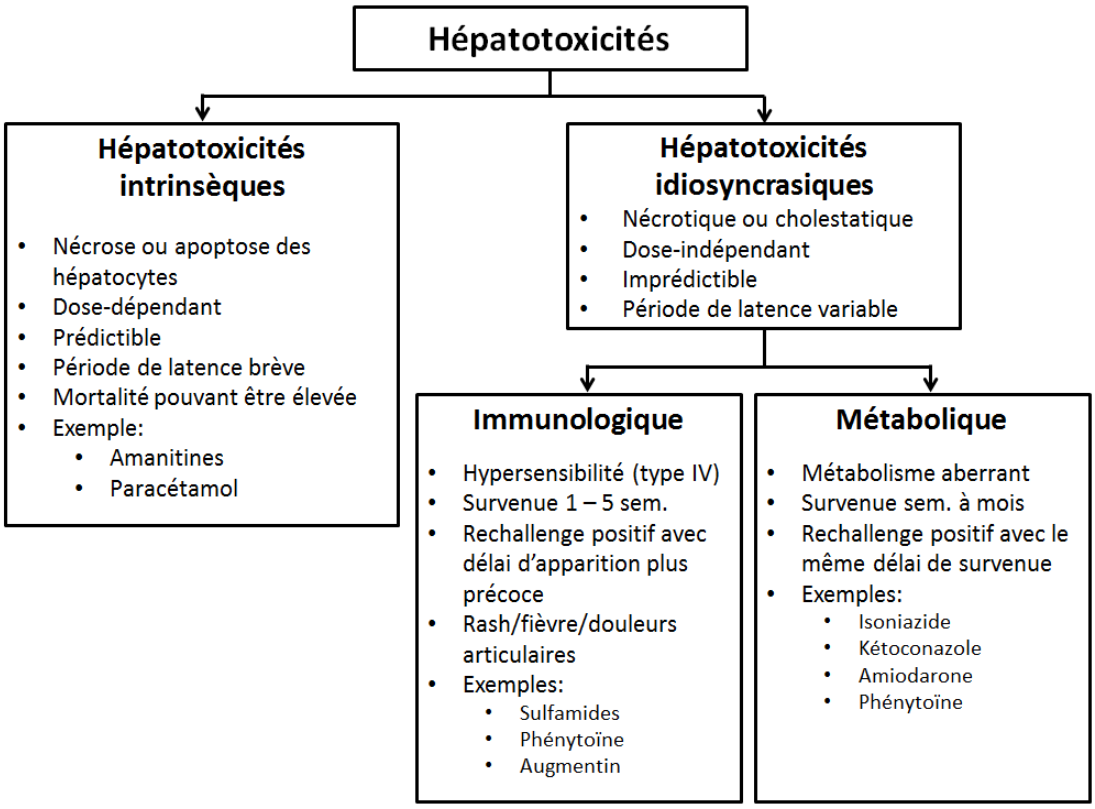


Figure 15: Classification des hépatotoxicités par mécanisme d'action.

b) Hépatotoxicités intrinsèques

Les hépatotoxicités intrinsèques font référence aux xénobiotiques étant capables de causer une nécrose hépatocellulaire prévisible et reproductible chez l'homme à partir d'une dose seuil. Elles sont ainsi directement médiées par la substance ou son métabolite (Chalasani et al. 2014). La période de latence entre l'exposition et le début de l'hépatotoxicité est brève, de quelques heures à quelques jours (Figure 15). Les mécanismes de toxicité sont, quant à eux, variés et souvent spécifiques à chaque substance (Tableau 2). De manière intéressante, il est cependant possible de classer les mécanismes d'hépatotoxicités intrinsèques selon un modèle à trois étapes : (i) les mécanismes initiaux de toxicité (stress cellulaire direct, altération mitochondriale…), (ii) les cascades de signalisation subséquentes et (iii) la mort cellulaire résultante (apoptose ou nécrose) (Russmann et al. 2009).

Mécanisme	Commentaires et exemples
Formation de liaisons covalentes	Formation d'adduits par liaison d'un toxique ou de son métabolite réactif à des protéines ou autres macromolécules intracellulaires à l'origine de lésions directes (exemple : paracétamol en phase initiale)
Peroxydation lipidique	Réaction de radicaux libres avec les acides gras polyinsaturés des membranes, à l'origine de troubles de la fluidité, de la perméabilité et de la stabilité des membranes (exemple : tétrachlorure de carbone)
Déplétion en ATP	Découplage de la phosphorylation oxydative mitochondriale (exemple : acide valproïque) ou altération de l'homéostasie calcique cytoplasmique (exemple : fer)
Lésions de l'ADN	Lésions directes ou activation de la poly(ADP-ribose) polymérase, conduisant à la mort cellulaire (exemple : agents alkylants) ou à la transformation néoplasique (exemple : stéroïdes)
Apoptose	Voies du récepteur au TNF-α/Fas/caspases ou par d'autres cytokines pro-inflammatoires (exemple : paracétamol en phase tardive)
Lésion des organelles intracellulaires	Réticulum (exemple : tétrachlorure de carbone), lysosome (exemple : amiodarone) ou mitochondrie (exemple : hydrazine)
Inhibition enzymatique directe	Blocage d'une enzyme (exemple : amanite phalloïde)
Ischémie	Trouble de l'apport d'oxygène, de nutriments et/ou réduction du débit sanguin hépatique (exemple : cocaïne)
Trouble de l'excrétion biliaire	Inhibition du cytosquelette, des microfilaments d'actine ou des pompes de transport (exemple : chlorpromazine)

Tableau 2: Mécanismes moléculaires pouvant aboutir à une lésion cellulaire hépatique toxique, adapté de Megarbane et al. 2007.

a. Mécanismes initiaux de toxicité

Les premiers évènements initiant les mécanismes toxiques sont majoritairement liés aux métabolites réactifs, bien que la molécule mère puisse être impliquée. Ainsi, le rôle du métabolisme oxydatif via les CYP prend une place importante dans ces mécanismes. Egalement, bien que le métabolisme de phase II soit très largement considéré comme détoxifiant, certains glucuroconjugués comme les acyl-glucuronides de xénobiotiques, sont connus comme pourvoyeurs d'hépatotoxicités (Spahn-Langguth et Benet 1992). Ces métabolites réactifs peuvent exercer un stress initial cellulaire, à travers de nombreux mécanismes, comme la déplétion en glutathion, ou la liaison à des protéines, lipides acides nucléiques et autres structures cellulaires.

L'exemple du paracétamol est certainement le mieux décrit dans la littérature à ce propos, son métabolite toxique, le N-acétyl-p-benzoquinone imine (NAPQI), se liant de manière covalente aux protéines mitochondriales (James et al. 2003). Dans le cas des amanitines, ces toxines inhibent directement l'ARN polymérase II, provoquant le blocage de la synthèse protéique hépatique.

De manière générale, une atteinte mitochondriale initiale par des composés toxiques peut découpler ou inhiber la chaine respiratoire mitochondriale, provoquant une déplétion en ATP, une augmentation de la production de ROS, des dommages à l'ADN mitochondrial, la création de pores de transition de perméabilité mitochondriale ou une inhibition de la β-oxydation (Russmann et al. 2009). A titre d'exemple, ce dernier mécanisme explique notamment la survenue de stéatose hépatique lors d'une accumulation intramitochondriale d'amiodarone (Patel et Sanyal 2013).

Enfin, les métabolites réactifs ou la molécule mère peuvent inhiber des fonctions hépatocellulaires comme les transporteurs d'efflux (BSEP), provoquant l'accumulation des substrats et des dommages hépatiques secondaires (Russmann et al. 2009).

b. Mécanismes secondaires de toxicité

Les atteintes spécifiques initiales décrites précédemment convergent vers des cascades de signalisation communes non spécifiques, constituant la 2ème étape des mécanismes de toxicité intrinsèque. Ainsi, l'activation de la voie du réticulum endoplasmique, la perméabilisation lysosomale ou l'activation des c-Jun N-terminal kinase (JNK) est classiquement impliquée. En conséquence, il y a activation des protéines pro-apoptotiques (Bax, Bak, Bad) et inhibition des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL) menant à la création de pores de transition de perméabilité mitochondriale (Gunawan et al. 2006; Russmann et al. 2009).

c. La mort cellulaire

Au cours de la troisième étape, l'altération des fonctions mitochondriales et donc de la production d'énergie conduit à l'apoptose ou la nécrose. La création de pores de transition de perméabilité mitochondriale permet l'influx massif de protons à travers la membrane mitochondriale interne, responsable de l'arrêt de la synthèse d'ATP.

Cette déplétion en ATP serait responsable de la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale et le relargage de cytochrome c et autres protéines pro-apoptotiques mitochondriale vers le cytosol (Lemasters et al. 1999; Haouzi et al. 2000; Malhi et Gores 2008).

Dans le cas de l'apoptose, le cytochrome c se lie à la protéine APAF-1 et à la pro-caspase 9, formant un complexe appelé apoptosome, qui active la voie de la caspase 9. Cependant, ce processus actif requiert de l'ATP, et peut donc se produire que dans le cas où la création de pores de transition de perméabilité mitochondriale ne s'est pas rapidement et simultanément produite dans toutes les mitochondries. Dans le cas où quelques mitochondries sont restées intactes et continuent à produire de l'ATP, l'activation de la pro-caspase 9 et d'autres protéines mitochondriales pro-apoptotiques mènent alors à l'activation subséquente de la caspase 3. Cette dernière clive des protéines spécifiques, activant notamment les caspases 6, 7, et 2, résultant en l'apoptose, caractérisée par une condensation nucléaire et cytoplasmique ainsi qu'une fragmentation cellulaire sans perte d'intégrité membranaire (Logue et Martin 2008). Ces fragments apoptotiques sont phagocytés, s'accompagnant d'une inflammation et donc de légères lésions secondaires hépatiques (Russmann et al. 2009).

Dans le cas de la nécrose, les mécanismes initiaux de toxicité sont tels que la création de pores de transition de perméabilité mitochondriale se produit dans toutes les mitochondries, empêchant le déclenchement de l'apoptose. Le gonflement et la lyse des cellules qui suivent une perturbation grave des fonctions cellulaires caractérisent la nécrose, et induisent des réponses inflammatoires comprenant la libération de cytokines. Ces mécanismes, sensibilisant les hépatocytes environnants, peuvent ainsi amplifier les lésions initiales et provoquer d'autres dommages collatéraux (Russmann et al. 2009).

Lors d'une intoxication, ces deux mécanismes coexistent, en proportion variable en fonction de la dose de toxique administrée et de la vulnérabilité préexistante des hépatocytes. Cependant, il est intéressant de noter que la mitochondrie est au centre de ces différents mécanismes, générant la majorité de l'ATP et des ROS intracellulaires et pouvant orienter le type de mort cellulaire (Leist et al. 1997; Russmann et al. 2009).

c) Hépatotoxicité idiosyncrasique

Contrairement aux hépatotoxicités intrinsèques, les hépatotoxicités idiosyncrasiques affectent les individus présentant une susceptibilité individuelle. La période de latence entre une exposition et la réaction est variable, allant majoritairement de un à trois mois, bien que des atteintes aient été rapportées jusqu'à un an après l'introduction du médicament (Uetrecht 2009).

La relation dose-dépendante est moins évidente, et les présentations cliniques plus variées. Cependant, il est reconnu que la survenue d'une hépatotoxicité idiosyncrasique reste extrêmement rare pour un médicament pris à des doses inférieures à 10 mg/jour (Séguin et Uetrecht 2003). Les hépatotoxicités allergiques à l'halothane surviennent plus fréquemment à des doses élevées (Touloukian et Kaplowitz 1981). Selon les recommandations de l'*American College of Gastroenterology*, il semble qu'elles soient le résultat d'interactions complexes entre l'environnement, le xénobiotique et l'hôte (facteurs génétiques, âge, sexe, facteurs immunitaire, pathologies pré-existantes) (Chalasani et al. 2014). Dans la littérature, il est cependant différencié les hépatotoxicités idiosyncrasiques métaboliques ou à médiation immune (Figure 15).

a. Hépatotoxicité idiosyncrasique métabolique

Dans les formes métaboliques, des déterminants génétiques, responsables de métabolisme aberrants, ont été incriminés dans le développement de ces toxicités. En effet, l'hypothèse d'une accumulation locale de métabolites toxiques, provoquant des liaisons covalentes à des protéines, enzymes, lipides et ADN a été avancée, et reste cohérente au vu des délais de survenue inchangés en cas de réadministration. La génération d'un stress oxydant résultant de ces modifications biochimiques conduirait alors à des modifications de la balance redox et de la peroxidation lipidique, entrainant la nécrose hépatocytaire (Gunawan et Kaplowitz 2007).

De plus, des structures cellulaires telles que les mitochondries, la signalisation des récepteurs, des microtubules et du réticulum endoplasmique peuvent également être affectées (Kaplowitz 2002, 2005). Une altération de la régulation des transporteurs d'efflux, ainsi que des mécanismes immunologiques ont également été mis en évidence (Björnsson et al. 2013).

Enfin, des néoantigènes peuvent être formés entre le métabolite et l'hépatocyte, pouvant mener à l'activation du système immunitaire (Spielberg et al. 1981). D'un point de vue clinique, il n'existe aucune manifestation d'hypersensibilité. A titre d'exemple, l'amiodarone, le diclofenac ou le valproate de sodium sont connus comme pourvoyeur de ce type d'hépatotoxicité.

b. Hépatotoxicité idiosyncrasique à médiation immune

Les hépatotoxicités idiosyncrasiques à médiation immune constituent les formes les moins bien connues. Elles peuvent être accompagnées de signes cliniques et histologiques mettant en évidence une hypersensibilité. Ainsi, des rashs, fièvres, douleurs articulaires et inflammatoires, adénopathies, hyperéosinophilies et des formes sévères comme des syndromes de Lyell ou de Stevens-Johnson peuvent être observés. La durée d'exposition est généralement autour d'une à huit semaines (Gunawan et Kaplowitz 2004). En cas de ré-administration, la récurrence des symptômes survient après une ou deux prises (Holt et Ju 2006; Björnsson et al. 2013).

Les facteurs initiaux influençant l'apparition d'une hypersensibilité semblent résulter d'une hapténisation des protéines du soi par fixation covalente d'un métabolite. Ces néoantigènes, présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH II) des cellules présentatrices d'antigènes aux lymphocytes T helper, aboutit au recrutement des lymphocytes T cytotoxiques, des cellules « natural killer » et des lymphocytes B (Knowles et al. 2000; Kaplowitz 2005; Holt et Ju 2006; Gunawan et Kaplowitz 2007; Uetrecht 2009) (Figure 16).

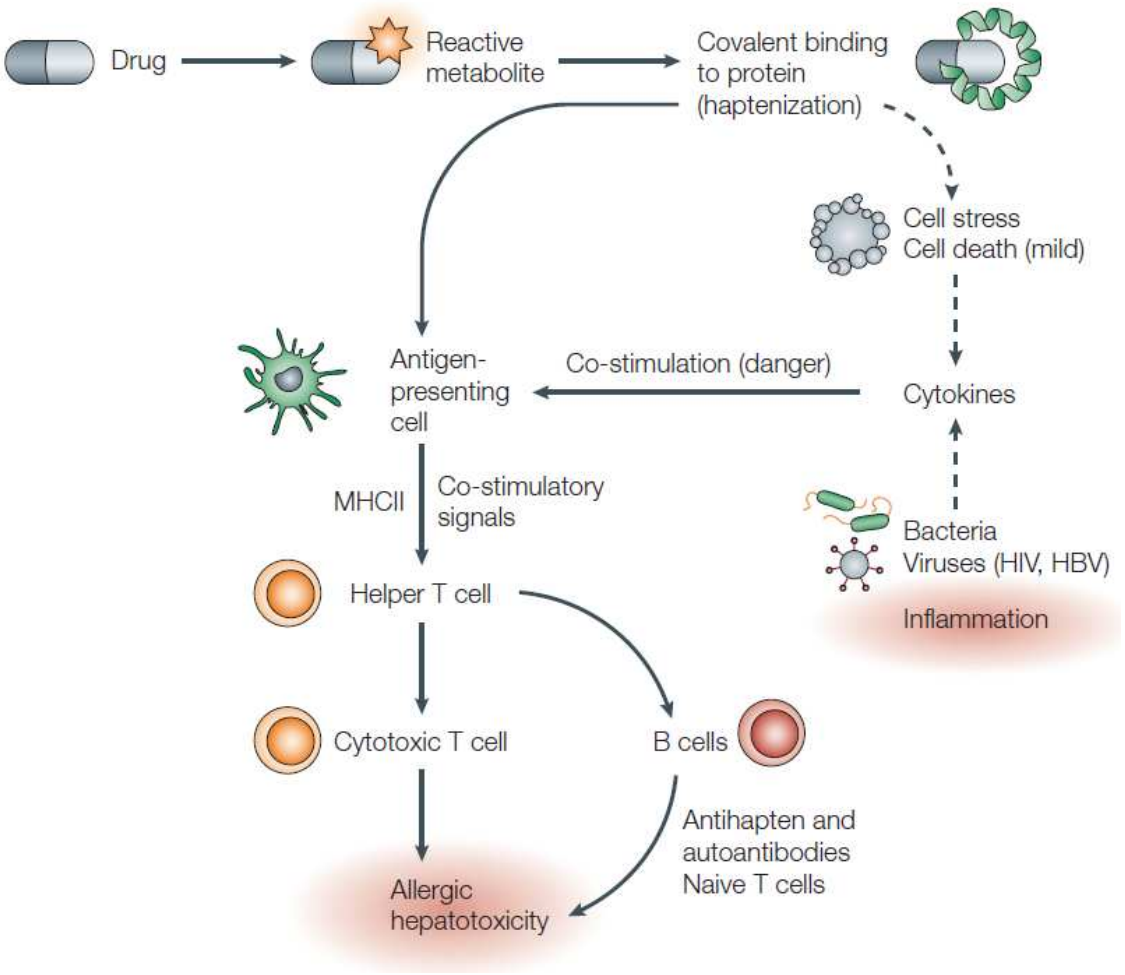


Figure 16 : Mécanismes généraux des hépatotoxicités idiosyncrasiques à médiation immune (Kaplowitz 2005).

Les mécanismes de morts cellulaires sont alors variés, dépendant des acteurs impliqués. Il est notamment connu que les lymphocytes-T cytotoxiques induisent l'apoptose via le Fas ligand et la granzyme B, que les hépatocytes développent un stress oxydant menant à la formation de ROS endommageant l'ADN, les protéines et les lipides, et que ces modifications aggravent des dommages hépatiques médiés par le système immunitaire (Jaeschke et al. 2012).

Enfin, il semble que les dysfonctions mitochondriales jouent également un rôle important dans la physiopathologie de ces atteintes, impliquant notamment l'activation des JNK (Han et al. 2013).

De manière intéressante, il semble que l'hapténisation seule ne soit pas toujours suffisante au déclenchement d'une réaction allergique. Ce concept, appelé l'hypothèse des dangers, suggère qu'un signal additionnel viendrait provoquer son déclenchement (Séguin et Uetrecht 2003). Dans le cas où des métabolites réactifs causeraient un stress modéré au sein des hépatocytes, le relargage de cytokines associé pourrait constituer un signal de danger entrainant la présentation d'antigène de manière CMH II-dépendant et le déclenchement d'une hépatotoxicité autoimmune. Egalement, la sensibilisation des hépatocytes par ces cytokines les rendraient plus sensibles aux effets létaux du TNFα, du Fas Ligand et de l'interféron γ provenant des cellules de Küpffer et des lymphocytes T cytotoxiques (Russmann et al. 2009).

La nécrose hépatique active également l'immunité innée, par l'intermédiaire de médiateurs pro-inflammatoires (chimiokines, cytokines, signaux de mort cellulaire). Ces médiateurs, pouvant aggraver la cytotoxicité par action directe ou recrutement d'autres cellules de l'immunité innée, sont également impliqués dans la réparation tissulaire, par l'intermédiaire de composés anti-inflammatoires (Liu et Kaplowitz 2002; Gunawan et Kaplowitz 2007).

Du fait de l'implication de l'immunité dans ces mécanismes, il semble cohérent que certains haplotypes HLA aient été associés au développement d'hépatotoxicités idiosyncrasiques. Par exemple, les HLA-DRB1*15 :01, HLA-B*5701 et HLA-DRB1*03 ont été associés aux hépatotoxicités induites respectivement par l'amoxicilline-acide clavulanique, la flucloxacilline et l'isoniazide (Kim et Naisbitt 2016).

Enfin, les hépatotoxicités induites par les xénobiotiques peuvent se présenter comme des hépatotoxicités « *auto-immune-like* ». D'un point de vue clinico-biologique, les patients présentent généralement une augmentation des gamma-globulines, des anticorps anti-nucléaires et/ou des anticorps anti-muscle lisse. Cependant, bien qu'il soit difficile de différencier ces formes iatrogènes des hépatites auto-immunes, ces dernières diffèrent par leur absence de réponse aux corticoïdes (Leise et al. 2014).

d) Autres mécanismes d'hépatotoxicité

Dans certains cas, la toxicité hépatique est liée à une atteinte des tissus non parenchymateux. A titre d'exemple, il est intéressant de noter les atteintes de l'épithélium biliaire par les métabolites de la flucloxacilline (Lakehal et al. 2001), la fibrose hépatique par activation des cellules stellaires au méthotrexate (Jaskiewicz et al. 1996), et les syndromes d'obstruction sinusoïdale par les alcaloïdes pyrrolizidiniques (DeLeve et al. 2002).

Enfin, le dernier mécanisme d'hépatotoxicité concerne le foie ischémique, lié au mécanisme d'action du xénobiotique (Megarbane et al. 2007). Cette entité, d'étiologie variable, peut suivre un épisode de bas débit périphérique (intoxication par un cardiotrope), d'hypoxémie extrême (intoxication par un psychotrope dépresseur du système nerveux central), ou de vasospasme (intoxication par la cocaïne) (Megarbane et al. 2007).

e) Facteurs favorisants des hépatotoxicités

Plusieurs facteurs ont été identifiés comme contributifs dans la physiopathologie des hépatotoxicités induites par les xénobiotiques. Ces derniers, quel que soit le mécanisme, altèrent le niveau d'exposition au produit toxique, augmentant le risque de survenue de ces atteintes. Parmi ceux-ci, il est intéressant de retenir (i) les facteurs génétiques responsable de polymorphisme des CYP, HLA et autres enzymes impliquées dans le métabolisme (DeLeve et Kaplowitz 1995; Smith et al. 1998), (ii) la consommation concomitante d'alcool, responsable d'une induction du CYP2E1 et d'une déplétion en glutathion (Lauterburg et Velez 1988; Schiodt et al. 2002), (iii) la prise de certains aliments comme les crucifères connus comme inducteurs du CYP1A2 ou le pamplemousse, connu pour inhiber le CYP3A4 (Alvares et al. 1979), (iv) la prescription de médicaments inducteurs ou inhibiteurs enzymatiques (Đaković-Švajcer et al. 1999), (v) les caractères démographiques (Le Couteur et McLean 1998; Hilmer et al. 2005), (vi) les pathologies hépatiques sous-jacentes (Verbeeck 2008), (vii) la dose (Russmann et al. 2009; Chen et al. 2013) et (viii) la lipophilie de la substance (Chen et al. 2013).

II. Les xénobiotiques hépatotoxiques

Les hépatotoxicités aux xénobiotiques, incluant les médicaments, les substances d'origine naturelle et les agents chimiques, constituent une cause importante de maladies hépatiques, comme illustré précédemment. De ce fait, elles constituent un véritable challenge pour les cliniciens, l'industrie pharmaceutique, et les agences de santé (Larrey 2009).

Les hépatites médicamenteuses représentent la principale cause d'hépatite fulminante, la moitié d'entre elles étant représentée par les surdosages volontaires au paracétamol. Les hépatites idiosyncrasiques à dose thérapeutique, représentent également une cause importante, dont la fréquence est équivalente à celles des hépatites virales (Lee et al. 2007). Plus de 1200 médicaments sont actuellement répertoriés comme potentiellement hépatotoxiques (Larrey 1997). Ainsi, ces effets indésirables constituent la première cause de retrait du marché ou d'arrêt de développement d'un médicament.

Les hépatotoxicités impliquant les substances d'origine naturelle présentent la même polyvalence clinique que les médicaments dits « classiques ». Les plantes médicinales sont une cause croissante d'atteintes hépatiques, notamment du fait de leur réputation d'innocuité. Le diagnostic, du fait de l'automédication fréquente ou de l'achat par Internet, peut s'avérer difficile. Actuellement, une cinquantaine de plantes sont connues pour être hépatotoxiques (Stickel et al. 2005; Verma et Thuluvath 2007).

Parmi les denrées alimentaires, nous retrouvons également de grands hépatotoxiques, comme les aflatoxines, produites par certains *Aspergillus* et pouvant contaminer les cultures alimentaires (Benkerroum 2020), ou l'éthanol beaucoup plus largement consommé au niveau mondial du fait de sa forte insertion dans les cultures sociales (World Health Organization 2011). Enfin, les amanitines, contenus dans plusieurs espèces de macromycètes comme les amanites, sont responsables de nombreuses atteintes hépatiques à travers le monde chaque année (Garcia et al. 2015).

II. LES XENOBIOTIQUES HEPATOTOXIQUES

Les produits chimiques sont également responsables d'atteintes hépatiques très variées, pouvant passer par diverses voies d'exposition, comme l'inhalation, l'ingestion ou le passage percutané. Leur rôle est particulièrement difficile à mettre en évidence du fait que l'exposition est souvent méconnue, intermittente et accidentelle. De plus, les effets produits peuvent avoir lieu longtemps après l'exposition, augmentant les difficultés d'imputabilité. Plusieurs dizaines d'agents chimiques sont concernés (Larrey 2009). Dans ce contexte, il est intéressant de rappeler l'épidémie d'ictères chez les adolescents français utilisant des détachants en inhalation à visée récréative dans les années 1980, contenant une association tetrachlorure de carbone et de trichloroéthylène (Pessayre 1986; Larrey 2000).

Les hépatites induites par les xénobiotiques ne présentent pas de traitement spécifique, hormis le cas des intoxications au paracétamol. La prise en charge repose sur l'interruption de l'exposition à l'agent responsable pour éviter une aggravation de l'atteinte hépatique. Dans ce travail, la volonté de travailler sur des toxiques fréquemment rencontrés en laboratoire de toxicologie et ne présentant pas de traitement spécifique nous a permis de nous focaliser sur deux xénobiotiques présentant une hépatotoxicité intrinsèque : l'éthanol et les amanitines.

A. L'éthanol

1. Propriétés et origine

L'éthanol, ou alcool éthylique, est un alcool primaire, de formule développée CH3-CH2-OH (Bonnard et al. 2011) (Figure 17). C'est un liquide mobile, volatil, incolore, inflammable et miscible à l'eau. L'éthanol est également miscible à la plupart des solvants usuels, étant lui-même un bon solvant des graisses et dissolvant des nombreuses matières plastiques.

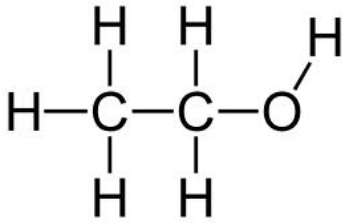


Figure 17 : Formule développée de l'éthanol

a) Fermentation

La fermentation alcoolique est une des principales sources d'alcool. Elle est majoritairement assurée par les levures de la famille des *Saccharomyces,* qui sont d'ailleurs utilisés pour la fabrication du vin, de la bière, du cidre et de diverses boissons fermentées. Ce phénomène naturel résulte de l'oxydation incomplète du glucose selon la formule suivante : $C_6H_{12}O_6$ (glucose) => 2 CO_2 + 2 C_2H_5OH + 2 ATP (Guiraud 1998). Cependant, de nombreux sucres sont fermentescibles en éthanol par les levures.

L'alcool produit paralysant les levures, la fermentation s'arrête définitivement à partir d'un certain degré d'alcool, variable selon les espèces de levures (Bourgeois et Larpent 1996). Une solution fermentée ne pourra ainsi pas dépasser les 13° d'alcool (Regnault). Pour recourir à des taux d'éthanol plus élevés, d'autres procédés sont utilisés.

b) Procédés industriels

Les procédés industriels regroupent principalement la « catalyse indirecte », développée dans les années 30 et aujourd'hui obsolète, ainsi que la « catalyse directe », développée dans les années 1970, et toujours grandement utilisée. La catalyse indirecte consiste en l'estérification de l'éthylène par l'acide sulfurique, produisant du sulfate d'éthyle, lui-même hydrolysé pour donner de l'éthanol et de l'acide sulfurique. La catalyse directe consiste quant à elle à l'hydratation de l'éthylène, en présence d'acide phosphorique comme catalyseur (Mills et Ecklund 1987; Logsdon 2004).

2. Consommation

L'histoire de l'origine de la consommation d'alcool est rapportée en Annexe 1, au sein de la Revue 1, et n'est donc pas détaillée au sein de cette section. Concernant les données plus contemporaines, selon l'Organisation mondiale de la santé, la consommation d'alcool est un facteur causal dans plus de 60 grands types de maladies et de blessures, entraînant environ 2,5 millions de décès chaque année (World Health Organization 2011). Ainsi, environ 4,5 % de la charge mondiale de morbidité et de mortalité est imputable à l'alcool. En outre, cette morbidité et cette mortalité causées par la consommation d'alcool ont des répercussions socio-économiques, notamment les coûts médicaux supportés par les gouvernements et la charge financière et psychologique pour les familles (World Health Organization 2011).

De nombreux chercheurs ont rapporté que de faibles niveaux de consommation d'alcool sont associés à un risque de mortalité plus faible (Keller 2016). La méta-analyse de Jayasekara et al. (2014) portant sur 62 950 participants à l'étude a révélé que l'effet protecteur de l'éthanol est observé pour des consommations de 1 à 29 g/jour (correspondant à 0 à 3 unités standard d'alcool par jour), avec un risque relatif (RR) [intervalle de confiance (IC) à 95 %] de 0,90 [0,81, 0,99]. Inversement, des consommations d'alcool comprises entre 30 et 59 g/jour et supérieures à 60 g/jour ont été associées à un RR [95% IC] de mortalité de 1,19 [0,89, 1,58] et 1,52 [0,78, 2,98], respectivement (Jayasekara et al. 2014).

Dans une étude portant sur 380 395 personnes, Bergmann et al. (2013) ont constaté que la limitation de la consommation d'alcool à moins de cinq unités d'alcool par jour était associée à un risque de décès plus faible (principalement en raison d'une diminution des maladies cardiovasculaires), tandis que la consommation de cinq boissons alcoolisées ou plus par jour était associée à un risque de décès 2 à 5 fois plus élevé (principalement en raison de pathologies cancéreuses liées à l'alcool) (Bergmann et al. 2013). Une méta-analyse établissant un lien entre une consommation modérée d'éthanol et une diminution de la mortalité toutes causes confondues était conforme à ces résultats (Gmel et al. 2003; Di Castelnuovo 2006).

Malgré le nombre croissant de preuves d'un effet protecteur d'une consommation faible à modérée d'alcool, les résultats sont toujours sujets à controverse. A titre d'exemple, l'étude de Goulden et al. (2016) portant sur 24 029 personnes de plus de 50 ans n'a pas révélé d'association entre la mortalité toutes causes confondues et la consommation modérée d'alcool (Goulden 2016). De même, une étude récente portant sur 28 millions d'individus a révélé que la mortalité toutes causes confondues augmentait avec l'augmentation des niveaux de consommation ; les auteurs concluant donc que le niveau de consommation d'alcool minimisant les conséquences néfastes sur la santé était nul (Griswold et al. 2018).

Ainsi, les preuves ne sont pas concluantes quant à savoir si une consommation modérée d'alcool a un effet protecteur. Cependant, tous les chercheurs s'accordent à dire qu'une consommation excessive d'alcool augmente la mortalité toutes causes confondues. La dose à laquelle une surmortalité est observée varie d'une étude à l'autre mais s'échelonne de 30 à 40 g/jour, ce qui correspond à trois ou quatre unités standard d'alcool (Bergmann et al. 2013; Jayasekara et al. 2014).

3. Toxicocinétique

a) Absorption et distribution

Les taux d'absorption d'alcool varient selon plusieurs paramètres. Il est par exemple rapporté que son absorption la plus rapide se produit lorsque l'estomac est vide et en présence de concentrations d'alcool entre 20 et 30%. Ainsi, les alcools type « sherry » (20% d'alcool) seront plus rapidement absorbés que la bière (3-8%), où les spiritueux (40%) ; ces derniers ralentissant la vidange gastrique et inhibant l'absorption d'éthanol. La nourriture, et particulièrement les glucides, ralentissent également l'absorption d'alcool ; la concentration sanguine n'atteignant pas un quart de celle obtenue avec un estomac vide (Paton 2005).

L'éthanol étant une molécule amphiphile de faible poids moléculaire, il possède une forte capacité de diffusion aux travers de tous les tissus et fluides corporels. Cette caractéristique lui permet d'atteindre de nombreux sites d'action. Bien que la plupart des organes soient ainsi exposés à une concentration égale à la concentration sanguine, le foie constitue une exception, recevant un flux sanguin plus concentré directement de l'estomac et de l'intestin via la veine porte.

D'un point de vue différence homme – femme, il ressort que ces dernières présentent des alcoolémies supérieures à celle des hommes pour une même consommation, et cela malgré un ajustement au poids du corps. L'alcool se distribuant très peu dans les graisses, le fait que les femmes possèdent un tissu sous cutané plus riche en graisse et un volume sanguin plus petit expliquerait ce phénomène. Egalement, les femmes possèdent moins d'alcool déshydrogénase au niveau stomacal, diminuant ainsi la métabolisation de l'alcool avant son absorption (Paton 2005).

b) Métabolisme

La toxicologie de l'éthanol étant étroitement liée à son métabolisme, la connaissance de ce dernier est indispensable pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques.

Comme mentionnée précédemment, l'ADH hépatique est la principale enzyme responsable du métabolisme oxydatif de phase I de l'éthanol, produisant de l'acétaldéhyde et du nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) (Cederbaum 2012). L'acétaldéhyde est ensuite oxydé par l'ALDH en acétate (Figure 18). L'acétate n'est cependant pas le métabolite final puisqu'il peut lui-même être converti en CO_2, acides gras, corps cétoniques, cholestérol ou stéroïdes (Cederbaum 2012).

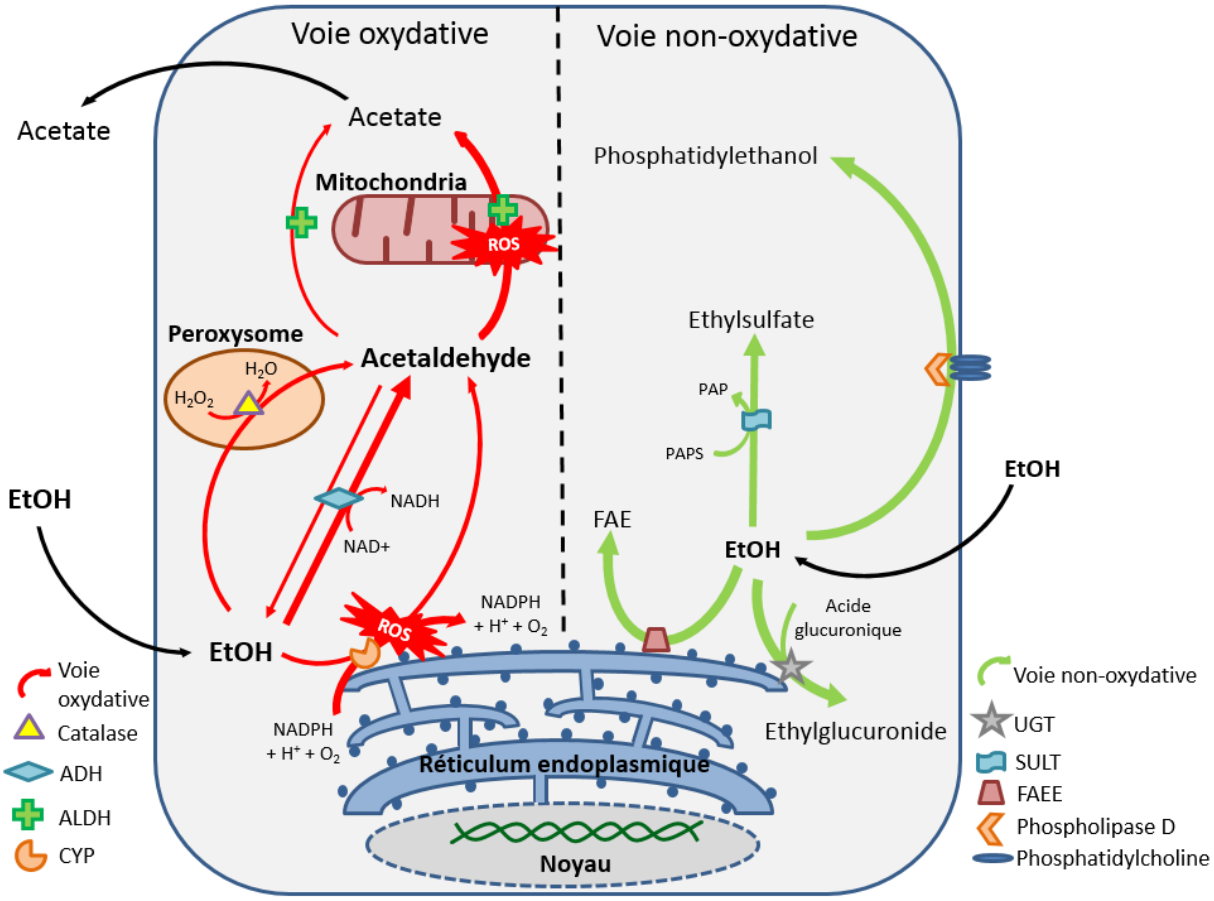


Figure 18 : Voies de métabolisation oxydative et non-oxydative de l'éthanol au sein des hépatocytes. ADH: alcohol dehydrogenase; ALDH: aldehyde dehydrogenase; CYP: cytochrome P450; EtOH: ethanol; FAE: fatty acid ester; FAEE: fatty acid ethyl ester; SULT: sulfotransferase; UGT: uridine diphosphate glucuronyltransferase (Adapté de Le Daré et al. 2019b.

La balance entre les différents isoformes d'ADH et ALDH régule les concentrations d'acétaldéhyde, et constitue un facteur de risque dans le développement de l'alcoolisme (Agarwal et Goedde 1989). En effet, les effets d'intolérance à l'éthanol tels que des nausées, et vasodilatations responsables notamment de « flush » faciaux, sont attribués à la concentration d'acétaldéhyde.

De manière intéressant, l'ADH et l'ALDH montrent des caractéristiques différentes en fonction de leurs variants génétiques, qui influencent le métabolisme de l'éthanol (Edenberg 2007). Par exemple, les génotypes de l'ADH ont été associés à des différences de consommation d'alcool; les sujets exprimant l'allèle ADH2*2 (enzyme hautement active) présentant un risque diminué d'alcoolisme (Borràs et al. 2000).

Egalement, 15 à 40% de la population du Sud-Est asiatique présente une inactivation de l'ALDH, menant à des taux d'acétaldéhyde 5 à 20 fois supérieur à la population présentant une isoenzyme active (Cederbaum 2012). Une accumulation de ce métabolite chez ces populations explique ainsi un « découragement » à boire de grande quantité d'alcool dans la vie quotidienne, les protégeant de l'alcoolisme en comparaison des populations caucasiennes.

Il existe également une voie de métabolisation secondaire de l'éthanol, impliquant la voie des cytochromes P450, notamment le CYP2E1. Cette voie de métabolisation oxydative, principalement retrouvée au niveau du réticulum endoplasmique des hépatocytes, permet la production d'acétaldéhyde à partir de l'éthanol, puis d'acétate à partir de l'acétaldéhyde. Par ailleurs, l'éthanol induit son propre métabolisme, par inhibition de la dégradation du CYP2E1 (Lu et Cederbaum 2008). Ce mécanisme est considéré comme jouant un rôle majeur dans la tolérance à l'éthanol chez les consommateurs chroniques (Cederbaum 2012).

Les autres voies de métabolisation mineures de l'éthanol comprennent la glucuroconjugaison, donnant naissance à l'éthylglucuronide, la sulfoconjucongaison produisant de l'éthylsulfate, la voie des esters éthyliques d'acides gras (FAEE) synthases formant des esters éthyliques d'acides gras et la voie de la phospholipase D synthétisant du phosphatidyléthanol (Cederbaum 2012).

c) Elimination

L'élimination de l'alcool est effectuée par plusieurs organes, notamment les reins, la peau ou encore les poumons. De manière similaire à l'absorption, de nombreux facteurs influencent l'élimination de l'alcool ; une variabilité de 3 à 4 fois étant observée en fonction des variabilités génétiques ou encore des facteurs environnementaux. En 2010, une étude réalisée sur 48 individus âgées de 50 à 59 ans avait ainsi estimé le taux d'élimination d'alcool entre 10 et 35 mg/100 mL/h (Jones 2010).

4. Toxicité

a) Vue d'ensemble de la toxicité de l'éthanol

Par convention, la toxicité de l'éthanol est subdivisée en toxicité aiguë et en toxicité chronique.

Les manifestations cliniques des intoxications aigues alcooliques sont bien connues, et sont étroitement liées à l'alcoolémie. Ces symptômes sont essentiellement d'ordre neuropsychiques, retrouvant une excitation intellectuelle et psychique, suivi d'un syndrome cérébelleux accompagnant l'ivresse caractérisée, puis d'un coma plus ou moins profond pouvant engager le pronostic vital par paralysie des centres respiratoires (Wimer et al. 1983; Girre et al. 1995).

Chez l'Homme, les premiers symptômes sont observables à partir de 0.2 g/L, pouvant donner lieu à une diminution de la coordination motrice, du temps de réaction, et des troubles du jugement. Ces effets, caractérisant l'ébriété, disparaissent rapidement après la fin de l'exposition (Bismuth et al. 2000). Les effets dépresseurs neuropsychiques de l'éthanol sont bien documentés et reliés à leur interaction avec les récepteurs GABA-A (Davies 2003).

La toxicité chronique de l'éthanol est quant à elle multi-organe, retrouvant des atteintes hépatiques, neurologiques, cardiovasculaires, hématologiques, reprotoxiques, ou encore des maladies cancéreuses. L'objet de ce travail se voulant centré sur les hépatotoxicités, seules les atteintes hépatiques seront développées dans cette présente partie. Toutefois, un travail de synthèse plus global portant sur les effets néfastes et bénéfiques de l'éthanol, aussi bien aiguë que chronique, ainsi que sur ses effets immunomodulateurs est présenté en Annexe 2 (Revue 2).

b) Pathologies hépatiques liées à l'éthanol

Les lésions hépatiques dues à l'éthanol peuvent être divisées en trois phases : la stéatose hépatique alcoolique, la stéatohépatite alcoolique et la fibrose/cirrhose alcoolique. La figure 19 ci-dessous représente l'évolution de ces atteintes.

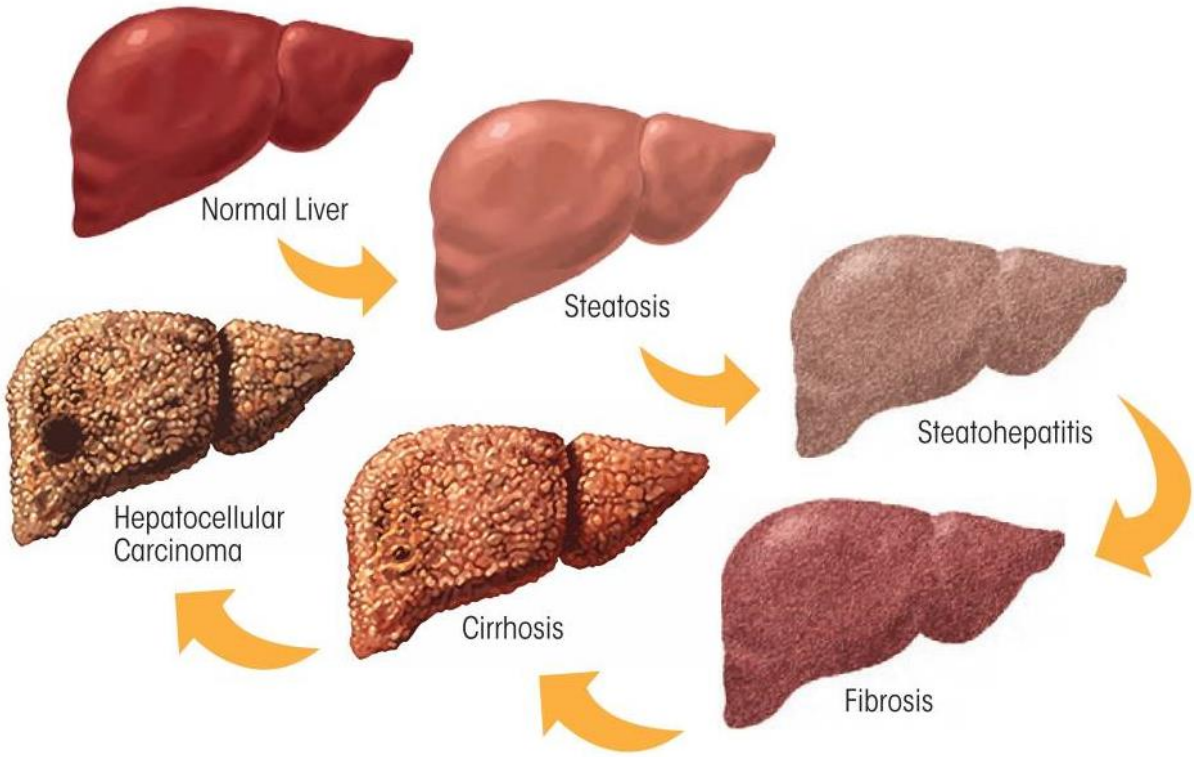


Figure 19 : Evolution des hépatopathies alcooliques (Osna et al. 2017)

a. Stéatose hépatique alcoolique

La stéatose, caractérisée par une accumulation de lipides au sein puis autour des hépatocytes, est la plus répandue et la plus précoce des lésions hépatiques. Elle se développe chez plus de 90% des individus consommant quatre à cinq unités standard d'alcool de manière chronique (Lieber 2004), ou chez les individus pratiquant le *binge drinking* , définit par une consommation de quatre à cinq unités d'alcool en moins de 2 h. Etant réversible, la stéatose hépatique est de bon pronostic, bien que sa chronicité constitue un facteur de risque de pathologies fibrotiques hépatiques (Teli et al. 1995).

Sa physiopathologie est étroitement liée au métabolisme oxydatif de l'éthanol, générant des hauts niveaux de NADH et de l'acétaldéhyde, qui altèrent la balance redox cellulaire. En conséquence, la protéine *early growth response-1* (Egr-1) est induite, entrainant d'une part l'activation du facteur de transcription *sterol regulatory element binding protein-1C* (SREBP-1c) qui induit l'expression des gènes de la lipogenèse et d'autre part la synthèse de TNF-α, une cytokine lipogénique (Osna et al. 2017) (Figure 20).

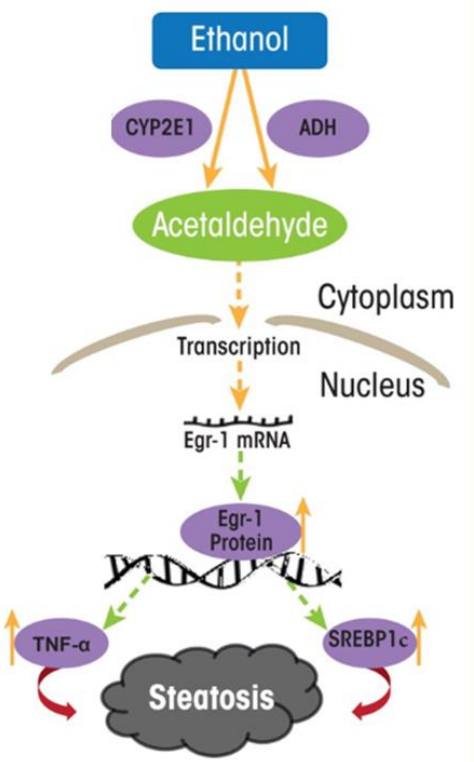


Figure 20 : Mécanismes proposés d'induction de la lipogenèse hépatique par l'éthanol (Adapté de Osna et al. 2017)

Parallèlement à cette augmentation de la production lipidique intra-hépatique, il est aujourd'hui bien décrit que l'éthanol altère la synthèse des lysosomes, indispensables au bon fonctionnement de la lipophagie. Ce processus, qui permet la digestion lipidique par des lipases et l'entrée dans la β-oxydation mitochondriale, est donc retardé (Kharbanda et al. 1995). De plus, la génération de NADH lors de l'oxydation de l'alcool, et la toxicité mitochondriale de l'acétaldéhyde inhibent la β-oxydation, résultant en une augmentation de l'accumulation lipidique.

Enfin, l'éthanol s'est montré inhibiteur de la production de *very low density lipoprotein* (VLDL), constituant responsable de l'export hépatique de triglycérides et de cholestérol (Kharbanda et al. 2009).

En provoquant la lipolyse au niveau des adipocytes, la consommation chronique d'alcool augmente également la fraction d'acides gras libres pouvant être capté par le foie (Wei et al. 2013). Par ailleurs, il est important de souligner que la production précoce de ROS lié à son métabolisme est responsable d'une augmentation rapide de la fluidité membranaire des hépatocytes. Cette dernière, provoquant une élévation secondaire de la teneur en fer de bas poids moléculaire cytoplasmique, conduit à une augmentation de la production de ROS. Ce phénomène peut alors induire une peroxydation lipidique et le déclenchement de l'apoptose (Sergent 2004). Considérant cette explosion de la production de ROS par l'augmentation de la fluidité membranaire, on comprend dès lors l'effet pervers d'une consommation chronique d'alcool.

b. Stéatohépatite alcoolique

La stéatohépatite alcoolique, qui se développe à partir de la stéatose sous-jacente, survient chez 30 à 40% des individus rapportant une consommation chronique d'alcool. En effet, les lipides accumulés au sein des hépatocytes sont d'avantage sujet à la peroxydation lipidique et aux dommages oxydatifs subséquents. Elle est associée à un fort taux de mortalité à court terme (Osna et al. 2017).

Les cellules de Küpffer jouent un rôle central dans la progression dans l'induction de l'inflammation hépatique. Ces cellules, représentant 15% des cellules hépatiques et 50% des macrophages de l'organisme, sont classiquement regroupées en deux phénotypes : les macrophages M1 pro-inflammatoires, et les macrophages M2 anti-inflammatoires. Cette polarisation est fonction de leur microenvironnement, incluant les facteurs de croissance circulants, les cytokines, les PAMPs, et les DAMPs, venant notamment du système digestif par la veine porte.

Lors d'une exposition chronique à l'éthanol, des interactions complexes impliquant les effets de l'acétaldéhyde, les ROS, les lésions médiées par les endotoxines intestinales (Lipopolysaccharide (LPS)) et le stress du réticulum endoplasmique sont responsables de la polarisation des macrophages en phénotype M1 pro-inflammatoire. Ces derniers, secrétant alors des cytokines pro-inflammatoires, promeuvent l'activation de l'inflammasome NLRP3 et le relargage de chimiokines, provoquant l'infiltration hépatique de cellules du système immunitaire comme les polynucléaires neutrophiles et les lymphocytes (Bode et Christian Bode 2003; Osna et al. 2017).

Les lésions hépatocytaires, et le relargage de signaux de danger associés comme l'ATP, liées notamment au métabolisme oxydatif de l'éthanol, serait également responsable d'une activation de l'inflammasome NLRP3 *via* les récepteurs purinergiques. Parallèlement, l'exposition à l'éthanol, notamment par l'intermédiaire du LPS, activerait le complément, interagissant avec les récepteurs macrophagiques C3aR et C5aR et conduisant à l'augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires (Dixon et al. 2013).

Le relargage massif de ces dernières, notamment le TNF-α, est directement responsable de la mort des hépatocytes par apoptose et de l'entretien de l'hépatite alcoolique (Duddempudi 2012). La figure 21 ci-dessous représente les principaux mécanismes d'activation des macrophages dans le cadre de la stéatohépatite alcoolique.

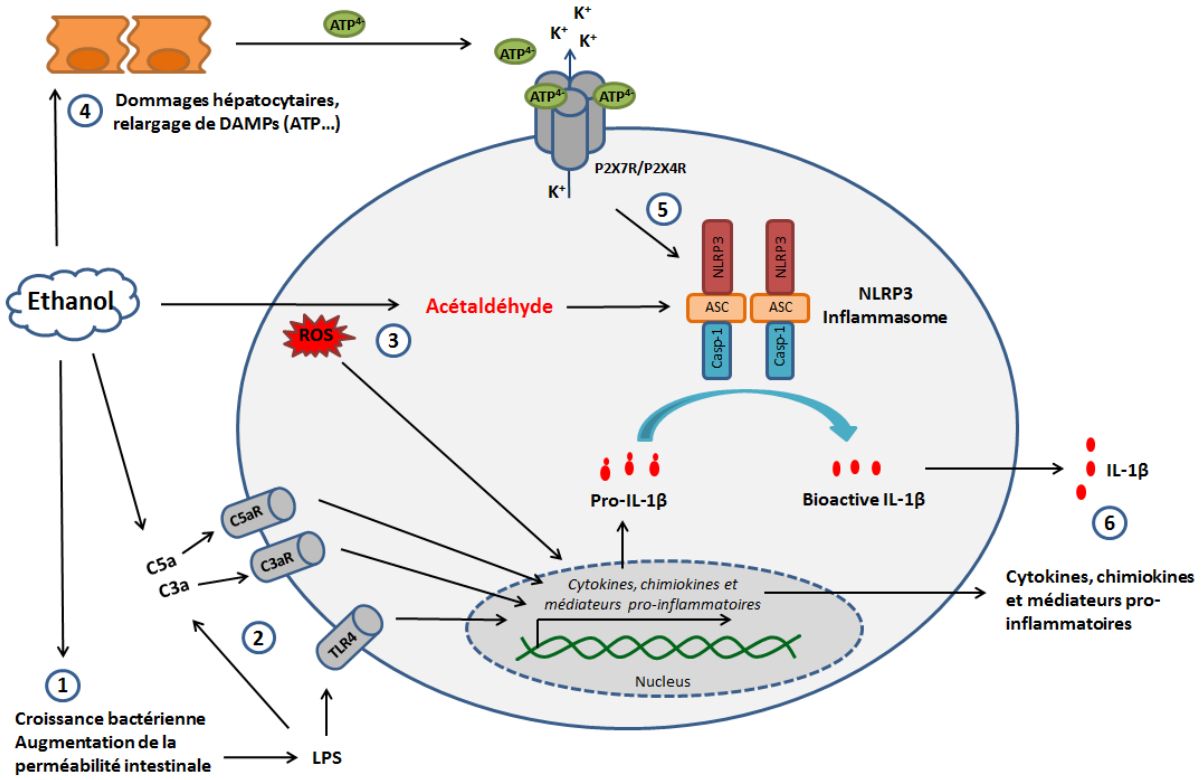


Figure 21 : Principaux mécanismes impliqués dans l'activation des cellules de Küpffer par la consommation d'éthanol. Etape 1 : Augmentation de la perméabilité intestinale entrainant le relargage de LPS dans la circulation systémique et l'activation du récepteur TLR4. Etape 2 : activation du complément, notamment par l'intermédiaire du LPS. Les étapes 1 et 2 entrainent la production de chimiokines, cytokines et médiateurs pro-inflammatoires. Etape 3 : métabolisme oxydatif de l'éthanol ; les ROS et l'acétaldéhyde entrainent l'activation de l'inflammasome NLRP3 et la production de cytokines pro-inflammatoires. Etape 4 : Dommages hépatocytaires dues au métabolisme oxydatif de l'éthanol entrainant le relargage de signaux de danger, notamment l'ATP. Etape 5 : L'ATP active l'inflammasome NLRP3 par l'intermédiaire des récepteurs purinergiques. Etapes 6 : Relargage des chimiokines, cytokines et médiateurs de l'inflammation produits en amont. Abbréviations : DAMPs : Danger associated molecular patterns ; LPS : lipopolysaccharide ; ROS : reactive oxygen species.

c. Fibrose et cirrhose hépatique alcoolique

La troisième phase est le reflet de la progression de la stéatohépatite à partir de l'état inflammatoire, où la régénération des hépatocytes est sévèrement compromise. A ce stade, les cellules stellaires hépatiques jouent un rôle clé dans le dépôt de matrice extracellulaire, composant caractérisant la fibrose. Normalement quiescentes dans l'espace de Disse, ces cellules subissent de complexes processus d'activation, du fait des lésions hépatiques, ainsi que du relargage de cytokines pro-inflammatoires par les cellules de Küpffer (Osna et al. 2017).

La progression de la fibrose lors de l'inflammation chronique produite par l'éthanol mène au remplacement progressif du parenchyme hépatique par un tissu cicatriciel, compromettant les fonctions métaboliques et homéostasiques hépatiques (Osna et al. 2017). Ce stade de cirrhose est alors le siège de développement de complications sévères, comprenant l'hypertension portale et le carcinome hépatocellulaire, deuxième cause de décès par cancer (Grewal et Viswanathen 2012).

Les mécanismes d'immunomodulation de l'éthanol apparaissent comme déterminants dans la toxicité de cet alcool et ouvrent ainsi de nombreux champs d'exploration. Les cellules de Küpffer, centrales dans la physiopathologie du tournant inflammatoires des alcoolopathies hépatiques, attirent donc les regards quant à de nouveaux espoirs thérapeutiques. Dans cette perspective, l'étude de cette population cellulaire en réponse à l'éthanol semble prometteuse.

B. Les amanitines

1. Propriétés et origine

Les amanitines font partie de la famille des amatoxines, octapeptides bicycliques toxiques de poids moléculaires d'environ 900 g/mol, contenus dans certains champignons. Actuellement, trois grandes familles de champignons sont connues comme contenant ces toxines : les amanites (A*manita* sp.), les galères (*Galerina* sp.), et les lépiotes (*Lepiota* sp.) (Tableau 3).

Amanita sp.	*Galerina* sp.	*Lepiota* sp.
A. phalloides	*G. badipes*	*L. brunneoincarnata*
A. bisporigera	*G. beinrothii*	*L. brunneolilacea*
A. decipiens	*G. fasciculare*	*L. castanea*
A. hygroscopica	*G. helvoliceps*	*L. clypeolaria*
A. ocreata	*G. marginata*	*L. clypeolarioides*
A. subalbiacea	*G. sulciceps*	*L. felina*
A. tenuifolia	*G. unicolor*	*L. fulvella*
A. verna	*G. venenata*	*L. fuscovinacea*
A. virosa		*L. griseovirens*
		L. heimii
		L. helveoloides
		L. kuehneri
		L. langei
		L. lilacea
		L. locanensis
		L. ochraceofulva
		L. pseudohelveola
		L. pseudolilacea
		L. rufescens
		L. subincarnata
		L. xanthophylla

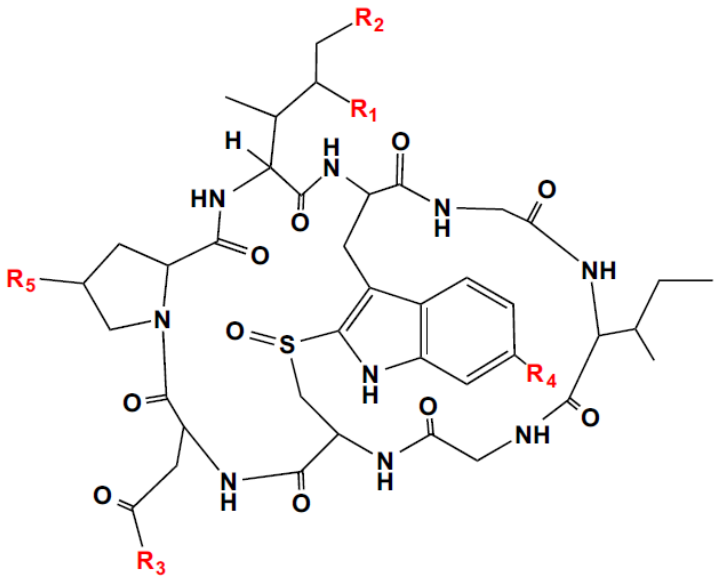
Tableau 3 : Principales espèces connues comme contenant des amanitines (Garcia et al. 2015)

Parmi l'ensemble de ces espèces, l'amanite phalloïde (*Amanita phalloides*) (Figure 22) est responsable de la plupart des intoxications mortelles, l'atteinte hépatique sévère qu'elle occasionne compromettant rapidement le pronostic vital (Diaz 2005). Cette espèce est largement prédominante en Europe, notamment centrale et occidentale (Barceloux 2008). Cependant, des cas d'intoxication ont également été décrits en Amérique du Nord, Amérique Centrale et Amérique du Sud, Australie, Asie, et Afrique (Garcia et al. 2015). De manière cohérente, le terme de syndrome phalloïdien est utilisé pour désigner les intoxications aux amanitines, quel que soit l'espèce fongique en cause.

Figure 22 : Amanite phalloïde (*Amanita phalloides*). Visualisation des éléments caractéristiques regroupant une couleur vert olive du chapeau, un corps large, une volve en sac, un anneau mou en jupe, des lames blanches nombreuses et libres laissant une sporée blanche.

La famille des amatoxines est composée d'au moins neuf composés : α-amanitine, β-amanitine, γ-amanitine, ε-amanitine, amanine, amaninamide, amanulline, acide amanullinique, et proamanulline (Figure 23) (Garcia et al. 2015).

Ces dernières sont classées en substances neutres (α-amanitine, γ-amanitine, amaninamide, amanulline, et proamanulline), et substances acides (β-amanitine, ε-amanitine, amanine et acide amanullinique), sans que ces différences de propriétés n'aient été associées à une différence de toxicité. Ces toxines sont très solubles dans l'eau, et présentent une grande résistance à la chaleur et au froid, les rendant extrêmement résistantes aux différents procédés de consommation (cuisson, congélation, assèchement) (Wieland et al. 1978). Egalement, ces toxines sont résistantes aux enzymes et dégradations acides, et ne subirait aucun métabolisme, les rendant résistantes aux procédés d'inactivation intestinale et de détoxification (Wieland et al. 1978; Garcia et al. 2015).



	R1	R2	R3	R4	R5
α-amanitin	CH_2OH	OH	NH_2	OH	OH
β-amanitin	CH_2OH	OH	OH	OH	OH
γ-amanitin	CH_3	OH	NH_2	OH	OH
ε-amanitin	CH_3	OH	OH	OH	OH
Amanin	CH_2OH	OH	OH	H	OH
Amanin amide	CH_2OH	OH	NH_2	H	OH
Amanullin	CH_3	H	NH_2	OH	OH
Amanullic acid	CH_3	H	OH	OH	OH
Proamanullin	CH_3	H	NH_2	OH	H

Figure 23: Structure des amatoxines selon Garcia et al. (2015)

En parallèle des amatoxines, deux autres familles de toxines ont été décrites comme impliquées dans la toxicité de ces champignons : les phallotoxines et les virotoxines. Cependant, étant donné leurs biodisponibilités nulles par voie orale, et notre intérêt pour l'étude de la toxicité hépatique, nous nous focaliserons uniquement sur les amatoxines au cours de ce travail.

2. Consommation

Ces dernières années, la consommation de champignons est devenue de plus en plus populaire, en partie du fait de leurs propriétés nutritionnelles et médicinales. Ce phénomène a ainsi augmenté le risque de confusion lors des cueillettes, et donc d'intoxications (Cheung 2010).

Au niveau mondial, il est estimé que 10 à 50 espèces de champignons sur les 14000 connues seraient potentiellement mortelles, en fonction des études (Jo et al. 2014; Govorushko et al. 2019). Selon leur répartition géographique, la problématique des intoxications aux champignons reste donc variable. Cette dernière représente un sérieux problème de santé publique dans plusieurs pays, incluant la Bulgarie, la République Tchèque, la Chine, l'Iran, le Mexique, l'Italie, la Hongrie, le Japon, le Népal, la Pologne, la Roumanie, la Russie, la Corée du Sud, la Thaïlande, la Turquie et l'Ukraine (Govorushko et al. 2019).

En France, les données des centres anti-poisons rapportent 10 662 intoxications aux champignons entre 2010 et 2017, avec un nombre croissant depuis 2016. Sur les 1300 cas par an en moyenne, environ 500 surviennent en octobre (Sinno-Tellier et al. 2018). Du fait des contextes de cueillette en famille, la dispersion d'âge reste très étendue (9 mois - 96 ans) avec une moyenne de 45,2 ans, et un sex ratio de 1.

Sur les 11 à 44 cas graves observés sur notre territoire chaque année, un syndrome phalloïdien est retrouvé dans 62,1% des cas, un syndrome panthérinien dans 12,6% des cas et un syndrome sudorien dans 10.1% des cas. Jusqu'à cinq décès par an sont finalement observés chaque année, majoritairement attribués à un syndrome phalloïdien (Sinno-Tellier et al. 2018).

3. Toxicocinétique

a) Absorption et distribution

Le syndrome phalloïdien constitue le syndrome le plus mortel parmi les intoxications aux champignons, et est majoritairement causé par le genre *Amanita* (Vetter 1998; Broussard 2001). Parmi les amatoxines, l'α- et la β-amanitine sont les plus largement étudiées. Les données de toxicocinétique, obtenues chez l'animal et au cours des cas d'intoxications humains, rapportent une très bonne absorption des amatoxines dans le tractus gastro-intestinale et une détection dans les urines dès 90 à 120 min post-ingestion (Faulstich et al. 1985; Homann et al. 1986; Jaeger et al. 1993).

La distribution rapide au niveau hépatique et rénale est notamment expliquée par une absence de liaison aux protéines plasmatiques. Après une administration intraveineuse chez le chien, la demi-vie des amatoxines a ainsi été estimée entre 26,7 et 49,6 min, leur détection sanguine n'étant plus possible après 4 à 6 h (Faulstich et al. 1985). Le foie constitue une cible privilégiée de ces toxines, recevant une quantité massive d'amanitines après absorption gastro-intestinale, et exprimant de manière spécifique le principal transporteur de ces toxines au niveau sinusoïdal, l'OATP1B3 (Letschert et al. 2006).

b) Métabolisme et élimination

Les amatoxines ne seraient pas métabolisées et excrétées en grande quantité dans les urines (80 à 90 %) au cours des premières 72 h d'intoxication (Jaeger et al. 1993). Faulstich et al. (1985) ont également montré qu'une petite quantité de toxines pouvait être éliminée par la bile (environ 7 %), et réabsorbée au niveau intestinal, accomplissant un cycle entéro-hépatique. Egalement, ces mêmes auteurs ont rapporté une élimination fécale d'α-amanitine dans les 24 premières heures (Faulstich et al. 1985).

Enfin, l'élimination urinaire des amatoxines explique la néphrotoxicité rapportée ; les concentrations rénales étant retrouvées 6 à 90 fois plus élevées qu'au niveau hépatique (Jaeger et al. 1993; Mydlík et Derzsiová 2006).

4. Toxicité

a) Aspects cliniques

Comme mentionné précédemment, la symptomatologie des intoxications à l'α-amanitine est très majoritairement attribuée à son accumulation au niveau hépatique et rénale. Cependant, les symptômes ne surviennent que lorsque des dommages importants sont occasionnés. De ce fait, les signes cliniques ne sont perceptibles que plusieurs heures à plusieurs jours après l'ingestion. Dans la littérature, trois phases sont classiquement distinguées : (i) la phase gastro-intestinale, (ii) la période de latence et (iii) la phase hépato-rénale (Karlson-Stiber et Persson 2003).

La première phase apparait brutalement, 6 à 24 h après l'ingestion, et est caractérisée par des nausées, vomissements, diarrhées, douleurs abdominales et hématurie. Elle dure 12 à 36 h, et peut être accompagnée de fièvre, de tachycardie, de désordres métaboliques tels que des hypoglycémies, de déshydratation et de perturbations électrolytiques (Barceloux 2008). Passé cette première phase, une période faussement rassurante de latence asymptomatique survient, au cours de laquelle s'installe l'atteinte hépatorénale de manière progressive, environ 72 h post-ingestion (Garcia et al. 2015; Tavassoli et al. 2019). Enfin, lorsque les lésions hépatiques deviennent significatives, la troisième phase est caractérisée par une augmentation des transaminases et de la lactate deshydrogénase, ainsi qu'une altération de la coagulation par diminution du taux de prothrombine. Egalement, l'apparition de manifestations hémorragiques par inhibition de la synthèse hépatique des facteurs de la coagulation, d'encéphalopathie ou de cardiomyopathie constitueront des éléments de mauvais pronostic (Garcia et al. 2015; Tavassoli et al. 2019).

Les données histologiques hépatiques décrites dans la cadre des syndromes phalloïdiens varient selon la gravité des intoxications. Dans le cas d'intoxications modérées non mortelles, Wepler et al. ont rapporté dans une série de huit cas l'apparition d'une nécrose centrolobulaire sans stéatose ni développement de réponse inflammatoire initiale. Après plusieurs semaines, la phagocytose des cellules nécrotiques par les cellules de Küpffer active une légère réponse inflammatoire, associé à l'infiltration de lymphocytes (Wepler et Opitz 1972).

Dans le cas d'intoxications mortelles, la présence d'une stéatose a été décrite comme précédant l'apparition de la nécrose centrolobulaire. Par ailleurs, trois phases ont été décrites, retrouvant (i) la pénétration d'érythrocytes au sein des hépatocytes, (ii) l'apparition de fusions lysosomales et (iii) le développement d'une nécrose centrolobulaire associé à des infiltrats hémorragiques hépatiques (Fineschi et al. 1996).

Chez la souris, des études en microscopie électronique ont permis de mettre en évidence des changements hépatocytaires très précoces après l'administration d'α-amanitine. Dès 30 minutes, l'administration de cette toxine provoque une diminution du nombre de fibrilles périchromatiniennes, associé à une fragmentation nucléaire et une augmentation des granules de périchromatine et interchromatiniens de 1 à 5 h après le début du traitement (Petrov et Sekeris 1971).

b) Toxicodynamique

Le principal mécanisme hépatotoxique des amanitines est attribué à l'inhibition nucléaire non covalente de l'ARN polymérase de type II (ARNPII), diminuant de ce fait les niveaux d'ARNm et de la synthèse protéique (Wieland 2009). Le foie étant un acteur majeur de la synthèse protéique, il est donc plus impacté. Egalement, les signaux de stress induits par les amanitines ont été montré inducteurs de la protéine p53, permettant la formation de complexes avec des protéines anti-apoptotiques (Bcl-X_L et Bcl-2) et le déclenchement de l'apoptose par relargage mitochondrial de cytochrome c dans le cytosol (Ljungman et al. 1999; Arima et al. 2005; Leu et George 2007).

De manière cohérente, Wang et al. (2018) ont montré que l'α-amanitine induisait des changements significatifs dans le protéome mitochondrial, associé à une destruction du potentiel de membrane (Wang et al. 2018). Ainsi, l'apoptose induite par les amanitines a été proposé comme étant déterminante dans la physiopathologie dans ces intoxications (Magdalan et al. 2010). La Figure 24 ci-dessous illustre les principaux mécanismes d'action toxique de l'α-amanitine.

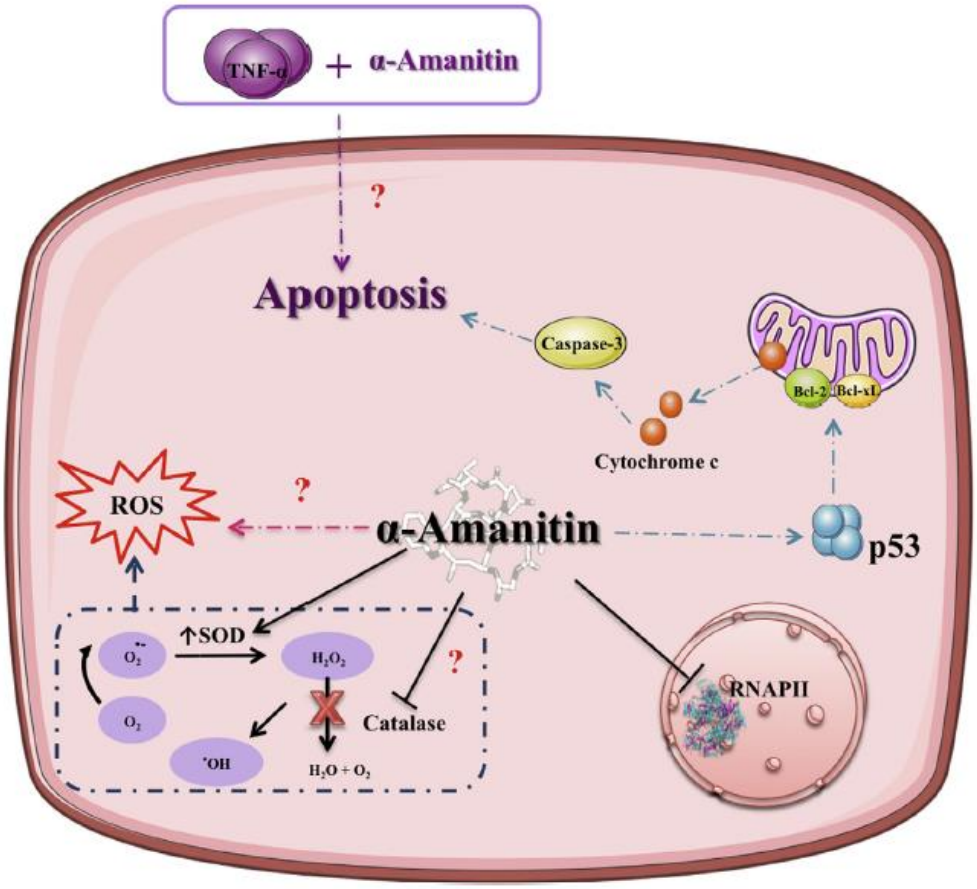


Figure 24 : Mécanismes d'action toxique de l'α-amanitine (Garcia et al. 2015).

La génération de stress oxydant a également été avancée comme étant importante dans le développement de ces hépatotoxicités sévères. En effet, il a été montré que l'accumulation d'α-amanitine conduit à une augmentation de l'activité de la superoxide dismutase (SOD) et de la glutathion peroxidase, des produits du malondialdehyde et de la peroxidation lipidique, corrélée à une inhibition de l'activité de la catalase (Zheleva et al. 2007; DüNdar et al. 2017). Enfin, Zheleva A. (2013) a montré que l'α-amanitine était capable de former des radicaux libres phénoxyl pouvant être impliqués dans la production des ROS (Zheleva 2013).

5. Prise en charge du syndrome phalloïdien

Actuellement, aucune recommandation internationale ne fait foi concernant la prise en charge des syndromes phalloïdiens. Les prises en charge médicales incluent (i) la stabilisation des fonctions vitales (ii) la prévention de l'absorption par lavage gastrique, charbon activé et hyperhydratation (iii) l'inhibition de l'entrée des amanitines dans les hépatocytes par utilisation de pénicilline G, cimétidine et polymyxine B, (iv) l'augmentation de son élimination par des techniques extracellulaires et la diurèse forcée par remplissage vasculaire et (v) l'utilisation d'antidotes spécifiques (Tavassoli et al. 2019).

Les antidotes actuellement utilisés sont principalement des antioxydants, incluant l'acide thioctique, le N-acetylcysteine, la vitamine C, la silymarine and la silibinin (Magdalan et al. 2011b; Ye et Liu 2018; Tavassoli et al. 2019). Cependant, aucun d'entre eux n'a montré une efficacité clinique exceptionnelle, un pourcentage de décès entre 10 et 30% étant toujours observé malgré leur utilisation (Enjalbert et al. 2002; Ganzert et al. 2005; Escudié et al. 2007). En cas d'issue fatale, cette dernière survient au bout d'une durée médiane de 6,1 jours (2,7 – 13,9 jours) (Ganzert et al. 2005).

Les données présentées ci-dessus objectivent des mécanismes partiellement décortiqués quant aux intoxications aux amanitines. Ce constat explique en partie l'absence d'antidote de haut niveau d'efficacité et constitue ainsi un challenge toujours d'actualité en toxicologie.

III. CONTEXTE ET OBJECTIF

L'objectif de ce travail est de mieux comprendre les mécanismes de toxicité des xénobiotiques hépatotoxiques afin d'identifier des cibles thérapeutiques adaptées. Dans ce but, nous avons ciblé deux substances fréquemment rencontrées en laboratoire de Toxicologie hospitalière : l'éthanol et les amanitines, puissantes toxines de champignons.

Les expérimentations menées au cours de ce travail se sont principalement portées sur deux modèles *in vitro* de cellules présentes au sein du foie : un modèle de macrophages dérivés de monocytes humains, et une lignée d'hépatocytes humains, les HepaRG progéniteurs et différenciés. Les macrophages proviennent de la différenciation de monocytes du sang périphérique à partir de sang de donneurs sains auprès de l'Etablissement français du sang (EFS) de Rennes. Exprimant différents récepteurs impliqués dans l'immunité innée et l'inflammation (notamment TLR et NLR), et libérant des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1α et IL-1β), ces cellules représentent un bon modèle de macrophages tissulaires. La lignée hépatocytaire HepaRG a été découverte et développée à Rennes à partir d'un hépatocarcinome humain (Gripon et al. 2002). Pouvant subir un programme de différenciation maximal en coculture d'hépatocytes et cholangiocytes, cette lignée stable exprime les enzymes du métabolisme des xénobiotiques (CYP, GST, SULT, UGT) et est ainsi métaboliquement compétente (Aninat et al. 2006).

Dans ce travail, un premier axe de recherche consistera à **évaluer l'implication de l'immunité innée dans la toxicité des xénobiotiques** avec l'exemple de l'éthanol. Bien que la toxicité de cet alcool soit très largement décrite dans la littérature, de récents éléments suggèrent que ses effets immunomodulateurs pourraient prendre part de manière non négligeable dans la physiopathologie des alcoolopathies. Dans ce contexte, nous avons choisi d'investiguer l'effet de l'éthanol sur la voie P2X7R-NLRP3 dans notre modèle de macrophages humains. Du fait de sa fréquence en termes d'intoxications, l'effet du paracétamol a également été exploré.

Puis, un second axe de recherche consistera à l'étude du métabolisme. En effet, ce dernier constitue un concept fondamental dans l'étude des xénobiotiques, puisqu'il conditionne leur toxicité et leur pharmacologie dans la majorité des cas. Cependant, l'utilisation d'outils visuels permettant l'exploration du métabolisme reste à ce jour très peu étudiée. Dans ce contexte, nous avons choisi d'**évaluer l'intérêt d'une méthode bio-informatique innovante, le réseau moléculaire, dans l'étude du métabolisme *in vivo* et *in vitro* des xénobiotiques**. Ce travail s'ancre notamment dans le projet PREVITOX, un réseau de laboratoire dédié à l'évaluation de la toxicité médicamenteuse, financé par l'agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. L'objectif secondaire de ce travail est de pouvoir réaliser des cartographies métaboliques des molécules étudiées.

Enfin, la dernière partie du travail sera consacrée aux intoxications aux amanitines (α et β). Suite à la validation de l'utilisation du réseau moléculaire, nous nous intéressons **à l'étude du métabolisme et des mécanismes toxiques des amanitines**. Dans ce contexte, nous nous intéresseront également au développement d'une méthode de dosage de ces toxines par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem.

Ce travail de toxicologie, de l'*in vitro* à l'*in vivo,* doit permettre d'améliorer la compréhension des mécanismes hépatotoxiques de ces xénobiotiques et d'apporter ainsi de nouveaux éléments permettant d'optimiser les prises en charge thérapeutiques des patients intoxiqués.

TRAVAUX PERSONNELS

Chapitre 1 :

Etude de l'implication de l'immunité innée dans la toxicité des xénobiotiques

A. Contexte scientifique

De nombreux xénobiotiques sont décrits comme interagissant avec la voie de signalisation activant l'inflammasome NLRP3. C'est notamment le cas de l'éthanol, pour lequel une dualité d'effet a été montrée. Lors d'une exposition aigue, l'éthanol inhibe la phosphorylation d'ASC, et empêche l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Nurmi et al. 2013; Hoyt et al. 2016). Lors d'une exposition chronique, le métabolisme oxydatif de cet alcool génère un stress oxydant, et un métabolite (l'acétaldéhyde) capable d'activer cet inflammasome (Hoyt et al. 2017). Bien que les effets de l'éthanol soient relativement bien décrits sur l'inflammasome NLRP3, peu de données existent quant aux effets de cet alcool sur les récepteurs purinergiques. Ainsi, notre étude s'est plus particulièrement portée sur l'effet de l'éthanol sur ces récepteurs.

Nous avons choisi de stimuler les macrophages pendant 18 heures par une faible dose de LPS (0,1 µg/mL) afin d'induire la production de la pro-IL-1β. Suite à cette étape de pré-activation, nous induisons l'activation de l'inflammasome NLRP3 à l'aide de 3'-O-(4-Benzoyl)benzoyl ATP (BzATP) (250 µg/mL) et de cristaux d'acide urique (MSU) (100 µg/mL). Ces deux stimuli présentent l'avantage d'activer l'inflammasome NLRP3, du moins partiellement, par l'intermédiaire des récepteurs purinergiques (Gicquel et al. 2014, 2015). Ils constituent donc des activateurs particulièrement intéressants dans l'exploration de la voie P2XR-NLRP3. Ainsi, nous avons mesuré l'expression de (i) l'inflammasome NLRP3, (ii) des récepteurs purinergiques P2X1R, P2X4R et P2X7R, et (iii) des cytokines pro-inflammatoires IL-1β, IL-1α et IL-6 dans des macrophages pré-activés. Afin de mettre en évidence le rôle de l'éthanol dans la modulation de la voie P2XR-NLRP3, nous avons prétraités les cellules par des doses croissantes de cet alcool pendant 7 h ou 48 h.

La partie théorique de ce travail, portant sur l'éthanol, a pu être valorisée et acceptée pour publication dans deux journaux à comité de lecture :

- Revue 1 : Le Daré B, Gicquel T. Therapeutic Applications of Ethanol: A Review. J Pharm Pharm Sci. 2019;22(1):525-535. (Annexe n°1)
- Revue 2 : Le Daré B, Lagente V, Gicquel T. Ethanol and its metabolites: update on toxicity, benefits, and focus on immunomodulatory effects. Drug Metab Rev. 2019 Oct 24:1-17. (Annexe n°2)

B. 1ère étude : Etude des effets de l'éthanol sur la voie P2X7R-NLRP3

Nous avons montré que l'éthanol inhibe la sécrétion d'IL-1β après 7 h d'exposition (mais pas après 48 h d'exposition). Cette disparition de l'effet inhibiteur de l'éthanol sur la sécrétion d'IL-1β après 48 h n'était pas médiée par une augmentation de l'expression des ARNm des interleukines (IL-1α, IL-6 et IL-1β) ou des composants de l'inflammasome NLRP3 (protéine NLRP3, ASC et Caspase 1). Cependant, l'éthanol s'est montré inducteur de l'expression des ARNm des récepteurs purinergiques P2X4 et P2X7 ; une augmentation de l'expression protéique par cytométrie en flux n'étant détectée que pour le récepteur P2X7.

Ces résultats suggèrent que l'éthanol induirait l'activation de l'inflammasome NLRP3 en régulant positivement le récepteur P2X7. D'un point de vue physiopathologique, on ne peut donc exclure que ce mécanisme soit impliqué dans les maladies inflammatoires liées à l'éthanol.

Particulièrement, l'IL- β et la voie de l'inflammasome NLRP3 ont été rapportés comme jouant un rôle important dans l'inflammation chronique hépatique, menant à la fibrose et la cirrhose (Gicquel et al. 2017). De ce fait, les récepteurs purinergiques pourraient constituer une nouvelle cible de médicaments anti-inflammatoires dans ces alcoolopathies.

La partie expérimentale de ce travail a été acceptée pour publication dans le journal *Fundamental and clinical pharmacology* et est présentée ci-dessous (Article 1): "Ethanol upregulates the P2X7 purinergic receptor in human macrophages".

doi: 10.1111/fcp.12433

ORIGINAL ARTICLE

Ethanol upregulates the P2X7 purinergic receptor in human macrophages

Brendan Le Daré[a,b]*, Tatiana Victoni[a], Aude Bodin[a], Manuel Vlach[a], Elise Vene[a], Pascal Loyer[a], Vincent Lagente[a], Thomas Gicquel[a,c]

[a]INSERM, INRA, CHU Rennes, Institut NuMeCan (Nutrition, Metabolism and Cancer), Univ Rennes, F-35000 Rennes, France
[b]Pharmacy Service, Pontchaillou University Hospital, F-35000 Rennes, France
[c]Forensic and Toxicology Laboratory, Pontchaillou University Hospital, F-35000 Rennes, France

Keywords
ethanol,
inflammation,
macrophage,
monosodium urate,
NLRP3,
P2X7

Received 3 August 2018;
revised 19 September 2018;
accepted 7 November 2018

*Correspondence and reprints:
brendan.ledare@hotmail.fr

ABSTRACT

Alcohol consumption is considered to be the third leading cause of death in the United States. In addition to its direct toxicity, ethanol has two contrasting effects on the immune system: the nucleotide oligomerization domain-like receptor pyrin domain-containing-3 (NLRP3) inflammasome is inhibited by acute ethanol exposure but activated by chronic ethanol exposure. Purinergic receptors (especially the P2X7 receptor) are able to activate the NLRP3 inflammasome and are involved in many ethanol-related diseases (such as gout, pulmonary fibrosis, alcoholic steatohepatitis, and certain cancers). We hypothesized that ethanol regulates purinergic receptors and thus modulates the NLRP3 inflammasome's activity. In experiments with monocyte-derived macrophages, we found that interleukin (IL)-1β secretion was inhibited after 7 h of exposure (but not 48 h of exposure) to ethanol. The disappearance of ethanol's inhibitory effect on IL-1β secretion after 48 h was not mediated by the upregulated production of IL-1β, IL-1α, IL-6 or the inflammasome components NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain, and caspase 1. P2X7R expression was upregulated by ethanol, whereas expression of the P2X4 and P2X1 receptors was not. Taken as a whole, our results suggest that ethanol induces NLRP3 inflammasome activation by upregulating the P2X7 receptor. This observation might have revealed a new mechanism for inflammation in ethanol-related diseases.

INTRODUCTION

According to the 2015 National Survey on Drug Use and Health (conducted by the US government's Substance Abuse and Mental Health Services Administration), 138.3 million of Americans aged 12 or older reported current use of alcohol. Nearly half of these current alcohol users (66.7 million people) reported binge alcohol use in the previous month, and 17.3 million reported heavy alcohol use in the previous month. Alcohol is considered to be among the most harmful drugs with regard to physical injury, social damage, and addiction [1]. Furthermore, alcohol consumption is considered to be the third leading cause of death in the USA, mainly from cancer, liver cirrhosis, and injury. The pathophysiological effects of alcohol are now being better characterized. The production of ethanol-induced reactive oxygen species (ROS) is now known to increase membrane fluidity, and ROS are also involved in the induction of apoptosis and alcoholic liver diseases such as fibrosis and cirrhosis [2–4]. Interestingly, ethanol has several contrasting effects on the immune system. Acute alcohol consumption leads to immunosuppression, whereas chronic exposure leads to inflammation [5,6]. It was recently reported that the nucleotide oligomerization domain-like receptor pyrin

© 2018 Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique

domain-containing-3 (NLRP3) inflammasome was involved in this dual effect: Acute ethanol exposure was found to inhibit the NLRP3 inflammasome pathway in leukocytes, whereas chronic exposure activated the pathway [7–9].

Inflammasomes are part of the pattern recognition receptor family of intracellular innate immune system sensors. The best known of these is the NLRP3 inflammasome, which is mainly expressed by myeloid cells like monocytes and macrophages. The NLRP3 inflammasome enables the production of IL-1β and IL-18 in response to pathogen-associated molecular patterns such as lipopolysaccharide (LPS). However, this first signal only enhances pro-IL-1β production and is not enough to activate the release of active IL-1β from macrophages; a second signal (such as a danger-associated molecular pattern (DAMP) or pathogen-associated molecular pattern (PAMP) is required [10]. This second step leads to the oligomerization of three main effectors: NLRP3, the apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC, an adaptor protein), and procaspase 1. This assembly converts procaspase-1 into mature caspase 1, which can cleave pro-IL-1β and pro-IL-18 into their respective active forms. These pro-inflammatory cytokines activate the acute inflammation pathway [11]. Overactivation of the inflammasome leads to pyroptosis, a type of programmed cell death that amplifies local inflammatory reactions [12]. The NLRP3 inflammasome can be activated by many different DAMPs and PAMPs, such as ATP or his synthetic analog BzATP, nigericin, and crystals of silica, cholesterol, or uric acid [13–15]. These molecular patterns activate the inflammasome through several pathways: potassium efflux triggered by purinergic receptors, and lysosomal breakdown triggered by crystals, for example. Membrane pore formation, ROS production, and ASC phosphorylation are also involved in activation of the NLRP3 inflammasome [16,17]. However, genetic mutations of NLRP3 protein lead to pathologies such as cryopyrin-associated periodic syndrome. Similarly, inflammasome overactivation is involved in several diseases, such as atherosclerosis, diabetes, or gout [7,18]. In view of the NLRP3 inflammasome's involvement in inflammatory diseases, cognate inhibitors are being developed as drug candidates. Interestingly, treatment with these compounds in vitro and in vivo is associated with reductions in neuroinflammation and colonic inflammation [19,20]. Furthermore, colchicine (an old compound used for the symptomatic treatment of various inflammatory diseases, including gout, Behçet syndrome, and familial Mediterranean fever) has been found to inhibit the NLRP3 inflammasome [21,22]. This observation highlighted new potential indications in the inhibition of atherosclerosis-associated inflammation [23]. Recently, molecular design studies have shown that benzene sulfonamide analogs can inhibit the NLRP3 inflammasome, and these compounds are also being developed as drug candidates [24]. However, given that two steps are required to activate the NLRP3 inflammasome, studying the factors able to modulate the second step is a challenge in anti-inflammatory drug research. As mentioned above, the stimulation of purinergic receptors (especially the P2X7 receptor (P2X7R)) has been shown to activate the NLRP3 inflammasome [25].

Purinergic receptors are ubiquitous receptors involved in nociception and the inflammatory response. They are activated by extracellular nucleotides [26]. Purinergic receptors are classified into two families: P1 receptors are selective for adenosine, and P2 receptors mainly bind ATP and ADP [27]. The P2 receptors can be subclassified into P2Y G-protein-coupled receptors and P2X ligand-gated ion channels [28]. Purinergic receptors are known to be involved in several disease processes. Recently, P2Y6R was linked to the development of pulmonary fibrosis [29], and P2X7R is thought to be involved in Parkinson's disease, pulmonary hypertension, gout, allergy, pulmonary fibrosis, and alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis [30–35]. Furthermore, high P2X7R expression levels may indicate a poor prognosis for patients with colorectal cancer [36]. In the present paper, we used BzATP, a potent agonist of P2X7R, in order to activate NLRP3 inflammasome through purinergic receptor pathway. Given that ethanol is able to regulate purinergic receptor P2X4 and P2X7 activity in a microglia cell line [37], we hypothesized that this alcohol might promote inflammatory disease regulating purinergic receptors in monocyte-derived macrophage (MdMs).

Thus, the objective of the present study was to gain a better understanding of the mechanisms linking ethanol, the NLRP3 inflammasome and purinergic receptors in MdMs.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Phosphate-buffered saline (PBS), RPMI 1640 medium, penicillin-streptomycin, and L-glutamine were purchased

© 2018 Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique

from Life Technologies (Eugene, OR, USA). Fetal calf serum (FCS) was from Hyclone (Logan, UT, USA), bovine serum albumin was from Eurobio (Les Ulis, France), ultrapure *E. coli* 0111:B4 LPS was purchased from InvivoGen (Toulouse, France), and recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF) was from R&D Systems Europe (Lille, France). 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), and 2′,3′-O-(4-benzoylbenzoyl) adenosine 5′-triphosphate (BzATP) were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Specific antibodies against P2X7R and P2X4R were purchased from Alomone (Jerusalem, Israel).

Crystal preparation

Monosodium urate (MSU) crystals were prepared by recrystallization from uric acid [38]. Briefly, the crystals were obtained by dissolving 1.68 mg of MSU in 500 mL of 0.01 M NaOH preheated to 70 °C (pH 7.1–7.2). The solution was slowly and continuously agitated at room temperature, until crystals formed. The crystals were washed twice with 100% ethanol, dried, autoclaved, and weighed under sterile conditions. Crystals were resuspended in PBS by sonication and examined with phase microscopy prior to use in our experiments. The crystal size (greatest dimension) ranged from 2 to 20 μm.

Preparation and treatment of MdMs

Peripheral blood mononuclear cells were obtained from human buffy coat (French Blood Establishment, Rennes, France) by differential centrifugation on UNI-SEP® U-10 (Novamed, Jerusalem, Israel). The experiments were performed in compliance with the French legislation on blood donation and blood product use and safety. Monocytes from healthy donors were enriched using a human CD14 separation kit (Microbeads, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), plated at a density of $0.5x10^6$ cells/well in 24-well plates, and cultured at 37 °C with 5% humidified CO_2 in RPMI 1640 medium supplemented with 100 IU/mL penicillin —100 μg/mL streptomycin, 2 mM L-glutamine, 1% sodium pyruvate, and 10% FCS. Macrophages were obtained after differentiation from monocytes by incubation with 50 ng/mL rhGM-CSF in RPMI 1640 medium. After 7 days, the supernatant was removed, and cells were exposed to various treatments. The MdMs were incubated overnight with 0.1 μg/mL ultrapure *E. coli* 0111:B4 LPS, incubated with ethanol for 1 h or for 42 h, and then incubated with ethanol and MSU or ethanol and BzATP for a further 6 h. At each change of treatment, the supernatant is removed in order to renew the ethanol-containing medium.

Cell viability

Cytotoxicity was assessed using MTT colorimetric assays. Briefly, after medium removal, 500 μL of RPMI medium containing MTT (0.5 mg/mL) was added to each well, and the cells were incubated for 2 h at 37 °C. The water-insoluble formazan was dissolved in 500 μL of DMSO, and absorbance was measured at 540 nm.

Cytokine production assays

The concentrations of IL-1β, IL-1α, and IL-6 in the culture supernatant were measured using Duoset® ELISA kits (R&D Systems, Abingdon, UK), according to the manufacturer's instructions.

Real-time PCR (RT-qPCR) analysis

After lysis of the MdMs, total RNA was isolated using a Macherey-Nagel NucleoSpin® RNAII kit (Macherey-Nagel, Dueren, Germany), according to the manufacturer's protocol. Total RNA (1 μg) was reverse-transcribed into first-strand cDNA using a High-Capacity cDNA Achieve Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. RNA quantity and purity were assessed with a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nyxor Biotech, Paris, France). qPCR was performed using the fluorescent dye SYBR Green method, with SYBR Green PCR Master Mix in 384-well plates and the StepOnePlus™ system (Applied Biosystems). Human GAPDH was used as the reference gene. Relative quantification values were expressed using the $2^{\Delta\Delta Ct}$ method as fold changes in the target gene, normalized to the reference gene, and related to the expression level in control experiments.

Flow cytometry detection of P2X4R and P2X7R proteins on MdMs

Cells were detached with trypsin, washed twice in PBS, and fixed for 10 min in 4% paraformaldehyde in PBS. After the paraformaldehyde had been discarded, the MdMs were resuspended in PBS supplemented with 2.5% nonimmune rabbit serum (in order to block non-specific sites). Isotype control immunoglobulins and primary antibodies against P2X4R and P2X7R were diluted 1/100, 1/100 and 1/75, respectively, and then incubated with the MdMs for 1 h. After washing with PBS, the cells were incubated for 1 h with FITC-

© 2018 Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique

conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) diluted 1/100. After a final wash with PBS, the cells were analyzed by flow cytometry (using a BD LSRFortessa™ X-20 cell analyzer and BD FACSDiva™ software (BD biosciences, San Jose, CA, USA)). The MdMs were first gated according to their forward- and side-scatter profiles, and then defined as $P2X4R^+$ and/or $P2X7R^+$. FlowLogic software (version 7.2.1, Inivai Technologies, Mentone, Australia) was used to analyze the flow cytometry data.

Statistical analysis

Data were expressed as the mean ± standard error of the mean (SEM). Intergroup differences as a function of the treatment were probed in a one-way analysis of variance (ANOVA), with a Bonferroni post hoc test for group comparisons. The significance of intergroup differences in the PCR analysis was determined using a Mann–Whitney test. All analyses were performed using Prism software (version 5.0, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). All tests were two-sided, and the threshold for statistical significance was set to $P < 0.05$.

RESULTS

Acute exposure to ethanol dose-dependently inhibits IL-1β hypersecretion by MdMs

Since acute ethanol exposure has been shown to inhibit the NLRP3 inflammasome in macrophages [7,8], we looked at whether this alcohol was able to dose-dependently inhibit interleukin production in response to BzATP (*Figure 1*) or MSU (*Figure 2*). BzATP and MSU were used in order to stimulate NLRP3 inflammasome through P2X7R pathway. We found that ethanol inhibited IL-1β production at a concentration of 30 mM or more when the MdMs had been previously stimulated with BzATP and at a concentration of 100 mM or more when the cells had been stimulated with MSU (*Figures 1a* and *2a*). Interestingly, IL-6 and IL-1α levels were unchanged (*Figures 1b,c* and *2b,c*). Furthermore, we observed a greater IL-1β production in the LPS + BzATP and LPS + MSU conditions, relative to LPS alone (*Figures 1a* and *2a*). When BzATP had been added, the presence of 300 mM ethanol was associated with lower cell viability. When MSU had been added, the presence of 1000 mM ethanol was associated with lower cell viability (*Figures 1d* and *2d*). Considering that IL-1β production was first inhibited at a nontoxic concentration of ethanol, our results show that ethanol's effect was not associated with cell death. Furthermore, given that others cytokines levels (IL-6 and IL-1α), regardless produced from NLRP3 inflammasome, were not affected by ethanol, the effect of this alcohol can be considered selective for the NLRP3 inflammasome pathway.

Ethanol's inhibition of IL-1β production disappears after 48 h

Identification of the lowest concentration of ethanol capable of inhibiting the NLRP3 inflammasome enabled us to investigate the time course of IL1α, IL-1β, and IL-6 production. After 7 h of ethanol exposure at 100 mM or 300 mM, only IL-1β production was inhibited in MdMs stimulated with LPS overnight and then with 300 μg/mL MSU for 6 h (*Figure 3a*). Levels of IL-6 and IL-1α were unchanged (*Figure 3c,e*). Forty-eight hours of ethanol exposure at 100 mM or 300 mM did not significantly inhibit the production of any of the ILs, regardless of the cell stimulus (3B, 3D, 3F). The MdMs' viability was not impaired by exposure to 300 mM ethanol for 48 h, followed by activation with 100 ng/mL LPS overnight and then with 300 μg/mL MSU for 6 h (data not shown). These results show that the inhibition of IL-1β production associated with acute ethanol exposure (7 h) is no longer present after 48 h of exposure.

Ethanol does not influence the mRNA expression of inflammasome components or interleukins 1β, 1α, and 6

To investigate the mechanism whereby the inflammasome NLRP3 pathway is inhibited by 7 h of ethanol exposure and to establish why this inhibition is no longer present after 48 h of ethanol exposure, we measured the mRNA expression of inflammatory cytokines (*IL-1β*, *IL-1α*, and *IL-6*) and inflammasome components *(NLRP3, CASP1, and ASC*) after 7 h of exposure to ethanol. There were no significant changes, relative to a control experiment in the absence of ethanol (*Figure 4*). These results show that the phenomena observed after 7 and 48 h of ethanol exposure were not related to the induction or inhibition of NLRP3 inflammasome components or the pro-inflammatory cytokines IL-1β, IL-1α, and IL-6.

Ethanol promotes the mRNA expression of P2X7R and P2X4R

Given that NLRP3 inflammasome is mainly activated by P2X receptors, we measured the mRNA expression

© 2018 Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique

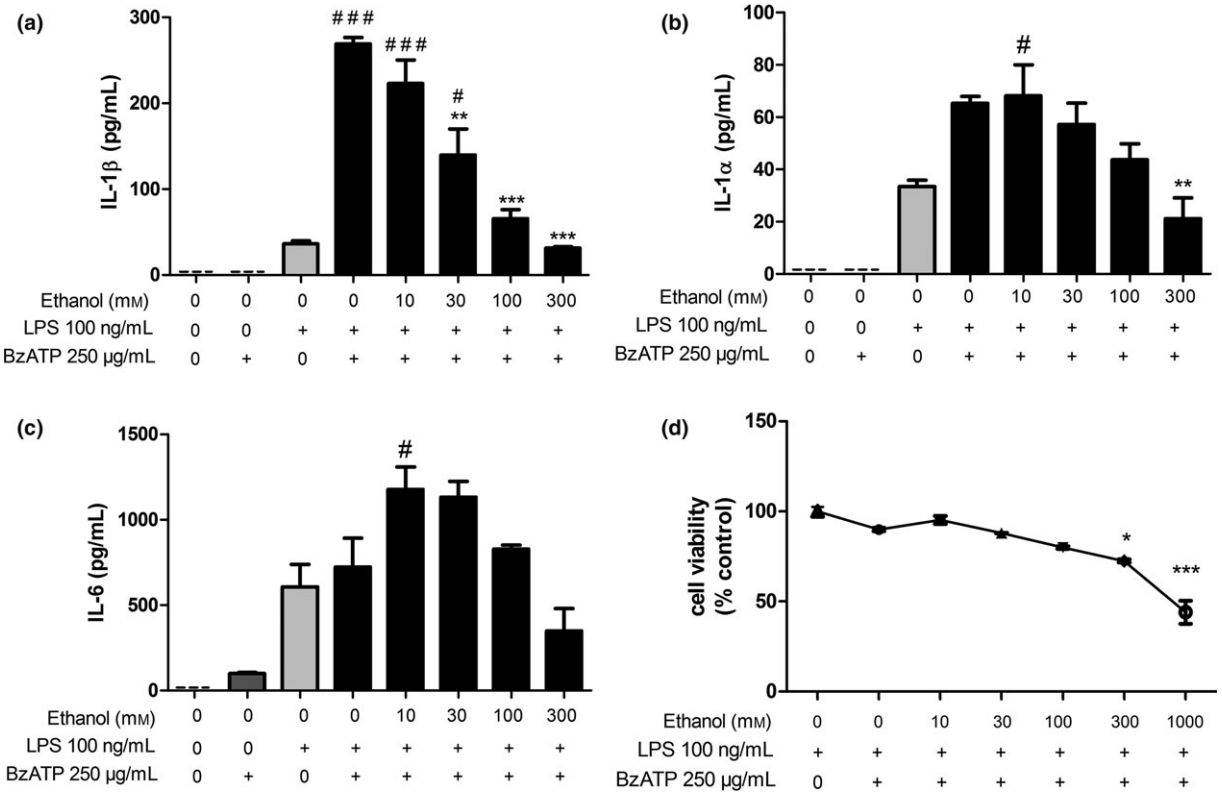


Figure 1 Acute exposure of MdMs to ethanol dose-dependently inhibits IL-1β hypersecretion after cell stimulation with LPS + BzATP. Secretion of IL-1β, IL-1α, and IL-6 into the cell culture supernatant was assessed (using an ELISA) after activation of MdMs with 100 ng/mL LPS overnight or medium, followed by a 6 h incubation with 250 µM BzATP or medium (a–c). Cell viability was measured in an MTT assay and expressed relative to the value determined after LPS treatment alone (set arbitrarily to 100%) (d). The data are quoted as the mean ± SEM from one representative experiment performed in triplicate. ***$P < 0.001$; **$P < 0.01$: LPS + BzATP in the absence of ethanol, compared with LPS + BzATP in the presence of various concentrations of ethanol. ###$P < 0.01$; #$P < 0.05$: LPS compared with LPS + BzATP in the presence or absence of ethanol.

levels of P2X1R, P2X4R, and P2X7R after 7 h of exposure to ethanol or medium alone in MdMs treated with 100 µg/L MSU or 250 mM BzATP. We found that ethanol exposure was associated with an induction of P2X4R and P2X7R mRNA expression but not P2X1R mRNA expression, regardless of whether the cells had been treated with MSU or BzATP (*Figure 5a,b*).

Ethanol promotes P2X7R and P2X4R expression

In order to confirm that the induction of P2X4R and P2X7R mRNA expression corresponded to higher cell surface levels of these receptors, we used flow cytometry to study MdMs incubated in the presence of absence of 100 mM ethanol for 24 h. The cells were incubated with 100 ng/mL LPS overnight and then with 300 µg/mL MSU for 6 h. A shift in fluorescence was observed for P2X7R but not P2X4R—indicating that P2X7R (but not P2X4R) was overexpressed in ethanol-treated cells (*Figure 6*).

DISCUSSION

Our present results show that prolonged exposure of MdMs to ethanol promoted activation of the NLRP3 inflammasome and upregulation of the P2X7R, which are known be involved in the pathophysiology of alcohol abuse. It has been well established that alcohol abuse is a leading cause of inflammatory diseases, including fibrosis, cirrhosis, chronic obstructive pulmonary disease, diabetes, and neuroinflammation [5,10,38–43]. It is also known that ethanol is a preventable risk factor for certain cancers, including colon cancer [44], hepatocellular carcinoma [45], breast cancer [46], and esophageal, pancreatic and prostate

© 2018 Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique

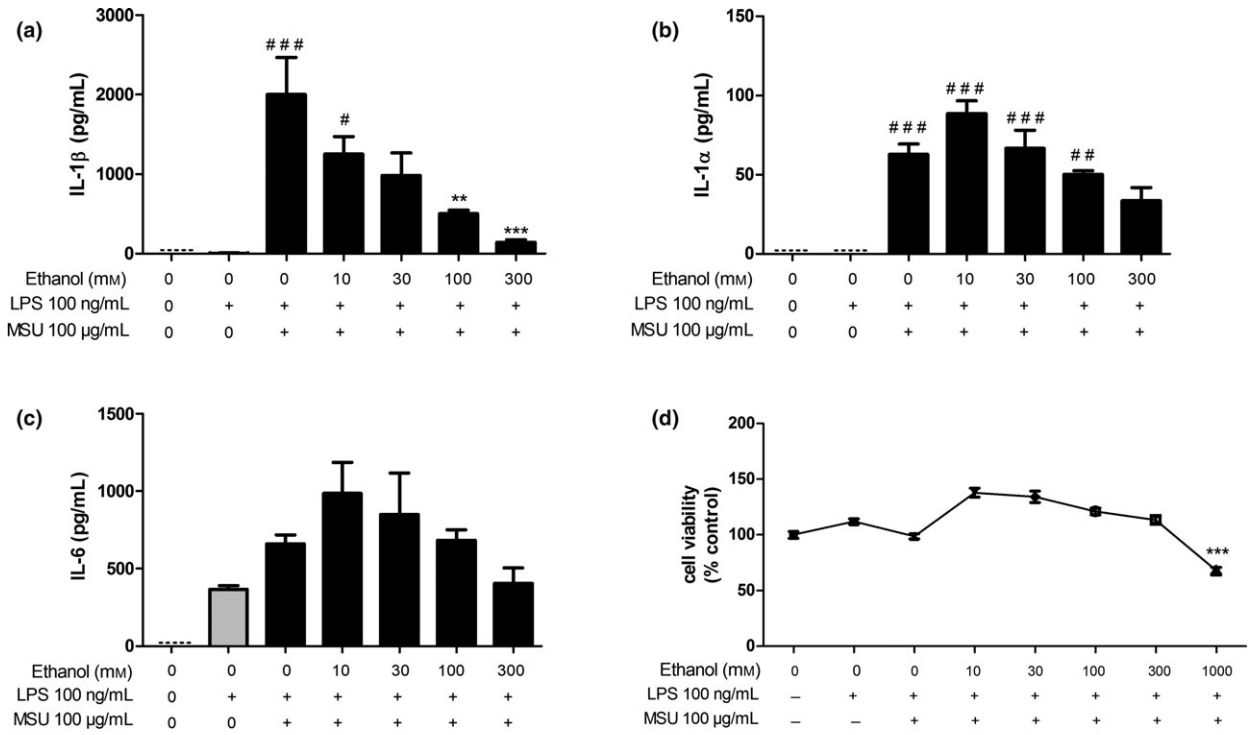


Figure 2 The acute exposure of MdMs to ethanol dose-dependently inhibits IL-1β hypersecretion after LPS + MSU stimulation. Secretion of IL-1β, IL-1α, and IL-6 into the culture supernatant was assessed by ELISA after cell activation with 100 ng/mL LPS overnight or medium, followed by 6 h of treatment with 100 µg/mL MSU or medium (a-c). Cell viability was measured in an MTT assay and expressed relative to the value determined after LPS treatment alone (arbitrary set to 100%) (d). The data are quoted as the mean ± SEM from one representative experiment performed in triplicate. ***$P < 0.001$; **$P < 0.01$: LPS + MSU in the absence of ethanol, compared with LPS + MSU in the presence of ethanol at various concentrations. ##$P < 0.01$; ###$P < 0.001$: LPS compared with LPS + MSU in the presence or absence of ethanol.

cancers [47]. *Via* activation of the NLRP3 inflammasome pathway and ROS generation, purinergic receptors are involved in the pathogenesis of many of these diseases—including liver fibrosis [48], diabetes [49], and neuroinflammation [50]. The overexpression of purinergic receptors (especially P2X7R) is thought to be involved in tumorigenesis [36,51–55].

Studies of ethanol's immunomodulatory effect on macrophages have recently highlighted the involvement of the NLRP3 inflammasome. Moreover, ethanol has a dual, contrasting effect on inflammation, depending on the concentration and exposure time. Considering that BzATP is the most potent P2X7R agonist available, we decided to use this compound to study selective P2X7R activation in the NLRP3 inflammasome pathway. Monosodium urate is also known to be a potent danger signal that activates the NLRP3 inflammasome pathway through cathepsin B, ATP release, and autocrine purinergic signaling [56]. As we have reported previously, LPS + BzATP stimulation selectively enhanced IL-1β production [25]. Furthermore, LPS + MSU stimulation was found to enhance IL-1β, IL-1α, and IL-6 production. After stimulation with BzATP or MSU, acute (7 h) ethanol exposure selectively inhibited IL-1β secretion (from 30 mM ethanol for BzATP and from 100 mM for MSU) but did not inhibit IL-6 and IL-1 α levels (*Figures 1a–c* and *2a–c*). These results were consistent with Hoyt et al.'s [9] report whereby acute ethanol exposure strongly and selectively inhibits the NLRP3 inflammasome pathway. Interestingly, IL-1α levels were greater after 10 mM of ethanol exposure for 7 h, but not after exposure of a higher concentration of ethanol, when MdMs were stimulated with BzATP (*Figure 1b*). Redox imbalance, known to induce IL-1α expression [57], is induced by ethanol [58]. Thus, we hypothesized that ethanol-induced oxidative stress is responsible of the greater amount of this cytokine. Same results were found with

© 2018 Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique

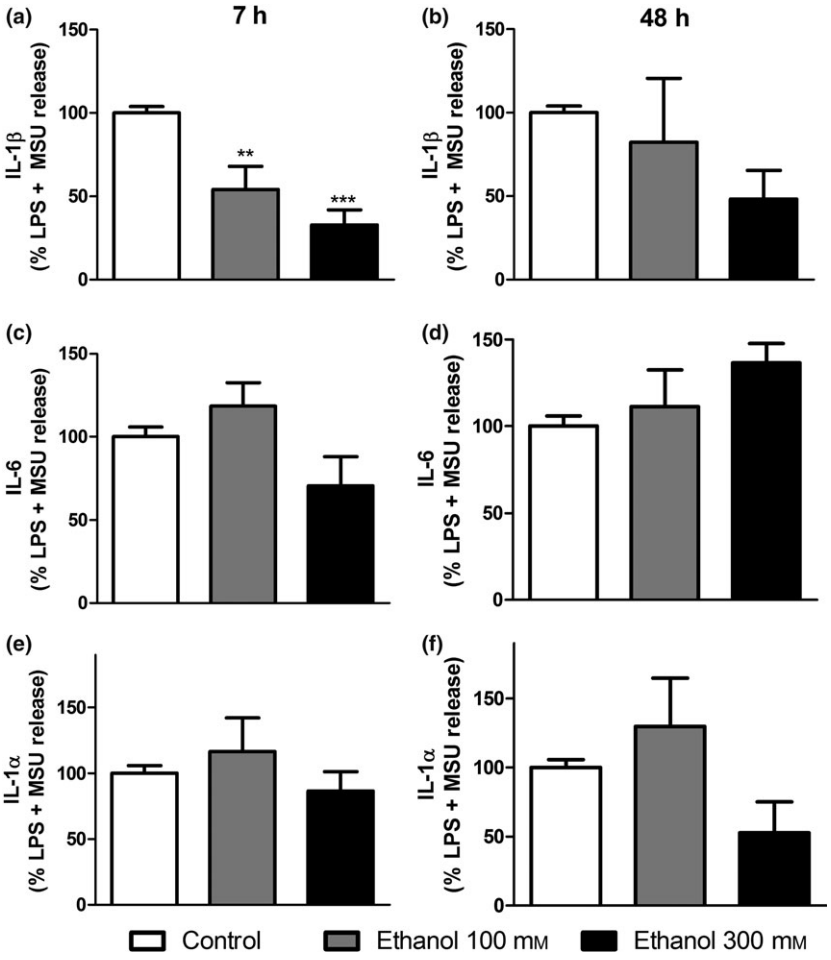


Figure 3 Ethanol's inhibition of IL-1β production disappears after 48 h. Secretion of IL-1β, IL-1α, and IL-6 into the culture supernatant was assessed by ELISA in the cell culture supernatant of MdMs after activation with 100 ng/mL LPS overnight, followed by 6 h of treatment with 300 μg/mL MSU (a–f). Ethanol at 100 mM or 300 mM was added 1 h (a; c; e) or 42 h (b; d; f) before MSU treatment and was present throughout the treatment period. The data are quoted as the mean ± SEM from three independent experiments performed in triplicate. ***$P < 0.001$; **$P < 0.01$; *$P < 0.05$: LPS + MSU in the absence of ethanol, compared with LPS + MSU in the presence of ethanol at various concentrations.

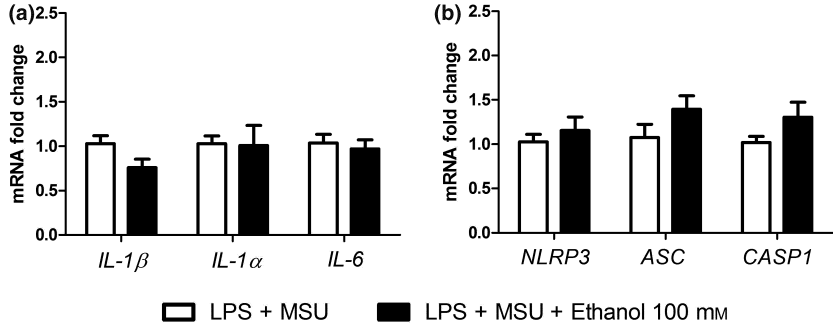


Figure 4 Ethanol does not influence the mRNA expression of inflammasome components or IL-1β, IL-1α, and IL-6 after LPS + MSU stimulation of MdMs. The MdMs were incubated overnight with 100 ng/mL LPS and then stimulated with 100 μg/mL MSU for 6 h. Ethanol (at 100 mM) was added 1 h before MSU and was present throughout the treatment period. Cell lysates were collected, and the mRNA expression levels of *IL-1β*, *IL-1α*, *IL-6* (a) and inflammasome components (*NLRP3, CASP1, and ASC*) (b) were determined using RT-qPCR. The results were normalized against *GAPDH* gene expression. The data are quoted as the mean ± SEM from three independent experiments performed in triplicate. ***$P < 0.001$; **$P < 0.01$; *$P < 0.05$ for ethanol treatment compared with the control treatment, for each receptor.

© 2018 Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique

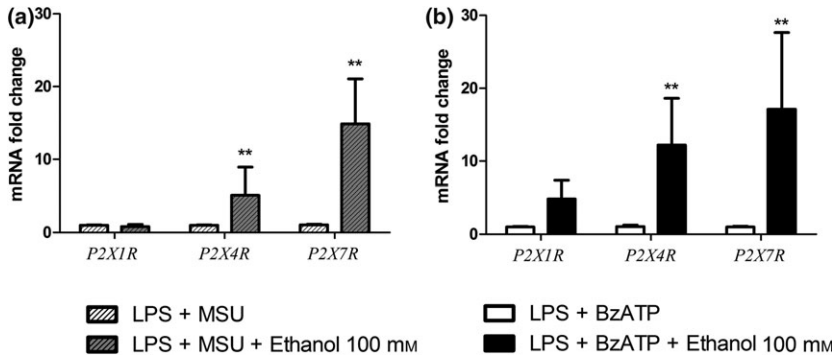


Figure 5 Ethanol promotes the mRNA expression of the purinergic receptors P2X7 and P2X4 following stimulation of MdMs with LPS + MSU. The MdMs were incubated overnight with 100 ng/mL LPS, followed by treatment with 100 μg/mL MSU or 250 mM BzATP for 6 h. Ethanol (100 mM) was added 1 h before MSU or BzATP and was present throughout the treatment period. Cell lysates were collected, and mRNA expression levels of purinergic receptors (P2X1, P2X4, and P2X7) were determined using RT-qPCR (a, b). The results were normalized against *GAPDH* gene expression. The data are quoted as the mean ± SEM of at least three independent experiments performed in triplicate. $^{**}P < 0.01$: treatment with ethanol, compared with the control treatment for each receptor.

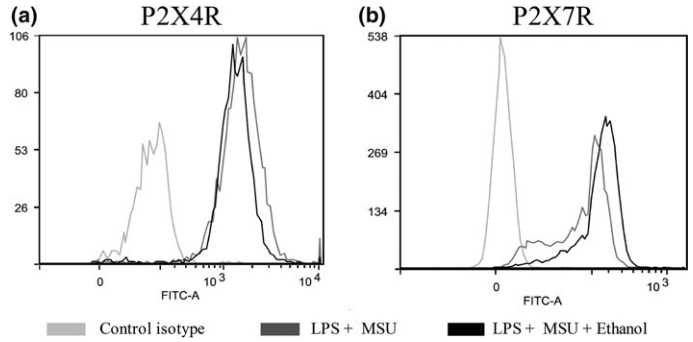


Figure 6 Ethanol increases mRNA expression levels of purinergic receptors in MdMs. The MdMs were obtained by incubating monocytes with rhGM-CSF (50 ng/mL) in medium. After 8 days, the cells were incubated overnight with 100 ng/mL LPS and then with 300 μg/mL MSU for 6 h. Ethanol (at 100 mM) or medium was added 18 h before MSU and was present throughout the treatment period. Expression of P2X7R and P2X4R on the cell surface was studied using flow cytometry. The data correspond to the fluorescence values for one experiment performed in triplicate.

IL-6 (*Figure 1c*). These results are consistent with those of Chen et al. [59] and Hong et al. [60], reporting elevated amount of IL-6 during acute exposure of ethanol. Furthermore, we think that the disappearance of the greater amount of IL-1α and IL-6 with higher concentration of ethanol is linked to the inhibition of IL-1β by ethanol from 30 mM. These results are supported by those of Cahill et al. [61] and Fettelschoss et al. [62], reporting that IL-1β secretion induces IL-6 production and is required for IL-1α secretion. Taken as a whole, these results indicate that our model is a relevant one for studying activation or inhibition of the NLRP3 inflammasome.

Forty-eight hours exposure to ethanol was enough to suppress the previously observed inhibitory effect of acute ethanol exposure on IL-1β secretion (*Figure 3a, b*). This observation indicates that only 48 h of ethanol exposure is enough to promote a response capable of activating the NLRP3 inflammasome. It has been shown that ethanol's effect on the NLRP3 inflammasome pathway is associated with greater inducible nitric oxide synthase expression, NO production, and mitochondrial dysfunction (ROS generation). Moreover, ethanol metabolites (including acetaldehyde) were found to be probable activators of the NLRP3 inflammasome [9]. However, toxicological monitoring of

© 2018 Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique

acetaldehyde is challenging, given the very low concentrations produced after alcohol consumption in humans [63–65]. Indeed, acetaldehyde is rapidly cleared from blood and metabolized into acetic acid and other compounds [66,67]. Although the blood acetaldehyde concentration is higher in alcoholics than in nonalcoholics, the mean plasma concentration measured in the former group was only 3.74 μM [68]. This acetaldehyde concentration is still far lower than those used in studies of NLRP3 inflammasome activation [9]. Furthermore, acetaldehyde is highly volatile in cell cultures at 37 °C. Considering that acetaldehyde is also metabolized through an oxidative pathway, it is possible that oxidative stress is more involved than acetaldehyde *per se* in NLRP3 inflammasome activation. We therefore hypothesize that chronic ethanol exposure triggers another pathway and thus suppresses an inhibitory effect of acute ethanol exposure on the NLRP3 inflammasome pathway.

The literature data show that 2 weeks of ethanol treatment leads to the hypersecretion of inflammasome compounds, including NLRP3, caspase-1, and ASC [9]. Conversely, our experiments on the THP-1 cell line (data not shown) and on MdMs demonstrated that 48 h of ethanol exposure does not modify the expression of IL-1α, IL-1β, IL-6 or the inflammasome components NLRP3, caspase-1, and ASC (*Figure 4*). These results suggest that ethanol does not increase NLRP3 inflammasome activity by increasing intracytoplasmic levels of this complex. We therefore decided to study the expression of proteins involved in the NLRP3 inflammasome activation pathway. As mentioned above, purinergic receptors are involved in NLRP3 inflammasome activation. Remarkably, we found that ethanol exposure is associated with greater mRNA expression levels of P2X4R and P2X7R but not P2X1R (*Figure* 5). For 100 mM and 300 mM ethanol, the same dose-dependent results were found with THP-1 (data not shown). Considering that MSU is known to upregulate P2X7R [56], we first hypothesized that ethanol potentiates this effect but does not have its own specific role. This hypothesis was rejected because P2X7R expression was induced with ethanol after BzATP stimulation—making ethanol the only common factor. These findings were confirmed by our flow cytometry experiments; P2X7R fluorescence was shifted when cells were exposed to ethanol (*Figure 6*). Taken as a whole, these results show for the first time that ethanol induces P2X7R expression independently of other treatments.

There is a growing body of evidence to show that P2X7R activation leads to mitochondrial toxicity, oxidative stress, and activation of the NLRP3 inflammasome pathway [69–71]. In parallel, overexpression of purinergic receptors has been observed in several disease processes. Here, we found that ethanol induced P2X7R protein expression in an MdM model. Thus, given that chronic use of alcohol is a leading cause of inflammatory diseases and cancer, and that purinergic receptor (particularly P2X7R) is involved in the pathogenesis of many of these ethanol-related diseases, it is therefore conceivable that ethanol amplifies inflammation activation and pathophysiological processes through mechanisms involving the upregulation of purinergic receptors. In the inflammatory environment, ethanol-induced overexpression of P2X7R in peripheral macrophages can trigger a greater fixation of agonistic danger signals of purinergic receptors, such as endogenous ATP. Therefore, the severity of inflammatory ethanol-related diseases can be directly linked to the upregulation of P2X7R. The observed upregulation of P2X7R indicates that it is especially worthwhile to test antagonists in vitro of this putative target in the context of ethanol-associated pathologies.

Several disease models involving ethanol are now being used to examine the effects of P2X7R antagonists. In HepG2 cells, it has been shown that decreasing the expression of P2X7R and the NLRP3 inflammasome pathway by treatment with dihydroquercetin reduces alcoholic liver steatosis through the inhibition of lipogenesis [72]. Similarly, inhibiting P2X7R with gentiopicroside enhances alcoholic liver steatosis, while IL-1β secretion aggravates it [34]. In ex vivo cultures of vessels with carotid plaques, the selective P2X7R antagonist A740003 decreased IL-1β secretion without involving the NLRP3/caspase-1 pathway; high IL-1β levels are usually associated with carotid plaque instability [73]. These findings suggest that targeting P2X7R might be of value in the treatment of atherosclerosis [73]. In the field of neurology, it has been shown that ethanol dose-dependently induces P2X4 and P2X7 expression in BV2 microglial cells [37]. Justifiably, P2X7 antagonists are now starting to be studied as drug candidates for the inhibition of neuroinflammation [74].

In conclusion, we found that the NLRP3 inflammasome pathway was inhibited by 7 h of exposure to ethanol and stimulated after 48 h of exposure to ethanol. Furthermore, ethanol induced P2X7R expression in MdMs. It is therefore conceivable that ethanol amplifies inflammation activation pathways and the

© 2018 Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique

pathophysiological processes through purinergic receptor upregulation—making macrophages react more strongly to danger signals. Our present results highlight a new putative mechanism for inflammation activation in ethanol-induced diseases. Hence, P2X7R antagonists might constitute a novel class of anti-inflammatory molecules with potential value in the treatment of ethanol-related inflammatory diseases.

ABBREVIATIONS

AMPA – α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ASC – apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
ATP – adenosine triphosphate
BSA – bovine serum albumin
BzATP – 2′,3′-O-(4-benzoylbenzoyl) adenosine 5′-triphosphate
DAMPs – danger-associated molecular patterns
EtOH – ethanol
FCS – fetal calf serum
GABA – gamma-aminobutyric acid
LPS – lipopolysaccharide
MSU – monosodium urate
NMDA – *N*-methyl-D-aspartate
NLRP3 – nucleotide oligomerization domain-like receptor pyrin domain-containing-3
PAMPs – pathogen-associated molecular patterns
P2X1R – purinergic receptor P2X1
P2X4R – purinergic receptor P2X4
P2X7R – purinergic receptor P2X7
PBS – phosphate-buffered saline
PRRs – pattern recognition receptors
ROS – reactive oxygen species
SEM – standard error of the mean

REFERENCES

1 Nutt D., King L.A., Saulsbury W., Blakemore C. Development of a rational scale to assess the harm of drugs of potential misuse. Lancet (2007) **369**(9566) 1047–1053.
2 Sergent O. Role for membrane fluidity in ethanol-induced oxidative stress of primary rat hepatocytes. J. Pharmacol. Exp. Ther. (2004) **313**(1) 104–111.
3 Miñana J. Mitochondrial oxidative stress and CD95 ligand: a dual mechanism for hepatocyte apoptosis in chronic alcoholism. Hepatology (2002) **35**(5) 1205–1214.
4 Nieto N. Stimulation and proliferation of primary rat hepatic stellate cells by cytochrome P450 2E1–derived reactive oxygen species. Hepatology (2002) **35**(1) 62–73.
5 González-Reimers E. Alcoholism: a systemic proinflammatory condition. World J. Gastroenterol. (2014) **20**(40) 14660.
6 Dai Q., Pruett S.B. Different effects of acute and chronic ethanol on LPS-induced cytokine production and TLR4 receptor behavior in mouse peritoneal macrophages. J Immunotoxicol. (2006) **3**(4) 217–225.
7 Nurmi K., Virkanen J., Rajamäki K., Niemi K., Kovanen P.T., Eklund K.K. Ethanol inhibits activation of NLRP3 and AIM2 inflammasomes in human macrophages–a novel anti-inflammatory action of alcohol. PLoS ONE (2013) **8**(11) e78537.
8 Hoyt L.R., Ather J.L., Randall M.J. et al. Ethanol and other short-chain alcohols inhibit NLRP3 inflammasome activation through protein tyrosine phosphatase stimulation. J Immunol. (2016) **197**(4) 1322–1334.
9 Hoyt L.R., Randall M.J., Ather J.L. et al. Mitochondrial ROS induced by chronic ethanol exposure promote hyper-activation of the NLRP3 inflammasome. Redox. Biol. (2017) **12** 883–896.
10 Kim J.S., Kim K.D., Na H.S. et al. Tumor necrosis factor-α and interleukin-1β expression pathway induced by Streptococcus mutans in macrophage cell line RAW 264.7: Macrophage cytokine induction by *S. mutans*. Mol Oral Microbiol. (2012) **27**(3) 149–159.
11 Keyel P.A. How is inflammation initiated? Individual influences of IL-1, IL-18 and HMGB1. Cytokine (2014) **69**(1) 136–145.
12 LaRock C.N., Cookson B.T. The Yersinia virulence effector YopM binds caspase-1 to arrest inflammasome assembly and processing. Cell Host Microbe (2012) **12**(6) 799–805.
13 Liao P.-C., Chao L.K., Chou J.-C. et al. Lipopolysaccharide/adenosine triphosphate-mediated signal transduction in the regulation of NLRP3 protein expression and caspase-1-mediated interleukin-1β secretion. Inflamm. Res. (2013) **62** (1) 89–96.
14 Dostert C., Petrilli V., Van Bruggen R., Steele C., Mossman B.T., Tschopp J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. Science (2008) **320**(5876) 674–677.
15 Rajamäki K., Lappalainen J., Öörni K. et al. Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation. PLoS ONE (2010) **5**(7) e11765.
16 Hara H., Tsuchiya K., Kawamura I. et al. Phosphorylation of the adaptor ASC acts as a molecular switch that controls the formation of speck-like aggregates and inflammasome activity. Nat. Immunol. (2013) **14**(12) 1247–1255.
17 Lin Y.-C., Huang D.-Y., Wang J.-S. et al. Syk is involved in NLRP3 inflammasome-mediated caspase-1 activation through adaptor ASC phosphorylation and enhanced oligomerization. J. Leukoc. Biol. (2015) **97**(5) 825–835.
18 Wen H., Gris D., Lei Y. et al. Fatty acid–induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. Nat. Immunol. (2011) **12**(5) 408–415.
19 Xu X., Yin D., Ren H. et al. Selective NLRP3 inflammasome inhibitor reduces neuroinflammation and improves long-term

© 2018 Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique

neurological outcomes in a murine model of traumatic brain injury. Neurobiol. Dis. (2018) **117** 15–27.
20 Perera A.P., Fernando R., Shinde T. et al. MCC950, a specific small molecule inhibitor of NLRP3 inflammasome attenuates colonic inflammation in spontaneous colitis mice. Sci. Rep. (2018) **8**(1) 8618.
21 Stack J., Ryan J., McCarthy G. Colchicine: new insights to an old drug. Am. J.Ther. (2015) **22**(5) e151–e157.
22 Dalbeth N., Lauterio T.J., Wolfe H.R. Mechanism of action of colchicine in the treatment of gout. Clin. Ther. (2014) **36**(10) 1465–1479.
23 Martínez G.J., Celermajer D.S., Patel S. Corrigendum to: "The NLRP3 inflammasome and the emerging role of colchicine to inhibit atherosclerosis-associated inflammation" [Atherosclerosis. 2018;269:262–271]. Atherosclerosis. 2018;**273**:157.
24 Fulp J., He L., Toldo S. et al. Structural insights of benzenesulfonamide analogues as NLRP3 inflammasome inhibitors: design, synthesis, and biological characterization. J. Med. Chem. (2018) **61**(12) 5412–5423.
25 Gicquel T., Victoni T., Fautrel A. et al. Involvement of purinergic receptors and NOD-like receptor-family protein 3-inflammasome pathway in the adenosine triphosphate-induced cytokine release from macrophages. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. (2014) **41**(4) 279–286.
26 Surprenant A., North R.A. Signaling at purinergic P2X receptors. Annu. Rev. Physiol. (2009) **71**(1) 333–359.
27 Ralevic V., Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. Pharmacol. Rev. (1998) **50**(3) 413–492.
28 Abbracchio M.P., Burnstock G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? Pharmacol. Ther. (1994) **64**(3) 445–475.
29 Müller T., Fay S., Vieira R.P. et al. P2Y6 receptor activation promotes inflammation and tissue remodeling in pulmonary fibrosis. Front Immunol. (2017) **8** 1028.
30 Miras-Portugal M.T., Sebastián-Serrano Á., de Diego García.L., Díaz-Hernández M. Neuronal P2X7 receptor: involvement in neuronal physiology and pathology. J. Neurosci. (2017) **37**(30) 7063–7072.
31 Yin J., You S., Liu H. et al. Role of P2X7R in the development and progression of pulmonary hypertension. Respir. Res. (2017) **18**(1) 127.
32 Riteau N., Gasse P., Fauconnier L. et al. Extracellular ATP is a danger signal activating $P2X_7$ receptor in lung inflammation and fibrosis. Am. J. Respir. Crit. Care Med. (2010) **182**(6) 774–783.
33 Chandrashekaran V., Das S., Seth R.K. et al. Purinergic receptor X7 mediates leptin induced GLUT4 function in stellate cells in nonalcoholic steatohepatitis. Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis. (2016) **1862**(1) 32–45.
34 Li X., Zhang Y., Jin Q. et al. Liver kinase B1/AMP-activated protein kinase-mediated regulation by gentiopicroside ameliorates P2X7 receptor-dependent alcoholic hepatosteatosis: Gentiopicroside improves alcoholic hepatosteatosis. Br. J. Pharmacol. (2018) **175**(9) 1451–1470.
35 Gicquel T., Le Daré B., Boichot E., Lagente V. Purinergic receptors: new targets for the treatment of gout and fibrosis. Fundam. Clin. Pharmacol. (2017) **31**(2) 136–146.
36 Qian F., Xiao J., Hu B., Sun N., Yin W., Zhu J. High expression of P2X7R is an independent postoperative indicator of poor prognosis in colorectal cancer. Hum. Pathol. (2017) **64** 61–68.
37 Asatryan L., Ostrovskaya O., Lieu D., Davies D.L. Ethanol differentially modulates P2X4 and P2X7 receptor activity and function in BV2 microglial cells. Neuropharmacology (2018) **128** 11–21.
38 Martinon F., Pétrilli V., Mayor A., Tardivel A., Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. Nature (2006) **440**(7081) 237–241.
39 Sueblinvong V., Kerchberger V.E., Saghafi R., Mills S.T., Fan X., Guidot D.M. Chronic alcohol ingestion primes the lung for bleomycin-induced fibrosis in mice. Alcohol. Clin. Exp. Res. (2014) **38**(2) 336–343.
40 Siegmund S.V., Brenner D.A. Molecular pathogenesis of alcohol-induced hepatic fibrosis. Alcohol. Clin. Exp. Res. (2005) **29**(11 Suppl) 102S–109S.
41 Szabo G., Mandrekar P., Oak S., Mayerle J. Effect of ethanol on inflammatory responses. Pancreatology (2007) **7**(2–3) 115–123.
42 Arvers P. Alcool et poumon : des liaisons dangereuses. Rev. Mal. Respir. (2018). https://doi.org/10.1016/j.rmr.2018.02.00
43 Pascual M., Baliño P., Aragón C.M.G., Guerri C. Cytokines and chemokines as biomarkers of ethanol-induced neuroinflammation and anxiety-related behavior: role of TLR4 and TLR2. Neuropharmacology (2015) **89** 352–359.
44 Rossi M., Jahanzaib Anwar M., Usman A., Keshavarzian A., Bishehsari F. Colorectal cancer and alcohol consumption—populations to molecules. Cancers (2018) **10** 38.
45 Ramadori P., Cubero F., Liedtke C., Trautwein C., Nevzorova Y. Alcohol and hepatocellular carcinoma: adding fuel to the flame. Cancers (2017) **9**(12) 130.
46 Liu Y., Nguyen N., Colditz G.A. Links between alcohol consumption and breast cancer: a look at the evidence. Womens Health (2015) **11**(1) 65–77.
47 International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Volume 100E: personal habits and indoor combustion: consumption of alcoholic beverages. Lyon, France [Internet]. 2012. Available from: https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono100E.pdf
48 Vaughn B.P., Robson S.C., Burnstock G. Pathological roles of purinergic signaling in the liver. J. Hepatol. (2012) **57**(4) 916–920.
49 Burnstock G., Novak I. Purinergic signalling and diabetes. Purinergic Signal. (2013) **9**(3) 307–324.
50 Parvathenani L.K., Tertyshnikova S., Greco C.R., Roberts S.B., Robertson B., Posmantur R. P2X $_7$ mediates superoxide production in primary microglia and Is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. J. Biol. Chem. (2003) **278**(15) 13309–13317.

© 2018 Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique

51 Adinolfi E., Raffaghello L., Giuliani A.L. et al. Expression of P2X7 receptor increases in vivo tumor growth. Cancer Res. (2012) **72**(12) 2957–2969.
52 Giannuzzo A., Pedersen S.F., Novak I. The P2X7 receptor regulates cell survival, migration and invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma cells. Mol. Cancer. (2015) **14**(1) 203.
53 Santos A.A., Cappellari A.R., de Marchi F.O. et al. Potential role of P2X7R in esophageal squamous cell carcinoma proliferation. Purinergic Signal. (2017) **13**(3) 279–292.
54 Tan C., Han L., Zou L. et al. Expression of P2X7R in breast cancer tissue and the induction of apoptosis by the gene-specific shRNA in MCF-7 cells. Exp Ther Med. (2015) **10**(4) 1472–1478.
55 Ghalali A., Wiklund F., Zheng H., Stenius U., Högberg J. Atorvastatin prevents ATP-driven invasiveness via P2X7 and EHBP1 signaling in PTEN-expressing prostate cancer cells. Carcinogenesis (2014) **35**(7) 1547–1555.
56 Gicquel T., Robert S., Loyer P. et al. IL-1β production is dependent on the activation of purinergic receptors and NLRP3 pathway in human macrophages. FASEB J. (2015) **29** (10) 4162–4173.
57 McCarthy D.A., Ranganathan A., Subbaram S. et al. Redox-control of the alarmin, Interleukin-1α. Redox. Biol. (2013) **1** (1) 218–225.
58 Liang Y., Harris F.L., Jones D.P., Brown L.A.S. Alcohol induces mitochondrial redox imbalance in alveolar macrophages. Free Radic. Biol. Med. (2013) **65** 1427–1434.
59 Chen M.M., Bird M.D., Zahs A. et al. Pulmonary inflammation after ethanol exposure and burn injury is attenuated in the absence of IL-6. Alcohol (2013) **47**(3) 223–229.
60 Hong F., Kim W.-H., Tian Z. et al. Elevated interleukin-6 during ethanol consumption acts as a potential endogenous protective cytokine against ethanol-induced apoptosis in the liver: involvement of induction of Bcl-2 and Bcl-xL proteins. Oncogene (2002) **21**(1) 32–43.
61 Cahill C.M., Rogers J.T. Interleukin (IL) 1β induction of IL-6 Is mediated by a novel phosphatidylinositol 3-kinase-dependent AKT/IκB kinase α pathway targeting activator protein-1. J. Biol. Chem. (2008 Sep 19) **283**(38) 25900–25912.
62 Fettelschoss A., Kistowska M., LeibundGut-Landmann S. et al. Inflammasome activation and IL-1 target IL-1 for secretion as opposed to surface expression. Proc. Natl Acad. Sci. (2011) **108**(44) 18055–18060.
63 Lindros K.O., Stowell A., Pikkarainen P., Salaspuro M. Elevated blood acetaldehyde in alcoholics with accelerated ethanol elimination. Pharmacol. Biochem. Behav. (1980) **13** (Suppl 1) 119–124.
64 Eriksson C.J. Human blood acetaldehyde concentration during ethanol oxidation (update 1982). Pharmacol. Biochem. Behav. (1983) **18**(Suppl 1) 141–150.
65 Di Padova C., Alderman J., Lieber C.S. Improved methods for the measurement of acetaldehyde concentrations in plasma and red blood cells. Alcohol. Clin. Exp. Res. (1986) **10**(1) 86–89.
66 Cederbaum A.I. Alcohol metabolism. Clin. Liver Dis. (2012) **16**(4) 667–685.
67 Eriksson C.J.P. Measurement of acetaldehyde: what levels occur naturally and in response to alcohol? Novartis Found. Symp. (2007) **285** 247–255; discussion 256–260.
68 Hernandez-Munoz R., Ma X.L., Baraona E., Lieber C.S. Method of acetaldehyde measurement with minimal artifactual formation in red blood cells and plasma of actively drinking subjects with alcoholism. J. Lab. Clin. Med. (1992) **120**(1) 35–41.
69 Seeland S., Kettiger H., Murphy M. et al. ATP-induced cellular stress and mitochondrial toxicity in cells expressing purinergic P2X7 receptor. Pharmacol Res Perspect. (2015) **3** (2) e00123.
70 Cruz C.M., Rinna A., Forman H.J., Ventura A.L.M., Persechini P.M., Ojcius D.M. ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. J. Biol. Chem. (2007) **282**(5) 2871–2879.
71 Abderrazak A., Syrovets T., Couchie D. et al. NLRP3 inflammasome: from a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. Redox. Biol. (2015) **4** 296–307.
72 Zhang Y., Jin Q., Li X. et al. Amelioration of alcoholic liver steatosis by dihydroquercetin through the modulation of AMPK-dependent lipogenesis mediated by P2X7R–NLRP3-inflammasome activation. J. Agric. Food Chem. (2018) **66** (19) 4862–4871.
73 Lombardi M., Mantione M.E., Baccellieri D. et al. P2X7 receptor antagonism modulates IL-1β and MMP9 in human atherosclerotic vessels. Sci. Rep. (2017) **7**(1) 4872.
74 Karoutzou O., Kwak S.-H., Lee S.-D. et al. Towards a novel class of multitarget-directed ligands: dual P2X7–NMDA receptor antagonists. Molecules (2018) **23**(1) 230.

© 2018 Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique

C. Résultats complémentaires

1. Ethanol sur la lignée THP-1

Les résultats obtenus sur MdMs ont été confirmés sur la lignée de macrophage THP-1 (Figures 25 à 27). Cependant, compte tenu de la pertinence du modèle de macrophages humains, nous n'avons pas jugé nécessaire de mettre ces résultats dans l'article 1. Ils sont cependant présentés ci-dessous. Sur les Figures 25 et 26, nous observons que 7 h d'exposition à l'éthanol inhibe la production d'IL-1β à partir de 100 mM, que les macrophages aient été stimulés par le BzATP (Figure 25A) ou le MSU (Figure 26A). De manière similaire aux résultats présentés sur MdMs, la viabilité cellulaire était significativement diminuée en présence de 300 mM d'éthanol pour les cellules stimulées au BzATP, et de 1000 mM d'éthanol pour les cellules stimulées par le MSU (Figures 25B, 26B).

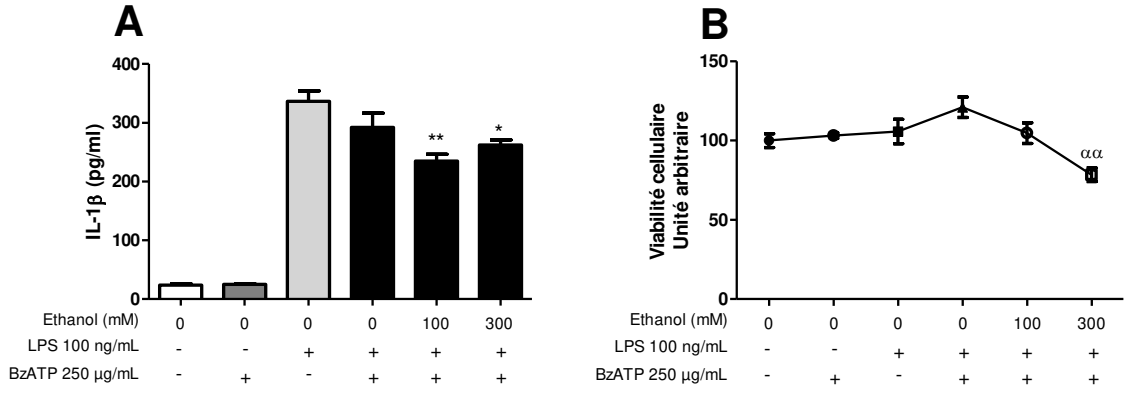


Figure 25 : Sept heures d'exposition à l'éthanol inhibe la production d'IL-1β sur des macrophages THP-1 stimulés avec du LPS + BzATP. (A) La production d'IL-1β dans le surnageant cellulaire (technique ELISA) a été évaluée après activation par du LPS 100 ng/mL ou du milieu de culture seul pendant 18 h, suivi par une incubation avec du BzATP 250 µM ou du milieu de culture seul. L'éthanol, lorsque présent, a été ajouté une heure avant le traitement de 6 h. (B) La viabilité cellulaire a été mesurée par un test MTT et est exprimée en valeur relative au traitement par le milieu de culture seul (défini arbitrairement à 100%). Les données sont indiquées en moyenne +/- écart type sur trois expérimentations réalisées en triplicat. ** $p < 0,01$ * $p < 0,5$: LPS + BzATP sans éthanol, comparé au LPS + BzATP en présence d'éthanol à différentes concentrations. $^{\alpha\alpha}$ $p < 0,01$: comparé à la viabilité cellulaire sans traitement.

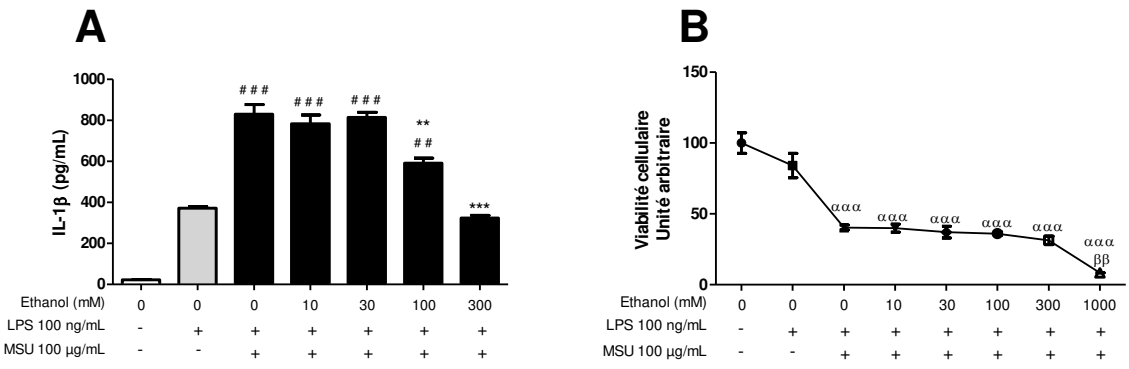


Figure 26 : Sept heures d'exposition à l'éthanol inhibe la production d'IL-1β sur des macrophages THP-1 stimulés avec du LPS + MSU. (A) La production d'IL-1 β dans le surnageant cellulaire (technique ELISA) a été évaluée après activation par du LPS 100 ng/mL ou du milieu de culture seul pendant 18 h, suivi par une incubation avec du MSU 100 µM ou du milieu de culture seul. L'éthanol, lorsque présent, a été ajouté une heure avant le traitement de 6 h. (B) La viabilité cellulaire a été mesurée par un test MTT et est exprimée en valeur relative au traitement par le milieu de culture seul (défini arbitrairement à 100%). Les données sont indiquées en moyenne +/- écart type sur trois expérimentations réalisées en triplicat. ** $p < 0.01$ * $p < 0.5$: LPS + MSU sans éthanol, comparé au LPS + MSU en présence d'éthanol à différentes concentrations. $^{\#\#\#}$ $p < 0,001$ $^{\#\#}$ $p < 0,01$: LPS comparé au LPS + MSU avec ou sans éthanol. $^{\alpha\alpha\alpha}$ $p < 0,001$: viabilité cellulaire sans traitement comparé à la viabilité cellulaire en présence de LPS, LPS + MSU sans éthanol ou LPS + MSU + éthanol. $^{\beta\beta}$ $p < 0,01$: comparé à la viabilité cellulaire en présence de LPS + MSU.

Les résultats illustrés en Figure 25 et 26 présentent également l'avantage de montrer une des limites du modèle THP-1 dans l'étude de l'inflammasome NLRP3. En effet, cette lignée cellulaire présente une caspase-1 constitutivement active (Netea et al. 2009), expliquant (i) l'augmentation de la production d'IL-1β dès l'ajout du LPS seul et (ii) l'absence de surproduction d'IL-1β entre la stimulation au LPS et la stimulation au LPS + BzATP (Figure 25A). Seul un activateur fort de l'inflammasome NLRP3, comme le MSU, permet ainsi d'observer cette augmentation de la production d'IL-1β après stimulation au LPS.

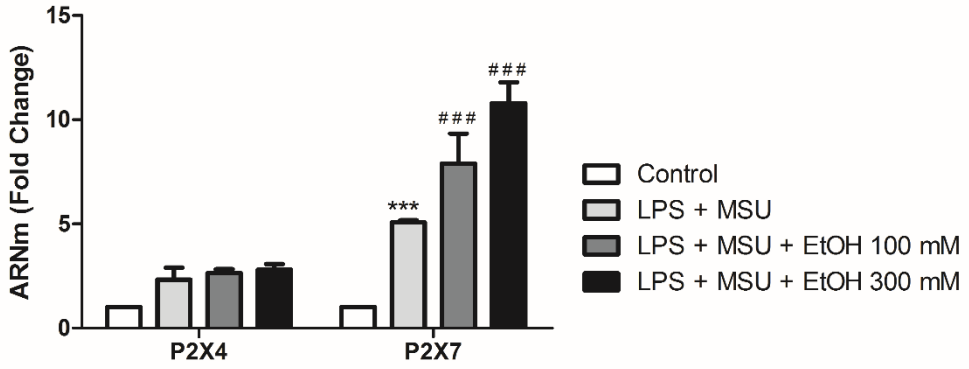


Figure 27 : L'éthanol induit l'expression des récepteurs purinergiques P2X4 et P2X7 à la suite d'une stimulation par LPS + MSU dans le modèle THP-1. Les cellules THP-1 ont été incubés 18 h avec du LPS à 100 ng/mL suite d'une stimulation par 100 µg/mL de MSU pendant 6 h. L'éthanol à 100 mM a été ajouté une heure avant le MSU et était présent tout au long de la période de traitement. Le lysat cellulaire a été collecté, et l'expression d'ARNm a été déterminée par RT-qPCR. Les résultats sont normalisés avec l'expression des gènes de la *GADPH*. Les données sont indiquées en moyenne +/- écart type d'une expérimentation représentative de trois expériences réalisées en triplicat. *** $p <$ 0.001contrôle non traité comparé à LPS + MSU $^{\#\#\#}$ $p < 0.001$ LPS + MSU comparé à LPS + MSU + éthanol.

De manière similaire aux résultats présentés sur MdMs, nous avons observé que l'exposition à l'éthanol était associée à une augmentation de l'expression des ARNm de P2X4R et P2X7R lorsque les cellules étaient stimulées par LPS + MSU (Figure 27). Cependant, nous n'avons pas réalisé de cytométrie en flux sur ce modèle cellulaire pour la confirmation de la surexpression protéique.

Afin de vérifier l'hypothèse d'un effet pro-inflammatoire temps-dépendant de l'éthanol, nous avons exposé à 113 heures d'éthanol des macrophages de la lignée THP-1 stimulé par du LPS ou du LPS + MSU (Figure 28). Ainsi, nous avons observé une surexpression d'IL-1β en présence d'éthanol à 300 mM pour les macrophages stimulés par LPS + MSU (100 ou 300 µg/mL) et à 100 mM pour les macrophages traités par LPS + MSU 300 µg/mL (Figure 28). Ces résultats montrent ainsi un effet stimulant concentration- et temps-dépendant de l'éthanol sur la production d'IL-1β.

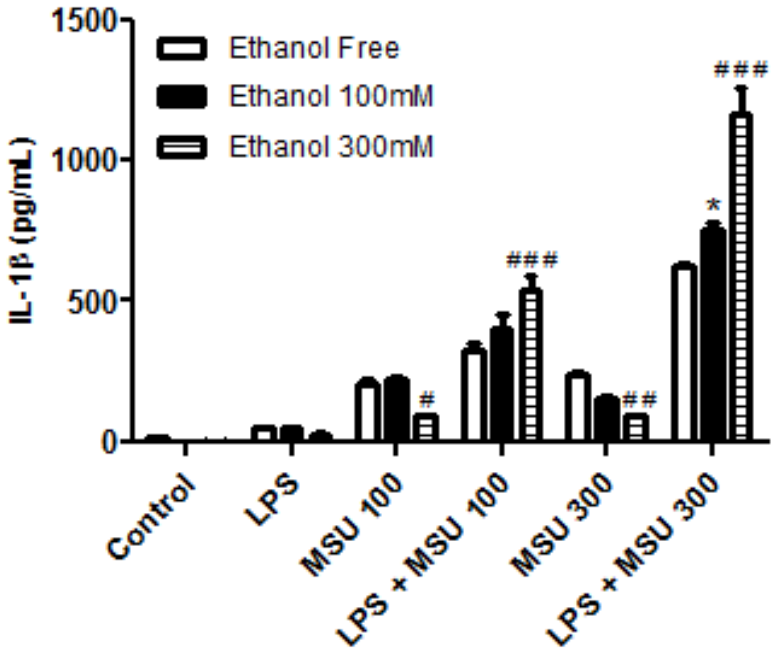


Figure 28 : Une exposition de 113 h à l'éthanol stimule la production d'IL-1β sur des macrophages THP-1 stimulés avec du LPS + MSU. La production d'IL-1 β dans le surnageant cellulaire (technique ELISA) a été évaluée après activation par du LPS 100 ng/mL ou du milieu de culture seul pendant 18 h, suivi par une incubation avec du MSU (100 µM ou 300 µg/mL) ou du milieu de culture seul. L'éthanol (100 mM ou 300 mM), lorsque présent, a été ajouté une heure avant le traitement de 6 h. Les données sont indiquées en moyenne +/- écart type sur une expérimentation réalisée en triplicat. # # # $p < 0.001$ # # $p < 0.01$ # 0.05 : LPS + MSU sans éthanol, comparé au LPS + MSU en présence d'éthanol à différentes concentrations.

2. Paracétamol et NLRP3

Suite à cette étude sur l'éthanol, nous pensions utiliser d'autres xénobiotiques hépatotoxiques et voir leur implication sur l'axe NLRP3-P2X7 et la sécrétion d'IL-1β. Le paracétamol étant très utilisé en thérapeutique et également métabolisé par le CYP2E1, il nous semblait intéressant de tester différentes concentrations.

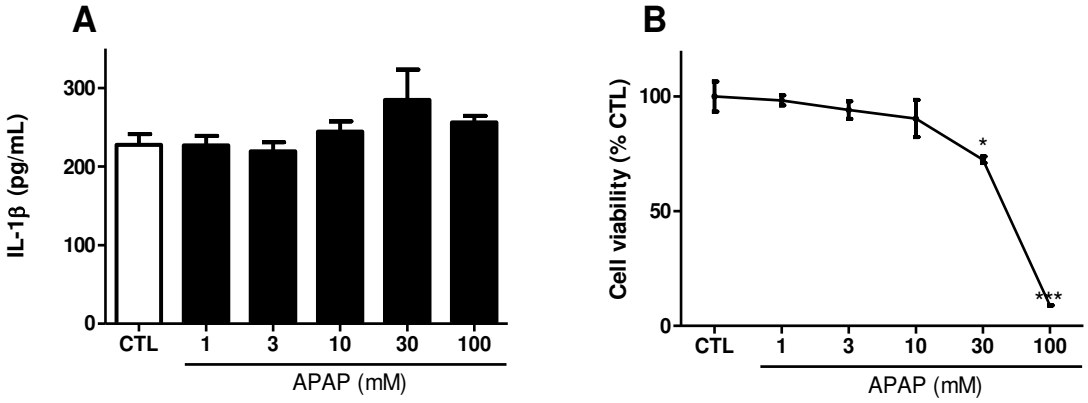


Figure 29 : Une exposition à des concentrations croissantes de paracétamol ne stimule pas la sécrétion d'IL-1β. (A) La production d'IL-1 β dans le surnageant cellulaire (technique ELISA) a été évaluée après 6 h de traitement par du paracétamol ou du milieu de culture seul. (B) Viabilité cellulaire mesurée à l'aide d'un test MTT. Les données sont indiquées en moyenne +/- écart type et sont représentatives de deux expérimentations réalisées en triplicat. *** $p < 0.001$ * $p < 0.05$: LPS + MSU sans éthanol, comparé au LPS + MSU en présence d'éthanol à différentes concentrations. Représentative de deux expériences réalisées en triplicat (MdMs)

Les résultats de ces expérimentations n'ont montré aucune modification significative de la sécrétion d'IL-1β en fonction de la concentration de paracétamol utilisée (0 à 100 mM) (Figure 29A). En parallèle, une diminution de la viabilité cellulaire a été observée à partir de 30 mM (Figure 29B). Les autres expériences réalisées n'étant pas concluante, nous avons décidé de ne pas continuer avec le paracétamol comme xénobiotique.

3. Amanitines et NLRP3

Enfin, nous nous sommes également intéressés aux effets des amanitines sur l'inflammasome NLRP3 de notre modèle de macrophages.

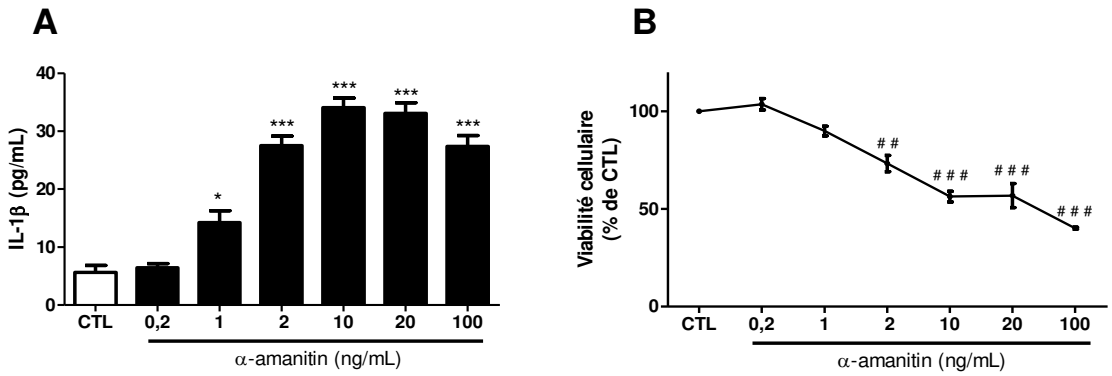


Figure 30 : Une exposition à des concentrations croissantes d'α-amanitine stimule la sécrétion d'IL-1β par les macrophages dérivés de monocytes humains (MdMs). (A) La production d'IL-1 β dans le surnageant cellulaire (technique ELISA) a été évaluée après 6 h de traitement par de l'α-amanitine ou du milieu de culture seul. (B) Viabilité cellulaire mesurée à l'aide d'un test MTT. Les données sont indiquées en moyenne +/- écart type et sont représentatives d'une expérimentation réalisée en triplicat. *** $p < 0.001$ * $p < 0.05$: α-amanitine à diverses concentrations, comparé au control (CTL) non traité.

Les résultats de ces expérimentations montrent que les amanitines augmentent faiblement, et de manière dose-dépendante, la production d'IL-1β par les MdMs (Figure 30). Cependant, ces résultats sont à interpréter en regard de la viabilité cellulaire, décroissante de manière dose-dépendante. Ainsi, il semble raisonnable de penser que cette sécrétion d'IL-1β est attribuée à la mort cellulaire plutôt qu'à une action de l'α-amanitine sur l'inflammasome NLRP-3.

4. Métabolisme de l'éthanol

En parallèle des études d'immunomodulation induites par les xénobiotiques, nous nous sommes intéressés à l'étude du comportement de ces substances au sein du foie, par des études de métabolisme. Dans un travail présenté en Annexe 3 de ce manuscrit, nous avons étudié le métabolisme de phase II de l'éthanol. En utilisant de la chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem, nous avons montré une production dose-dépendante et temps-dépendante d'éthylglucuronide et éthylsulfate après traitement d'HepaRG différenciés et hépatocytes humains en culture primaire par de l'éthanol (25 ou 50 mM).

Egalement, nous avons montré une induction significative de l'expression des ARNm du CYP2E1 par les HepaRG différenciés au cours d'une exposition aiguë à l'éthanol. Enfin, l'utilisation d'HepG2 recombinant exprimant différents variants d'UGT nous a permis d'identifier l'UGT1A9 comme enzyme majoritairement impliquée dans la glucuroconjugaison de l'éthanol (Hugbart et al. 2020) (Annexe 3).

5. Conclusion

Notre étude montre l'implication des récepteurs purinergiques P2X7 dans les effets pro-inflammatoires de l'éthanol dans les macrophages humains traités par analogue de l'ATP et MSU.

En effet, nous observons que la surexpression des récepteurs purinergiques P2X7 semble se mettre en place dans les 48 premières heures d'exposition à l'éthanol. Ainsi, une exposition courte d'éthanol (7 h) est associée à un effet inhibiteur de la production d'IL-1β disparaissant après 48 h. Après 113 h d'exposition à l'éthanol, nous observons une surproduction de cette cytokine.

Cette étude permet d'étayer l'hypothèse de thérapeutiques utilisant des antagonistes de P2X7R dans le traitement des maladies inflammatoires, notamment hépatiques, liées à l'éthanol.

A contrario, le paracétamol et les amanitines ne semblent pas interférer avec la voie de l'inflammasome NLRP3, bien que les résultats présentés ci-dessus doivent être interprétés avec précaution du fait de leur faible puissance statistique.

Chapitre 2 :

Evaluation de l'intérêt du réseau moléculaire dans l'étude du métabolisme des xénobiotiques

A. Contexte scientifique

L'étude du métabolisme des xénobiotiques constitue un élément fondamental de leur pharmacologie et de leur toxicologie. Dans ce travail, nous avons ainsi souhaité développer des outils d'exploration du métabolisme à l'aide de méthodes bio-informatiques. Parmi ces dernières, le réseau moléculaire, ou molecular networking, est un outil permettant la représentation graphique de données complexes acquises par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) (Wang et al. 2016). Tout d'abord développé pour le profilage des espèces végétales (Zhou et al. 2019), son utilisation progresse vers d'autres domaines, comme la métabolomique (Allard et al. 2017), la déréplication de substances d'origines naturelles (Allard et al. 2016), ou l'étude du métabolisme des xénobiotiques à des fins cliniques ou médico-légales (Allard et al. 2018; Le Daré et al. 2019a). La fragmentation des molécules par la MS/MS étant dicté par leurs structures, deux molécules apparentées chimiquement sont susceptibles de présenter des spectres de fragmentation similaires (Quinn et al. 2017). Par traitement bio-informatique, il est ainsi possible de représenter les ions et leurs spectres de fragmentation comme des nœuds interconnectés en cluster en fonction de leur similarité spectrale.

Cet outil utilise une succession de logiciels en accès libre. Tout d'abord, l'utilisation du logiciel MzMine 2.0® permet de pré-traiter les données afin de (i) définir les seuils de détection des masses ciblées, (ii) éliminer les bruits de fond et isotopes du chromatogramme (iii) aligner les différents échantillons en fonction de leur composition chimique, (v) détecter des molécules d'intérêt faiblement exprimées par « gap-filling » et (vi) réaliser une sélection des seules molécules présentant un spectre de fragmentation. Ces données, traitées en ligne sur la plateforme « Global Natural Product Social (GNPS) Molecular Networking » (Wang et al. 2016) facilite ainsi la comparaison des échantillons et permet de créer un réseau multi-matrices de manière semi-quantitative à l'aide du logiciel Cytoscape® (Shannon 2003).

Dans ce travail de thèse, nous avons souhaité évaluer l'intérêt du réseau moléculaire dans l'étude du métabolisme de xénobiotiques. A cette fin, nous avons réalisé une première étude portant le métabolisme de médicaments (Article n°2) *in vivo*. La deuxième étude s'est quant à elle portée sur le métabolisme de médicaments *in vitro* (Article n°3).

Ces travaux réalisés *in vitro* s'inscrivent dans le projet PREVITOX, ayant pour objectif d'établir un réseau d'experts, de laboratoires et de plateformes afin de proposer des solutions alternatives aux modèles animaux pour l'évaluation préclinique et pharmacogénétique de la toxicité des produits de santé (Ferron P-J et Clément B 2019).

Le réseau PREVITOX, composé de 32 laboratoires, 4 infrastructures nationales et un accélérateur de technologie (ART-Bioprint), est organisé en 4 groupes de travail. Ces derniers sont respectivement dédiés (i) à la toxicologie *in vitro* sur des modèles et lignées cellulaires (2D, 3D, organoïdes), et des cellules différenciées issues d'iPS humaines (ii) à l'identification de biomarqueurs dans les modèles *in vitro* par des approches protéomiques et métabolomiques, (iii) à la collection des données biologiques issues de la pharmacovigilance et de la pharmacogénétique pour valider des paramètres de susceptibilités individuelles et (iv) à la modélisation des données obtenues d'une part *in vitro* et chez les patients, et d'autre part *in silico*, à partir des structures moléculaires des médicaments.

Cet outil polyvalent pourra également intervenir lors de l'apparition d'effets indésirables graves chez des individus isolés ou dans des sous-groupes des populations cibles, dans le but d'analyser les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués ; d'identifier des biomarqueurs spécifiques à ces toxicités inattendues ; et d'évaluer le rôle des susceptibilités individuelles de réponse à ces traitements (Ferron P-J et Clément B 2019).

Le réseau moléculaire constitue dans ce contexte un outil potentiellement puissant pour la réalisation de cartographies métaboliques et l'identification de métabolites toxiques.

B. 2ème étude : Evaluation de l'intérêt du réseau moléculaire dans l'étude du métabolisme de xénobiotiques *in vivo*

Afin d'apporter des éléments de preuve quant à l'utilisation du réseau moléculaire dans l'étude du métabolisme de xénobiotiques *in vivo*, nous avons choisi un cas d'intoxication médicamenteuse à l'acébutolol. Dans ce contexte, les concentrations de cette molécule sont attendues élevées, nous permettant d'éliminer, au moins partiellement, les problématiques de détection.

L'acébutolol, qui appartient à la classe des antagonistes des récepteurs β-adrénergiques, possède un effet stabilisant de membrane modéré et une activité sympathomimétique intrinsèque. Cependant, ces effets peuvent également allonger le QRS et l'intervalle QTc, prédisposant les patients à des tachycardies ventriculaires. Nous rapportons dans ce travail les résultats toxicologiques et d'autopsies d'un cas mortel d'intoxication médicamenteuse volontaire à l'acébutolol chez une femme de 70 ans. Les analyses toxicologiques, réalisées sur des prélèvements en *post-mortem* par chromatographie liquide haute résolution couplée à un spectromètre de masse en tandem (LC-HR-MS/MS), ont révélé de fortes concentrations en acébutolol et son métabolite le diacetolol dans le sang fémoral (92,8 mg/L et 21,2 mg/L, respectivement) et d'autres matrices (sang cardiaque, urine, bile et liquide gastrique).

L'approche analytique par réseau moléculaire nous a fourni des informations utiles sur le métabolisme de l'acébutolol, nous révélant l'existence de deux métabolites jusqu'ici non décrits dans la littérature. Par ailleurs, cette approche bio-informatique nous a permis de faciliter la visualisation de données complexes acquises par LC-HR-MS/MS et la comparaison d'échantillons, confirmant l'ingestion massive d'acébutolol.

La partie expérimentale de ce travail a été acceptée pour publication dans le journal *International Journal of Legal Medicine* et est présentée ci-dessous (Article 2): "A case of fatal acebutolol poisoning : an illustration of the potential of molecular networking".

International Journal of Legal Medicine
https://doi.org/10.1007/s00414-019-02062-9

CASE REPORT

A case of fatal acebutolol poisoning: an illustration of the potential of molecular networking

Brendan Le Daré[1,2] · Sophie Allard[3] · Renaud Bouvet[4,5] · Alain Baert[4] · Pierre-Marie Allard[6] · Isabelle Morel[1,3] · Thomas Gicquel[1,3]

Received: 7 February 2019 / Accepted: 5 April 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Acebutolol is a β1-selective adrenergic receptor antagonist with moderate membrane-stabilizing activity and intrinsic sympathomimetic activity; accordingly, the drug is indicated in hypertension, angina pectoris, and arrhythmia. However, acebutolol's beta-blocking properties also extend the QRS and QTc intervals, and may predispose the patient to ventricular tachydysrhythmia. Here, we report autopsy and toxicological findings on a fatal case of acebutolol self-poisoning in a 70-year-old woman. Toxicological analyses of post-mortem samples (using a liquid chromatography high-resolution mass spectrometry (LC-HR-MS) method) highlighted high concentrations of acebutolol and its metabolite diacetolol in femoral blood (92.8 mg/L and 21.2 mg/L, respectively) and other matrices (cardiac blood, urine, bile, and gastric contents). A molecular networking approach provided useful information on acebutolol's metabolism and revealed the existence of an unknown phase II metabolite of acebutolol. Molecular networking also facilitated visualization of the complex LC-HR-MS/MS datasets and the sample-to-sample comparisons that confirmed massive acebutolol intoxication by ingestion.

Keywords acebutolol · Diacetolol · Molecular networking · Beta blocker · Poisoning · Metabolism

Introduction

Acebutolol (3′-acetyl-4′-(2-hydroxy-3-isopropylaminopropoxybutyranilide)) is a β1-selective adrenergic receptor antagonist (with little or no effect on β2 receptors except at high doses) with moderate membrane-stabilizing activity and intrinsic sympathomimetic activity [1–4]. This beta blocker's therapeutic indications include hypertension, angina pectoris, and arrhythmia, at a typical daily dose of between 200 and 1200 mg [5, 6]. As with other beta blockers, the typical signs of acebutolol overdose are bradycardia, severe hypotension, and/or cardiac dysrhythmia. However, acebutolol stands out for its ability to prolong the QRS and QTc intervals and thus predispose to ventricular tachydysrhythmia [7, 8]. Despite the fact that acebutolol is widely prescribed, few cases of fatal poisoning have been reported to date, and analytical and forensic data are scarce [1, 9–12]. Furthermore, acebutolol's metabolism in humans has not been extensively studied. Although the two metabolites acetolol and diacetolol are well known [13] other phase I and phase II metabolites have not been unambiguously identified in vivo.

Molecular networking is a novel tool that allows the organization and representation of tandem mass spectrometry (MS/MS) data in a graphical form [14]. A molecular network displays visual representation of chemical interaction between MS profiles obtained during an untargeted MS/MS analysis. Each node represents an ion and its associated fragmentation spectrum, and the links between the nodes indicate similarities between spectra. By propagating structural information within

✉ Brendan Le Daré
brendan.ledare@hotmail.fr

1 INSERM, INRA, CHU Rennes, Institut NuMeCan (Nutrition, Metabolism and Cancer), University Rennes, 35000 Rennes, France

2 Pharmacy Service, Rennes University Hospital, 35000 Rennes, France

3 Forensic Toxicology Laboratory, Rennes University Hospital, 35000 Rennes, France

4 Department of Forensic Medicine, Rennes University Hospital, 35000 Rennes, France

5 IDPSP - EA 4640, University Rennes, 35000 Rennes, France

6 School of Pharmaceutical Sciences, University of Geneva and University of Lausanne, Geneva, Switzerland

Published online: 17 April 2019

the network and facilitating sample-to-sample comparison, the molecular networking approach offers valuable insights into drug metabolism [15]. Thereby, a multimatrix approach provides a semi-quantitative visualization of molecule repartition in different biological samples.

Here, we report autopsy and quantitative toxicological findings in a case of death following acebutolol ingestion. The toxicological data were acquired using a liquid chromatography high-resolution mass spectrometry (LC-HR-MS) method. The case illustrated the advantages of molecular networking via the visualization of acebutolol, its metabolites, and its impurities in the five biological matrices collected during the autopsy.

Case report

A 70-year-old woman was found dead on the floor of her living room, in the prone position and next to the sofa. Six alprazolam pills were found in the immediate vicinity of the body, and three empty acebutolol blisters were found in the kitchen sink. Acebutolol was prescribed to the woman for heart failure related to mitral valve insufficiency. The woman's 65-year-old husband was also found in the house; he was in a comatose state due to intoxication (alcohol and benzodiazepine) and had a neck wound. He was transferred first to a local hospital and then to a university hospital. In the bedroom, the severely handicapped, bedbound 39-year-old daughter was also found dead, with a clear plastic bag on her head.

The husband survived and confirmed the couple's plan to end their lives and those of their severely disabled daughter, whom they have always kept at home with them. They had become very worried about their ability to keep her in their homes and did not imagine placing her in an institution. Funeral instructions had been left in plain view in the house.

The woman's autopsy was performed on the following day. She was 165 cm tall and weighed 80 kg, giving a body mass index of 29.4 kg/m^2. An external inspection of the body had not revealed any specific lesions. The autopsy showed pulmonary edema. The left lung weighed 375 g and the right lung 408 g. Macroscopic examination of the heart (385 g) mainly showed calcification of the mitral annulus. There were no obvious myocardial abnormalities. The coronary circulation was right-dominant. The left coronary arteries (the anterior interventricular and left circumflex arteries) and the right coronary artery had areas of arteriosclerosis (some of which were calcified) but no significant stenosis. A histologic examination of the lung confirmed the pulmonary edema and showed emphysematous bronchopneumopathy, with inflammatory lesions of the right lower lobe. A histological examination of the myocardium did not show any lesions, fibrosis, or necrosis. No fibro-adipose lesions were seen on the wall of the right ventricle. No inflammatory damage or granulomatous lesions were observed. A papillary, fibroelastoma-like benign tumor was found on the free edge of the tricuspid valve; the tumor was too small to be seen in a macroscopic examination. The rest of the endocardium and the cardiac valves did not show any dystrophic or inflammatory damage. Only moderate arteriosclerotic lesions were observed on the various coronary trunks; no inflammation was present, and the lumens did not contain thromboemboli. No mechanical causes or signs of trauma were found. In view of the family context and the presence of acebutolol blisters around the body, the cause of death was suspected to be self-poisoning. Samples of urine, bile, gastric contents, cardiac blood, and femoral blood were collected for toxicological analysis. Only 27 mL of the total homogenized gastric contents had been collected.

Material and methods

Toxicological analysis

The biological samples collected post-mortem were tested for various types of analyte (e.g., alcohol, psychotropic agents, illegal drugs, and opioid withdrawal medications). Volatile compounds were quantified by headspace gas chromatography–flame ionization detector (HS-GC-FID) on a Thermo Scientific TRACE 2000 GC including a TriPlus Headspace autosampler (Thermo Scientific) and drugs were analyzed by LC-HR-MS using a Q Exactive™ Orbitrap mass spectrometer (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) coupled to an Accela 1250 pump (Thermo Scientific) as already described [16, 17]. Quantitative assays of psychoactive and cardiotropic drugs (including acebutolol and its major metabolite diacetolol) were performed using a validated method on LC-HR-MS with a heated electrospray source in positive ion and full-scan mode. Briefly, 200 μL of each sample (femoral blood, cardiac blood, urine, bile, and gastric contents) was supplemented with 500 μL of methanol containing internal standard (flurazepam) and then extracted with 300 μL of 0.1 M zinc sulfate solution. After the supernatant had been evaporated, the residue was dissolved in 200 μL of LC-MS grade water and transferred into chromatographic vials for LC-HR-MS analysis. Furthermore, toxicological screening was performed using LC-HR-MS/MS, as reported previously [15].

Molecular networking

Data acquisition, processing (i.e., MS data conversion, preprocessing, MS1 annotation, and generation of molecular networks), visualization, and network analysis have been described in detail elsewhere [15]. Briefly, raw data were converted to an open MS format (.mzXML) with ProteoWizard's MSConvert module [18]. The mzXML files were then preprocessed (deconvolution, alignment, de-isotoping, gap-

filling, and MS1 annotation) with MZmine 2 software [19]. The single .mgf output file was then loaded on the Global Natural Products Social (GNPS) networking web–based platform for generation of the multimatrix molecular network [14]. The molecular network was visualized using Cytoscape 3.5.1 software [20]. The nodes were annotated by comparison with reference standards, by spectral matching with the curated GNPS and mzCloud online mass spectral libraries [21]. The compounds were annotated with a confidence level, as defined by Schymanski et al [22]. Here, level 1 (confirmed structure by reference standard), level 2a (probable structure by library spectrum match), and level 2b (probable structure by diagnostic evidence) were all achieved.

Results

Neither alcohol nor illegal drugs were detected in the woman's samples. Therapeutic concentrations of alprazolam, oxazepam, and sertraline were found in the femoral blood sample (0.04 mg/L, 0.22 mg/L, and 0.04 mg/L, respectively). These three drugs were also detected and quantified in the other matrices. High concentration of acebutolol and its main metabolite diacetolol were found in the femoral blood sample (92.8 mg/L and 21.2 mg/L, respectively). The concentrations in the five matrices are reported in Table 1. The gastric content sample was 27 mL, giving an amount of acebutolol and diacetolol of 81.7 mg and 67.5 μg respectively.

The molecular network (Fig. 1) displayed all the MS/MS data acquired during analysis. A different color was assigned to each matrix. The nodes were linked together in clusters according to their spectral similarities (Fig. 1a). Within the overall network, a cluster containing acebutolol and chemically related compounds was apparent (Fig. 1b). The size of each node was related to the area of the corresponding peak in the femoral blood sample.

In the acebutolol cluster, we observed the nodes corresponding to acebutolol itself (*m/z* 337.215) and its main metabolites: acetolol (*m/z* 267.173), diacetolol (*m/z* 309.184), a hydroxylated metabolite (*m/z* 353.21), and N-dealkyl-acebutolol (*m/z* 295.168). We also propose two novel compounds: (i) a phase II acebutolol glucuronide metabolite (*m/z* 513.247) linked by a mass shift 176.0321 to the acebutolol node (explained by glucuronidation) and (ii) an N-dealkyl-diacetolol metabolite (N-[3-acetyl-4-(3-amino-2-hydroxypropoxy)phenyl]acetamide) (*m/z* 267.137) linked by a mass shift 42.0469 to the diacetolol node (explained by dealkylation, loss of C_3H_6). An acebutolol dimer (*m/z* 673.421) and an impurity (J) (*m/z* 323.99) known to be found in acebutolol tablets were also identified [23–25]. The known and putative chemical structures (solid and dashed lines in Fig. 1, respectively) were confirmed or proposed on the basis of the MS/MS spectra, the spectral similarity with known compounds, and the exact mass shift between molecules (i.e., the propagation of structural information within the cluster; Table 2).

In this case, most of the acebutolol and its impurities (impurity J and the acebutolol dimer) were present in the gastric contents (shown in khaki). In contrast, most of the acebutolol metabolites (such as diacetolol and its glucuronide) were found in the bile (shown in green).

Hence, untargeted screening and then molecular networking confirmed the quantitative LC-HR-MS results for acebutolol and diacetolol.

Table 1 Post-mortem concentrations of acebutolol and diacetolol (mg/mL) in the different matrices collected during autopsy

	Acebutolol (mg/L)	Diacetolol (mg/L)
Gastric contents	3028.5*	2.5*
Femoral blood	98.2	21.2
Cardiac blood	126.5	10.6
Bile	1271.9	480.5
Urine	85.4	69.6

*Gastric content sample = 27 mL

Discussion

Here, we reported on a fatal case of acebutolol self-poisoning in the context of a family suicide. In the light of the autopsy results (concluding that the cause of death was asphyxia in the absence of trauma or violence) and the conclusions reached by the judicial investigations according to the usual procedures (investigation of the "crime scene", multiple DNA samples on site, interviews with relatives, neighbors, and husband), the most probable explanation was self-poisoning. The initial toxicological results ruled out intoxication by alcohol or illegal drugs at the time of death. Furthermore, the therapeutic concentrations of the patient's usual medications (alprazolam, oxazepam, and sertraline) measured in a femoral blood sample (0.04 mg/L, 0.22 mg/L, and 0.04 mg/L, respectively) ruled out poisoning by these drugs. The presence of acebutolol blisters in the sink prompted us to assay for this drug in the various matrices collected during the autopsy (including bile and urine, in which acebutolol is excreted). The concentrations of acebutolol and diacetolol in the femoral blood sample were 92.8 mg/L and 21.2 mg/L; these values are higher than therapeutic concentrations in blood, which range from 0.5 to 1.25 mg/L for acebutolol and from 0.65 to 4.5 mg/L for diacetolol [26]. Acebutolol and diacetolol were also detected in the gastric contents, cardiac blood, bile, and urine (Table 1). Acebutolol is known to prolong the QRS and QTc intervals and thus predisposes to ventricular tachydysrhythmia [27]. In the event of an overdose, the beta blockers' toxicity is thought

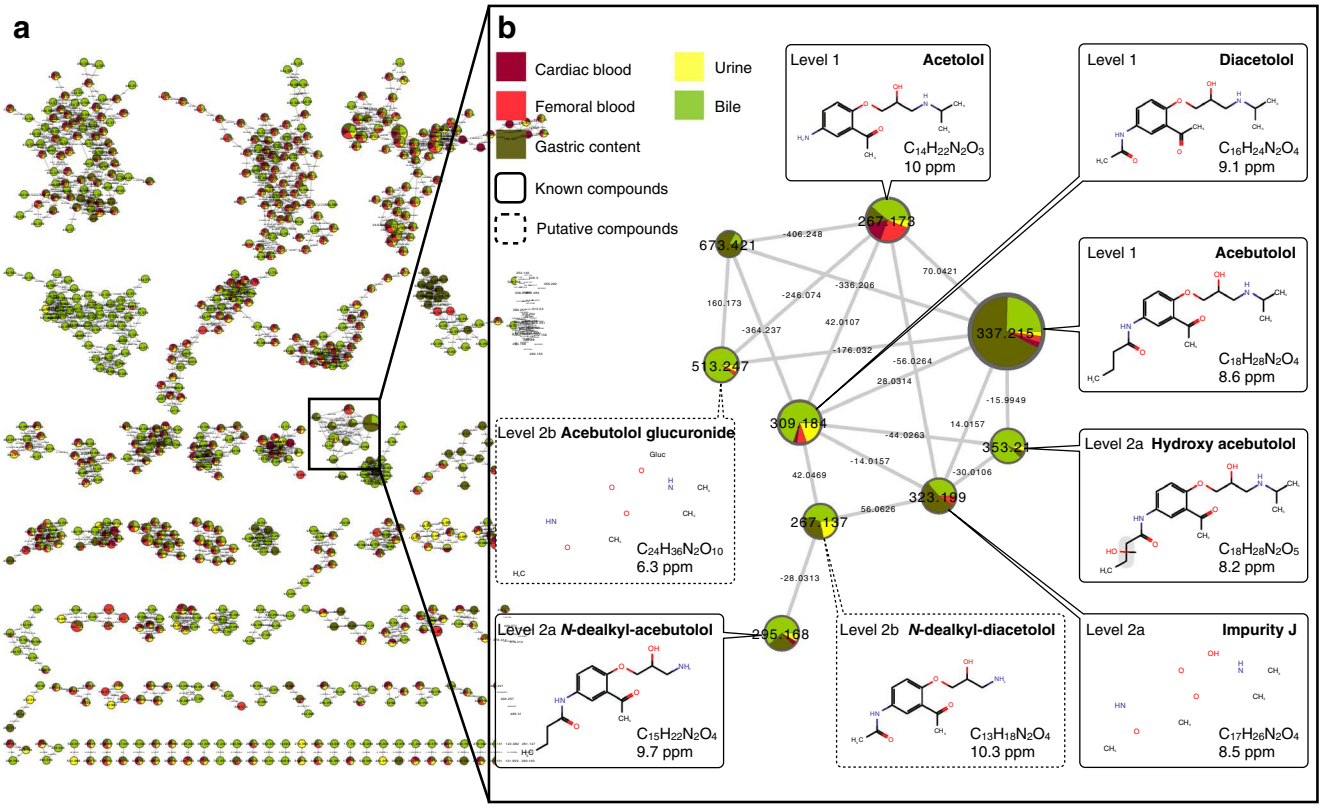


Fig. 1 **a** The multimatrix molecular network. Each matrix is depicted in a specific color: cardiac blood in dark red, femoral blood in red, gastric contents in khaki, urine in yellow, and bile in green. **b** Details of the specific acebutolol-containing cluster. Nodes are labelled with the exact protonated mass (*m/z*), and chemical structures and the links are labelled with the exact mass shift

to be due to their negative inotropic, chronotropic, and dromotropic effects [8]. Moreover, acebutolol's membrane-stabilizing activity is also known to contribute to a poor prognosis [27]. In view of these mechanisms, we hypothesized that the cause of death was acebutolol intoxication.

A molecular networking approach enabled us to efficiently compare datasets by highlighting both similarities and differences between samples [15]. Organizing data by their spectral similarity is a useful means to identifying new metabolites. Furthermore, the graphical display of multiple sets of metadata (exact mass, retention time, annotations, semi-quantitative information, mass shifts, and structural or metabolic relationships) might be a potent tool in forensic toxicology, where the identification of unknown drug metabolites can provide valuable information on the cause of death.

Although the metabolism of acebutolol has not yet been fully characterized, it is currently thought that the drug is primarily metabolized to acetolol in the liver through hydrolysis by carboxylesterase 2. Next, acetolol may be metabolized to diacetolol by N-acetyl-transferase 2 [3, 13]. In the present case, acebutolol's main metabolites (diacetolol and acetolol) were mainly found in the bile and urine samples—confirming the available pharmacokinetic data in humans. In accordance with guidelines for collection of biological

Table 2 Observed exact mass shifts and corresponding formula changes (resulting from biotransformation) in the acebutolol cluster

Biotransformation	Exact mass shift (Da)	Formula change
Nitroreduction	− 29.9742	$-O_2 + H_2$
Deethylation or 2× demethylation	− 28.0313	$-C_2H_4$
Demethylation	− 14.0157	$-CH_2$
Desisopropylation	− 42.0157	$-C_3H_6$
Carbonylation	+ 13.9793	$-H_2 + O$
Methylation	+ 14.0157	$+CH_2$
Hydroxylation	+ 15.9949	+O
Hydroxylation + methylation	+ 30.0105	$+CH_2O$
Glucuronidation	+ 176.0321	$+C_6H_8O_6$

samples for clinical and forensic toxicological analysis, which recommend that approximately 30 mL of the total homogenized gastric contents be collected, we sampled only 27 mL [28]. Therefore, considering that not all the gastric content was collected, we could not estimate the total quantity of acebutolol and its metabolites in this matrix. However, we observed high amount of acebutolol in the gastric contents in comparison with its metabolites (81.7 mg of acebutolol and 67.5 μg of diacetolol), in a much higher proportion than in other matrices, which is a sign of poor absorption and a lack of acebutolol metabolism prior to death. Hence, although the interpretation of post-mortem drug concentrations remains tricky, our findings were consistent with a massive intake of acebutolol few hours before death.

Interestingly, a molecular networking approach also provided insight into the metabolism of acebutolol. According to Muta et al. (2015), acetolol may be metabolized into N-hydroxy-acetolol (which then forms protein adducts) by CYP2C19 [3, 13]. Bussy et al. (2013) predicted a number of metabolites on the basis of electrochemical conversion experiments and studies in rat liver microsomes [29]. In the present analysis of post-mortem human biological samples, we found acetolol, diacetolol, N-dealkyl-acebutolol (*m/z* 295.168), and hydroxyl-acebutolol (*m/z* 353.21) but not the metabolites predicted by Muta et al. or Bussy et al. [3, 13, 29]. Likewise, and with the exception of acetolol, we did not detect the previously described forced in vitro degradation products of acebutolol [30]. The fact that acetolol can be produced under acid stress conditions is consistent with our detection of this metabolite in the gastric contents (pH = 4.7).

Lastly, in consideration of the exact mass, the MS/MS spectra and the propagation of the information enabled us to detect and identify other putative impurities and metabolites; these included a phase II glucuronide derivative (*m/z* 513.247) that had not previously been described. Nevertheless, an unambiguous assignment cannot always be made due to the limitations of mass spectrometry for structure assignment (e.g., isomeric compounds) and the unavailability of chemical standards or confirmatory methods (e.g., nuclear magnetic resonance). Therefore, we recommend the use of a confidence level system for metabolite identification, as suggested by Schymanski et al. [22].

Conclusion

We reported on a case of oral acebutolol self-poisoning in the context of a family suicide. The combination of an LC-HR-MS drug analysis in post-mortem samples of femoral blood, cardiac blood, gastric content, bile, and urine with a molecular networking post-processing approach enabled us to (i) identify and visualize new metabolites of acebutolol, and (ii) conclude that the cause of death was acebutolol poisoning.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Tracqui A, Kintz P, Wendling P, Ritter-Lohner S, Mangin P, Jaeger A (1992) Toxicological findings in a fatal case of acebutolol self-poisoning. J Anal Toxicol 16(6):398–400
2. Frishman WH, Saunders E (2011) β-Adrenergic blockers: β-adrenergic blockers. J Clin Hypertens 13(9):649–653
3. Sweetman S (2011) Martindale: the complete drug reference, thirty-seventh edn. Pharmaceutical Press, London
4. Giacomini JC, Thoden WR (1985) Ancillary pharmacologic properties of acebutolol: cardioselectivity, partial agonist activity, and membrane-stabilizing activity. Am Heart J 109(5 Pt 2):1137–1144
5. Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, Casey DE, Collins KJ, Dennison Himmelfarb C, et al. (2018) 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA guideline for the prevention, detection, evaluation, and management of high blood pressure in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. Hypertension [cited 2019 Mar 12];71(6). Available from: https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/HYP.0000000000000065
6. DiBianco R, Singh S, Singh JB, Katz RJ, Bortz R, Gottdiener JS, Spodick DH, Laddu AR, Fletcher RD (1980) Effects of acebutolol on chronic stable angina pectoris. A placebo-controlled, double-blind, randomized crossover study. Circulation. 62(6):1179–1187
7. Love JN, Enlow B, Howell JM, Klein-Schwartz W, Litovitz TL (2002) Electrocardiographic changes associated with beta-blocker toxicity. Ann Emerg Med 40(6):603–610
8. Weinstein RS (1984) Recognition and management of poisoning with beta-adrenergic blocking agents. Ann Emerg Med 13(12):1123–1131
9. Love JN (2000) Acebutolol overdose resulting in fatalities. J Emerg Med 18(3):341–344
10. Klug E, Schneider V (1979) Lethal intoxication by acebutolol (author's transl). Z Rechtsmed 83(4):325–330
11. Chennebault JM, Turcant A, Harry P, Alquier P, Allain P (1986) Fatal poisoning by acebutolol. Therapie. 41(2):143
12. Weiser JR, Gerling I (1985) Fatal acebutolol poisoning. Dtsch Med Wochenschr 1946 110(46):1793–1795
13. Muta K, Fukami T, Nakajima M (2015) A proposed mechanism for the adverse effects of acebutolol: CES2 and CYP2C19-mediated metabolism and antinuclear antibody production. Biochem Pharmacol 98(4):659–670
14. Wang M, Carver JJ, Phelan VV, Sanchez LM, Garg N, Peng Y, Nguyen DD, Watrous J, Kapono CA, Luzzatto-Knaan T, Porto C, Bouslimani A, Melnik AV, Meehan MJ, Liu WT, Crüsemann M, Boudreau PD, Esquenazi E, Sandoval-Calderón M, Kersten RD, Pace LA, Quinn RA, Duncan KR, Hsu CC, Floros DJ, Gavilan RG, Kleigrewe K, Northen T, Dutton RJ, Parrot D, Carlson EE, Aigle B, Michelsen CF, Jelsbak L, Sohlenkamp C, Pevzner P, Edlund A, McLean J, Piel J, Murphy BT, Gerwick L, Liaw CC, Yang YL, Humpf HU, Maansson M, Keyzers RA, Sims AC, Johnson AR, Sidebottom AM, Sedio BE, Klitgaard A, Larson CB, Boya P CA, Torres-Mendoza D, Gonzalez DJ, Silva DB, Marques LM, Demarque DP, Pociute E, O'Neill EC, Briand E, Helfrich EJN, Granatosky EA, Glukhov E, Ryffel F, Houson H, Mohimani H, Kharbush JJ, Zeng Y, Vorholt JA, Kurita KL, Charusanti P, McPhail KL, Nielsen KF, Vuong L, Elfeki M,

Traxler MF, Engene N, Koyama N, Vining OB, Baric R, Silva RR, Mascuch SJ, Tomasi S, Jenkins S, Macherla V, Hoffman T, Agarwal V, Williams PG, Dai J, Neupane R, Gurr J, Rodríguez AMC, Lamsa A, Zhang C, Dorrestein K, Duggan BM, Almaliti J, Allard PM, Phapale P, Nothias LF, Alexandrov T, Litaudon M, Wolfender JL, Kyle JE, Metz TO, Peryea T, Nguyen DT, VanLeer D, Shinn P, Jadhav A, Müller R, Waters KM, Shi W, Liu X, Zhang L, Knight R, Jensen PR, Palsson BØ, Pogliano K, Linington RG, Gutiérrez M, Lopes NP, Gerwick WH, Moore BS, Dorrestein PC, Bandeira N (2016) Sharing and community curation of mass spectrometry data with global natural products social molecular networking. Nat Biotechnol 34(8):828–837

15. Allard S, Allard P-M, Morel I, Gicquel T (2018) Application of a molecular networking approach for clinical and forensic toxicology exemplified in three cases involving 3-MeO-PCP, doxylamine, and chlormequat. Drug Test Anal [Internet]. [cited 2018 Dec 16]; Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/dta.2550
16. Boumrah Y, Gicquel T, Hugbart C, Baert A, Morel I, Bouvet R (2016) Suicide by self-injection of chlormequat trademark C5SUN ®. Forensic Sci Int 263:e9–e13
17. Gicquel T, Hugbart C, Le Devehat F, Lepage S, Baert A, Bouvet R et al (2016) Death related to consumption of Rauvolfia sp. powder mislabeled as Tabernanthe iboga. Forensic Sci Int 266:e38–e42
18. Kessner D, Chambers M, Burke R, Agus D, Mallick P (2008) ProteoWizard: open source software for rapid proteomics tools development. Bioinformatics. 24(21):2534–2536
19. Pluskal T, Castillo S, Villar-Briones A, Orešič M (2010) MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. BMC Bioinformatics [Internet]. [cited 2019 Feb 5];11(1). Available from: https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-11-395
20. Shannon P (2003) Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. Genome Res 13(11):2498–2504
21. HighChem LLC (2019) mzCloud - advanced mass spectral database [internet]. [cited 2018 Nov 12]. Available from: https://www.mzcloud.org/
22. Schymanski EL, Jeon J, Gulde R, Fenner K, Ruff M, Singer HP, Hollender J (2014) Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: communicating confidence. Environ Sci Technol 48(4):2097–2098
23. Pubchem. N-(3-Acetyl-4-(2-hydroxy-3-(isopropylamino)-propoxy)phenyl)propionamide, acebutolol hydrochloride impurity J [internet]. [cited 2018 Dec 16]. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/71587095
24. Kim S, Thiessen PA, Bolton EE, Chen J, Fu G, Gindulyte A, Han L, He J, He S, Shoemaker BA, Wang J, Yu B, Zhang J, Bryant SH (2016) PubChem substance and compound databases. Nucleic Acids Res 44(D1):D1202–D1213
25. PubChem. acebutolol dimer [Internet]. [cited 2018 Dec 12]. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/71312706#section=Top
26. Negrusz A, Cooper GAA (2013) Clarke's analytical forensic toxicology. Pharmaceutical Press, London
27. Henry JA, Cassidy SL (1986) Membrane stabilising activity: a major cause of fatal poisoning. Lancet Lond Engl 1(8495):1414–1417
28. Dinis-Oliveira RJ, Vieira DN, Magalhães T (2016) Guidelines for collection of biological samples for clinical and forensic toxicological analysis. Forensic Sci Res 1(1):42–51
29. Bussy U, Delaforge M, El-Bekkali C, Ferchaud-Roucher V, Krempf M, Tea I et al (2013 Jul) Acebutolol and alprenolol metabolism predictions: comparative study of electrochemical and cytochrome P450-catalyzed reactions using liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. Anal Bioanal Chem 405(18):6077–6085
30. Rakibe U, Tiwari R, Mahajan A, Rane V, Wakte P (2018) LC and LC–MS/MS studies for the identification and characterization of degradation products of acebutolol. J Pharm Anal 8(6):357–365

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

C. 3ème étude : Evaluation de l'intérêt du réseau moléculaire dans l'étude du métabolisme de xénobiotiques *in vitro*

Suite aux validations de cette méthode sur des échantillons *in vivo*, nous avons souhaité développer un modèle d'exploration du métabolisme *in vitro* par réseau moléculaire. Cette preuve du concept, permettant de décupler les possibilités d'exploration, a été appliquée à une étude du métabolisme de la quétiapine sur une lignée cellulaire hépatique douée de métabolisme : les HepaRG différenciées.

La quétiapine, un antipsychotique de seconde génération largement prescrit, a été choisie du fait d'un métabolisme important bien décrit dans la littérature. De ce fait, elle représente un candidat idéal pour une preuve de concept. Dans ce travail expérimental *in vitro*, nous montrons que le réseau moléculaire permet de visualiser des cinétiques métaboliques, découvrir de nouveaux métabolites, décortiquer les voies métaboliques par l'utilisation d'inhibiteurs de CYP, et évaluer la pertinence d'un modèle de métabolisation *in vitro* par comparaison à des données *in vivo.*

Ces données *in vitro* apportent une preuve consistante de l'intérêt du réseau moléculaire dans la cartographie métabolique, et constituent une première validation de son utilisation dans le cadre du projet PREVITOX.

La partie expérimentale de ce travail a été soumise dans le journal *Scientific reports* et est présentée ci-dessous (Article 3): "New insights into drug metabolism quetiapine using molecular networking".

New insights into quetiapine metabolism using molecular networking

Brendan Le Daré[1,2*], Pierre-Jean Ferron[1], Pierre-Marie Allard[3], Bruno Clément[1], Isabelle Morel[1,2], Thomas Gicquel[1,2]

1. *Univ Rennes, INSERM, INRAE, CHU Rennes, Institut NuMeCan (Nutrition, Metabolism and Cancer), PREVITOX network, F-35033 Rennes, France.*
2. *Rennes University Hospital, Forensic Toxicology Laboratory, F-35033 Rennes, France.*
3. *Institute of Pharmaceutical Sciences of Western Switzerland (ISPSO), University of Geneva, Centre Médical Universitaire (CMU), Geneva, Switzerland*

Corresponding author: Dr. Brendan Le Daré (ORCID**:** 0000-0002-5907-2450 and Publons: AAL-7050-2020)

Address : Laboratoire de toxicologie biologique et medico-légale, CHU Pontchaillou, 2 Rue Henri Le Guilloux, 35000 Rennes.

E-mail: brendan.le.dare@chu-rennes.fr

Contributors

All authors contributed and agree with the content of the manuscript: **Conception/Design**: Brendan Le Daré, Pierre-Jean Ferron, Thomas Gicquel; **Acquisition and/or analysis of data**: Brendan Le Daré, Pierre-Jean Ferron, Thomas Gicquel; **Data interpretation**: All authors; **Manuscript writing:** All authors; **Final approval of manuscript**: All authors.

ABSTRACT

Metabolism is involved in both pharmacology and toxicology of most xenobiotics including drugs. Yet, visualization tools facilitating metabolism exploration are still underused, despite the availibility of pertinent bioinformatics solutions. Since molecular networking appears suitable tool to explore structurally related molecules, we aimed to investigate its interest in metabolism exploration. Quetiapine, a widely prescribed antipsychotic drug, undergoes well-described extensive metabolism, and is therefore an ideal candidate for such a proof of concept. Quetiapine was incubated in metabolically competent human liver cell models (HepaRG) in order to study its metabolism kinetic and pathways. Supernatants were extracted by a liquid liquid extraction, and analyzed on an ultra-high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-HRMS/MS). Molecular networking allowed to quickly visualize the quetiapine metabolism kinetics and the major pathway involved. In addition,two unknown putative metabolites have been detected. These results were confirmed in blood sample from a patient treated with quetiapine. This is the first report using LC-HRMS/MS untargeted screening and molecular networking to explore *in vitro* quetiapine metabolism. Our data provide new evidences of the interest of molecular networking in drug metabolism exploration and allow our *in vitro* model consistency assessment.

Keywords: molecular networking, quetiapine, metabolism, LC-HRMS/MS, CYP3A4/5, CYP2D6

1. INTRODUCTION

Quetiapine is an orally administered atypical antipsychotic indicated in schizophrenia treatment, bipolar disorders and as an adjuvant treatment in major depressive disorders [1]. Widely prescribed in these indications, this dibenzodiazepine derivative shows affinity for various neurotransmitter receptors including serotonin, dopamine, histamine and adrenergic receptors and has binding characteristics at the dopamine-2 receptor similar to those of clozapine [2]. Quetiapine undergoes an extensive liver biotransformation, involving cytochromes P450 (CYPs) and uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferases (UGTs) [3–6]. Among them, CYP3A4 and CYP2D6 are the predominant metabolic systems : CYP3A4 is known to give rise to *N*-desalkylquetiapine, *N*-desalkylquetiapine sulfoxide and quetiapine sulfoxide and CYP2D6 is known to give rise to 7-hydroxyquetiapine, 7-hydroxy-*N*-desalkylquetiapine [3,6,7]. In addition, minor metabolism though CYP3A5 is known to give rise to *O*-desalkylquetiapine [7]. This knowledge on quetiapine metabolism is resulting from a sequence of works specifically targeting the metabolism of one molecule after another. Despite the recent design of appropriate bioinformatics tools, visualization tools allowing metabolism exploration are still underused.

Molecular networking (MN) is a novel tool that allows the organization and representation of untargeted tandem mass spectrometry (MS/MS) data in a graphical form [8]. Each node represents an ion and its associated fragmentation spectrum, the links between the nodes indicating similarities between spectra. By propagating structural information within the network and facilitating sample-to-sample comparison, the molecular networking approach offers valuable insights into drug metabolism [9]. Thereby, a multimatrix approach provides a semi-quantitative visualization of molecule repartition in different matrix samples. Molecular networking has already proven its interest in plant species profiling [10], metabolomics [11], the dereplication of naturally produced substances [12], and in drug metabolism analysis for *in vivo* clinical or forensic purposes [9,13]. Particularly, previous works focused on *in vivo* new psychoactive substances metabolite discovery [9], multi matrix post-mortem samples in case of drug intoxication [13], and toxic plant samples in case of intoxication [14]. However, to our knowlegde, molecular networking applied to *in vitro* metabolism exploration has not already been reported.

Many human hepatic cell lines, including HepG2 and HuH7 have been used as pharmacological and toxicological models. However, the lack of relevant expression of metabolism proteins is a major shortcoming when using cell cultures, particularly in drug biotransformation studies [15,16]. HepaRG, originally isolated from a female patient suffering from hepatocellular carcinoma, is a bipotent cell line that can differentiate into either cholangiocyte- or hepatocyte-like cells in appropriate culture conditions [17]. Differentiated hepatocyte-like HepaRG transcribe liver-specific genes at high levels, closer to primary human hepatocytes (pHH) and human liver tissue than any other liver cell lines [18,19]. More precisely, HepaRG cells express most of the drug processing genes including major CYPs [20] and UGTs [19,21]. HepaRG cell culture exhibit a long-term fonctional stability while pHH loose their differentiated phenotype and drug metabolism over time. Moreover, HepaRG cells have been successfully used in metabolomics [22] and have shown greater metabolite production compared to human liver microsome due to the lack of sulfation, methylation, acetylation or glutathione conjugation in this latter model [23]. Thus, there is a large body of evidence that differentiated HepaRG culture is a particularly relevant cell model system for drug metabolism study.

In the present study, molecular networking application to *in vitro* metabolism exploration was investigated using our original MN analytical approach in differentiated HepaRG cells. Since *in vivo* quetiapine metabolism pathways generate well defined metabolite derivatives, we used this drug in order to explore the consistency of our *in vitro* metabolic model.

2. RESULTS

In vitro **quetiapine metabolism kinetic.** In order to understand quetiapine metabolism kinetic, we incubated quetiapine (13 µM) in metabolically competent human liver cell models, differentiated HepaRG cells during 0, 3, 8 and 24 hours (H0, H3, H8 and H24, respectively). Analysis of culture media at different time allowed us to generate a multi-matrix molecular network which displayed the MS/MS data acquired during analysis (Figure 1a). A specific color was assigned to each time (H0 in white, H3 in blue, H8 in yellow and H24 in orange). Nodes were linked together in cluster according to their MS^2 spectral similarities (Figure 1a). Visual analysis of the multi-matrix molecular network shows a cluster containing quetiapine linked to other nodes (Figure 1b).

The molecular network allows to make two observations. The first on beeing that quetiapine amount decrease as a function of incubation time with the HepaRG cells. The second one beeing that quetiapine is correlated with eight structurally related molecules (*m/z* 296.121 (RT: 6.3 min); 312.116 (RT: 5.5 min); 340.147 (RT: 6.4 min); 354.126 (RT: 6.4 min); 356.142 (RT: 5.5 min); 398.152 (RT: 6.5 min); 400.168 (RT: 4.9 min); 400.168 (RT: 5.6 min)). Immediately after quetiapine incubation (H0), none of these latter molecules was detectable. Taken together, these results suggest that these spectrally related molecules are putative quetiapine metabolites.

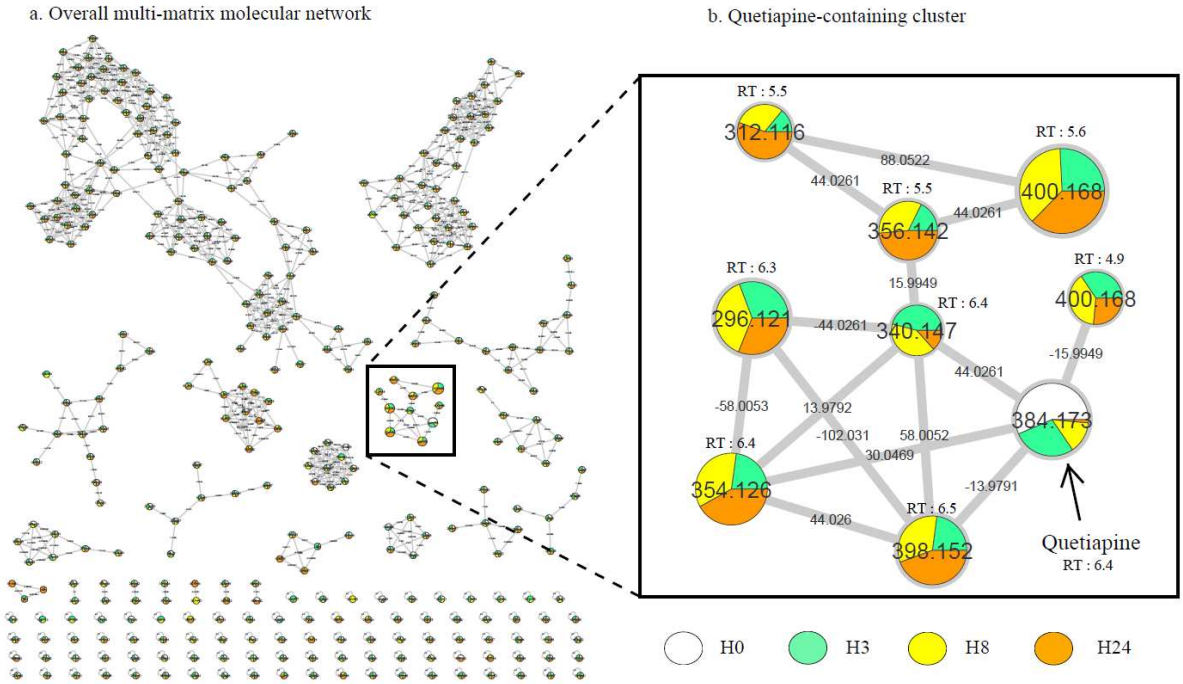


Figure 1: Visualization of *in vitro* quetiapine metabolism kinetics using molecular networking. Differentiated HepaRG were incubated with quetiapine (13 µM) during different incubation time. a) The multimatrix molecular network. Each incubation time is depicted in a specific color: H0 in white, H3 in green, H8 in yellow and H24 in orange. b) Details of the specific quetiapine-containing cluster. Nodes are labelled with the exact protonated mass (*m/z*) and retention times (RT in minutes) and the links are labelled with the exact mass shift.

In this quetiapine-containing cluster (Fig. 1b.), the related metabolites can be classified in two subgroups. The first subgroup corresponds to molecules that accumulate over time and therefore present their highest concentration at H24 (*m/z* 312.116; 354.126; 356.142; 398.152). The second subgroup corresponds to molecules that does not accumulate and present relatively constant concentrations over time as long as quetiapine remains (*m/z* 296.121; 340.147; 400.168 (RT: 4.9 min); 400.168 (RT: 5.6 min)) (Figure 1b). Taken together, these visual results give a good understanding of quetiapine metabolism kinetic, and suggest that the quetiapine structurally closed molecules can be divided into metabolite accumulating over time and transitory metabolite which do not accumulate.

Identification step. Structural identification remains a challenge in metabolism exploration. Here, a node identified using GNPS or open spectral library can serve as a starting point to identify another node in the same cluster using information propagation. Spectrally related molecules sometimes display mass shifts corresponding to well-established biotransformation reactions (Supplementary Table 1) [13]. Our data showed also two compounds with the same exact mass (*m/z* 400.168) but with two different retention time (RT: 4.9 and 5.6 min) (Figure 1b). According to literature data, *m/z* 400.168 could correspond to 7-hydroxyquetiapine (*m/z* 400.168) or quetiapine sulfoxide (*m/z* 400.168)) [6]. These nodes are linked to quetiapine (*m/z* 384.173) with a mass shift of +15.994, corresponding to oxidation reaction. We found also mass shifts which could correspond to two desalkylation (-44.026 Da), giving rise to *m/z* 296.121 compound (Figure 1b). In order to find where the biotransformation took place, we used MZMine chromatogram profile analysis and MS^2 fragmentation trees analysis using SIRIUS 4.0.1 software [24]. Figure 2 displays the example of two *m/z* 400.168 isomers (RT 4.9 and 5.6 min).

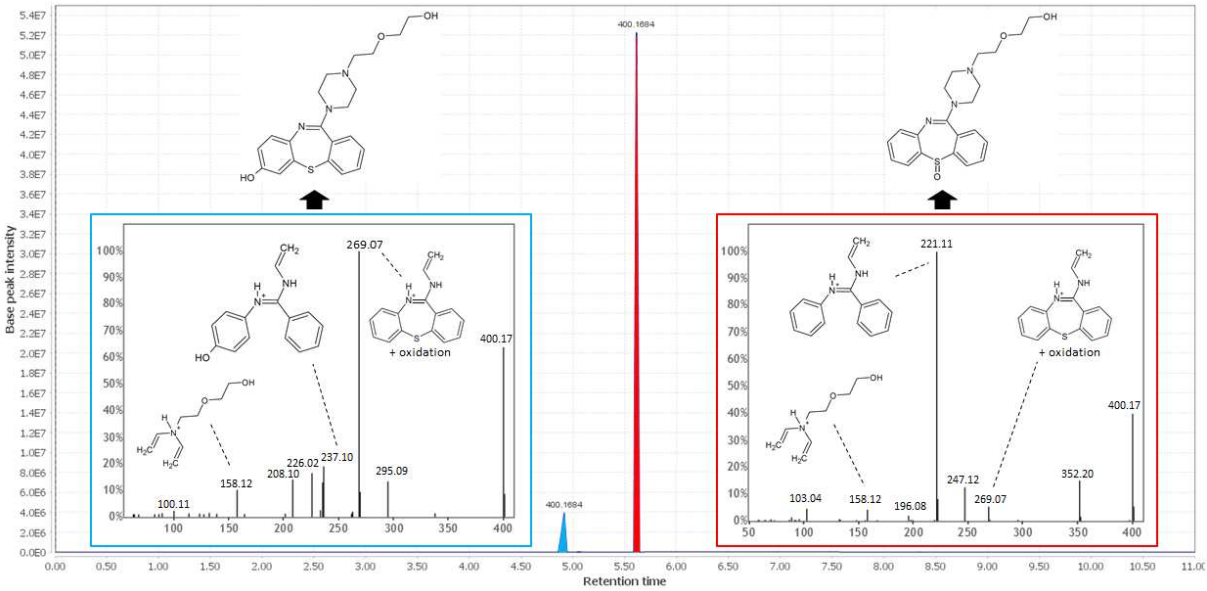


Figure 2: Isomer differentiation using. Chromatogram analysis of *m/z* 400.168 isomers (RT 4.9 and RT 5.6) at H24 and analysis of MS² spectra allowed isomer differentiation. a) Blue box: 7-hydroxyquetiapine MS² spectra shows the oxidized cycle structure without sulfur fragment (*m/z* 237.10). b) Red box: quetiapine sulfoxide MS² spectra shows the unoxidized cycle without sulfur fragment (*m/z* 221.11).

We found that both isomers presented *m/z* 158.12 and *m/z* 269.07 fragments, which could correspond to the same alkyl chain of quetiapine and an oxidized tricycle, respectively. Thus, we concluded that oxidation reaction took place on the quetiapine tricycle. In addition, we found that *m/z* 237.10 and *m/z* 221.10 fragments correspond to an oxidized tricycle without sulfur and an unoxidized tricycle without sulfur, respectively (Figure 2). These results suggest that *m/z* 400.168 (RT: 4.9 min) and *m/z* 400.168 (RT: 5.6 min) correspond to 7-OH-quetiapine and quetiapine sulfoxide, respectively. Same methodology was applied to other nodes, allowing identification of all the quetiapine-containing cluster molecules shown in Figure 1.

Quetiapine metabolic pathways exploration. In order to explore metabolic pathways, we incubated quetiapine (13 µM) with or without cytochrome P450 (CYP) inhibitors during H24. Ketoconazole (10 µM) and quinidine (10 µM) were used as CYP3A4/5 and CYP2D6 inhibitors, respectively. Quetiapine quantitative analysis using a LC-HR-MS method allowed us to control inhibitors effectiveness and measure quetiapine concentration at different time (Figure 3). The relevance of HepaRG model (Figure 3a) was assessed by comparing it to pHH

in the same conditions (Figure 3b). We observed a higher quetiapine metabolism in differentiated HepaRG cells compared to pHH. Indeed, approximately 50% of quetiapine were metabolized at H6 compared to 25% in pHH. However, of CYPs inhibitors displayed a similar profile between these two models. The use of quinidine showed a weak inhibition of quetiapine metabolism while ketoconazole allowed a strong inhibition. Taking together, these results suggest that (i) CYP3A4/5 is more likely involved than CYP2D6 in quetiapine metabolism and that (ii) differentiated HepaRG is a relevant model for this study.

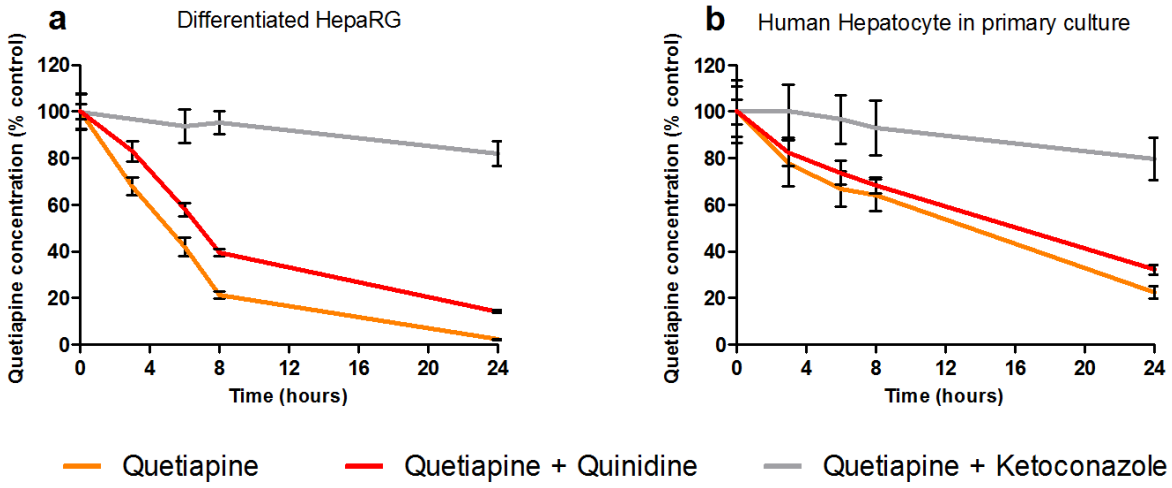


Figure 3: Cytochrome inhibitors enable quetiapine metabolic pathway inhibition in differentiated HepaRG and primary Human hepatocytes (pHH). Cells were incubated with quetiapine (13 µM) with or without CYPs inhibitors (ketoconazole 10 µM as a CYP3A4/5 inhibitor in grey; quinidine 10 µM as a CYP2D6 inhibitor in red) in (a) differentiated HepaRG cells or (B) pHH. Quetiapine concentration was measured at H0, H3, H6, H8 and H24 using high-resolution liquid-chromatography and expressed relative to the value determined at H0 (set arbitrarily to 100%). The data are quoted as the mean ± SEM from one experiment performed in triplicate

We performed a molecular networking approach in the presence of ketoconazole or quinidine CYP inhibitors in differentiated HepaRG cells to visualize what putative metabolites are CYP3A4/5- and/or CYP2D6-dependent. Since the aim was to compare metabolite accumulation with or without CYP inhibitor, the H24 time was chosen (Figure 4). All the known molecules were named consistently with the literature data, conversely with unknown putative metabolites, here called quetiapine M1 (*m/z* 356.142; RT: 5.5 min) and quetiapine M2 (*m/z* 354.127; RT: 6.4 min).

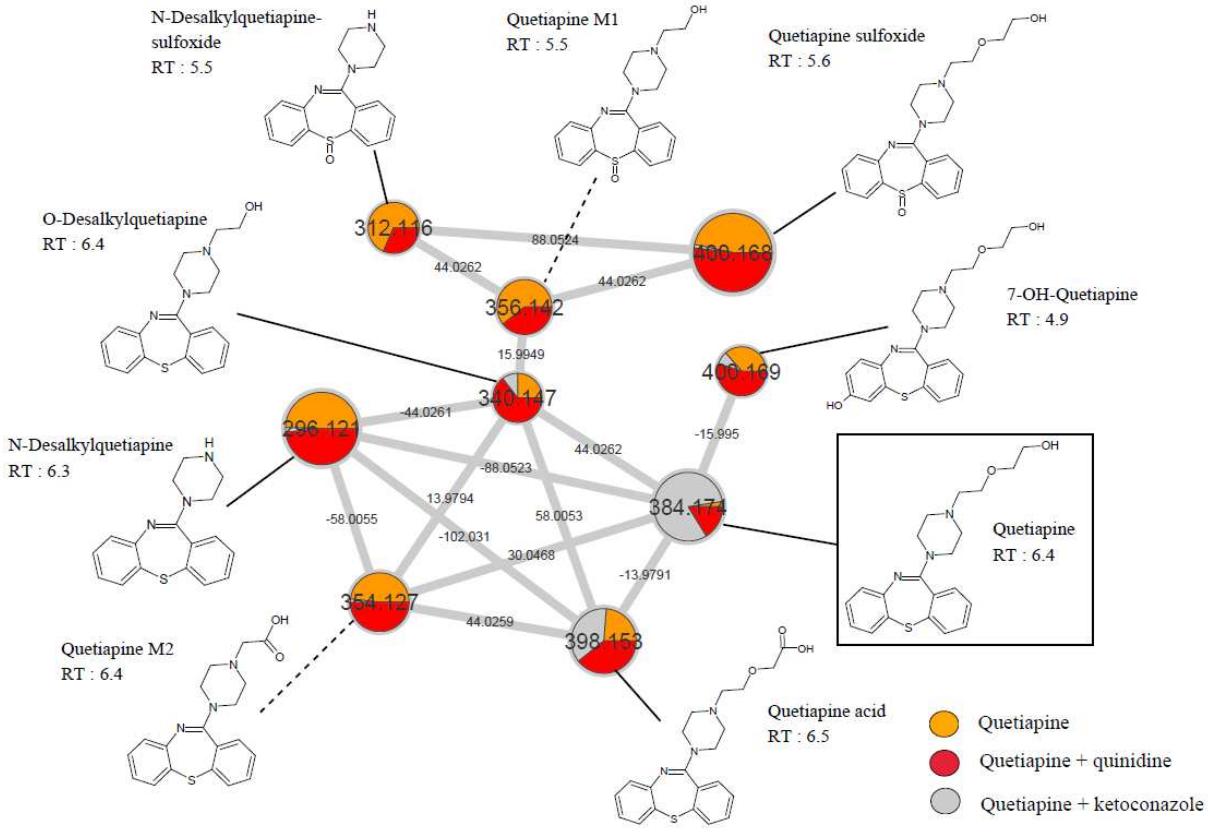


Figure 4: Extinction of CYP3A4/5 and CYP2D6 metabolic pathway visualization in differentiated HepaRG cells using molecular networking. Differentiated HepaRG were incubated with quetiapine (13 µM) during H24 with or without cytochrome inhibitors. Ketoconazole (10 µM) is used as a CYP3A4 inhibitor and quinidine (10µM) is used as a CYP2D6 inhibitor. Each experimental condition is depicted in a specific color: quetiapine in orange, quetiapine + quinidine in red and quetiapine + ketoconazole in grey. Nodes are labelled with the exact protonated mass (*m/z*), chemical structures and retention times (RT in minutes) and the links are labelled with the exact mass shift.

We observed that quetiapine (*m/z* 382.174) incubated alone (in orange) is nearly absent of culture media at H24 in Figure 4. In addition, quetiapine incubated with quinidine (in red) showed a lower amount at H24, compared with quetiapine incubated with ketoconazole (in grey). This corroborate our quantitative results, showing a minor metabolism through CYP2D6 (Figure 3). We found that a few putative metabolites were nearly absent of culture media when incubated with ketoconazole (in grey), suggesting a CYP3A4/5-dependent metabolic pathway for (N-desalkyquetiapine, Quetiapine M2, 7-OH-quetiapine and quetiapine sulfoxide). Similarly, production of some putative metabolites was decreased in the presence of quinidine (in red), suggesting a CYP2D6-dependent metabolic pathway (N-desalkyquetiapine sulfoxide and quetiapine M1). We also observe that a few metabolites

undergo metabolism through these two isoenzymes (quetiapine M1, *N*-desalkylquetiapine sulfoxide and *O*-desalkylquetiapine). The same experiment was carried out in our pHH model (Supplementary Fig 1). However, fewer metabolites were found, which is consistent with our quantitative results showing a slower metabolism in this model (Figure 3). Taken together, these results show that molecular networking allows detailed visual analysis of *in vitro* metabolism, including metabolic pathways.

***In vivo* versus *in vitro* quetiapine metabolism.** In order to compare our *in vitro* findings to *in vivo* data, we performed a sample-to-sample comparison using molecular networking, including one blood sample of patient treated by quetiapine and our culture media of differentiated HepaRG incubated by quetiapine (13 µM) during H24 (Figure 5).

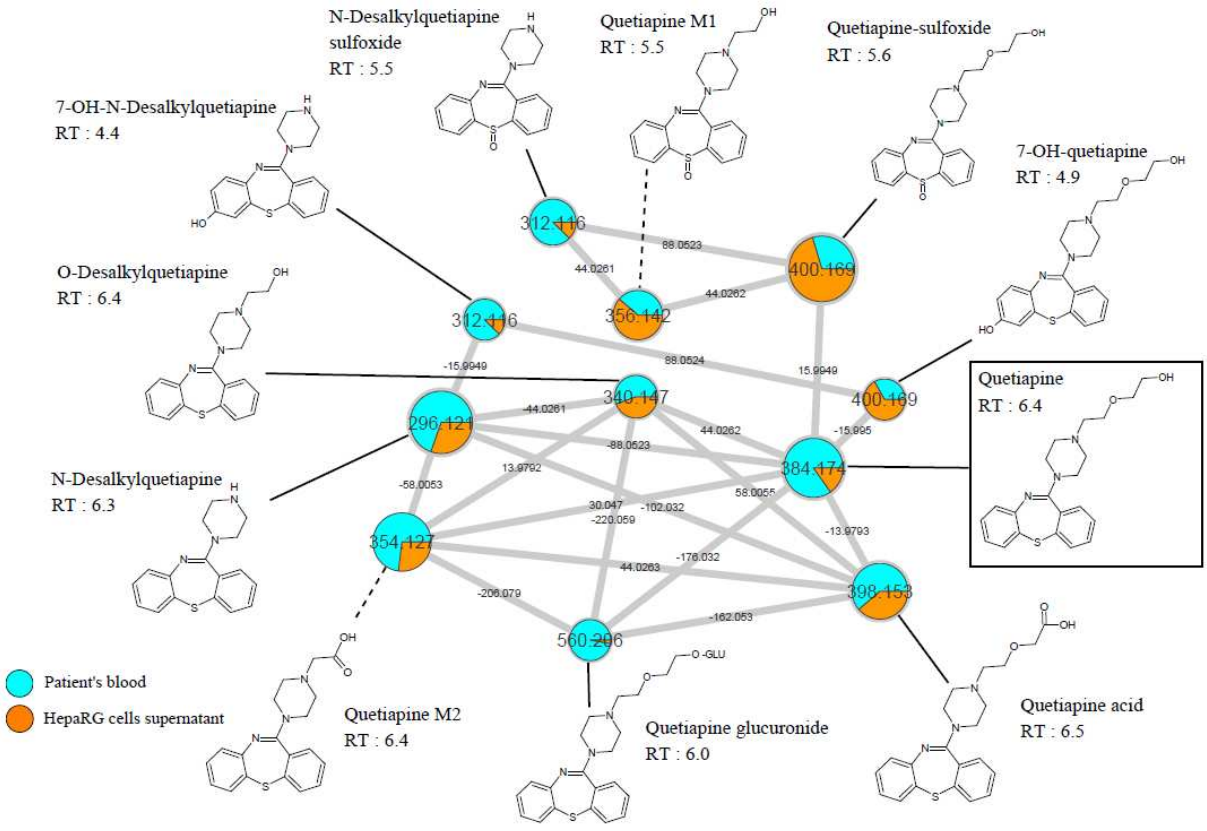


Figure 5: *In vivo* versus *in vitro* quetiapine metabolism. Blood sample from a patient treated with quetiapine was compared with differentiated HepaRG cells culture media incubated with quetiapine (13 µM) during H24. In this quetiapine-containing cluster, patient sample and differentiated HepaRG cells supernatant are depicted in blue and orange, respectively. Nodes are labelled with the exact protonated mass (*m/z*), chemical structures, and retention times and the links are labelled with the exact mass shift.

Quetiapine-containing cluster visual analysis revealed that all putative metabolites found in our previous *in vitro* experiment were present in the patient blood sample (N-desalkylquetiapine, N-desalkyquetiapine sulfoxide, quetiapine M1, quetiapine M2, O-desalkylquetiapine, 7-OH-quetiapine and quetiapine sulfoxide and quetiapine acid). In addition, we found two other metabolites, present in both blood sample and differentiated HepaRG cells supernatant, resulting from oxidation of N-desalkylquetiapine (*m/z* 312.116; RT: 4.4) and glucuronidation (+ 176.032) of quetiapine (*m/z* 560.206). Identification step suggested that these two metabolites could correspond to 7-OH-*N*-desalkylquetiapine and quetiapine glucuronide, respectively.

Taken together, these results suggest that differentiated HepaRG is a strong and consistent model in metabolism study. Sample-to-sample comparison including *in vivo* samples seems to be is a potent tool to further explore *in vitro* data experiment. Supplementary Table 2 reports putative identified compounds or metabolites contained in the quetiapine-containing clusters, and metabolic pathway involved in quetiapine metabolites biotransformation.

3. DISCUSSION

Metabolism unraveling is a fundamental objective of pharmacologic studies. However, visualization tools allowing quick metabolism exploration are still under-used. The aim of this study is to illustrate the interest of molecular network for *in vitro* drug metabolism exploration.

Quetiapine appeared as a suitable candidate drug to carry out this proof of concept. Indeed, this molecule undergoes an extensive and well-described metabolism. The existence of an abundant literature allows us to compare it with our data in order to assess their relevance [3–7]. In addition, it is an inexpensive and widely prescribed molecule. Samples from patients treated with quetiapine were then easily available to compare real-life data with our *in vitro* study.

Identification means were also of major importance in this study. For this purpose, we used validated process based on exact mass, mass spectra, retention times, fragmentation pattern analysis with SIRIUS 4.0.1 software, information propagation, and mass shifts corresponding to biotransformation reactions as already described [9,13,24]. Here, we propose identification of 10 putative quetiapine metabolites, among which two of them (quetiapine M1 and M2) have not been already described in the literature (Supplementary Table 2). Kinetic metabolism study brings us valuable data on quetiapine-related nodes. Indeed, by visualizing quetiapine clearance, correlated with structurally related molecules appearance, we present strong evidence for claiming they are metabolites. None of them was detectable before H3 incubation and since their intermediate and final metabolite profils could be distinguished, a good understanding of the metabolites filiation can be proposed. These data allowed us to bring additional evidence on quetiapine metabolic pathway (Supplementary Fig 2).

To date, it is well established that quetiapine is primarily metabolized by CYP3A4, CYP2D6, and CYP3A5 to a lesser extent. CYP3A5 appears to be routinely present in human kidney tissue but it is detected in only 25 to 30% of adult liver samples [25,26]. Thus, pHH model may be limited by the lack of this cytochrome expression in a donor. This limitation was partially overcome using differentiated HepaRG cells that exhibit poor but present metabolizer alleles for CYP3A5 [27]. To further investigate quetiapine metabolism pathways, we used quetiapine metabolism inhibitors. Ketoconazole is well known to be a CYP3A inhibitor, including CYP3A4 and CYP3A5, having high inhibitory potency and producing reversible inhibition through competitive and non-competitive mechanisms [28–34]. In this way, *in vitro* studies have shown that 10 µM ketoconazole inhibits specific activity of CYP3A4 on HepaRG cells [35]. Since ketoconazole is known to inhibit CYP3A4 and CYP3A5, we were not able to precisely determine which cytochrome was the most involved in metabolites production. Therefore, we chose to mention CYPA4/5 in Supplementary Figure 2 and Supplementary Table 2.

In addition, a potent competitive inhibitor of CYP2D6 is quinidine [36–39]. For these reasons, these two molecules (ketoconazole and quinidine) have been used in this study to clarify metabolism pathways. Metabolism inhibition visualization using molecular networking brings further insight into metabolism pathways mapping and allows us to objectify a predominant CYP3A4/5 metabolism.

Comparing HepaRG data with *in vivo* data appears critical to establish the proof of concept concerning the use of molecular network in *in vitro* drug metabolism exploration. Among the 10 known quetiapine metabolites (Supplementary Fig 2) [3,5–7], we identify 8 of them (*N*-desalkylquetiapine, *N*-desalkyquetiapine sulfoxide, 7-OH-*N*-desalkyquetiapine, *O*-desalkylquetiapine, 7-OH-quetiapine, quetiapine sulfoxide, quetiapine acid and quetiapine glucuronide) whereas two other compounds were unknown putatives metabolites (quetiapine M1 and quetiapine M2). The 10 putative metabolites reported in this study have been found in both human sample and HepaRG cells supernatant, showing the consistency of this latter model. Furthermore, by comparing *in vitro* and *in vivo* data, we found two metabolites that were not seen in previous *in vitro* molecular networks (quetiapine glucuronide and 7-OH-*N*-desalkylquetiapine). Since these latter metabolites were found to be equally present in *in vitro* experiments according to exact mass and retention time comparison at the gap-filling step, we believe that this preprocess made it possible to link the information of weakly expressed molecules *in vitro*. Thus, sample-to-sample comparison is found to be a potent tool to visualize weakly expressed molecules.

However, as expected, molecular networking must be interpreted considering several limitations and requires optimizations at every stage of data processing, and a good knowledge of LC-MS/MS analysis. We cannot exclude that different LC-MS/MS settings would have allowed the visualization of other metabolites, in particular phase II metabolites.

We demonstrated that organizing data by their spectral similarities is a useful means to identifying new metabolites. Furthermore, unknown drug metabolite identification can provide valuable information on drug toxicity. It would be interesting to consider broader perspectives on metabolite mapping in the context of toxicity studies [40]. In vitro cell line models such as HepaRG can be used to study pathophysiology mechanism of diseases like steatosis and NAFLD [41]. Moreover, next-generation liver organoids can be produced directly from patient's cells (ie blood cells, urine cells) and modified genetically to study patient diseases and regenerative medicine purposes [42]. Those tools combined with MN approaches provide a new way to integrate patient individual variability in therapeutic efficiency and toxicity studies.

4. MATERIAL AND METHODS

Material. William's E medium (ref: 12551032) was purchased from Gibco (ThermoFischer Scientific, San Jose, CA). Penicillin-streptomycin was obtained from Life Technologies (Grand Island, NY USA). Fetal Bovine Serum (FBS) was purchased from Eurobio (Courtaboeuf, France) and from Hyclone™ GE Healthcare Life Sciences (Logan, UT USA). Hydrocortisone hemisuccinate was purchased from Serb (Paris, France). Dimethyl sulfoxide (DMSO), formic acid, insulin, ketoconazole and quinidine were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO USA). Quetiapine was purchased from LGC Standards® (Teddington, UK).

Cell culture and treatment. Progenitor HepaRG cells were cultured as previously described [20]. Briefly, HepaRG cells were seeded at a density of 10^5 cells/well in 96-well plates in a culture medium (William's E medium (1X) (A12176-01, Gibco) supplemented with 10 % FBS, 50 U/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin, 5 µg/mL insulin, 2 mM glutamine, 50 µM sodium hydrocortisone hemisuccinate and 2 % DMSO). After 2 weeks, cells were cultured during two more weeks in the same medium supplemented with 2 % DMSO. After 4 weeks, the cultures are differentiated in both cholangiocyte- and hepatocyte like cells [17]. The detection of quetiapine and its metabolites was performed using this coculture model. pHH were obtained from the processing of biological samples through the Centre de Ressources Biologiques (CRB) Santé of Rennes BB-0033-00,056 under French legal guidelines and fulfilled the requirements of the institutional ethics committee. Cells were isolated by collagenase-perfusion of liver biopsies from adult donors [43] and these cells were plated in 96-well plate at a density of $1.5x10^5$ /cm^2 and cultured in the same William's E medium than HepaRG cells supplemented with 2% of DMSO. Cells were cultivated 4 days after plating prior to compounds exposure.

Differentiated HepaRG cells and pHH were incubated with 100 µL of quetiapine (13 µM) during H0, H3, H6, H8 and H24 with or without CYP inhibitors during all the treatment time. Ketoconazole (10 µM) and quinidine (10 µM) were chosen in order to inhibit CYP3A4 and CYP2D6, respectively.

Samples extraction. *In vitro* samples (25 µL) and *in vivo* blood samples (200 µL) obtained from one patient at the Toxicology Laboratory of Rennes University Hospital were extracted as already described [13,14]. Briefly, samples were supplemented with 500 µL of methanol containing internal standard (risperidone-D4) and then extracted with 300 µL of 0.1 M zinc sulfate solution. After supernatant evaporation, the residue was dissolved in 200 µL of LC-MS grade water and transferred into chromatographic vials for LC-HR-MS analysis and quantification. In order to extract and analyze samples using non-targeted screening, 25 µL of each sample were supplemented with 75 µL of methanol. The supernatant (50 µL) was then diluted with LC-MS grade water (50 µL) and transferred into chromatographic vials for LC-HR-MS analysis.

LC-MS settings. Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analyses were carried out using Orbitrap Q Exactive™ mass spectrometer coupled to an UltiMate 3000 pump (Thermo Scientific, San Jose, CA). A heated electrospray ionization source (HESI-II) was used for the ionization of the target compounds. Data acquisition, calibration and instrument control were performed using Xcalibur ® 2.1 (Thermo Scientific) software. Samples were maintained at 15 °C in the autosampler and quality controls were injected before each analysis.

Quetiapine quantitation assays were performed using a validated LC-HRMS method as already used [13] as follow: The mobile phases were composed of ammonium formiate at 10 mM and formic acid 0.1% in water (phase A) and acetonitrile and formic acid 0.1% phase B). LC was performed on a on a Hypersil Gold column (5 mm x 2.1 mm, 3 µm) (Thermo Scientific, San Jose, CA).

Gradient elution was as follow : initial conditions of 95:5 (A:B) maintained for 1.5 min, increasing to 70:30 (A:B) for 3.5 min, increasing to 60:40 (A:B) for 3 min, increasing to 5:95 (A:B) for 1 min, followed by a 1 min plateau with 5:95 (A:B), decreasing to 95:5 (A:B) for 3 min, and return to initial conditions 95:5 (A:B) for equilibration for 3 min. This corresponded to a total chromatographic run of 15 min. The flow rate was 500 µL/min, the column temperature was maintained at 25 °C, the injection volume was 5 µL. For mass spectrometry, the instrument operated in ESI positive mode, the range for acquisition was 120-700 *m/z*.

Full scan data were acquired at a resolution of 140.000 FWHM, with an AGC target of 1e6 and a maximum injection time of 200 ms. Source parameters were as follows: source voltage + 4.5 kV, sheath gas flow 35 units, auxiliary gas flow 15 units, capillary temperature 300 °C, S-Lens RF level 50 units.

Non-targeted screening LC-HRMS/MS method used for molecular networking building was as follow: The mobile phases were composed of ammonium formiate at 2 mM and formic acid 0.1% in water (phase A) and ammonium formiate at 2 mM and formic acid 0.1% in methanol and acetonitrile (50/50) (phase B). LC was performed on a Accucore Phenyl Hexyl (100 x 2.1 mm, 2.6 µm) (Thermo Scientific, San Jose, CA) using the following gradient elution: initial conditions of 99:1 (A:B) maintained for 1 min, increasing to 1:99 (A:B) for 9 min, followed by a 1.5 min plateau with 1:99 (A:B) and return to initial conditions 99:1 (A:B) for equilibration. This corresponded to a total chromatographic run of 15 min. The flow rate was 500 µL/min, the column temperature was maintained at 40 °C, the injection volume was 10 µL. For mass spectrometry, the instrument operated alternately in ESI positive and negative mode in the same run, the range for acquisition was, respectively, 70–1000 m/z in positive mode and negative mode. Ion precursor selection was performed in the data dependent mode of operation where the most intense ion from the previous scan was selected for fragmentation. Full scan (MS1) data were acquired for each ionization mode at a resolution of 35,000 FWHM, with an AGC target of 1e6 and a maximum injection time of 120 ms. Source parameters were as follows: source voltage + 3.0 and − 4.0 kV, sheath gas flow 60 units, auxiliary gas flow 10 units, capillary temperature 320 °C, S-Lens RF level 60 units. MS/MS (MS2) data were acquired at a resolution of 17,500 FWHM with an AGC target of 1e5, maximum injection time was 50 ms, a TopN of 5 in positive mode and 2 in negative mode, an isolation window of 2.0 m/z. The normalized collision energy (NCE) was stepped at 17.5, 35 and 52.5, and the dynamic exclusion time set at 3 s.

Molecular networking generation. Spectral data allowed us to generate MN using semi-quantitative bioinformatics approach. Data acquisition, processing (*i.e.* MS data conversion, preprocessing, MS1 annotation, and generation of molecular networks), visualization and network analysis have been described in detail elsewhere [9]. Briefly, raw data were converted to an open MS format (.mzXML) with ProteoWizard's MSConvert module [44].

The mzXML files were then preprocessed (deconvolution, de-isotoping, alignment, gap-filling) with MZmine 2 software [45]. The single .mgf output file was then loaded on the Global Natural Products Social networking (GNPS) web-based platform in order to generate the multimatrix molecular network [8]. To the use of high resolution data, the basic parameters were modified to *m/z* 0.02 for the mass tolerance of precursor and fragment ions used for MS/MS spectral library searching, and *m/z* 0.02 for the mass tolerance of fragment ions used for molecular networking. The minimum cluster size was set to 1. In addition, links between nodes were created when the cosine score was greater than 0.70, and the minimum number of common fragment ions shared by two MS/MS spectra was 6. Links between two nodes were only kept in the network if each node was in the top 10 most similar nodes. Full data processed through the GNPS platform are accessible through these links:

- https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=028beffa249c495dbe8c9c94dfbc3e49 (Figure 1: in vitro quetiapine metabolism kinetic);
- https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=cfabffd4f1cf4fbb8571bb039040ab75 (Figure 4: *In vitro* quetiapine metabolism pathway inhibition in differentiated HepaRG cells);
- https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=dfe75ac4273d49b69b832bbe3c2c5ef5 (Figure 5: *In vitro* versus *in vivo* quetiapine metabolism);
- https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=8f00f95fd3ca4ea99fc6477ba1a55caf (Supplementary Figure 1 : *In vitro* quetiapine metabolism pathway inhibition in pHH)

The molecular network was visualized using Cytoscape 3.5.1 software [46]. The nodes were annotated by comparison with reference standards, by spectral matching with the curated GNPS, mzCloud online mass spectral libraries and information propagation [47].

Conflict of Interest Statement

The authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors thank the University of Rennes, Inserm and ANSM (PREVITOX network) for their financial supports.

REFERENCES

1. Cross, A. J. *et al.* Quetiapine and its metabolite norquetiapine: translation from *in vitro* pharmacology to *in vivo* efficacy in rodent models: Translational pharmacology of quetiapine. *Br. J. Pharmacol.* **173**, 155–166 (2016).
2. Nemeroff, C. B., Kinkead, B. & Goldstein, J. Quetiapine: preclinical studies, pharmacokinetics, drug interactions, and dosing. *J. Clin. Psychiatry* **63 Suppl 13**, 5–11 (2002).
3. Bakken, G. V., Molden, E., Knutsen, K., Lunder, N. & Hermann, M. Metabolism of the Active Metabolite of Quetiapine, *N* -Desalkylquetiapine In Vitro. *Drug Metab. Dispos.* **40**, 1778–1784 (2012).
4. Beloti, L., Miranda, L. & Queiroz, M. Butyl Methacrylate-Co-Ethylene Glycol Dimethacrylate Monolith for Online in-Tube SPME-UHPLC-MS/MS to Determine Chlopromazine, Clozapine, Quetiapine, Olanzapine, and Their Metabolites in Plasma Samples. *Molecules* **24**, 310 (2019).
5. DeVane, C. L. & Nemeroff, C. B. Clinical Pharmacokinetics of Quetiapine: An Atypical Antipsychotic. *Clin. Pharmacokinet.* **40**, 509–522 (2001).
6. Fisher, D. S., Handley, S. A., Taylor, D. & Flanagan, R. J. Measurement of quetiapine and four quetiapine metabolites in human plasma by LC-MS/MS: Measurement of quetiapine and four metabolites by LC-MS/MS. *Biomed. Chromatogr.* **26**, 1125–1132 (2012).
7. Fisher, D. S., Handley, S. A., Flanagan, R. J. & Taylor, D. M. Plasma Concentrations of Quetiapine, N-Desalkylquetiapine, O-Desalkylquetiapine, 7-Hydroxyquetiapine, and Quetiapine Sulfoxide in Relation to Quetiapine Dose, Formulation, and Other Factors: *Ther. Drug Monit.* 1 (2012) doi:10.1097/FTD.0b013e3182603f62.
8. Wang, M. *et al.* Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat. Biotechnol.* **34**, 828–837 (2016).
9. Allard, S., Allard, P.-M., Morel, I. & Gicquel, T. Application of a molecular networking approach for clinical and forensic toxicology exemplified in three cases involving 3-MeO-PCP, doxylamine, and chlormequat. *Drug Test. Anal.* (2018) doi:10.1002/dta.2550.
10. Zhou, S. *et al.* Identification of chemotypes in bitter melon by metabolomics: a plant with potential benefit for management of diabetes in traditional Chinese medicine. *Metabolomics* **15**, (2019).
11. Allard, P.-M., Genta-Jouve, G. & Wolfender, J.-L. Deep metabolome annotation in natural products research: towards a virtuous cycle in metabolite identification. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **36**, 40–49 (2017).
12. Allard, P.-M. *et al.* Integration of Molecular Networking and *In-Silico* MS/MS Fragmentation for Natural Products Dereplication. *Anal. Chem.* **88**, 3317–3323 (2016).
13. Le Daré, B. *et al.* A case of fatal acebutolol poisoning: an illustration of the potential of molecular networking. *Int. J. Legal Med.* (2019) doi:10.1007/s00414-019-02062-9.

14. Allard, S., Le Daré, B., Allard, P.-M., Morel, I. & Gicquel, T. Comparative molecular networking analysis of a Rauwolfia plant powder and biological matrices in a fatal ingestion case. *Forensic Toxicol.* (2020) doi:10.1007/s11419-020-00531-0.

15. Guo, L. *et al.* Similarities and Differences in the Expression of Drug Metabolizing Enzymes between Human Hepatic Cell Lines and Primary Human Hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* (2010) doi:10.1124/dmd.110.035873.

16. Andersson, T. B., Kanebratt, K. P. & Kenna, J. G. The HepaRG cell line: a unique in vitro tool for understanding drug metabolism and toxicology in human. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **8**, 909–920 (2012).

17. Cerec, V. *et al.* Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor. *Hepatology* **45**, 957–967 (2007).

18. Hart, S. N. *et al.* A Comparison of Whole Genome Gene Expression Profiles of HepaRG Cells and HepG2 Cells to Primary Human Hepatocytes and Human Liver Tissues. *Drug Metab. Dispos.* **38**, 988–994 (2010).

19. Hugbart, C. *et al.* Non-oxidative ethanol metabolism in human hepatic cells in vitro: Involvement of uridine diphospho-glucuronosyltransferase 1A9 in ethylglucuronide production. *Toxicol. In Vitro* **66**, 104842 (2020).

20. Aninat, C. *et al.* Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **34**, 75–83 (2006).

21. Quesnot, N. *et al.* Production of chlorzoxazone glucuronides via cytochrome P4502E1 dependent and independent pathways in human hepatocytes. *Arch. Toxicol.* **92**, 3077–3091 (2018).

22. Manier, S. K., Wagmann, L., Flockerzi, V. & Meyer, M. R. Toxicometabolomics of the new psychoactive substances α-PBP and α-PEP studied in HepaRG cell incubates by means of untargeted metabolomics revealed unexpected amino acid adducts. *Arch. Toxicol.* (2020) doi:10.1007/s00204-020-02742-1.

23. Richeval, C. *et al.* In vitro Characterization of NPS Metabolites Produced by Human Liver Microsomes and the HepaRG Cell Line Using Liquid Chromatographyhigh Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS) Analysis: Application to Furanyl Fentanyl. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **18**, 806–814 (2018).

24. Dührkop, K. *et al.* SIRIUS 4: a rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information. *Nat. Methods* **16**, 299–302 (2019).

25. Wrighton, S. A., VandenBranden, M. & Ring, B. J. The human drug metabolizing cytochromes P450. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **24**, 461–473 (1996).

26. *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. (Springer International Publishing, 2015). doi:10.1007/978-3-319-12108-6.

27. Jackson, J. P., Li, L., Chamberlain, E. D., Wang, H. & Ferguson, S. S. Contextualizing Hepatocyte Functionality of Cryopreserved HepaRG Cell Cultures. *Drug Metab. Dispos.* **44**, 1463–1479 (2016).

28. Greenblatt, D. J. *et al.* Mechanism of cytochrome P450-3A inhibition by ketoconazole: Ketoconazole inhibition of CYP3A. *J. Pharm. Pharmacol.* **63**, 214–221 (2011).

29. Niwa, T., Imagawa, Y. & Yamazaki, H. Drug Interactions between Nine Antifungal Agents and Drugs Metabolized by Human Cytochromes P450. *Curr. Drug Metab.* **15**, 651–679 (2015).

30. Venkatakrishnan, K., von Moltke, L. L. & Greenblatt, D. J. Effects of the Antifungal Agents on Oxidative Drug Metabolism: Clinical Relevance. *Clin. Pharmacokinet.* **38**, 111–180 (2000).

31. Zhao, P. *et al.* Quantitative Evaluation of Pharmacokinetic Inhibition of CYP3A Substrates by Ketoconazole: A Simulation Study. *J. Clin. Pharmacol.* **49**, 351–359 (2009).

32. Abe, S. *et al.* Modification of single-nucleotide polymorphism in a fully humanized CYP3A mouse by genome editing technology. *Sci. Rep.* **7**, 15189 (2017).

33. Allqvist, A., Miura, J., Bertilsson, L. & Mirghani, R. A. Inhibition of CYP3A4 and CYP3A5 catalyzed metabolism of alprazolam and quinine by ketoconazole as racemate and four different enantiomers. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **63**, 173–179 (2007).

34. Tseng, E. *et al.* Relative Contributions of Cytochrome CYP3A4 Versus CYP3A5 for CYP3A-Cleared Drugs Assessed In Vitro Using a CYP3A4-Selective Inactivator (CYP3cide). *Drug Metab. Dispos.* **42**, 1163–1173 (2014).

35. Ferron, P.-J., Hogeveen, K., Dubreuil, E., Fessard, V. & Le Hegarat, L. Modulation of CYP3A4 activity alters the cytotoxicity of lipophilic phycotoxins in human hepatic HepaRG cells To be published in: Toxicology in Vitro. *Toxicology in Vitro* (2016).

36. Guengerich, F. P., Miller, G. P., Hanna, I. H., Sato, H. & Martin, M. V. Oxidation of Methoxyphenethylamines by Cytochrome P450 2D6: analysis of rate-limiting steps. *J. Biol. Chem.* **277**, 33711–33719 (2002).

37. Guengerich, F. P., Müller-Enoch, D. & Blair, I. A. Oxidation of quinidine by human liver cytochrome P-450. *Mol. Pharmacol.* **30**, 287–295 (1986).

38. Otton, S. V., Brinn, R. U. & Gram, L. F. In vitro evidence against the oxidation of quinidine by the sparteine/debrisoquine monooxygenase of human liver. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **16**, 15–17 (1988).

39. McLaughlin, L. A. *et al.* Why Is Quinidine an Inhibitor of Cytochrome P450 2D6?: the role of key active-site residues in quinidine binding. *J. Biol. Chem.* **280**, 38617–38624 (2005).

40. Yokoyama, Y. *et al.* Comparison of Drug Metabolism and Its Related Hepatotoxic Effects in HepaRG, Cryopreserved Human Hepatocytes, and HepG2 Cell Cultures. *Biol. Pharm. Bull.* **41**, 722–732 (2018).

41. Le Guillou, D. *et al.* Drug-Induced Alterations of Mitochondrial DNA Homeostasis in Steatotic and Nonsteatotic HepaRG Cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **365**, 711–726 (2018).

42. Broutier, L. *et al.* Culture and establishment of self-renewing human and mouse adult liver and pancreas 3D organoids and their genetic manipulation. *Nat. Protoc.* **11**, 1724–1743 (2016).

43. Guguen-Guillouzo, C. *et al.* High yield preparation of isolated human adult hepatocytes by enzymatic perfusion of the liver. *Cell Biol. Int. Rep.* **6**, 625–628 (1982).

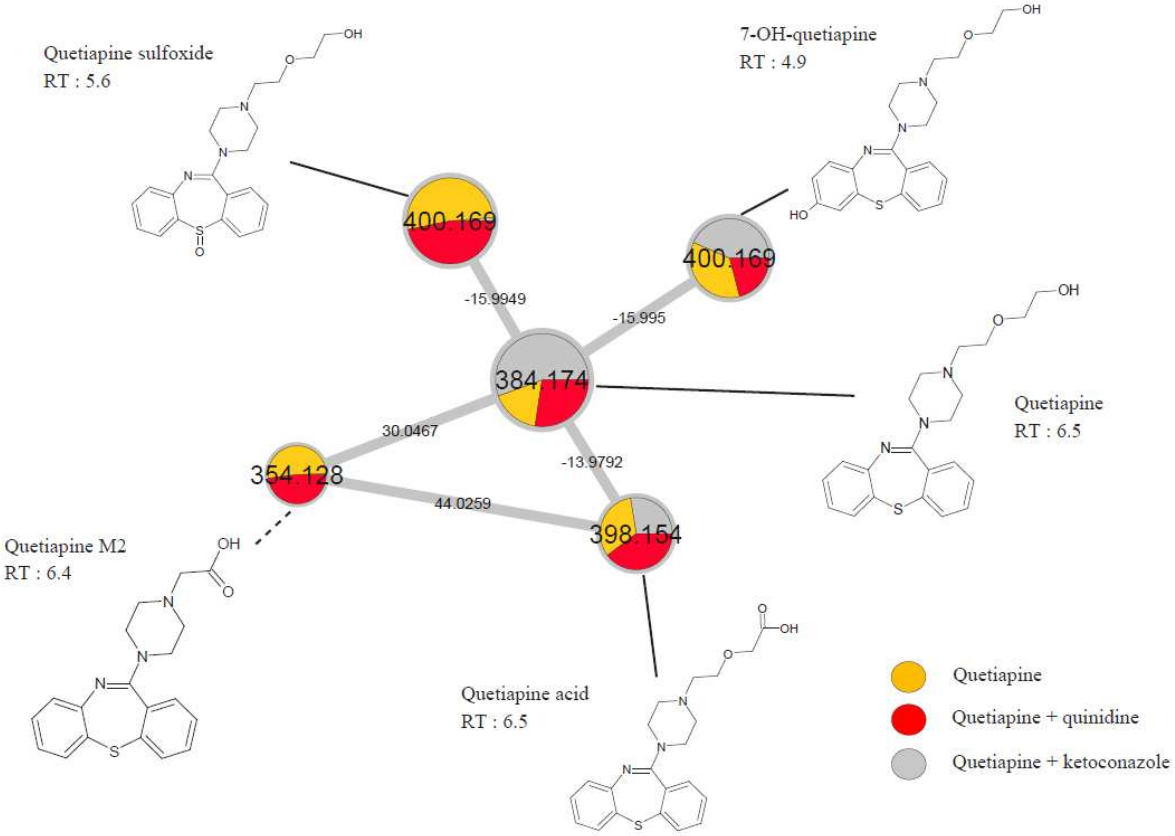
44. Kessner, D., Chambers, M., Burke, R., Agus, D. & Mallick, P. ProteoWizard: open source software for rapid proteomics tools development. *Bioinformatics* **24**, 2534–2536 (2008).

45. Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A. & Orešič, M. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics* **11**, (2010).

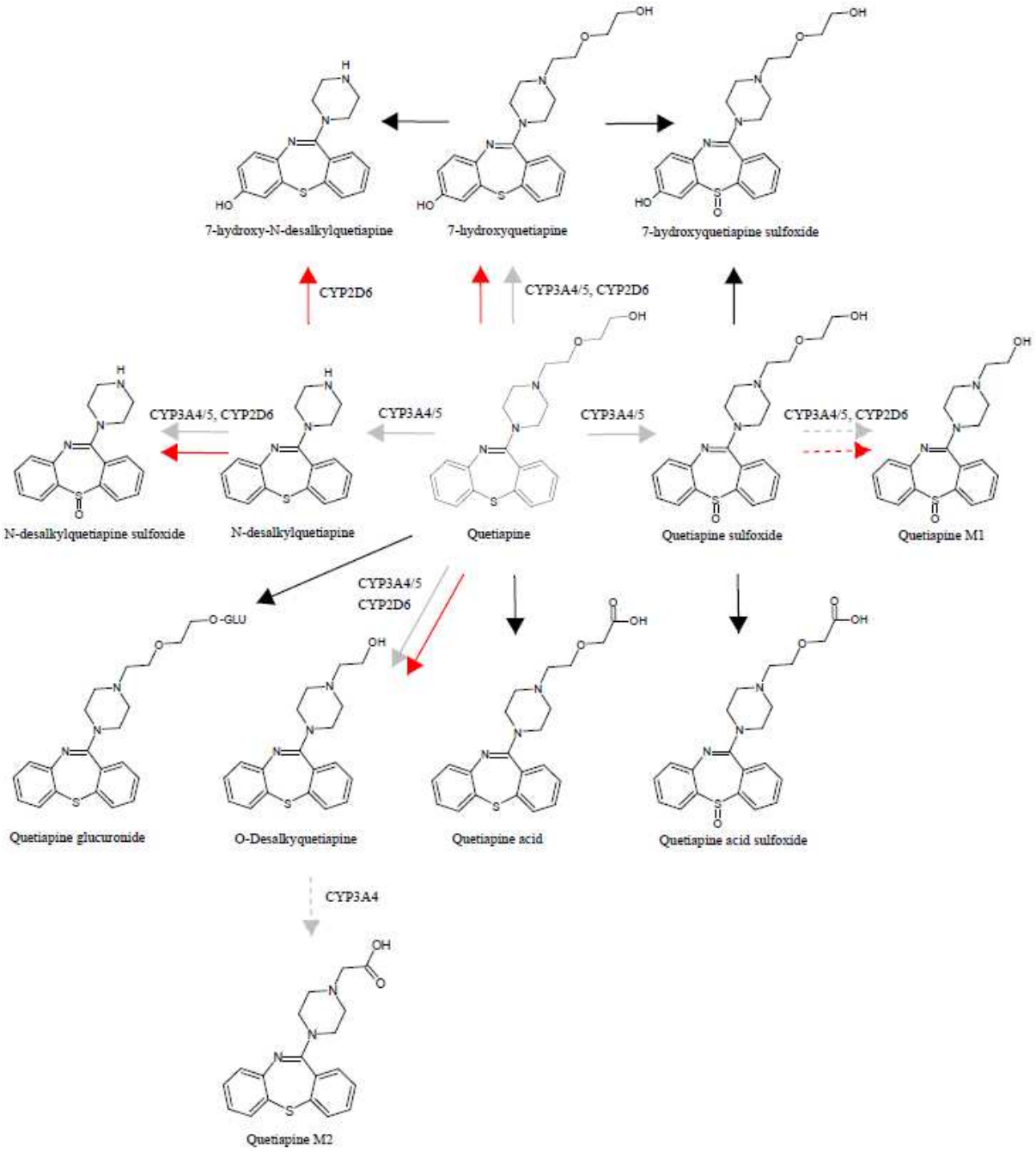
46. Shannon, P. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res.* **13**, 2498–2504 (2003).

47. HighChem LLC. mzCloud - Advanced Mass Spectral Database. https://www.mzcloud.org/ (2019).

SUPLLEMENTARY DATA



Supplementary Figure 1: Extinction of CYP3A4/5 and CYP2D6 metabolic pathway in primary Human hepatocytes (pHH) using molecular networking. pHH were incubated with quetiapine (13 µM) during H24 with or without cytochrome inhibitors. Ketoconazole (10 µM) is used as a CYP3A4/5 inhibitor and quinidine (10µM) is used as a CYP2D6 inhibitor. Each experimental condition is depicted in a specific color: quetiapine in white, quetiapine + quinidine in red, quetiapine + ketoconazole in grey and quetiapine + quinidine + ketoconazole in green. Nodes are labelled with the exact protonated mass (*m/z*), chemical structures and the links are labelled with the exact mass shift.



Supplementary Figure 2: Quetiapine metabolism overview. New putative identified metabolites are shown with a dash line. Metabolites for which metabolism involve CYP3A4/5 or CYP2D6 are shown with grey and red arrow, respectively.

Supplementary Table 1: Exact mass shift differences corresponding to biotransformations reactions

Biotransformation	**Corresponding formula**	**Exact mass shift (Da)**
Oxidation + Dehydrogenation	+ H2 -O	13.970
Oxidation	+ O	15.994
Deacetylation + Dehydrogenation	- C2H4O	44.026
Acetylation + oxidation	+ C2H2O2	58.005
Glucuronidation	+ C6H8O6	176.032

Supplementary Table 2 Putative identified compounds or metabolites contained in the molecular network.

t_R (min)	Observed *m/z* $[M+H^+]$	Theorical *m/z* $[M+H^+]$	Molecular formula	Δ exact mass error	ESI-HRMS² data (*m/z*)	Putative compound identification	CYP involved in compound production and/or metabolism
4,4	312,1168	312.1170	C17H17N3SO	0.0002	70.07; 84.96; 89.06; 103.04; 226.03; 243.06; 269.07; 297.15	7-hydroxy-N-desalkylquetiapine	-
4,9	400,1691	400.1695	C21H25N3O3S	0.0004	70.07; 96.08; 158.12; 208.10; 226.03; 237.10; 263.12; 269.07; 295.09	7-hydroxyquetiapine	CYP3A4/5
5,5	356,1428	356.1432	C19H21N3O2S	0.0004	90.98; 103.04; 114.09; 221.11; 247.12; 269.07; 308.18	Quetiapine M1	CYP3A4/5, CYP2D6
5,5	312,1162	312.1170	C17H17N3SO	0.0008	70.07; 195.09; 221.11; 247.12; 264.15	N-desalkylquetiapine sulfoxide	CYP3A4/5, CYP2D6
5,6	400,1690	400.1695	C21H25N3O3S	0.0005	68.05; 70.07; 158.12; 196.08; 221.11; 247.12; 269.07; 352.20;	Quetiapine sulfoxide	CYP3A4/5
6,0	560,2066	560.2066	C27H33N3O8S	0.0000	70.07; 96.08; 132.10; 158.12; 210.04; 221.11; 247.12; 253.08; 279.10; 384.17	Quetiapine glucuronide	None
6,3	296,1217	296.1221	C17H17N3S	0.0004	70.07; 210.04; 221.11; 227.06; 253.08; 279.10	N-desalkyquetiapine (norquetiapine)	CYP3A4/5
6,4	340,1478	340.1483	C19H21N3O1S	0.0005	88.08; 114.09; 210.04; 221.11; 247.12; 253.08; 279.10	O-desalkyquetiapine	CYP3A4/5, CYP2D6
6,4	354,1273	354.1276	C19H19N3O2S	0.0003	59.05; 84.08; 210.04; 221.11; 247.12; 253.08; 279.10	Quetiapine M2	CYP3A4/5
6,4	384,1741	384.1745	C21H25N3O2S	0.0004	59.05; 73.03; 158.12; 210.04; 221.11; 247.12; 253.08; 279.10	Quetiapine	CYP3A4/5, CYP2D6
6,5	398,1534	398.1538	C21H23N3O3S	0.0004	70.07; 103.04; 146.08; 172.10; 210.04; 221.11; 247.12; 253.08; 279.10	Quetiapine acid	?

D. Résultats complémentaires

Initialement développé dans le domaine des substances naturelles, le réseau moléculaire, *via* la plateforme GNPS, dispose de riches bibliothèques d'identification de ces composés. En vue d'une application à l'étude du métabolisme des amanitines, nous avons souhaité réaliser une preuve de concept de l'intérêt du réseau moléculaire dans l'étude du métabolisme des substances naturelles. Dans ce contexte, nous avons réexaminé un cas d'intoxication fatal à une poudre inconnue, étiquetée *Tabernanthe iboga*, survenue au laboratoire de Toxicologie et médico-légale du CHU de Rennes.

La poudre inconnue suspectée ingérée, une poudre témoin de racine de *Tabernanthe iboga* et des échantillons biologiques prélevés en post-mortem (sang périphérique, et bile) ont été extraits et analysés selon une méthode de criblage par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (Q-Exactive®). L'analyse de ces quatre matrices par réseau moléculaire a révélé un cluster de nœuds composés d'alcaloïdes indolomonoterpéniques caractéristiques de la famille des *Apocynaceae* (ibogaine, ibogamine, ajmaline, reserpiline, yohimbine). L'analyse des annotations spectrales de la poudre inconnue suspectée ingérée ayant quant à elle montré une majorité d'entité chimiques rattachés au genre *Rauwolfia*, qui diffère de la poudre témoin de *Tabernanthe iboga*. L'utilisation du réseau moléculaire nous a ainsi permis d'écarter l'hypothèse d'identification de *Tabernanthe iboga* et de suggérer une espèce alternative de la famille des *Apocynaceae*, appartenant de manière probable au genre *Rauwolfia*.

Egalement, ces résultats ont permis de mettre en évidence un métabolisme *in vivo* de ces substances d'origine naturelle. La Figure 31 montre le métabolisme de la réserpiline (*m/z* 412.19982), tout d'abord en demethylreserpiline (*m/z* 398.18417) puis en demethylreserpiline glucuronide (*m/z* 574.21626), demethylreserpiline sulfate (*m/z* 478.14099) et hydroxy-demethylreserpiline (*m/z* 414.17909). Ici, les différences de masse entre les composés, correspondants à des réactions de biotransformations connues, ainsi que l'analyse des spectres de masse, ont permis l'identification des composés. De manière cohérente, ces différentes substances ont été retrouvées dans la bile, matrice connue pour concentrer les métabolites (Vanbinst et al. 2002).

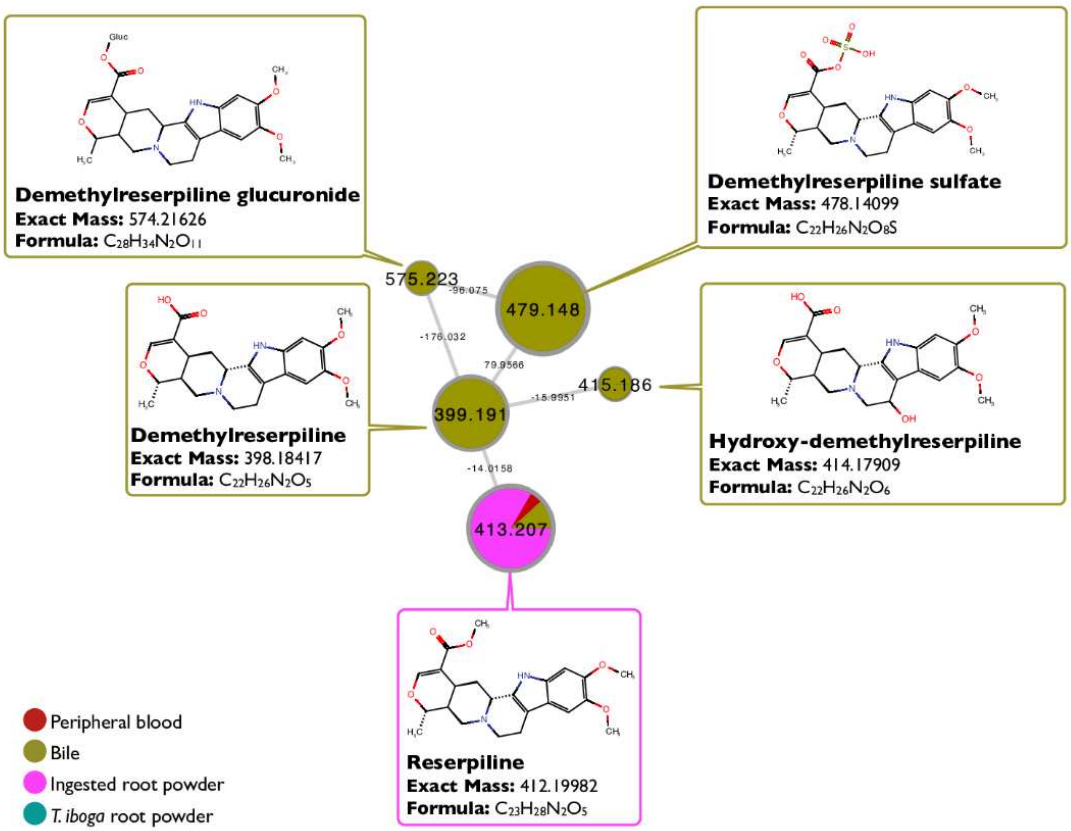


Figure 31 : Visualisation du métabolisme *in vivo* de la réserpiline par réseau moléculaire.

La partie expérimentale de ce travail a été acceptée pour publication dans le journal *Forensic Toxicology* et est présentée en Annexe 4: " Comparative molecular networking analysis of a *Rauwolfia* plant powder and biological matrices in a fatal ingestion case ".

E. Conclusion

Ces différents travaux confirment l'intérêt certain du réseau moléculaire dans l'étude du métabolisme. En effet, les exemples *in vivo* et *in vitro* présentés dans ce chapitre ont montré la possibilité de découverte de nouveaux métabolites, visualiser des cinétiques métaboliques, décortiquer les voies métaboliques, et évaluer la pertinence d'un modèle de métabolisation *in vitro*. Par ailleurs, la comparaison d'échantillons à l'aide de cet outil bio-informatique permet de visualiser la répartition de ces différentes substances au sein de l'organisme.

Enfin, il ressort de ces expérimentations la possibilité d'étudier le métabolisme de substances naturelles, particulièrement intéressant en vue du chapitre 3, qui a pour but d'étudier le métabolisme et la toxicité des amanitines.

Chapitre 3 :

Etude du métabolisme et de la toxicité des amanitines

A. Contexte scientifique

En 2017, 1386 cas d'intoxications aux champignons ont été rapportés dans le système d'information des centres anti-poisons français. Parmi ces derniers, le syndrome phalloïdien constitue le syndrome le plus mortel, et est majoritairement causé par le genre *Amanita* (Vetter 1998; Broussard 2001). Parmi les nombreuses toxines présentent au sein de ces espèces, on attribue la toxicité de ce syndrome à l'α- et la β-amanitine. Bien que le principal mécanisme hépatotoxique des amanitines soit attribué à l'inhibition de l'ARN polymérase de type II (ARNPII), il semble que la génération de stress oxydant soit également largement contributive dans le développement de ces hépatotoxicités sévères (Cf partie II.B.4.b.).

Aujourd'hui, le principal antidote utilisé en pratique clinique reste la silymarin (Legalon®), capable d'augmenter l'expression des systèmes antioxydants de l'organisme comme la SOD et d'inhiber le transporteur d'entrée des amanitines, l'OATP1B3. Cependant, l'utilisation de cet antidote reste associée à une mortalité d'environ 10%, témoignant du manque de thérapeutiques efficaces (Wellington et Jarvis 2001).

Actuellement, l'étude des mécanismes toxiques des amanitines constitue l'approche la plus prometteuse dans le but de proposer des thérapeutiques efficaces futures. Les données de la littérature sont peu claires quant à l'intervention d'un métabolisme dans la toxicité de ces substances. Dans ce contexte, nous avons souhaité développer un modèle d'hépatocytes permettant l'étude du métabolisme et de la toxicité des amanitines, notamment afin d'y appliquer l'outil de réseau moléculaire.

B.4ème étude : étude du métabolisme et de la toxicité des amanitines

1. Matériels et méthodes

a) Réactifs

Le tampon phosphate salin (PBS), le milieu Williams E, la solution saline équilibrée de Han (HBSS), la pénicilline-streptomycine, et la L-glutamine ont été obtenus chez Life Technologies (Eugene, OR, USA). Le sérum de veau fœtal (FCS) a été obtenu chez Hyclone (Logan, UT, USA). L'insuline, l'hydrocortisone, l'α- et la β-amanitine, l'acide formique et l'acétate d'ammonium ont été obtenus chez Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Le kit de dosage d'ATP a été obtenu chez Abcam (Cambridge, MA, USA). La sonde de détection d'ion superoxide MitoSOX a été obtenue chez ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA). La virginiamycine, utilisé comme étalon interne (EI), a été obtenu chez Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX). Le méthanol, l'acétonitrile et l'eau ont été obtenues chez Fisher Scientific UK (Loughborough, Leicestershire, UK). L'ammoniac a été obtenu chez Probalo (Paris, France). Tous les réactifs et solvants utilisés dans le cadre des dosages d'amanitine sont certifiés de qualité LC-MS.

b) Mise au point du dosage des amanitines par LC-MS/MS

a. Instruments de mesure

Les analyses ont été réalisées sur un spectromètre de masse Thermo Scientific Q Exactive™ (San Jose, USA) couplé à une pompe Accela (Thermo Scientific, San Jose, USA). Un électrospray HESI-II a été utilisé pour la ionisation des composés d'intérêt. L'acquisition des données, l'intégration des pics et la calibration ont été réalisés à l'aide du logiciel Xcalibur® 2.1 (ThermoScientific, San Jose, CA, USA).

b. Paramètres de chromatographie liquide

La séparation par chromatographie liquide a été réalisée sur une colonne Accucore C18 (100 mm x 2.1, 2.6 µm). L'éluant correspond à un mélange de solvant A (Acétate d'ammonium 10 mM, acide formique 0.1%) et de solvant B (Acétonitrile, acide formique 0.1%). La chromatographie dure 6 minutes à un débit constant de 500 µL/min suivant plusieurs gradients d'élution. Le gradient débute par un mélange constitué de 91% de solvant A – 9% de solvant B de 0 à 0,5 minutes puis évolue jusqu'à une composition de 95% de solvant B – 5% de solvant A de 0,5 à 1,5 minutes. Ce mélange est maintenu de 1,5 à 4 minutes, avant de finir par un mélange constitué de 91% de solvant A – 9% de solvant B de 4 à 6 minutes pour l'équilibrage. Tous les échantillons ont été gardé à 15°C dans l'autosampler jusqu'à injection de 20 µL dans la colonne thermostatée à 30°C du système LC-HR-MS (boucle partielle).

c. Paramètres MS

Les paramètres MS sont les suivants : HESI en mode positif, température du capillaire: 300 °C; voltage du spray: 3500 V; débit de sheath et gaz auxiliaire (azote): 40 psi et 10 (unité arbitraire), respectivement. Les données ont été obtenues en mode ciblé SIM (Single Ion Monitoring). Les paramètres ont été optimises par infusion directe des molécules d'intérêt individuellement (α-amanitine et virginiamycine) à une concentration de 1 mg/L dans la phase mobile et injecté dans la sonde d'ionisation à un débit de 500 µL/min en mode ionisation positive. La résolution a été fixée à 140 000 FWHM et l'AGC Target était de $2e^5$. Le « Maximum injection time" était de 503 ms et l'isolation width de 4.0 m/z. Les valeurs mesurées des composés protonnés étaient de 919,3614 *m/z* et 867,4055 *m/z* pour l'α-amanitine et la virginiamycine, respectivement. En mode PRM, l'ion parent pourra être fragmenté en ions fils caractérisé par son rapport *m/z* par un flux d'argon avec une énergie de collisions normalisée à 50 eV pour l'α-amanitine et 30 eV pour la virginiamycine. Les transitions 919,3614 → 259,1287 *m/z* et 919,3614 → 339,1183 *m/z* ont été sélectionnées pour l'α-amanitine et la transition 867,4055 → 663,2773 *m/z* a été sélectionnée pour la virginiamycine. La quantification a été obtenue par extraction des masses exactes de chaque composé protonné, ainsi que de leurs fragments protonnés en utilisant une fenêtre de détection de 5 ppm.

d. Solutions standards

La solution mère d'α-amanitine, a été préparée dans de l'eau bidistillée (1.0 g/L) et stockée à -20°C. L'étalon interne a été préparé dans du méthanol (1.0 g/L) et stocké à -20°C.

e. Préparation des échantillons

Les échantillons d'urine de patients, de surnageants de culture et de lysats cellulaires (500 µL) ont été supplémentés avec 20 µL d'EI à 100 ng/mL (20 ng/mL de virginiamycine dans le vial final) et extraits par extraction en phase solide (SPE). Après dilution des échantillons dans 1 mL de tampon de dilution (acide formique 1% ; pH=2), sonication pendant 10 minutes et centrifugation 10 minutes à 4000 g, les surnageants ont été instillés sur une colonne C18 Bond Elut Agilent C18 (200 mg, 3mL) préalablement conditionnée avec 2 mL de méthanol, 2 mL d'eau distillée et 2 mL de solution tampon. Les colonnes ont ensuite été lavées avec 4 mL d'eau LC-MS après passage des échantillons. Les analytes ont ensuite été élués avec 3 mL de méthanol à 2% d'ammoniaque. Les surnageants ont ensuite été évaporés jusqu'à l'obtention d'un résidu sec sous un flux d'azote à 50°C. Les résidus ont été dissous dans 200 µL de phase mobile et transférés dans des vials pour l'analyse par LC-HR-MS/MS.

c) Cultures cellulaires et traitements

a. Cellules HepaRG

Les cellules HepaRG progéniteurs ont été cultivées comme précédemment décrit (Aninat et al. 2006). Brièvement, les cellules HepaRG ont été ensemencées à une densité de 2.6×10^4 cellules/cm^2 en plaque de 96 puits dans du milieu William's E supplémenté avec 10 % de Sérum de Veau Fœtal (SVF), 50 U/mL de pénicilline, 50 µg/mL de streptomycine, 5 µg/mL d'insuline, 2 mM de glutamine, et 50 µM d'hémisuccinate d'hydrocortisone. Après deux semaines, les cellules ont été cultivées pendant deux semaines supplémentaires dans le même milieu supplémenté avec 2 % de DMSO afin de provoquer la différenciation des hépatocytes et obtenir un fort niveau d'expression des fonctions hépatiques spécifiques. Après quatre semaines, les cultures obtenues sont différenciées en cholangiocytes et hépatocytes (Cerec et al. 2007).

b. Cellules parentales HepG2

Les cellules HepG2, obtenues chez l'*American Tissue Culture Collection* (ATCC, Los Altos, CA, USA) ont été ensemencées à une densité de $6.6x10^4$ cellules/cm^2 dans des plaques de 96 puits dans du milieu MEM Eagle supplémenté avec 10 % de SVF, 50 UI/mL de pénicilline, 50 µg/mL de streptomycine et 4 mM de L-glutamine. Les cellules ont été utilisées quatre jours après l'ensemencement.

c. Traitement des cellules

Les trois types cellulaires (HepaRG progéniteurs, HepaRG différenciés et HepG2) ont été incubés en présence d'amanitines à différentes concentrations dans le but de déterminer la concentration toxique pour 50 % des cellules (0,2 à 100 µM).

d) Viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire de nos différents modèles de cellules hépatiques a été évaluée à l'aide d'un kit de dosage d'ATP luminescent (Abcam, Cambridge, MA, USA). Brièvement, le milieu de culture a été enlevé après 24 h de traitement et les cellules ont été rincées avec 100 µL de PBS à température ambiante, avant de les incuber pendant 30 minutes avec 100 µL de milieu William's sans rouge de phénol. Le réactif ATP reconstitué selon les instructions du fabricant (100 µL) a été ajouté dans chaque puit.

Les plaques ont ensuite été agitées pendant trois minutes sur un agitateur orbital (300 rpm) à l'abri de la lumière puis laissées 10 minutes à reposer. Cent microlitres de chaque puit ont été transférés dans une plaque de 96 puits opaque afin de les lire au lecteur de microplaque (POLARstar Omega®, BMG labtech®, Ortenberg, Allemagne).

e) Mesure du stress oxydant

La sonde MitoSOX (ThermoFisher Scientific, MA, USA) a été utilisée pour mesurer la production des ROS mitochondriaux. Brièvement, après 24 h de traitement, les cellules ont été incubées avec 100 µL de sonde MitoSox (5 µM) pendant 30 minutes à 37°C et 5% CO2 à l'abri de la lumière. Le milieu de culture a ensuite été retiré et les cellules lavées une fois avec 100 µL de HBSS à température ambiante.

La fluorescence des plaques multi-puits a ensuite été lue à l'aide du lecteur de plaque (POLARstar Omega®, BMG labtech®, Ortenberg, Allemagne) et les données ont été analysées à l'aide du logiciel MARS (BMG labtech®, Ortenberg, Allemagne). Les résultats ont été normalisés à l'aide d'un dosage de protéines dans les puits respectifs (Pierce BCA protein assay Kit®, ThermoFisher Scientific®, Allemagne).

f) Analyses statistiques

Les données sont exprimées en moyenne ± écart type. Les différences intergroupes en fonction des traitements ont été analysées par un test "one-way analysis of variance » (ANOVA), avec un post test de Bonferroni pour les comparaisons de groupes. Toutes les analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel Prism (version 5.0, Logiciel GraphPad, La Jolla, CA, USA). Les seuils de significativité ont été fixés à $p < 0.05$.

2. Résultats

a) Choix du modèle cellulaire d'étude des amanitines

Afin de pouvoir étudier la toxicodynamie et le métabolisme des amanitines, nous avons tout d'abord souhaité développer un modèle cellulaire adéquat *in vitro*. Bien que les hépatocytes humains en culture primaire soient considérés comme la référence en termes de modèle cellulaire *in vitro*, ces cellules présentent une variabilité de leurs capacités métaboliques en fonction du donneur et se dédifférencient au cours du temps. Dans ce contexte, il est intéressant de trouver des alternatives.

Trois lignées cellulaires hépatiques (les HepaRG différenciés, les HepaRG progéniteurs ainsi que la lignée cellulaire HepG2) ont été incubées avec des concentrations croissantes d'α- et β-amanitine (0,2 à 100 µM) ou du milieu de culture seul pendant 24 h.

La lignée cellulaire d'HepaRG différenciés s'est révélé la plus pertinente dans l'étude de l'hépatotoxicité des amanitines, présentant une bonne stabilité dans le temps, le matériel enzymatique suffisant pour le métabolisme, et une bonne sensibilité à ces toxines, en comparaison des HepG2 et HepaRG progéniteurs. En effet, aucune diminution de la viabilité cellulaire n'a été observée avec les cellules HepG2 ; les HepaRG progéniteurs n'ayant présenté qu'une faible sensibilité à ces toxines (Figure 32).

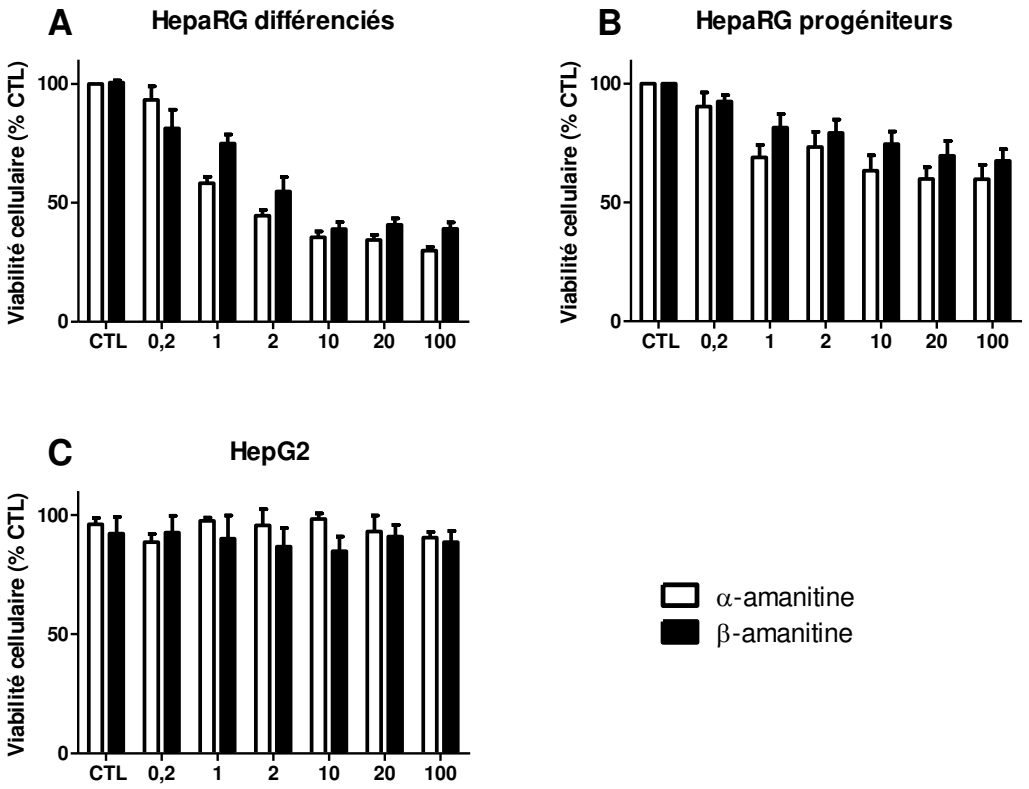


Figure 32 : Effet de l'α- et la β-amanitine sur la viabilité de différents modèles de cellules hépatiques. L'α-, la β-amanitine (0.2 à 100 µM) ou du milieu seul (CTL) ont été incubés pendant 24 h sur (A) des HepaRG différenciés, (B) des HepaRG progéniteurs et (C) des cellules HepG2 ensemencés à 100 000 cellules/puit en plaque de 96-puits. La viabilité cellulaire a été mesurée par dosage de l'ATP extracellulaire et exprimée en fonction de la valeur déterminée après traitement par milieu seul (arbitrairement fixée à 100 %). Les données sont exprimées en moyenne +/- écart type sur trois expérimentations réalisées en triplicat sur les modèles HepaRG (Différenciés et progéniteurs) et une expérimentation réalisée en triplicat pour les cellules HepG2.

La dose de 2 µM d'amanitine (α- et β-), permettant d'atteindre la concentration toxique pour environ 50 % des cellules HepaRG différenciés, a été choisie pour la poursuite des expérimentations (Figure 32).

b) Etude du métabolisme des amanitines

Suite au développement du réseau moléculaire dans l'étude du métabolisme de xénobiotiques, nous avons souhaité l'appliquer à l'étude du métabolisme des amanitines. Une première analyse *in vivo* a ainsi été appliquée à des prélèvements urinaires de patients intoxiqués, avant d'étudier le métabolisme de ces toxines *in vitro* sur notre modèle de cellules HepaRG différenciés.

a. Etude du métabolisme des amanitines *in vivo* par réseau moléculaire

La mise au point du dosage des amanitines par LC-MS/MS sur des échantillons de patients suspectés intoxiqués nous a permis de repérer des prélèvements urinaires positifs. Quatre échantillons ont ainsi été choisis, ayant des concentrations de 63 ng/mL (patient 1), 40 ng/mL (patient 2), 22 ng/mL (patient 3), et 20 ng/mL (patient 4). Ces échantillons urinaires extraits de patients intoxiqués ont ensuite été analysés par une méthode de screening pseudo-ciblée par LC-MS/MS, tel que décrit dans le matériels et méthodes du travail réalisé sur le métabolisme de la quétiapine (Article 3). L'application du réseau moléculaire nous a permis de visualiser un nœud isolé correspondant à l'α-amanitine, retrouvé chez les quatre patients. La présence de β-amanitine n'a cependant pas été détectée au sein de ce réseau moléculaire (Figure 33).

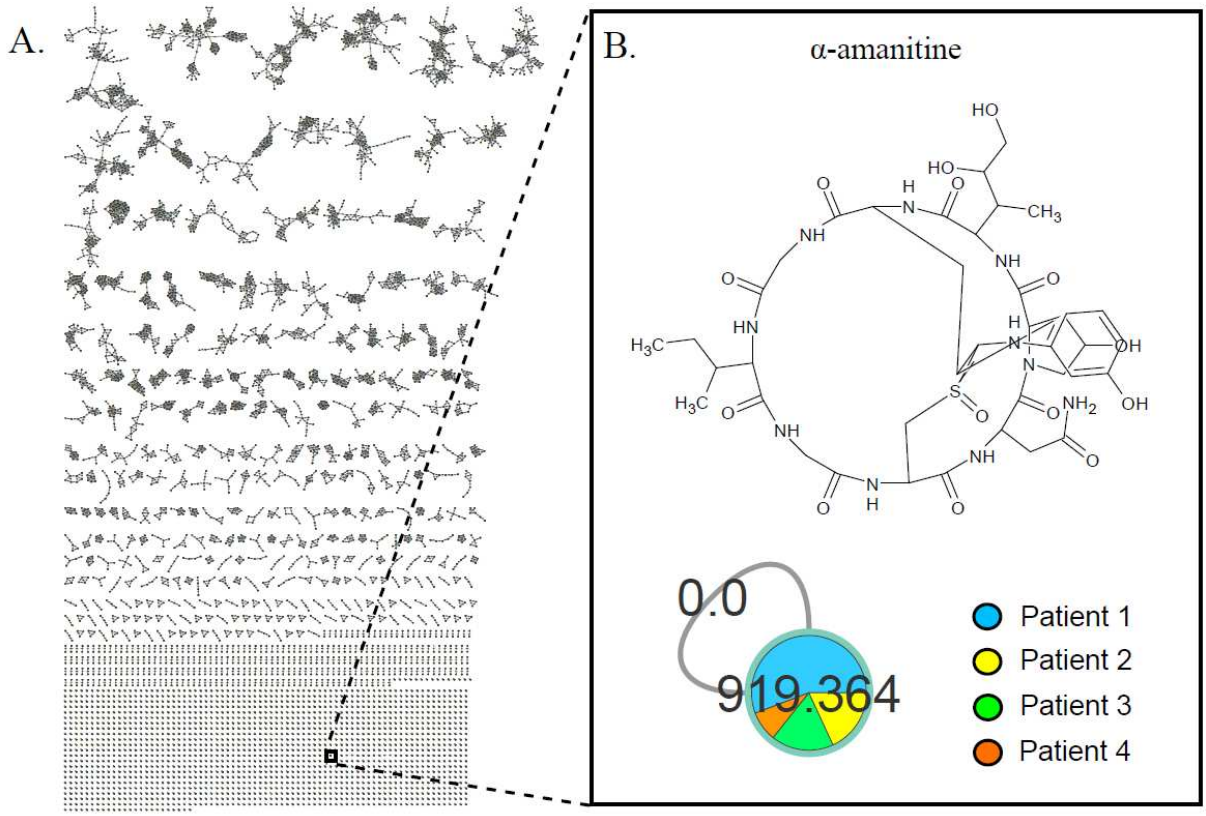


Figure 33 : Etude du métabolisme des amanitines *in vivo*. A) Réseau moléculaire multi-matrice permettant l'étude de la composition urinaire de quatre patients intoxiqués aux amanitines. B) Nœud isolé de l'α-amanitine.

Bien que l'absence de nœuds reliés à l'α-amanitine constitue ici un argument en faveur d'une absence de métabolites détectés lors de ces analyses, nous avons vérifié ces résultats dans le cadre d'une étude *in vitro*.

b. Etude du métabolisme des amanitines *in vitro* par réseau moléculaire

Afin d'étudier le métabolisme des amanitines *in vitro*, nous avons incubé de l'α-amanitine et de la β-amanitine à 2 µM pendant 24 h sur une culture cellulaire d'HepaRG différenciés ensemencés à une densité de 100 000 cellules/puit en plaque de 96-puits. Les surnageants ont été extraits et analysés selon une méthode de screening pseudo-ciblée par LC-MS/MS, tel que décrit dans le matériels et méthodes du travail réalisé sur le métabolisme de la quétiapine (Article 3).

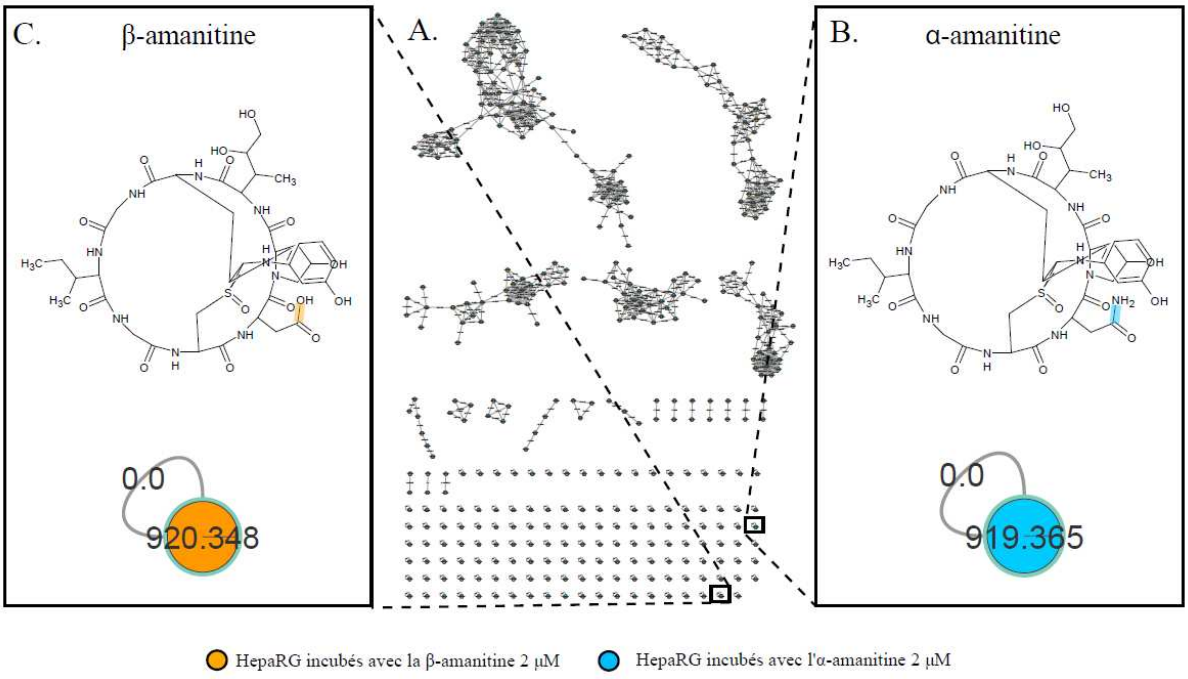


Figure 34 : Etude du métabolisme des amanitines *in vitro*. A) Réseau moléculaire multi-matrice permettant l'étude de la composition des surnageants de culture cellulaire d'HepaRG différenciés incubés avec de l'α- et de la β-amanitine à 2 µM pendant 24 h. B et C) Nœuds isolés de l'α-amanitine et la β-amanitine.

De manière cohérente avec les résultats retrouvés *in vivo*, notre analyse par réseau moléculaire n'a pas mis en évidence de molécules structurellement proche de l'α-amanitine, et susceptibles d'être des métabolites (Figure 34). Egalement, cette étude *in vitro* ne nous a

pas permis de visualiser de métabolites de la β-amanitine. De manière globale, nos résultats obtenus par réseau moléculaire *in vivo* et *in vitro* semblent apporter un niveau de preuve confortable permettant d'écarter l'hypothèse d'un métabolisme des amanitines. La toxicité de ces toxines peut ainsi être considérée comme indépendante du métabolisme.

c) Etude des mécanismes de toxicité des amanitines

Le stress oxydant étant considéré comme impliqué dans la toxicodynamique des amanitines, nous avons souhaité investigué l'effet de ces toxines à différentes concentrations sur le stress oxydant mitochondrial, à l'aide de la sonde MitoSox® (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Nos résultats montrent que les amanitines induisent un stress oxydant mitochondrial de manière dose-dépendante à partir de 2 µM pour l'α-amanitine et 20 µM pour la β-amanitine (Figure 35).

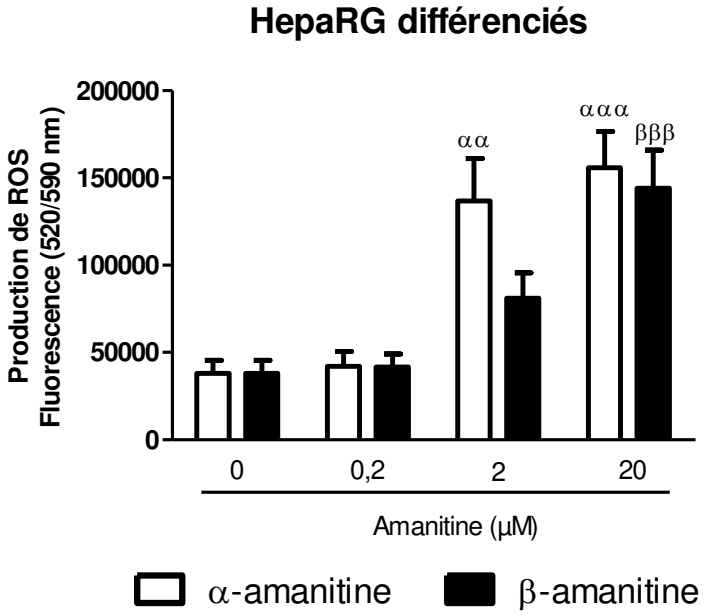


Figure 35 : Mesure des ROS mitochondriaux induits par les amanitines. L'α- ou la β-amanitine (0,2 à 20 µM) ou du milieu de culture seul ont été incubés sur des cellules HepaRG différenciés pendant 24 h à 37°C et 5% CO_2. Les espèces réactives de l'oxygène mitochondriales ont été mesurées 24 h après le traitement par amanitine à l'aide de la sonde MitoSox (5 µM). Les résultats sont exprimés en intensité de fluorescence ± écart type sur trois expérimentations indépendantes réalisées en triplicat et normalisés à l'aide d'un dosage de protéines. α α $p < 0,01$ α α α $p < 0,001$: condition α-amanitine comparée à la condition milieu seul. β β β $p < 0,001$: condition β-amanitine comparée à la condition milieu seul.

C. Conclusion

Dans cette étude, nous avons montré que les HepaRG différenciés constituent un bon modèle permettant l'étude de la toxicité des amanitines. Par ailleurs, l'utilisation du réseau moléculaire, réalisée sur des prélèvements *in vivo* et *in vitro*, nous a permis d'exclure l'implication d'un métabolisme des amanitines dans leur toxicité.

Bien que l'explication des mécanismes de toxicité des amanitines nécessitent de bien plus amples expérimentations, nous montrons également que l'induction d'un stress oxydant mitochondrial de manière dose-dépendante semble participer à leur toxicité.

DISCUSSION GENERALE

Le système immunitaire est un organe cible de toxicité, et l'immunotoxicologie a pour objectif d'en étudier les interférences avec les xénobiotiques. Du fait de sa position anatomique particulière, le foie est continuellement exposé à nombre de ces molécules. Par conséquent, il est le siège de mécanismes immunitaires complexes, au sein duquel l'immunité innée, en particulier les macrophages, joue un rôle prépondérant, orchestrant les premières étapes de la réponse immunitaire.

Dans une 1ère étude, nos résultats montrent que l'exposition prolongée des MdMs à l'éthanol favorise l'activation de l'inflammasome NLRP3 et la surexpression de la protéine P2X7R, tout deux connus comme étant impliquées dans la physiopathologie des alcoolopathies. Il est ainsi suggéré que l'éthanol amplifie l'activation de l'inflammation et les processus physiopathologiques par des mécanismes impliquant la surexpression des récepteurs purinergiques. Dans un environnement inflammatoire, la surexpression macrophagique de P2X7R induite par l'éthanol est susceptible de les sensibiliser aux signaux de danger agonistes des récepteurs purinergiques, tels que l'ATP. De manière intéressante, les données de la littérature obtenues *in vivo* semblent corroborer ces observations fondamentales.

A titre d'exemple, Su et al. (2019) ont montré dans le modèle murin C56BL/6 que l'administration d'A438079, un antagoniste des récepteurs P2X7, diminuait les lésions de stéato-hépatite induites par un régime d'alcoolisation chronique (Su et al. 2019). Par ailleurs, du fait de la stimulation de la sécrétion de la pro-IL-1β par le LPS, l'exposition du foie à ces toxines provenant du système porte rend ces observations particulièrement pertinentes dans le cas des alcoolopathies hépatiques.

D'un point de vue mécanistique, il pourrait être pertinent d'identifier le rôle de l'éthanol ou de son métabolite, l'acétaldéhyde, dans l'induction de l'expression du récepteur P2X7R. L'incubation des MdMs avec de l'acétaldéhyde, comme rapportée par Hoyt et al. dans la littérature, permettrait d'étudier son rôle propre dans la surexpression des récepteurs purinergiques (Hoyt et al. 2017). De manière similaire, l'effet de l'éthanol sur l'expression de P2X7R pourrait être étudié en présence d'un inhibiteur de l'ADH comme le fomépizole.

En résumé de ce chapitre, nous montrons que les xénobiotiques sont susceptibles de moduler les réponses inflammatoires des macrophages, en particulier en niveau hépatique. Ces mécanismes pourraient participer à la sévérité des atteintes, et constituer des cibles de futures thérapeutiques.

Au sein du chapitre 2, nous nous sommes intéressés au métabolisme des xénobiotiques, fréquemment impliqué dans leur toxicité. Du fait que les outils de visualisation permettant une exploration rapide du métabolisme sont encore peu étudiés, il semblait intéressant d'illustrer l'intérêt de l'outil de réseau moléculaire pour l'exploration du métabolisme des xénobiotiques. Des travaux *in vivo* et *vitro* ont ainsi été réalisés.

Dans une première partie de ce chapitre (2ème étude), nous avons rapporté un cas mortel d'intoxication médicamenteuse volontaire à l'acébutolol, un béta-bloquant, dans le cadre d'un suicide familial. La comparaison de différentes matrices *in vivo* (sang fémoral, sang cardiaque, contenu gastrique, bile et urine) par l'utilisation du réseau moléculaire nous a apporté de précieux éléments dans l'analyse toxicologique de ce décès. Bien que le métabolisme de cette substance n'ait pas encore été entièrement caractérisé, il est à ce jour avancé que ce médicament est principalement hydrolysé en acétolol au niveau hépatique par la carboxyestérase 2. Ensuite, l'acétolol peut être métabolisé en diacétolol par la N-acétyl-transférase 2 (Sweetman 2011; Muta et al. 2015).

Dans le cas présent, l'acébutolol et le diacétolol ont été détectés dans le sang fémoral, le contenu gastrique, le sang cardiaque, la bile et l'urine. Egalement, l'acétolol a été trouvé principalement dans les échantillons de bile et d'urine, confirmant les données pharmacocinétiques disponibles chez l'homme. Nous avons également observé une quantité élevée d'acébutolol dans le contenu gastrique par rapport à ses métabolites, objectivant une absorption incomplète et un manque de métabolisme de cette substance avant la mort. Ainsi, nos résultats concordent avec une prise massive d'acébutolol quelques heures avant le décès.

Il est intéressant de noter qu'une approche de réseau moléculaire a également permis de mieux comprendre le métabolisme de l'acébutolol. Ici, le fait que l'acétolol puisse être produit dans des conditions acide reste cohérent avec notre détection de ce métabolite dans le contenu gastrique, où le pH était de 4,7 (Rakibe et al. 2018). Par ailleurs, en trouvant du N-déalkyl-acébutolol (*m/z* 295.168) et de l'hydroxyl-acébutolol (*m/z* 353.21), nous avons vérifié les prédictions métaboliques de Bussy et al. (2013) observées sur microsomes hépatiques de rat (Bussy et al. 2013).

Enfin, la prise en compte de la masse exacte, des spectres MS/MS et de la propagation de l'information, nous a permis de détecter et d'identifier d'autres impuretés et métabolites présumés, dont un dérivé glucuronide de phase II (*m/z* 513,247), jusqu'alors non décrit dans la littérature. Ces données ont notamment permis de montrer la pertinence du réseau moléculaire dans l'étude du métabolisme.

Dans une seconde partie de ce chapitre (3ème étude), nous nous sommes intéressés à l'exploration du métabolisme *in vitro* des xénobiotiques par réseau moléculaire. Nous avons utilisé le modèle HepaRG différenciés, du fait de l'expression de la plupart des enzymes du métabolisme, incluant les principaux CYPs et les UGTs (Aninat et al. 2006; Quesnot et al. 2018; Hugbart et al. 2020). La quétiapine, du fait de son métabolisme important et bien décrit dans la littérature, a été choisie pour l'élaboration de la preuve de concept (DeVane et Nemeroff 2001; Bakken et al. 2012; Fisher et al. 2012b, 2012a; Beloti et al. 2019).

Par l'étude de la cinétique métabolique de la quétiapine, il s'est tout d'abord révélé possible de distinguer des métabolites intermédiaires et des métabolites finaux, permettant de mieux comprendre la filiation métabolique. En parallèle, il nous semblait intéressant d'utiliser des inhibiteurs pharmacologiques du métabolisme de la quétiapine, afin d'explorer les voies métaboliques par réseau moléculaire. Du fait d'un métabolisme impliquant le CYP3A4, le CYP2D6 et le CYP3A5, nous avons choisi le kétoconazole comme inhibiteur du CYP3A4/5, et la quinidine comme inhibiteur du CYP2D6 (McLaughlin et al. 2005; Greenblatt et al. 2011; Niwa et al. 2015). Ainsi, la visualisation de l'inhibition du métabolisme à l'aide de la mise en réseau moléculaire nous a permis de décortiquer les voies métaboliques et d'objectiver un métabolisme prédominant par le CYP3A4/5, en cohérence avec les données de la littérature.

Dans cette étude, la prise en compte de la masse exacte, des spectres de masse, des temps de rétention, de la propagation de l'information et des décalages de masse correspondant aux réactions de biotransformation nous a permis d'identifier 8 métabolites connus de la quétiapine (*N*-desalkylquétiapine, *N*-desalkyquetiapine sulfoxyde, 7-OH-*N*-desalkyquetiapine, O-desalkylquétiapine, 7-OH-quétiapine, quétiapine sulfoxyde, quétiapine acide et quétiapine glucuronide), ainsi que deux métabolites potentiels inconnus (quétiapine M1 et M2) (DeVane et Nemeroff 2001; Bakken et al. 2012; Fisher et al. 2012b, 2012a).

Dans ce travail, les conditions *in vitro* permettent de faire varier de nombreux paramètres d'étude, en comparaison des conditions *in vivo*. Ces considérations ouvrent ainsi de nombreuses perspectives quant à l'exploration du métabolisme. Parallèlement à l'utilisation des inhibiteurs pharmacologiques pour l'étude des voies métaboliques, d'autres technologies telles que des siRNA (Laurent et al. 2013), des lignées mutantes surexprimant certaines enzymes du métabolisme (Hugbart et al. 2020), ou des CRISPS-Cas9 (Karlgren et al. 2018) pourraient être explorées. Dans cette réflexion, il est également envisageable d'investiguer des interactions médicamenteuses, par incubation de plusieurs molécules dans le milieu de culture des HepaRG différenciés, en cohérence avec les objectifs du projet PREVITOX.

Dans la troisième partie de ce chapitre, nous nous sommes intéressés à l'utilisation des réseaux moléculaires pour la comparaison des matrices biologiques et végétales afin d'identifier la plante impliquée dans le décès d'une femme. La représentation graphique du réseau moléculaire nous a ainsi permis de comparer les signatures de nombreuses molécules, qu'elles aient été rapportées ou non dans la littérature. Avant même d'identifier la poudre ingérée, cet outil nous a permis de la différencier d'une poudre authentique de *T. iboga*. Ici, le cluster était principalement composé d'alcaloïdes de type indolomonoterpénique, permettant une orientation vers la famille des *Apocynaceae*. L'annotation des nœuds de la poudre ingérée et des matrices biologiques a révélé la présence d'ajmaline, de réserpiline et de yohimbine, suggérant que la poudre ingérée provient d'une plante du genre *Rauwolfia* sp (Lewis 1956).

En termes de métabolisme, le réseau moléculaire a permis l'identification de nœuds appartenant à la fois au sang et à la bile, et absent dans les autres matrices (poudre ingérée, et authentique poudre de T. iboga). Considérant leurs spectres MS^2 et les différences de masse correspondant à des biotransformations, ces molécules ont été marquées comme des métabolites humains potentiels d'alcaloïdes du genre *Rauwolfia*. Dans le cas de la réserpiline, nous avons ainsi pu détecter et identifier des métabolites présumés uniquement présents dans la bile (produits de déméthylation, glucuronidation, sulfatation et hydroxylation). À notre connaissance, ces métabolites n'ont pas encore été décrits dans la littérature.

De manière globale, les réseaux moléculaires présentent plusieurs avantages. Premièrement, la représentation graphique unifiée de multiples métadonnées (masse exacte, temps de rétention, annotations, informations semi-quantitatives, différences de masse et relations structurelles/voies métaboliques) constitue un grand atout, permettant de comparer aisément les échantillons. Egalement, elle améliore l'annotation et la classification des métabolites décrits précédemment, et facilite l'identification de nouveaux métabolites en visualisant les relations structurelles. Ainsi, le réseau moléculaire est apparu comme un outil puissant en toxicologie médico-légale, où l'identification de métabolites de xénobiotiques inconnus peut fournir des informations précieuses sur la cause du décès (Allard et al. 2018).

Deuxièmement, cette méthode de traitement des données est complémentaire des approches habituelles en médecine légale et en toxicologie analytique (en particulier en cas d'intoxication par des produits naturels), et permet de regrouper des composés structurellement apparentés sans connaissances préalables de leur comportement de fragmentation. Des preuves d'identification supplémentaires peuvent ainsi être fournies sans nécessiter l'utilisation de standards. Troisièmement, la "tolérance spectrale" impliquée par la similarité spectrale permet à cette approche de prendre en compte des ensembles de données produits par différents spectromètres de masse couplé à la chromatographie liquide. Enfin, comme ces outils Open Access deviennent de plus en plus conviviaux, leur utilisation est désormais démocratisée.

En revanche, les limites de ces approches bio-informatiques incluent le besoin d'une expertise en spectrométrie de masse, les paramètres analytiques étant essentiels à l'acquisition de données de haute qualité. Par exemple, les variations de l'énergie de collision étant susceptibles de modifier les spectres de fragmentation et donc le regroupement spectral, les paramètres d'acquisition doivent être optimisés. Dans ce contexte, l'étude du métabolisme de la quétiapine a bénéficié de paramètres de spectrométrie de masse optimisés en comparaison des études portant sur le métabolisme de l'acébutolol et de la poudre de *Rauwolfia*.

Le prétraitement des données dans MZmine® nécessite également un ajustement minutieux des paramètres à chaque étape. Il nécessite aussi une interprétation et une validation manuelle approfondies du réseau moléculaire obtenu, ce qui reste essentiel pour l'évaluation fiable des structures de métabolites proposés.

Enfin, il n'est pas toujours possible de procéder à une annotation univoque en raison des limites de la spectrométrie de masse pour l'attribution de la structure (par exemple, les composés isomères) et de l'indisponibilité des normes chimiques ou des méthodes de confirmation (par exemple, la résonance magnétique nucléaire). Cette dernière limite nous a conduits à recommander l'utilisation d'un système de niveau de preuve pour l'identification des métabolites afin d'indiquer la confiance dans le candidat, comme le suggèrent Schymanski et al. (2014). Cette méthodologie a ainsi été appliquée au cas d'intoxication à l'acébutolol.

Dans le troisième chapitre, constituant la dernière partie de ce travail de thèse (4ème étude), nous nous sommes intéressés au métabolisme et aux mécanismes d'action toxiques des amanitines. En effet, nous faisons l'hypothèse que l'exploration des mécanismes toxiques de ces substances, incomplètement connus, pourraient révéler une cible permettant la proposition d'un antidote spécifique. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons tout d'abord entrepris de développer un modèle cellulaire d'hépatocytes *in vitro* adéquat, sensible à la toxicité des amanitines.

La lignée cellulaire HepG2 a tout d'abord été écartée, du fait de l'absence de toxicité observée malgré les différentes concentrations d'amanitines utilisées. L'absence d'expression des transporteurs OATP1B3 dans ce modèle, décrit dans la littérature, nous a ici permis de retenir l'hypothèse d'une absence de pénétration des amanitines dans l'hépatocyte (Wiśniewski et al. 2016). Egalement, les HepaRG progéniteurs se sont montrés peu sensibles aux amanitines, permettant d'écarter ce modèle dans les expérimentations ultérieures.

Dans ce modèle cellulaire, il pourrait être intéressant d'étudier spécifiquement les expressions des transporteurs de la famille des OATP1B, afin d'apporter des éléments de compréhension quant aux effets dose-réponse observés. Enfin, les HepaRG différenciés se sont montrés les plus pertinents, affichant une bonne sensibilité aux amanitines, et une concentration létale 50 de 2 µM, conformément aux principaux modèles utilisés dans la littérature (Magdalan et al. 2009, 2010, 2011b, 2011a). Egalement, le modèle d'HepaRG différenciés étant reconnu comme un modèle pertinent pour l'étude du métabolisme, son application au métabolisme des amanitines nous a paru adaptée.

Bien qu'aucune donnée de la littérature ne soutienne l'hypothèse d'un métabolisme des amanitines (Garcia et al. 2015), nous avons exploré cette question à l'aide du réseau moléculaire. L'élimination de ces toxines étant majoritairement urinaire (80 à 90%), un réseau moléculaire réalisé à partir d'urines de quatre patients intoxiqués a tout d'abord été réalisé.

Dans cette étude, l'α-amanitine a pu être détectée dans les quatre échantillons, sans retrouver la présence de molécules structurellement proches. L'absence de β-amanitine dans ces échantillons a ici été limitante dans l'étude de son métabolisme potentiel. Du fait d'une concentration similaire entre l'α- et la β-amanitine au sein des espèces fongiques concernées (Kaya et al. 2013), l'hypothèse d'un rendement d'extraction différent entre ces toxines lors du dosage a été retenue. En effet, les propriétés acides de la β-amanitine (pKa 4.02), et neutres de l'α-amanitine (pKa 9.63) pourraient expliquer ces observations.

Du fait de l'absence de métabolites d'amanitines retrouvés *in vivo*, une étude similaire a été menée *in vitro*. Après incubation de l'α-amanitine et la β-amanitine (2 µM) sur une culture d'HepaRG différenciés, ces deux toxines ont pu être détectées, bien que non liées à de potentiels métabolites au sein du réseau moléculaire.

Dans cette étude, on ne peut cependant exclure la formation de métabolites réactifs formant des adduits intracellulaires, non détectables à l'extérieur de la cellule, de manière similaire au NAPQI lors des intoxications au paracétamol. Dans ce contexte, il aurait été pertinent de réaliser des réseaux moléculaires sur des lysats de culture cellulaire d'HepaRG différenciés traités par amanitines. Pour autant, ces différents résultats apportant des éléments de preuve suffisants pour conforter l'hypothèse d'une toxicité indépendante d'un éventuel métabolisme, nous avons souhaité investiguer les mécanismes toxiques des amanitines.

Dans ce travail, il semble intéressant de noter le contraste entre les observations histologiques de patients intoxiqués aux amanitines, rapportant de la nécrose hépatique centrolobulaire (Wepler et Opitz 1972; Fineschi et al. 1996), et les données d'études *in vitro* qui semblent nettement impliquer l'apoptose dans la toxicité des amanitines. Des différents mécanismes toxiques décrits, l'implication du stress oxydant et les altérations mitochondriales semblent toutefois être au centre de la physiopathologie, bien que les mécanismes précis ne soient pas totalement élucidés (Zheleva et al. 2007; Magdalan et al. 2010, 2011a; DüNdar et al. 2017; Wang et al. 2018). De manière cohérente, nos résultats rapportent la génération de ROS mitochondriaux de manière dose-dépendante après traitement par amanitines.

Une attention particulière portée sur les mitochondries pourrait ici apporter des éléments de compréhension précieux quant à la physiopathologie des syndromes phalloïdiens. L'utilisation du SeaHorse®, en vue d'étudier la respiration mitochondriale et la glycolyse, et l'étude des mécanismes de développement de la stéatose observée de manière histologique dans les intoxications graves, serait de première importance. Dans un autre temps, il serait également intéressant d'étudier le stress du réticulum endoplasmique et l'activation des caspases.

De manière globale, les différences observées entre les données histologiques et celles *in vitro* pourraient constituer un élément fondamental dans l'appréhension des mécanismes de mort cellulaire. En effet, on ne peut exclure que les amanitines provoquent la lyse des cellules environnantes, induisant des réponses inflammatoires comprenant la libération de cytokines, la sensibilisation des hépatocytes, et l'amplification les lésions initiales, comme le suggère Meldolesi et al. (1967).

Ces réflexions sont à mettre en regard des résultats d'incubation d'amanitine sur macrophages humains, présentés au sein du chapitre 1, pour lesquels une augmentation de la sécrétion d'IL-1β était constatée, probablement du fait de la mort cellulaire. Il serait ainsi intéressant d'étudier l'effet des amanitines dans le cadre de coculture ou milieux conditionnés, afin d'appréhender, par exemple, le rôle des macrophages hépatiques dans cette physiopathologie.

En résumé de ce chapitre, de nombreux mécanismes toxiques restent à ce jour inexpliqués concernant les amanitines. Toutefois, la mitochondrie et la génération de stress oxydant semblent jouer un rôle décisif dans le déclenchement de la mort cellulaire. A notre connaissance, notre équipe est la première à proposer les HepaRG différenciés comme modèle d'étude de toxicité des amanitines. Enfin, nous montrons ici que les mécanismes toxiques de ces molécules sont indépendants d'un métabolisme.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La toxicité hépatique des xénobiotiques constitue un sujet extrêmement varié, au vu des multiples mécanismes et acteurs impliqués. Afin de partir de questions cliniques, nous avons ciblé deux substances fréquemment rencontrées en laboratoire de toxicologie hospitalière : l'éthanol et les amanitines. Ce travail de toxicologie, de l'*in vitro* à l'*in vivo,* avait pour but d'améliorer la compréhension des mécanismes hépatotoxiques de ces xénobiotiques et d'apporter ainsi de nouveaux éléments permettant d'optimiser les prises en charge thérapeutiques des patients intoxiqués. Nos travaux ont permis d'une part une meilleure compréhension des mécanismes de toxicité hépatique impliquant les macrophages à travers l'exemple de l'éthanol, et d'autre part le développement d'outils d'études du métabolisme sur cellules hépatiques (HepaRG différenciés), permettant d'aborder l'étude des amanitines avec des outils adaptés.

Dans un premier temps, nous avons apporté des éléments supplémentaires de compréhension sur les mécanismes de réponse des macrophages à l'éthanol. Ces interactions xénobiotiques – cellules, montrées à travers l'exemple de l'induction des récepteurs P2X7, semblent participer à la sévérité des atteintes hépatiques alcooliques, et témoignent de la plasticité des macrophages en situation pathologique. Ces résultats, allant dans le sens de l'intérêt des antagonistes des récepteurs P2X7 dans les alcoolopathies, mériteraient cependant des investigations supplémentaires afin d'étudier les données d'efficacité et de tolérance de ces nouveaux anti-inflammatoires. Par ailleurs, ces réflexions font écho aux progrès réalisés ces dernières années dans la compréhension des mécanismes de polarisation des macrophages, et ouvrent des perspectives concernant la « macrophage therapy », destinée à reprogrammer ces cellules en phénotype impliqué dans la réparation tissulaire et le déclenchement d'une réponse anti-inflammatoire.

Dans un deuxième temps, nous avons appliqué l'outil de réseau moléculaire, permettant la visualisation de données complexes acquises par LC-MS/MS, à l'étude du métabolisme de xénobiotiques. L'étude du métabolisme de l'acébutolol dans le cadre d'une intoxication médicamenteuse volontaire d'une part, et l'étude du métabolisme de la quétiapine de manière *in vitro* d'autre part, nous ont apporté des preuves consistantes sur l'intérêt du réseau moléculaire dans ce contexte. Par ailleurs, cet outil nous a permis de décortiquer le métabolisme de substances naturelles, à travers l'exemple d'une intoxication à une plante du genre *Rauwolfia* sp., nous permettant de conforter sa pertinence dans l'étude du métabolisme et continuer ce travail sur les amanitines.

Dans un troisième et dernier temps, l'application du réseau moléculaire nous a permis d'écarter raisonnablement l'hypothèse d'un métabolisme des amanitines *in vivo* et *in vitro*. Par ailleurs, nous avons montré pour la première fois que le modèle d'HepaRG différenciés constitue un modèle pertinent dans l'étude des amanitines, et objectivé l'implication de la production des ROS mitochondriaux dans la toxicité de ces substances.

Des présentes études, d'importantes questions ressortent néanmoins. Par exemple, ces travaux de thèse s'étant intéressés à l'hépatotoxicité des xénobiotiques sur un foie sain, il est légitime de se demander si des conditions pathologiques sous-jacentes, telles qu'une stéatose ou une stéato-hépatite, pourraient modifier la toxicocinétique et la toxicodynamique de ces molécules. En pratique, des modèles de lignées cellulaires *in vitro* tels que les HepaRG peuvent être utilisés en condition stéatosée (Michaut et al. 2016; Le Guillou et al. 2018) ou inflammatoire (Al-Attrache et al. 2016) et pourraient apporter des éléments de réponses pertinents. Ces outils, combinés aux approches de réseau moléculaire, offrent une nouvelle façon d'intégrer la variabilité individuelle des patients dans les études d'efficacité et de toxicité des xénobiotiques. Enfin, il est vraisemblable que la compréhension des différences observées entre l'*in vivo* et l'*in vitro* pourraient partiellement résider dans la communication cellulaire environnante. Dans ce contexte, les mécanismes d'activation des cellules de Küpffer en situation pathologique semblent pouvoir conditionner la sévérité des atteintes hépatiques, et ouvrent le champ à de nouvelles thérapies prometteuses visant les macrophages.

BIBLIOGRAPHIE

Abbracchio MP, Burnstock G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? Pharmacol Ther. 1994;64(3):445‑75.

Abdel-Misih SRZ, Bloomston M. Liver Anatomy. Surg Clin North Am. août 2010;90(4):643‑53.

Abderrazak A, Syrovets T, Couchie D, El Hadri K, Friguet B, Simmet T, et al. NLRP3 inflammasome: From a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. Redox Biol. avr 2015;4:296‑307.

Adinolfi E, Raffaghello L, Giuliani AL, Cavazzini L, Capece M, Chiozzi P, et al. Expression of P2X7 Receptor Increases In Vivo Tumor Growth. Cancer Res. 15 juin 2012;72(12):2957‑69.

Agarwal DP, Goedde HW. Human aldehyde dehydrogenases: their role in alcoholism. Alcohol Fayettev N. déc 1989;6(6):517‑23.

Aksentijevich I, Nowak M, Mallah M, Chae JJ, Watford WT, Hofmann SR, et al. De novoCIAS1 mutations, cytokine activation, and evidence for genetic heterogeneity in patients with neonatal-onset multisystem inflammatory disease (NOMID): A new member of the expanding family of pyrin-associated autoinflammatory diseases. Arthritis Rheum. déc 2002;46(12):3340‑8.

Al-Attrache H, Sharanek A, Burban A, Burbank M, Gicquel T, Abdel-Razzak Z, et al. Differential sensitivity of metabolically competent and non-competent HepaRG cells to apoptosis induced by diclofenac combined or not with TNF-α. Toxicol Lett. sept 2016;258:71‑86.

Allard P-M, Genta-Jouve G, Wolfender J-L. Deep metabolome annotation in natural products research: towards a virtuous cycle in metabolite identification. Curr Opin Chem Biol. févr 2017;36:40‑9.

Allard P-M, Péresse T, Bisson J, Gindro K, Marcourt L, Pham VC, et al. Integration of Molecular Networking and *In-Silico* MS/MS Fragmentation for Natural Products Dereplication. Anal Chem. 15 mars 2016;88(6):3317‑23.

Allard S, Allard P-M, Morel I, Gicquel T. Application of a molecular networking approach for clinical and forensic toxicology exemplified in three cases involving 3-MeO-PCP, doxylamine, and chlormequat. Drug Test Anal [Internet]. 23 nov 2018 [cité 16 déc 2018]; Disponible sur: http://doi.wiley.com/10.1002/dta.2550

Allen IC, Scull MA, Moore CB, Holl EK, McElvania-TeKippe E, Taxman DJ, et al. The NLRP3 Inflammasome Mediates In Vivo Innate Immunity to Influenza A Virus through Recognition of Viral RNA. Immunity. avr 2009;30(4):556‑65.

Allocati N, Masulli M, Di Ilio C, Federici L. Glutathione transferases: substrates, inihibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. Oncogenesis [Internet]. janv 2018 [cité 30 janv 2020];7(1). Disponible sur: http://www.nature.com/articles/s41389-017-0025-3

Almazroo OA, Miah MK, Venkataramanan R. Drug Metabolism in the Liver. Clin Liver Dis. févr 2017;21(1):1‑20.

Alvares AP, Pantuck EJ, Anderson KE, Kappas A, Conney AH. Regulation of Drug Metabolism in Man by Environmental Factors. Drug Metab Rev. janv 1979;9(2):185‑205.

Amoroso F, Falzoni S, Adinolfi E, Ferrari D, Di Virgilio F. The P2X7 receptor is a key modulator of aerobic glycolysis. Cell Death Dis. août 2012;3(8):e370‑e370.

Aninat C, Piton A, Glaise D, Le Charpentier T, Langouët S, Morel F, et al. Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. Drug Metab Dispos Biol Fate Chem. janv 2006;34(1):75‑83.

Arima Y, Nitta M, Kuninaka S, Zhang D, Fujiwara T, Taya Y, et al. Transcriptional Blockade Induces p53-dependent Apoptosis Associated with Translocation of p53 to Mitochondria. J Biol Chem. 13 mai 2005;280(19):19166‑76.

Awad F, Assrawi E, Louvrier C, Jumeau C, Georgin-Lavialle S, Grateau G, et al. Inflammasome biology, molecular pathology and therapeutic implications. Pharmacol Ther. juill 2018;187:133‑49.

Bakken GV, Molden E, Knutsen K, Lunder N, Hermann M. Metabolism of the Active Metabolite of Quetiapine, *N* -Desalkylquetiapine In Vitro. Drug Metab Dispos. sept 2012;40(9):1778‑84.

Barceloux DG. Medical toxicology of natural substances: foods, fungi, medicinal herbs, plants, and venomous animals. Hoboken, NJ: Wiley; 2008.

Beloti L, Miranda L, Queiroz M. Butyl Methacrylate-Co-Ethylene Glycol Dimethacrylate Monolith for Online in-Tube SPME-UHPLC-MS/MS to Determine Chlopromazine, Clozapine, Quetiapine, Olanzapine, and Their Metabolites in Plasma Samples. Molecules. 16 janv 2019;24(2):310.

Bénichou C. Criteria of drug-induced liver disorders. J Hepatol. sept 1990;11(2):272‑6.

Benkerroum N. Chronic and Acute Toxicities of Aflatoxins: Mechanisms of Action. Int J Environ Res Public Health. 8 janv 2020;17(2):423.

Bergmann MM, Rehm J, Klipstein-Grobusch K, Boeing H, Schutze M, Drogan D, et al. The association of pattern of lifetime alcohol use and cause of death in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. Int J Epidemiol. 1 déc 2013;42(6):1772‑90.

Bhatia SN, Underhill GH, Zaret KS, Fox IJ. Cell and tissue engineering for liver disease. Sci Transl Med. 16 juill 2014;6(245):245sr2-245sr2.

Bigos KL, Bies RR, Pollock BG, Lowy JJ, Zhang F, Weinberger DR. Genetic variation in CYP3A43 explains racial difference in olanzapine clearance. Mol Psychiatry. juin 2011;16(6):620‑5.

Bismuth C, Baud F, Conso F, Dally S, Frejaville JP, Garnier R. Toxicologie clinique. Médecine-Sciences Flammarion, Paris; 2000.

Björnsson ES, Bergmann OM, Björnsson HK, Kvaran RB, Olafsson S. Incidence, Presentation, and Outcomes in Patients With Drug-Induced Liver Injury in the General Population of Iceland. Gastroenterology. juin 2013;144(7):1419-1425.e3.

Bode C, Christian Bode J. Effect of alcohol consumption on the gut. Best Pract Res Clin Gastroenterol. août 2003;17(4):575‑92.

Bonnard N, Falcy M, Jargot D, Pasquier E. Ethanol – Fiche toxicologique n°48 [Internet]. Institut National de Recherche et de Sécurité; 2011 [cité 3 juill 2018]. Disponible sur: http://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX_48&section=bibliographieAuteurs

Borràs E, Coutelle C, Rosell A, Fernández-Muixi F, Broch M, Crosas B, et al. Genetic polymorphism of alcohol dehydrogenase in europeans: TheADH2*2 allele decreases the risk for alcoholism and is associated withADH3*1. Hepatology. avr 2000;31(4):984‑9.

Bourgeois CM, Larpent J-P. Microbiologie alimentaire. Tome 2 : Aliments fermentés et fermentations alimentaires – 2ème édition. Edition Tec & Doc; 1996.

Bradford MD, Soltoff SP. P2X7 receptors activate protein kinase D and p42/p44 mitogen-activated protein kinase (MAPK) downstream of protein kinase C. Biochem J. 15 sept 2002;366(3):745‑55.

Brouckaert P, Libert C, Everaerdt B, Takahashi N, Cauwels A, Fiers W. Tumor necrosis factor, its receptors and the connection with interleukin 1 and interleukin 6. Immunobiology. avr 1993;187(3‑5):317‑29.

Broussard C. Mushroom poisoning—from diarrhea to liver transplantation. Am J Gastroenterol. nov 2001;96(11):3195‑8.

Burnstock G. Purinergic Signalling: Therapeutic Developments. Front Pharmacol [Internet]. 25 sept 2017 [cité 20 juill 2018];8. Disponible sur: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2017.00661/full

Burnstock G, Knight GE. The potential of P2X7 receptors as a therapeutic target, including inflammation and tumour progression. Purinergic Signal. mars 2018;14(1):1‑18.

Burnstock G, Knight GE, Greig AVH. Purinergic Signaling in Healthy and Diseased Skin. J Invest Dermatol. mars 2012;132(3):526‑46.

Burnstock G, Novak I. Purinergic signalling and diabetes. Purinergic Signal. sept 2013;9(3):307‑24.

Burnstock G, Vaughn B, Robson SC. Purinergic signalling in the liver in health and disease. Purinergic Signal. mars 2014;10(1):51‑70.

Bussy U, Delaforge M, El-Bekkali C, Ferchaud-Roucher V, Krempf M, Tea I, et al. Acebutolol and alprenolol metabolism predictions: comparative study of electrochemical and cytochrome P450-catalyzed reactions using liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. Anal Bioanal Chem. juill 2013;405(18):6077‑85.

Cantin L-D, Bayrakdarian M, Buon C, Grazzini E, Hu Y-J, Labrecque J, et al. Discovery of P2X3 selective antagonists for the treatment of chronic pain. Bioorg Med Chem Lett. avr 2012;22(7):2565‑71.

Caro AA, Cederbaum AI. O XIDATIVE S TRESS , T OXICOLOGY , AND P HARMACOLOGY OF CYP2E1. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 10 févr 2004;44(1):27‑42.

Castell JV, Gómez-Lechón MJ, David M, Hirano T, Kishimoto T, Heinrich PC. Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2/HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes. FEBS Lett. 23 mai 1988;232(2):347‑50.

Cattaneo M. The platelet P2Y12 receptor for adenosine diphosphate: congenital and drug-induced defects. Blood. 17 févr 2011;117(7):2102‑12.

Cederbaum AI. Alcohol Metabolism. Clin Liver Dis. nov 2012;16(4):667‑85.

Cerec V, Glaise D, Garnier D, Morosan S, Turlin B, Drenou B, et al. Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor. Hepatology. avr 2007;45(4):957‑67.

Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, Nelson N, Van Ness K, Greenstreet TA, et al. Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. Science. 3 avr 1992;256(5053):97‑100.

Chalasani NP, Hayashi PH, Bonkovsky HL, Navarro VJ, Lee WM, Fontana RJ. ACG Clinical Guideline: The Diagnosis and Management of Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury: Am J Gastroenterol. juill 2014;109(7):950‑66.

Chandrashekaran V, Das S, Seth RK, Dattaroy D, Alhasson F, Michelotti G, et al. Purinergic receptor X7 mediates leptin induced GLUT4 function in stellate cells in nonalcoholic steatohepatitis. Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis. janv 2016;1862(1):32‑45.

Chen M, Borlak J, Tong W. High lipophilicity and high daily dose of oral medications are associated with significant risk for drug-induced liver injury. Hepatology. juill 2013;58(1):388‑96.

Cheung PCK. The nutritional and health benefits of mushrooms: Nutritional and health benefits of mushrooms. Nutr Bull. déc 2010;35(4):292‑9.

Choi JH, Ahn BM, Yi J, Lee JH, Lee JH, Nam SW, et al. MRP2 haplotypes confer differential susceptibility to toxic liver injury. Pharmacogenet Genomics. juin 2007;17(6):403‑15.

Coughtrie MWH. Function and organization of the human cytosolic sulfotransferase (SULT) family. Chem Biol Interact. nov 2016;259:2‑7.

Crabb DW. Ethanol oxidizing enzymes: roles in alcohol metabolism and alcoholic liver disease. Prog Liver Dis. 1995;13:151‑72.

Cruz CM, Rinna A, Forman HJ, Ventura ALM, Persechini PM, Ojcius DM. ATP Activates a Reactive Oxygen Species-dependent Oxidative Stress Response and Secretion of Proinflammatory Cytokines in Macrophages. J Biol Chem. 2 févr 2007;282(5):2871‑9.

Cunha RA. How does adenosine control neuronal dysfunction and neurodegeneration? J Neurochem. déc 2016;139(6):1019‑55.

Cunningham MR, Nisar SP, Mundell SJ. Molecular mechanisms of platelet P2Y $_{12}$ receptor regulation. Biochem Soc Trans. 1 févr 2013;41(1):225‑30.

Đaković-Švajcer K, Samojlik I, Rašković A, Popović M, Jakovljević V. The activity of liver oxidative enzymes after single and multiple grapefruit juice ingestion. Exp Toxicol Pathol. juill 1999;51(4‑5):304‑8.

Dalbeth N, Lauterio TJ, Wolfe HR. Mechanism of Action of Colchicine in the Treatment of Gout. Clin Ther. oct 2014;36(10):1465‑79.

Davies M. The role of GABAA receptors in mediating the effects of alcohol in the central nervous system. J Psychiatry Neurosci JPN. juill 2003;28(4):263‑74.

DeLeve LD, Kaplowitz N. Mechanisms of drug-induced liver disease. Gastroenterol Clin North Am. déc 1995;24(4):787‑810.

DeLeve LD, Shulman HM, McDonald GB. Toxic Injury to Hepatic Sinusoids: Sinusoidal Obstruction Syndrome (Veno-Occlusive Disease). Semin Liver Dis. 2002;22(1):027‑42.

DeVane CL, Nemeroff CB. Clinical Pharmacokinetics of Quetiapine: An Atypical Antipsychotic. Clin Pharmacokinet. 2001;40(7):509‑22.

Di Castelnuovo A. Alcohol Dosing and Total Mortality in Men and Women: An Updated Meta-analysis of 34 Prospective Studies. Arch Intern Med. 11 déc 2006;166(22):2437.

Diaz JH. Syndromic diagnosis and management of confirmed mushroom poisonings: Crit Care Med. févr 2005;33(2):427‑36.

Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. Blood. 15 mars 1996;87(6):2095‑147.

Dinarello CA. A Signal for the Caspase-1 Inflammasome Free of TLR. Immunity. avr 2007;26(4):383‑5.

Dinarello CA. IL-1: Discoveries, controversies and future directions. Eur J Immunol. mars 2010;40(3):599‑606.

Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. Blood. 7 avr 2011;117(14):3720‑32.

Dixon LJ, Barnes M, Tang H, Pritchard MT, Nagy LE. Kupffer Cells in the Liver. In: Terjung R, éditeur. Comprehensive Physiology [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2013 [cité 28 janv 2020]. Disponible sur: http://doi.wiley.com/10.1002/cphy.c120026

Döring B, Petzinger E. Phase 0 and phase III transport in various organs: Combined concept of phases in xenobiotic transport and metabolism. Drug Metab Rev. août 2014;46(3):261‑82.

Dranoff JA, Kruglov EA, Abreu-Lanfranco O, Nguyen T, Arora G, Aurora G, et al. Prevention of liver fibrosis by the purinoceptor antagonist pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonate (PPADS). Vivo Athens Greece. déc 2007;21(6):957‑65.

Duddempudi AT. Immunology in Alcoholic Liver Disease. Clin Liver Dis. nov 2012;16(4):687‑98.

Duncan JA, Gao X, Huang MT-H, O'Connor BP, Thomas CE, Willingham SB, et al. *Neisseria gonorrhoeae* Activates the Proteinase Cathepsin B to Mediate the Signaling Activities of the NLRP3 and ASC-Containing Inflammasome. J Immunol. 15 mai 2009;182(10):6460‑9.

DüNdar ZD, ErgiN M, Kilinç İ, çOlak T, Oltulu P, Cander B. The role of oxidative stress in α-amanitin-induced hepatotoxicityin an experimental mouse model. Turk J Med Sci. 2017;47:318‑25.

Edenberg HJ. Regulation of the mammalian alcohol dehydrogenase genes. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. 2000;64:295‑341.

Edenberg HJ. The genetics of alcohol metabolism: role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase variants. Alcohol Res Health J Natl Inst Alcohol Abuse Alcohol. 2007;30(1):5‑13.

Eder C. Mechanisms of interleukin-1β release. Immunobiology. juill 2009;214(7):543‑53.

Enjalbert F, Rapior S, Nouguier-Soulé J, Guillon S, Amouroux N, Cabot C. Treatment of Amatoxin Poisoning: 20-Year Retrospective Analysis. J Toxicol Clin Toxicol. janv 2002;40(6):715‑57.

Escudié L, Francoz C, Vinel J-P, Moucari R, Cournot M, Paradis V, et al. Amanita phalloides poisoning: Reassessment of prognostic factors and indications for emergency liver transplantation. J Hepatol. mars 2007;46(3):466‑73.

Eser A, Colombel J-F, Rutgeerts P, Vermeire S, Vogelsang H, Braddock M, et al. Safety and Efficacy of an Oral Inhibitor of the Purinergic Receptor P2X7 in Adult Patients with Moderately to Severely Active Crohn's Disease: A Randomized Placebo-controlled, Double-blind, Phase IIa Study. Inflamm Bowel Dis. juill 2015;1.

Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: Translating Functional Genomics into Rational Therapeutics. Science. 15 oct 1999;286(5439):487‑91.

Fan J, de Lannoy IAM. Pharmacokinetics. Biochem Pharmacol. janv 2014;87(1):93‑120.

Fathalla AM, Soliman AM, Ali MH, Moustafa AA. Adenosine A2A Receptor Blockade Prevents Rotenone-Induced Motor Impairment in a Rat Model of Parkinsonism. Front Behav Neurosci [Internet]. 29 févr 2016 [cité 23 juill 2018];10. Disponible sur: http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fnbeh.2016.00035/abstract

Faulstich H, Talas A, Wellhöner HH. Toxicokinetics of labeled amatoxins in the dog. Arch Toxicol. janv 1985;56(3):190‑4.

Ferron P-J, Clément B. PREVITOX : un réseau national pour l'évaluation préclinique et pharmacogénétique de la toxicité médicamenteuse. 2019 [cité 15 juill 2020]; Disponible sur: http://rgdoi.net/10.13140/RG.2.2.18050.94405

Fineschi V, Di Paolo M, Centini F. Histological Criteria for Diagnosis of Amanita Phalloides Poisoning. J Forensic Sci. 1 mai 1996;41(3):13929J.

Fisher DS, Handley SA, Flanagan RJ, Taylor DM. Plasma Concentrations of Quetiapine, N-Desalkylquetiapine, O-Desalkylquetiapine, 7-Hydroxyquetiapine, and Quetiapine Sulfoxide in Relation to Quetiapine Dose, Formulation, and Other Factors: Ther Drug Monit. juill 2012a;:1.

Fisher DS, Handley SA, Taylor D, Flanagan RJ. Measurement of quetiapine and four quetiapine metabolites in human plasma by LC-MS/MS: Measurement of quetiapine and four metabolites by LC-MS/MS. Biomed Chromatogr. sept 2012b;26(9):1125‑32.

Franchi L, Kanneganti T-D, Dubyak GR, Núñez G. Differential Requirement of P2X7 Receptor and Intracellular K^+ for Caspase-1 Activation Induced by Intracellular and Extracellular Bacteria. J Biol Chem. 29 juin 2007;282(26):18810‑8.

Freire D, Reyes RE, Baghram A, Davies DL, Asatryan L. P2X7 Receptor Antagonist A804598 Inhibits Inflammation in Brain and Liver in C57BL/6J Mice Exposed to Chronic Ethanol and High Fat Diet. J Neuroimmune Pharmacol. juin 2019;14(2):263‑77.

Fulp J, He L, Toldo S, Jiang Y, Boice A, Guo C, et al. Structural Insights of Benzenesulfonamide Analogues as NLRP3 Inflammasome Inhibitors: Design, Synthesis, and Biological Characterization. J Med Chem. 28 juin 2018;61(12):5412‑23.

Ganzert M, Felgenhauer N, Zilker T. Indication of liver transplantation following amatoxin intoxication. J Hepatol. févr 2005;42(2):202‑9.

Garcia J, Costa VM, Carvalho A, Baptista P, de Pinho PG, de Lourdes Bastos M, et al. Amanita phalloides poisoning: Mechanisms of toxicity and treatment. Food Chem Toxicol. déc 2015;86:41‑55.

Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The Interleukin-1 Family: Back to the Future. Immunity. déc 2013;39(6):1003‑18.

Ghalali A, Wiklund F, Zheng H, Stenius U, Högberg J. Atorvastatin prevents ATP-driven invasiveness via P2X7 and EHBP1 signaling in PTEN-expressing prostate cancer cells. Carcinogenesis. juill 2014;35(7):1547‑55.

Giannuzzo A, Pedersen SF, Novak I. The P2X7 receptor regulates cell survival, migration and invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma cells. Mol Cancer [Internet]. déc 2015 [cité 19 juill 2018];14(1). Disponible sur: http://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-015-0472-4

Gicquel T, Le Daré B, Boichot E, Lagente V. Purinergic receptors: new targets for the treatment of gout and fibrosis. Fundam Clin Pharmacol. avr 2017;31(2):136‑46.

Gicquel T, Robert S, Loyer P, Victoni T, Bodin A, Ribault C, et al. IL-1β production is dependent on the activation of purinergic receptors and NLRP3 pathway in human macrophages. FASEB J. oct 2015;29(10):4162‑73.

Gicquel T, Victoni T, Fautrel A, Robert S, Gleonnec F, Guezingar M, et al. Involvement of purinergic receptors and NOD-like receptor-family protein 3-inflammasome pathway in the adenosine triphosphate-induced cytokine release from macrophages. Clin Exp Pharmacol Physiol. avr 2014;41(4):279‑86.

Girre C, Hispard E, Tuszynski T. Toxicité de l'éthanol. Encyclopédie Médico-Chirurgicale Toxicologie-Pathologie professionnelle. Elsevier, Paris; 1995.

Gmel G, Gutjahr E, Rehm J. How stable is the risk curve between alcohol and all-cause mortality and what factors influence the shape? A precision-weighted hierarchical meta-analysis. Eur J Epidemiol. 2003;18(7):631‑42.

Goulden R. Moderate Alcohol Consumption Is Not Associated with Reduced All-cause Mortality. Am J Med. févr 2016;129(2):180-186.e4.

Govorushko S, Rezaee R, Dumanov J, Tsatsakis A. Poisoning associated with the use of mushrooms: A review of the global pattern and main characteristics. Food Chem Toxicol. juin 2019;128:267‑79.

Greenblatt DJ, Zhao Y, Venkatakrishnan K, Duan SX, Harmatz JS, Parent SJ, et al. Mechanism of cytochrome P450-3A inhibition by ketoconazole: Ketoconazole inhibition of CYP3A. J Pharm Pharmacol. févr 2011;63(2):214‑21.

Grewal P, Viswanathen VA. Liver Cancer and Alcohol. Clin Liver Dis. nov 2012;16(4):839‑50.

Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Cannie I, et al. Nonlinear partial differential equations and applications: Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. Proc Natl Acad Sci. 26 nov 2002;99(24):15655‑60.

Griswold MG, Fullman N, Hawley C, Arian N, Zimsen SRM, Tymeson HD, et al. Alcohol use and burden for 195 countries and territories, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. The Lancet. sept 2018;392(10152):1015‑35.

Gross O, Poeck H, Bscheider M, Dostert C, Hannesschläger N, Endres S, et al. Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. Nature. mai 2009;459(7245):433‑6.

Gu Y, Kuida K, Tsutsui H, Ku G, Hsiao K, Fleming MA, et al. Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme. Science. 10 janv 1997;275(5297):206‑9.

Guiraud J-P. Microbiologie alimentaire. Edition Dunod; 1998.

Gunawan B, Kaplowitz N. Clinical Perspectives on Xenobiotic-Induced Hepatotoxicity. Drug Metab Rev. janv 2004;36(2):301‑12.

Gunawan BK, Kaplowitz N. Mechanisms of Drug-Induced Liver Disease. Clin Liver Dis. août 2007;11(3):459‑75.

Gunawan BK, Liu Z, Han D, Hanawa N, Gaarde WA, Kaplowitz N. c-Jun N-Terminal Kinase Plays a Major Role in Murine Acetaminophen Hepatotoxicity. Gastroenterology. juill 2006;131(1):165‑78.

Guo C, Masin M, Qureshi OS, Murrell-Lagnado RD. Evidence for Functional P2X4/P2X7 Heteromeric Receptors. Mol Pharmacol. 11 sept 2007;72(6):1447‑56.

Guo H, Callaway JB, Ting JP-Y. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. Nat Med. juill 2015;21(7):677‑87.

Gur S, Kadowitz PJ, Hellstrom WJG. Purinergic (P2) receptor control of lower genitourinary tract function and new avenues for drug action: an overview. Curr Pharm Des. 2007;13(31):3236‑44.

Guzman SJ, Gerevich Z. P2Y Receptors in Synaptic Transmission and Plasticity: Therapeutic Potential in Cognitive Dysfunction. Neural Plast. 2016;2016:1‑12.

Han D, Dara L, Win S, Than TA, Yuan L, Abbasi SQ, et al. Regulation of drug-induced liver injury by signal transduction pathways: critical role of mitochondria. Trends Pharmacol Sci. avr 2013;34(4):243‑53.

Haouzi D, Lekéhal M, Moreau A, Moulis C, Feldmann G, Robin M-A, et al. Cytochrome P450–generated reactive metabolites cause mitochondrial permeability transition, caspase activation, and apoptosis in rat hepatocytes. Hepatology. août 2000;32(2):303‑11.

Harmse R, van der Walt MM, Petzer JP, Terre'Blanche G. Discovery of 1,3-diethyl-7-methyl-8-(phenoxymethyl)-xanthine derivatives as novel adenosine A 1 and A 2A receptor antagonists. Bioorg Med Chem Lett. déc 2016;26(24):5951‑5.

Higgins LG, Hayes JD. Mechanisms of induction of cytosolic and microsomal glutathione transferase (GST) genes by xenobiotics and pro-inflammatory agents. Drug Metab Rev. mai 2011;43(2):92‑137.

Hilmer SN, Shenfield GM, Le Couteur DG. Clinical implications of changes in hepatic drug metabolism in older people. Ther Clin Risk Manag. 2005;1(2):151‑6.

Hoffman HM, Mueller JL, Broide DH, Wanderer AA, Kolodner RD. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle–Wells syndrome. Nat Genet. nov 2001;29(3):301‑5.

Holt MP, Ju C. Mechanisms of drug-induced liver injury. AAPS J. mars 2006;8(1):E48‑54.

Homann J, Rawer P, Bleyl H, Matthes K-J, Heinrich D. Early detection of amatoxins in human mushroom poisoning. Arch Toxicol. oct 1986;59(3):190‑1.

Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. Nat Immunol. août 2008;9(8):847‑56.

Hoyt LR, Ather JL, Randall MJ, DePuccio DP, Landry CC, Wewers MD, et al. Ethanol and Other Short-Chain Alcohols Inhibit NLRP3 Inflammasome Activation through Protein Tyrosine Phosphatase Stimulation. J Immunol. 15 août 2016;197(4):1322‑34.

Hoyt LR, Randall MJ, Ather JL, DePuccio DP, Landry CC, Qian X, et al. Mitochondrial ROS induced by chronic ethanol exposure promote hyper-activation of the NLRP3 inflammasome. Redox Biol. août 2017;12:883‑96.

Hugbart C, Verres Y, Le Daré B, Bucher S, Vène E, Bodin A, et al. Non-oxidative ethanol metabolism in human hepatic cells in vitro: Involvement of uridine diphospho-glucuronosyltransferase 1A9 in ethylglucuronide production. Toxicol In Vitro. août 2020;66:104842.

Ichinohe T, Pang IK, Iwasaki A. Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. Nat Immunol. mai 2010;11(5):404‑10.

Ireton RC, Gale Jr. M. RIG-I Like Receptors in Antiviral Immunity and Therapeutic Applications. Viruses. 23 juin 2011;3(6):906‑19.

Iyer SS, He Q, Janczy JR, Elliott EI, Zhong Z, Olivier AK, et al. Mitochondrial Cardiolipin Is Required for Nlrp3 Inflammasome Activation. Immunity. août 2013;39(2):311‑23.

Jaeger A, Jehl F, Flesch F, Sauder P, Kopferschmitt J. Kinetics of amatoxins in human poisoning: Therapeutic implications. J Toxicol Clin Toxicol. janv 1993;31(1):63‑80.

Jaeschke H, McGill MR, Ramachandran A. Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: Lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. Drug Metab Rev. févr 2012;44(1):88‑106.

James LP, Mayeux PR, Hinson JA. Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity. Drug Metab Dispos. déc 2003;31(12):1499‑506.

Jancova P, Anzenbacher P, Anzenbacherova E. Phase II Drug Metabolizing Enzymes. Biomed Pap. 1 juin 2010;154(2):103‑16.

Jarvis MF, Khakh BS. ATP-gated P2X cation-channels. Neuropharmacology. janv 2009;56(1):208‑15.

Jaskiewicz K, Voigt H, Blakolmer K. Increased Matrix Proteins, Collagen and Transforming Growth Factor are Early Markers of Hepatotoxicity in Patients on Long-Term Methotrexate Therapy. J Toxicol Clin Toxicol. janv 1996;34(3):301‑5.

Jayasekara H, English DR, Room R, MacInnis RJ. Alcohol Consumption Over Time and Risk of Death: A Systematic Review and Meta-Analysis. Am J Epidemiol. 1 mai 2014;179(9):1049‑59.

Jenkins SJ, Ruckerl D, Cook PC, Jones LH, Finkelman FD, van Rooijen N, et al. Local Macrophage Proliferation, Rather than Recruitment from the Blood, Is a Signature of TH2 Inflammation. Science. 10 juin 2011;332(6035):1284‑8.

Jiang H, He H, Chen Y, Huang W, Cheng J, Ye J, et al. Identification of a selective and direct NLRP3 inhibitor to treat inflammatory disorders. J Exp Med. 11 oct 2017a;:jem.20171419.

Jiang S, Zhang Y, Zheng J-H, Li X, Yao Y-L, Wu Y-L, et al. Potentiation of hepatic stellate cell activation by extracellular ATP is dependent on P2X7R-mediated NLRP3 inflammasome activation. Pharmacol Res. mars 2017b;117:82‑93.

Jo E-K, Kim JK, Shin D-M, Sasakawa C. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. Cell Mol Immunol. mars 2016;13(2):148‑59.

Jo W-S, Hossain MdA, Park S-C. Toxicological Profiles of Poisonous, Edible, and Medicinal Mushrooms. Mycobiology. sept 2014;42(3):215‑20.

Jones AW. Evidence-based survey of the elimination rates of ethanol from blood with applications in forensic casework. Forensic Sci Int. juill 2010;200(1‑3):1‑20.

Kaczmarek-Hájek K, Lörinczi É, Hausmann R, Nicke A. Molecular and functional properties of P2X receptors—recent progress and persisting challenges. Purinergic Signal. sept 2012;8(3):375‑417.

Kaplowitz N. Biochemical and Cellular Mechanisms of Toxic Liver Injury. Semin Liver Dis. 16 mai 2002;22(02):137‑44.

Kaplowitz N. Idiosyncratic drug hepatotoxicity. Nat Rev Drug Discov. juin 2005;4(6):489‑99.

Karlgren M, Simoff I, Keiser M, Oswald S, Artursson P. CRISPR-Cas9: A New Addition to the Drug Metabolism and Disposition Tool Box. Drug Metab Dispos. nov 2018;46(11):1776‑86.

Karlson-Stiber C, Persson H. Cytotoxic fungi—an overview. Toxicon. sept 2003;42(4):339‑49.

Kaya E, Yilmaz I, Sinirlioglu ZA, Karahan S, Bayram R, Yaykasli KO, et al. Amanitin and phallotoxin concentration in Amanita phalloides var. alba mushroom. Toxicon. déc 2013;76:225‑33.

Keller DL. Benefits of Moderate Alcohol Consumption Not Disproven. Am J Med. août 2016;129(8):e149.

Khakh BS, Alan North R. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. Nature. 3 août 2006;442(7102):527‑32.

Khakh BS, Bao XR, Labarca C, Lester HA. Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds. Nat Neurosci. avr 1999;2(4):322‑30.

Kharbanda KK, McVicker DL, Zetterman RK, Donohue TM. Ethanol consumption reduces the proteolytic capacity and protease activities of hepatic lysosomes. Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj. déc 1995;1245(3):421‑9.

Kharbanda KK, Todero SL, Ward BW, Cannella JJ, Tuma DJ. Betaine administration corrects ethanol-induced defective VLDL secretion. Mol Cell Biochem. juill 2009;327(1‑2):75‑8.

Kim S-H, Naisbitt DJ. Update on Advances in Research on Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury. Allergy Asthma Immunol Res. 2016;8(1):3.

Knowles SR, Uetrecht J, Shear NH. Idiosyncratic drug reactions: the reactive metabolite syndromes. The Lancet. nov 2000;356(9241):1587‑91.

Köck K, Brouwer KLR. A Perspective on Efflux Transport Proteins in the Liver. Clin Pharmacol Ther. nov 2012;92(5):599‑612.

Kruglov EA, Correa PRAV, Arora G, Yu J, Nathanson MH, Dranoff JA. Molecular basis for calcium signaling in hepatic stellate cells. Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol. avr 2007;292(4):G975‑82.

Kuemmerle-Deschner JB. CAPS — pathogenesis, presentation and treatment of an autoinflammatory disease. Semin Immunopathol. juill 2015;37(4):377‑85.

Kupka D, Sibbing D. P2Y $_{12}$ receptor inhibitors: an evolution in drug design to prevent arterial thrombosis. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 4 mars 2018;14(3):303‑15.

Lafortune M, Denys A, Sauvanet A, Schmidt S. Anatomie du foie : ce qu'il faut savoir. J Radiol. juill 2007;88(7-8-C2):1020‑35.

Lakehal F, Dansette PM, Becquemont L, Lasnier E, Delelo R, Balladur P, et al. Indirect Cytotoxicity of Flucloxacillin toward Human Biliary Epithelium via Metabolite Formation in Hepatocytes. Chem Res Toxicol. juin 2001;14(6):694‑701.

Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, Thummel KE. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. Adv Drug Deliv Rev. nov 2002;54(10):1271‑94.

Lamkanfi M, Dixit VM. Inflammasomes and Their Roles in Health and Disease. Annu Rev Cell Dev Biol. 10 nov 2012;28(1):137‑61.

Lapierre P, Alvarez F. Le foie : un organe du système immunitaire ? médecine/sciences. nov 2007;23(11):985‑90.

Larrey D. Hepatotoxicity of herbal remedies. J Hepatol. janv 1997;26:47‑51.

Larrey D. Drug-induced liver diseases. J Hepatol. janv 2000;32:77‑88.

Larrey D. Foie, médicaments et agents chimiques. Gastroentérologie Clin Biol. déc 2009;33(12):1136‑46.

Laurent V, Glaise D, Nübel T, Gilot D, Corlu A, Loyer P. Highly Efficient SiRNA and Gene Transfer into Hepatocyte-Like HepaRG Cells and Primary Human Hepatocytes: New Means for Drug Metabolism and Toxicity Studies. In: Phillips IR, Shephard EA, Ortiz de Montellano PR, éditeurs. Cytochrome P450 Protocols [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2013 [cité 6 juill 2020]. p. 295‑314. (Methods in Molecular Biology; vol. 987). Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-321-3_25

Lauterburg BH, Velez ME. Glutathione deficiency in alcoholics: risk factor for paracetamol hepatotoxicity. Gut. 1 sept 1988;29(9):1153‑7.

Le Couteur DG, McLean AJ. The Aging Liver: Drug Clearance and an Oxygen Diffusion Barrier Hypothesis. Clin Pharmacokinet. 1998;34(5):359‑73.

Le Daré B, Allard S, Bouvet R, Baert A, Allard P-M, Morel I, et al. A case of fatal acebutolol poisoning: an illustration of the potential of molecular networking. Int J Legal Med [Internet]. 17 avr 2019a [cité 28 juin 2019]; Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/s00414-019-02062-9

Le Daré B, Lagente V, Gicquel T. Ethanol and its metabolites: update on toxicity, benefits, and focus on immunomodulatory effects. Drug Metab Rev. 2 oct 2019b;51(4):545‑61.

Le Guillou D, Bucher S, Begriche K, Hoët D, Lombès A, Labbe G, et al. Drug-Induced Alterations of Mitochondrial DNA Homeostasis in Steatotic and Nonsteatotic HepaRG Cells. J Pharmacol Exp Ther. juin 2018;365(3):711‑26.

Lecut C, Frederix K, Johnson DM, Deroanne C, Thiry M, Faccinetto C, et al. P2X1 Ion Channels Promote Neutrophil Chemotaxis through Rho Kinase Activation. J Immunol. 15 août 2009;183(4):2801‑9.

Lee G-S, Subramanian N, Kim AI, Aksentijevich I, Goldbach-Mansky R, Sacks DB, et al. The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca2+ and cAMP. Nature. déc 2012;492(7427):123‑7.

Lee WM, Squires RH, Nyberg SL, Doo E, Hoofnagle JH. Acute liver failure: Summary of a workshop. Hepatology. 19 déc 2007;47(4):1401‑15.

Leise MD, Poterucha JJ, Talwalkar JA. Drug-Induced Liver Injury. Mayo Clin Proc. janv 2014;89(1):95‑106.

Leist M, Single B, Castoldi AF, Kühnle S, Nicotera P. Intracellular Adenosine Triphosphate (ATP) Concentration: A Switch in the Decision Between Apoptosis and Necrosis. J Exp Med. 21 avr 1997;185(8):1481‑6.

Lemasters JJ, Qian T, Bradham CA, Brenner DA, Cascio WE, Trost LC, et al. Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death. J Bioenerg Biomembr. août 1999;31(4):305‑19.

Letschert K, Faulstich H, Keller D, Keppler D. Molecular Characterization and Inhibition of Amanitin Uptake into Human Hepatocytes. Toxicol Sci. 1 mai 2006;91(1):140‑9.

Leu JI-J, George DL. Hepatic IGFBP1 is a prosurvival factor that binds to BAK, protects the liver from apoptosis, and antagonizes the proapoptotic actions of p53 at mitochondria. Genes Dev. 1 déc 2007;21(23):3095‑109.

Lewis JJ. THE RAUWOLFIA ALKALOIDS. J Pharm Pharmacol. sept 1956;8(1):465‑94.

Li X, Jin Q, Zhang Y, Wu Y-L, Jin C-M, Cui B-W, et al. Inhibition of P2X7R–NLRP3 Inflammasome Activation by *Pleurotus citrinopileatus* : A Possible Protective Role in Alcoholic Hepatosteatosis. J Agric Food Chem. 19 déc 2018;66(50):13183‑90.

Lieber CS. Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. Alcohol. août 2004;34(1):9‑19.

Lin CC, Potter JJ, Mezey E. Erythrocyte aldehyde dehydrogenase activity in alcoholism. Alcohol Clin Exp Res. déc 1984;8(6):539‑41.

Liu Y-T, Hao H-P, Liu C-X, Wang G-J, Xie H-G. Drugs as CYP3A Probes, Inducers, and Inhibitors. Drug Metab Rev. janv 2007;39(4):699‑721.

Liu Z-X, Kaplowitz N. Immune-mediated drug-induced liver disease. Clin Liver Dis. août 2002;6(3):755‑74.

Ljungman M, Zhang F, Chen F, Rainbow AJ, McKay BC. Inhibition of RNA polymerase II as a trigger for the p53 response. Oncogene. janv 1999;18(3):583‑92.

Logsdon JE. Ethanol. In: John Wiley & Sons, Inc., éditeur. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2004 [cité 27 juill 2018]. Disponible sur: http://doi.wiley.com/10.1002/0471238961.0520080112150719.a01.pub2

Logue SE, Martin SJ. Caspase activation cascades in apoptosis. Biochem Soc Trans. 1 févr 2008;36(1):1‑9.

Lu Y, Cederbaum AI. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. Free Radic Biol Med. mars 2008;44(5):723‑38.

Magdalan J, Ostrowska A, Piotrowska A, Gomułkiewicz A, Szeląg A, Dzięgiel P. Comparative antidotal efficacy of benzylpenicillin, ceftazidime and rifamycin in cultured human hepatocytes intoxicated with α-amanitin. Arch Toxicol. déc 2009;83(12):1091‑6.

Magdalan J, Ostrowska A, Piotrowska A, Izykowska I, Nowak M, Gomułkiewicz A, et al. alpha-Amanitin induced apoptosis in primary cultured dog hepatocytes. Folia Histochem Cytobiol [Internet]. 10 juin 2010 [cité 24 janv 2020];48(1). Disponible sur: http://czasopisma.viamedica.pl/fhc/article/view/4264

Magdalan J, Piotrowska A, GomuŁkiewicz A, Sozański T, Podhorska-OkoŁów M, Szeląg A, et al. Benzylpenicyllin and acetylcysteine protection from α-amanitin-induced apoptosis in human hepatocyte cultures. Exp Toxicol Pathol. mai 2011a;63(4):311‑5.

Magdalan J, Piotrowska A, Gomułkiewicz A, Sozański T, Szeląg A, Dziegięl P. Influence of commonly used clinical antidotes on antioxidant systems in human hepatocyte culture intoxicated with α-amanitin. Hum Exp Toxicol. janv 2011b;30(1):38‑43.

Malhi H, Gores GJ. Cellular and Molecular Mechanisms of Liver Injury. Gastroenterology. mai 2008;134(6):1641‑54.

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends Immunol. déc 2004;25(12):677‑86.

Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. Nature. mars 2006;440(7081):228‑32.

Martínez GJ, Celermajer DS, Patel S. Corrigendum to: "The NLRP3 inflammasome and the emerging role of colchicine to inhibit atherosclerosis-associated inflammation" [Atherosclerosis. 2018 Feb;269:262–271]. Atherosclerosis. juin 2018;273:157.

Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. Mol Cell. août 2002;10(2):417‑26.

Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The Inflammasomes: Guardians of the Body. Annu Rev Immunol. avr 2009;27(1):229‑65.

Massicot F, Hache G, David L, Chen D, Leuxe C, Garnier-Legrand L, et al. P2X7 Cell Death Receptor Activation and Mitochondrial Impairment in Oxaliplatin-Induced Apoptosis and Neuronal Injury: Cellular Mechanisms and In Vivo Approach. Mukhopadhyay P, éditeur. PLoS ONE. 27 juin 2013;8(6):e66830.

McLaughlin LA, Paine MJI, Kemp CA, Maréchal J-D, Flanagan JU, Ward CJ, et al. Why Is Quinidine an Inhibitor of Cytochrome P450 2D6?: The Role Of Key Active-Site Residues In Quinidine Binding. J Biol Chem. 18 nov 2005;280(46):38617‑24.

Meech R, Hu DG, McKinnon RA, Mubarokah SN, Haines AZ, Nair PC, et al. The UDP-Glycosyltransferase (UGT) Superfamily: New Members, New Functions, and Novel Paradigms. Physiol Rev. 1 avr 2019;99(2):1153‑222.

Megarbane B, Deye N, Baud F. Foie toxique : mécanismes lésionnels et thérapeutiques pharmacologiques spécifiques. Réanimation. nov 2007;16(7‑8):632‑42.

Meldolesi J, Pelosi G, Brunelli A, Genovese E. Electron microscopic studies on the effects of amanitin in mice: liver and heart lesions. Virchows Arch Für Pathol Anat Physiol Für Klin Med. 1967;342(3):221‑35.

Meng G, Zhang F, Fuss I, Kitani A, Strober W. A Mutation in the Nlrp3 Gene Causing Inflammasome Hyperactivation Potentiates Th17 Cell-Dominant Immune Responses. Immunity. juin 2009;30(6):860‑74.

Menu P, Vince JE. The NLRP3 inflammasome in health and disease: the good, the bad and the ugly: Inflammasomes: the good, the bad and the ugly. Clin Exp Immunol. oct 2011;166(1):1‑15.

Metzger MW, Walser SM, Aprile-Garcia F, Dedic N, Chen A, Holsboer F, et al. Genetically dissecting P2rx7 expression within the central nervous system using conditional humanized mice. Purinergic Signal. juin 2017;13(2):153‑70.

Miao EA, Rajan JV, Aderem A. Caspase-1-induced pyroptotic cell death: Caspase-1-induced pyroptotic cell death. Immunol Rev. sept 2011;243(1):206‑14.

Michaut A, Le Guillou D, Moreau C, Bucher S, McGill MR, Martinais S, et al. A cellular model to study drug-induced liver injury in nonalcoholic fatty liver disease: Application to acetaminophen. Toxicol Appl Pharmacol. févr 2016;292:40‑55.

Mills GA, Ecklund EE. Alcohols as Components of Transportation Fuels. Annu Rev Energy. nov 1987;12(1):47‑80.

Miras-Portugal MT, Sebastián-Serrano Á, de Diego García L, Díaz-Hernández M. Neuronal P2X7 Receptor: Involvement in Neuronal Physiology and Pathology. J Neurosci. 26 juill 2017;37(30):7063‑72.

Monif M, Burnstock G, Williams DA. Microglia: Proliferation and activation driven by the P2X7 receptor. Int J Biochem Cell Biol. nov 2010;42(11):1753‑6.

Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. Nat Rev Immunol. déc 2008;8(12):958‑69.

Müller T, Fay S, Vieira RP, Karmouty-Quintana H, Cicko S, Ayata CK, et al. P2Y6 Receptor Activation Promotes Inflammation and Tissue Remodeling in Pulmonary Fibrosis. Front Immunol [Internet]. 22 août 2017 [cité 19 juill 2018];8. Disponible sur: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.01028/full

Murakami T, Ockinger J, Yu J, Byles V, McColl A, Hofer AM, et al. Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. Proc Natl Acad Sci. 10 juill 2012;109(28):11282‑7.

Muta K, Fukami T, Nakajima M. A proposed mechanism for the adverse effects of acebutolol: CES2 and CYP2C19-mediated metabolism and antinuclear antibody production. Biochem Pharmacol. déc 2015;98(4):659‑70.

Mydlík M, Derzsiová K. Liver and kidney damage in acute poisonings. In 2006.

Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VAK, Lee S-J, Dolinay T, Lam HC, et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. Nat Immunol. mars 2011;12(3):222‑30.

Nakamura M, Imanaka T, Sakamoto A. Diquafosol Ophthalmic Solution for Dry Eye Treatment. Adv Ther. juill 2012;29(7):579‑89.

Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, Joosten LAB, Opitz B, van der Meer JHM, et al. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1β in monocytes and macrophages. Blood. 5 mars 2009;113(10):2324‑35.

Netea MG, van de Veerdonk FL, van der Meer JWM, Dinarello CA, Joosten LAB. Inflammasome-Independent Regulation of IL-1-Family Cytokines. Annu Rev Immunol. 21 mars 2015;33(1):49‑77.

Neves AR, Castelo-Branco MTL, Figliuolo VR, Bernardazzi C, Buongusto F, Yoshimoto A, et al. Overexpression of ATP-activated P2X7 Receptors in the Intestinal Mucosa Is Implicated in the Pathogenesis of Crohn's Disease: Inflamm Bowel Dis. mars 2014;20(3):444‑57.

Nicke A, Kerschensteiner D, Soto F. Biochemical and functional evidence for heteromeric assembly of P2X1 and P2X4 subunits. J Neurochem. févr 2005;92(4):925‑33.

Niwa T, Imagawa Y, Yamazaki H. Drug Interactions between Nine Antifungal Agents and Drugs Metabolized by Human Cytochromes P450. Curr Drug Metab. 26 janv 2015;15(7):651‑79.

Nurmi K, Virkanen J, Rajamäki K, Niemi K, Kovanen PT, Eklund KK. Ethanol Inhibits Activation of NLRP3 and AIM2 Inflammasomes in Human Macrophages–A Novel Anti-Inflammatory Action of Alcohol. Catapano A, éditeur. PLoS ONE. 11 nov 2013;8(11):e78537.

Oakley A. Glutathione transferases: a structural perspective. Drug Metab Rev. mai 2011;43(2):138‑51.

Omiecinski CJ, Vanden Heuvel JP, Perdew GH, Peters JM. Xenobiotic Metabolism, Disposition, and Regulation by Receptors: From Biochemical Phenomenon to Predictors of Major Toxicities. Toxicol Sci. 1 mars 2011;120(Supplement 1):S49‑75.

Osna NA, Donohue TM, Kharbanda KK. Alcoholic Liver Disease: Pathogenesis and Current Management. Alcohol Res Curr Rev. 2017;38(2):147‑61.

Parvathenani LK, Tertyshnikova S, Greco CR, Roberts SB, Robertson B, Posmantur R. P2X $_7$ Mediates Superoxide Production in Primary Microglia and Is Up-regulated in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. J Biol Chem. 11 avr 2003;278(15):13309‑17.

Patel V, Sanyal AJ. Drug-Induced Steatohepatitis. Clin Liver Dis. nov 2013;17(4):533‑46.

Paton A. Alcohol in the body. BMJ. 8 janv 2005;330(7482):85‑7.

Perera AP, Fernando R, Shinde T, Gundamaraju R, Southam B, Sohal SS, et al. MCC950, a specific small molecule inhibitor of NLRP3 inflammasome attenuates colonic inflammation in spontaneous colitis mice. Sci Rep [Internet]. déc 2018 [cité 19 juill 2018];8(1). Disponible sur: http://www.nature.com/articles/s41598-018-26775-w

Pessayre D. Mécanismes des hépatites médicamenteuses. MS Médecine Sci Rev Pap ISSN 0767-0974 1986 Vol 2 N° 7 P373-379 [Internet]. 1986 [cité 14 mai 2020]; Disponible sur: http://www.ipubli.inserm.fr/handle/10608/3534

Pétrilli V, Papin S, Dostert C, Mayor A, Martinon F, Tschopp J. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. Cell Death Differ. sept 2007;14(9):1583‑9.

Petrov P, Sekeris C. Early action of ?-amanitin on extranucleolar ribonucleoproteins, as revealed by electron microscopic observation. Exp Cell Res. déc 1971;69(2):393‑401.

Petzinger E, Geyer J. Drug transporters in pharmacokinetics. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. mars 2006;372(6):465‑75.

Qian F, Xiao J, Hu B, Sun N, Yin W, Zhu J. High expression of P2X7R is an independent postoperative indicator of poor prognosis in colorectal cancer. Hum Pathol. juin 2017;64:61‑8.

Qiu Y, Li W, Zhang H, Liu Y, Tian X-X, Fang W-G. P2X7 Mediates ATP-Driven Invasiveness in Prostate Cancer Cells. Kanellopoulos J, éditeur. PLoS ONE. 8 déc 2014;9(12):e114371.

Quesnot N, Bucher S, Gade C, Vlach M, Vene E, Valença S, et al. Production of chlorzoxazone glucuronides via cytochrome P4502E1 dependent and independent pathways in human hepatocytes. Arch Toxicol. oct 2018;92(10):3077‑91.

Quinn RA, Nothias L-F, Vining O, Meehan M, Esquenazi E, Dorrestein PC. Molecular Networking As a Drug Discovery, Drug Metabolism, and Precision Medicine Strategy. Trends Pharmacol Sci. févr 2017;38(2):143‑54.

Rabolli V, Badissi AA, Devosse R, Uwambayinema F, Yakoub Y, Palmai-Pallag M, et al. The alarmin IL-1α is a master cytokine in acute lung inflammation induced by silica micro- and nanoparticles. Part Fibre Toxicol [Internet]. déc 2014 [cité 23 oct 2020];11(1). Disponible sur: http://particleandfibretoxicology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12989-014-0069-x

Rakibe U, Tiwari R, Mahajan A, Rane V, Wakte P. LC and LC–MS/MS studies for the identification and characterization of degradation products of acebutolol. J Pharm Anal. déc 2018;8(6):357‑65.

Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. Pharmacol Rev. sept 1998;50(3):413‑92.

Regnault J-P. Microbiologie générale – Vol.1. Edition Vigot;

Rider P, Carmi Y, Voronov E, Apte RN. Interleukin-1α. Semin Immunol. déc 2013;25(6):430‑8.

Rissiek B, Haag F, Boyer O, Koch-Nolte F, Adriouch S. P2X7 on Mouse T Cells: One Channel, Many Functions. Front Immunol [Internet]. 19 mai 2015 [cité 26 juill 2018];6. Disponible sur: http://www.frontiersin.org/Inflammation/10.3389/fimmu.2015.00204/abstract

Riteau N, Gasse P, Fauconnier L, Gombault A, Couegnat M, Fick L, et al. Extracellular ATP Is a Danger Signal Activating P2X $_7$ Receptor in Lung Inflammation and Fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 15 sept 2010;182(6):774‑83.

Rossi L, Salvestrini V, Ferrari D, Di Virgilio F, Lemoli RM. The sixth sense: hematopoietic stem cells detect danger through purinergic signaling. Blood. 20 sept 2012;120(12):2365‑75.

Rossol M, Pierer M, Raulien N, Quandt D, Meusch U, Rothe K, et al. Extracellular Ca2+ is a danger signal activating the NLRP3 inflammasome through G protein-coupled calcium sensing receptors. Nat Commun [Internet]. janv 2012 [cité 17 juill 2018];3(1). Disponible sur: http://www.nature.com/articles/ncomms2339

Russmann S, Kullak-Ublick G, Grattagliano I. Current Concepts of Mechanisms in Drug-Induced Hepatotoxicity. Curr Med Chem. 1 août 2009;16(23):3041‑53.

Sakaki H, Fujiwaki T, Tsukimoto M, Kawano A, Harada H, Kojima S. P2X4 receptor regulates P2X7 receptor-dependent IL-1β and IL-18 release in mouse bone marrow-derived dendritic cells. Biochem Biophys Res Commun. mars 2013;432(3):406‑11.

Santos AA, Cappellari AR, de Marchi FO, Gehring MP, Zaparte A, Brandão CA, et al. Potential role of P2X7R in esophageal squamous cell carcinoma proliferation. Purinergic Signal. sept 2017;13(3):279‑92.

Schattgen SA, Fitzgerald KA. The PYHIN protein family as mediators of host defenses: PYHIN/p200 family in innate immunity. Immunol Rev. sept 2011;243(1):109‑18.

Schiodt FV, Lee WM, Bondesen S, Ott P, Christensen E. Influence of acute and chronic alcohol intake on the clinical course and outcome in acetaminophen overdose. Aliment Pharmacol Ther. avr 2002;16(4):707‑15.

Schlichter R. Les récepteurs P2X de l'ATP dans les neurones du système nociceptif spinal : rôle dans les douleurs neuropathiques. Douleurs Eval - Diagn - Trait. juin 2008;9(3):127‑33.

Schroder K, Tschopp J. The Inflammasomes. Cell. mars 2010;140(6):821‑32.

Schuetz JD, Beach DL, Guzelian PS. Selective expression of cytochrome P450 CYP3A mRNAs in embryonic and adult human liver: Pharmacogenetics. févr 1994;4(1):11‑20.

Schymanski EL, Jeon J, Gulde R, Fenner K, Ruff M, Singer HP, et al. Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. Environ Sci Technol. 18 févr 2014;48(4):2097‑8.

Seeland S, Kettiger H, Murphy M, Treiber A, Giller J, Kiss A, et al. ATP-induced cellular stress and mitochondrial toxicity in cells expressing purinergic P2X7 receptor. Pharmacol Res Perspect. mars 2015;3(2):e00123.

Séguin B, Uetrecht J. The danger hypothesis applied to idiosyncratic drug reactions. Curr Opin Allergy Clin Immunol. août 2003;3(4):235‑42.

Seil M, El Ouaaliti M, Fontanils U, Etxebarria IG, Pochet S, Dal Moro G, et al. Ivermectin-dependent release of IL-1beta in response to ATP by peritoneal macrophages from P2X7-KO mice. Purinergic Signal. déc 2010;6(4):405‑16.

Sergent O. Role for Membrane Fluidity in Ethanol-Induced Oxidative Stress of Primary Rat Hepatocytes. J Pharmacol Exp Ther. 10 nov 2004;313(1):104‑11.

Shang Y, Li X-F, Jin M-J, Li Y, Wu Y-L, Jin Q, et al. Leucodin attenuates inflammatory response in macrophages and lipid accumulation in steatotic hepatocytes via P2x7 receptor pathway: A potential role in alcoholic liver disease. Biomed Pharmacother. nov 2018;107:374‑81.

Shannon P. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. Genome Res. 1 nov 2003;13(11):2498‑504.

Shcherbatko A, Foletti D, Poulsen K, Strop P, Zhu G, Hasa-Moreno A, et al. Modulation of P2X3 and P2X2/3 Receptors by Monoclonal Antibodies. J Biol Chem. 3 juin 2016;291(23):12254‑70.

Shimada K, Crother TR, Karlin J, Chen S, Chiba N, Ramanujan VK, et al. Caspase-1 Dependent IL-1β Secretion Is Critical for Host Defense in a Mouse Model of Chlamydia pneumoniae Lung Infection. Häcker G, éditeur. PLoS ONE. 23 juin 2011;6(6):e21477.

Shimada K, Crother TR, Karlin J, Dagvadorj J, Chiba N, Chen S, et al. Oxidized Mitochondrial DNA Activates the NLRP3 Inflammasome during Apoptosis. Immunity. mars 2012;36(3):401‑14.

Sims JE, Smith DE. The IL-1 family: regulators of immunity. Nat Rev Immunol. févr 2010;10(2):89‑102.

Sinno-Tellier S, Greillet C, Bruneau C. Surveillance nationale des intoxications accidentelles par des champignons : bilan des cas rapportés au réseau des centres antipoison de 2010 à 2017. Toxicol Anal Clin. sept 2018;30(3):159.

Smith DA, Di L, Kerns EH. The effect of plasma protein binding on in vivo efficacy: misconceptions in drug discovery. Nat Rev Drug Discov. déc 2010;9(12):929‑39.

Smith G, Stubbins MJ, Harries LW, Wolf CR. Molecular genetics of the human cytochrome P450 monooxygenase superfamily. Xenobiotica. janv 1998;28(12):1129‑65.

Song B-J. Ethanol Induces CYP2E1 by Protein Stabilization. J Biol Chem. 15 déc 1995;270(50):29632‑5.

Spahn-Langguth H, Benet LZ. Acyl glucuronides revisited: is the glucuronidation process a toxification as well as a detoxification mechanism? Drug Metab Rev. 1992;24(1):5‑47.

Spielberg SP, Gordon GB, Blake DA, Goldstein DA, Herlong HF. Predisposition to Phenytoin Hepatotoxicity Assessed in Vitro. N Engl J Med. 24 sept 1981;305(13):722‑7.

Stack J, Ryan J, McCarthy G. Colchicine: New Insights to an Old Drug. Am J Ther. 2015;22(5):e151‑7.

Stenvall A, Larsson E, Strand S-E, Jönsson B-A. A small-scale anatomical dosimetry model of the liver. Phys Med Biol. 7 juill 2014;59(13):3353‑71.

Stickel F, Patsenker E, Schuppan D. Herbal hepatotoxicity. J Hepatol. nov 2005;43(5):901‑10.

Su Q, Tian Y, Liu Z, Ci L, Lv X. Purinergic P2X7 receptor blockade mitigates alcohol-induced steatohepatitis and intestinal injury by regulating MEK1/2-ERK1/2 signaling and egr-1 activity. Int Immunopharmacol. janv 2019;66:52‑61.

Suiko M, Kurogi K, Hashiguchi T, Sakakibara Y, Liu M-C. Updated perspectives on the cytosolic sulfotransferases (SULTs) and SULT-mediated sulfation. Biosci Biotechnol Biochem. 2 janv 2017;81(1):63‑72.

Surprenant A, North RA. Signaling at Purinergic P2X Receptors. Annu Rev Physiol. mars 2009;71(1):333‑59.

Sutterwala FS, Haasken S, Cassel SL. Mechanism of NLRP3 inflammasome activation: Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. Ann N Y Acad Sci. juin 2014;1319(1):82‑95.

Suurväli J, Boudinot P, Kanellopoulos J, Rüütel Boudinot S. P2X4: A fast and sensitive purinergic receptor. Biomed J. oct 2017;40(5):245‑56.

Sweetman S. Martindale: The Complete Drug Reference, thirty-seventh ed., Pharmaceutical Press, London. 2011.

Tan C, Han L, Zou L, Luo C, Liu A, Sheng X, et al. Expression of P2X7R in breast cancer tissue and the induction of apoptosis by the gene-specific shRNA in MCF-7 cells. Exp Ther Med. oct 2015;10(4):1472‑8.

Tavassoli M, Afshari A, Arsene AL, Mégarbane B, Dumanov J, Paoliello MMB, et al. Toxicological profile of Amanita virosa – A narrative review. Toxicol Rep. 2019;6:143‑50.

Teli MR, Day CP, James OFW, Burt AD, Bennett MK. Determinants of progression to cirrhosis or fibrosis in pure alcoholic fatty liver. The Lancet. oct 1995;346(8981):987‑90.

Testa B, Clement B. Biotransformation Reactions and their Enzymes. In: The Practice of Medicinal Chemistry [Internet]. Elsevier; 2015 [cité 28 janv 2020]. p. 561‑84. Disponible sur: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124172050000249

Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1βprocessing in monocytes. Nature. avr 1992;356(6372):768‑74.

Tiemi Shio M, Eisenbarth SC, Savaria M, Vinet AF, Bellemare M-J, Harder KW, et al. Malarial Hemozoin Activates the NLRP3 Inflammasome through Lyn and Syk Kinases. Kazura JW, éditeur. PLoS Pathog. 21 août 2009;5(8):e1000559.

Ting JP-Y, Lovering RC, Alnemri ES, Bertin J, Boss JM, Davis BK, et al. The NLR Gene Family: A Standard Nomenclature. Immunity. mars 2008;28(3):285‑7.

Touloukian J, Kaplowitz N. Halothane-induced hepatic disease. Semin Liver Dis. mai 1981;1(2):134‑42.

Uetrecht J. Immunoallergic Drug-Induced Liver Injury in Humans. Semin Liver Dis. nov 2009;29(04):383‑92.

Vanbinst R, Koenig J, Di Fazio V, Hassoun A. Bile analysis of drugs in postmortem cases. Forensic Sci Int. août 2002;128(1‑2):35‑40.

Vasiliou V, Pappa A. Polymorphisms of Human Aldehyde Dehydrogenases. Pharmacology. 2000;61(3):192‑8.

Vaughn BP, Robson SC, Burnstock G. Pathological roles of purinergic signaling in the liver. J Hepatol. oct 2012;57(4):916‑20.

Verbeeck RK. Pharmacokinetics and dosage adjustment in patients with hepatic dysfunction. Eur J Clin Pharmacol. déc 2008;64(12):1147‑61.

Verma S, Thuluvath PJ. Complementary and Alternative Medicine in Hepatology: Review of the Evidence of Efficacy. Clin Gastroenterol Hepatol. avr 2007;5(4):408‑16.

Vetter J. Toxins of Amanita phalloides. Toxicon. janv 1998;36(1):13‑24.

Walton J. The Cyclic Peptide Toxins of Amanita and Other Poisonous Mushrooms [Internet]. Springer International Publishing; 2018 [cité 31 janv 2020]. Disponible sur: https://www.springer.com/gp/book/9783319768212

Wan P, Liu X, Xiong Y, Ren Y, Chen J, Lu N, et al. Extracellular ATP mediates inflammatory responses in colitis via P2 × 7 receptor signaling. Sci Rep [Internet]. mai 2016 [cité 30 juill 2018];6(1). Disponible sur: http://www.nature.com/articles/srep19108

Wang M, Carver JJ, Phelan VV, Sanchez LM, Garg N, Peng Y, et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. Nat Biotechnol. août 2016;34(8):828‑37.

Wang M, Chen Y, Guo Z, Yang C, Qi J, Fu Y, et al. Changes in the mitochondrial proteome in human hepatocytes in response to alpha-amanitin hepatotoxicity. Toxicon. déc 2018;156:34‑40.

Wang S, Xie X, Lei T, Zhang K, Lai B, Zhang Z, et al. Statins Attenuate Activation of the NLRP3 Inflammasome by Oxidized LDL or TNF α in Vascular Endothelial Cells through a PXR-Dependent Mechanism. Mol Pharmacol. sept 2017;92(3):256‑64.

Wei X, Shi X, Zhong W, Zhao Y, Tang Y, Sun W, et al. Chronic Alcohol Exposure Disturbs Lipid Homeostasis at the Adipose Tissue-Liver Axis in Mice: Analysis of Triacylglycerols Using High-Resolution Mass Spectrometry in Combination with In Vivo Metabolite Deuterium Labeling. Mukhopadhyay P, éditeur. PLoS ONE. 6 févr 2013;8(2):e55382.

Weisman GA, Ajit D, Garrad R, Peterson TS, Woods LT, Thebeau C, et al. Neuroprotective roles of the P2Y2 receptor. Purinergic Signal. sept 2012;8(3):559‑78.

Wellington K, Jarvis B. Silymarin: A Review of its Clinical Properties in the Management of Hepatic Disorders: BioDrugs. 2001;15(7):465‑89.

Wells PG, Mackenzie PI, Roy Chowdhury J, Guillemette C, Gregory PA, Ishii Y, et al. GLUCURONIDATION AND THE UDP-GLUCURONOSYLTRANSFERASES IN HEALTH AND DISEASE. Drug Metab Dispos. mars 2004;32(3):281‑90.

Wen H, Gris D, Lei Y, Jha S, Zhang L, Huang MT-H, et al. Fatty acid–induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. Nat Immunol. mai 2011;12(5):408‑15.

Wepler W, Opitz K. Histologic changes in the liver biopsy in Amanita phalloides intoxication. Hum Pathol. janv 1972;3(2):249‑54.

Wieland T. The toxic peptides from Amanita mushrooms. Int J Pept Protein Res. 12 janv 2009;22(3):257‑76.

Wieland T, Faulstich H, Fiume L. Amatoxins, Phallotoxins, Phallolysin, and Antamanide: The Biologically Active Components of Poisonous *Amanita* Mushroom. CRC Crit Rev Biochem. janv 1978;5(3):185‑260.

Wimer W, Russel J, Kaplan H. Alcohols toxicology. Park Ridg : Noyes Data Corp; 1983.

Wiśniewski JR, Vildhede A, Norén A, Artursson P. In-depth quantitative analysis and comparison of the human hepatocyte and hepatoma cell line HepG2 proteomes. J Proteomics. mars 2016;136:234‑47.

Woods LT, Ajit D, Camden JM, Erb L, Weisman GA. Purinergic receptors as potential therapeutic targets in Alzheimer's disease. Neuropharmacology. mai 2016;104:169‑79.

World Health Organization. Global status report on alcohol and health [Internet]. 2011 [cité 22 sept 2018]. Disponible sur: http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/msbgsruprofiles.pdf

Wright WC, Chenge J, Chen T. Structural perspectives of the CYP3A family and their small molecule modulators in drug metabolism. Liver Res. déc 2019;3(3‑4):132‑42.

Wrighton SA, VandenBranden M, Ring BJ. The human drug metabolizing cytochromes P450. J Pharmacokinet Biopharm. oct 1996;24(5):461‑73.

Xu X, Yin D, Ren H, Gao W, Li F, Sun D, et al. Selective NLRP3 inflammasome inhibitor reduces neuroinflammation and improves long-term neurological outcomes in a murine model of traumatic brain injury. Neurobiol Dis. sept 2018;117:15‑27.

Ye Y, Liu Z. Management of Amanita phalloides poisoning: A literature review and update. J Crit Care. août 2018;46:17‑22.

Yegutkin GG, Guerrero-Toro C, Kilinc E, Koroleva K, Ishchenko Y, Abushik P, et al. Nucleotide homeostasis and purinergic nociceptive signaling in rat meninges in migraine-like conditions. Purinergic Signal. sept 2016;12(3):561‑74.

Yin J, You S, Liu H, Chen L, Zhang C, Hu H, et al. Role of P2X7R in the development and progression of pulmonary hypertension. Respir Res [Internet]. déc 2017 [cité 19 juill 2018];18(1). Disponible sur: http://respiratory-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12931-017-0603-0

Yin J, Zhao F, Chojnacki JE, Fulp J, Klein WL, Zhang S, et al. NLRP3 Inflammasome Inhibitor Ameliorates Amyloid Pathology in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. Mol Neurobiol. mars 2018;55(3):1977‑87.

Young CN, Sinadinos A, Lefebvre A, Chan P, Arkle S, Vaudry D, et al. A novel mechanism of autophagic cell death in dystrophic muscle regulated by P2RX7 receptor large-pore formation and HSP90. Autophagy. 2 janv 2015;11(1):113‑30.

Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. Pharmacol Ther. avr 2013;138(1):103‑41.

Zempo H, Sugita Y, Ogawa M, Watanabe R, Suzuki J, Isobe M. A P2X7 receptor antagonist attenuates experimental autoimmune myocarditis via suppressed myocardial CD4+ T and macrophage infiltration and NADPH oxidase 2/4 expression in mice. Heart Vessels. juill 2015;30(4):527‑33.

Zhang X, Ouyang J, Thung SN. Histopathologic Manifestations of Drug-induced Hepatotoxicity. Clin Liver Dis. nov 2013;17(4):547‑64.

Zheleva A. Phenoxyl radicals formation might contribute to severe toxicity of mushrooom toxin alpha amanitin - an electron paramagnetic resonance study. In 2013.

Zheleva A, Tolekova A, Zhelev M, Uzunova V, Platikanova M, Gadzheva V. Free radical reactions might contribute to severe alpha amanitin hepatotoxicity – A hypothesis. Med Hypotheses. janv 2007;69(2):361‑7.

Zheng Q-H. Radioligands targeting purinergic P2X7 receptor. Bioorg Med Chem Lett. juin 2020;30(12):127169.

Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. Nat Immunol. févr 2010;11(2):136‑40.

Zhou S, Allard P-M, Wolfrum C, Ke C, Tang C, Ye Y, et al. Identification of chemotypes in bitter melon by metabolomics: a plant with potential benefit for management of diabetes in traditional Chinese medicine. Metabolomics [Internet]. août 2019 [cité 9 août 2019];15(8). Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/s11306-019-1565-7

de Zoete MR, Palm NW, Zhu S, Flavell RA. Inflammasomes. Cold Spring Harb Perspect Biol. 1 déc 2014;6(12):a016287‑a016287.

ANNEXES

ANNEXE 1

Le Daré B, Gicquel T. Therapeutic Applications of Ethanol: A Review. J Pharm Pharm Sci. 2019;22(1):525-535. doi: 10.18433/jpps30572.

Therapeutic Applications of Ethanol: A Review

Brendan Le Daré[1,2], Thomas Gicquel[1,2]

[1.] Univ Rennes, INSERM, INRA, Institut NuMeCan (Nutrition, Metabolisms and Cancer) Rennes, France.
[2.] Rennes University Hospital, Forensic Toxicology Laboratory, Rennes, France.

Received, July 31, 2019; Revised, September 17, 2019; Accepted, September 31, 2019; Published, October 3, 2019.

ABSTRACT - Purpose: To review knowledge on therapeutic uses of ethanol and the latter's effectiveness and safety profiles in a range of indications. **Methods**: MEDLINE and PubMed databases were searched for relevant peer-reviewed papers published in English between 1888 and 2018 using the following search terms: ethanol, therapeutic, alcohol withdrawal syndrome, antiseptic, antidote, methanol, ethylene glycol, neurolysis, embolization, cyst, sclerosing agent, sclerotherapy, arteriovenous malformations, ablating agent. Studies providing information about association between alcohol and therapeutic indications, or mechanic explanation for the association were included for review. **Results**: According to the World Health Organization, approximately three millions deaths worldwide are attributable to alcohol consumption each year. However, the low-to-moderate consumption of ethanol has a number of beneficial effects (mainly on cardiovascular mortality and diabetes). Hence, ethanol has an unusual spectrum of effects that seems interesting for therapeutic purposes. Ethanol's risk-benefit ratio appears to be positive in some therapeutic indications such as antidote to methanol or ethylene glycol poisoning, neurolysis, alcohol withdrawal syndrome, or antiseptic. **Conclusion**: With the development of interventional radio technologies, and thus extremely precise access to anatomical structures, alcohol has been given new indications - particularly as an embolization, sclerosing or ablation agent. Moreover, constant progress in our knowledge of ethanol's pharmacodynamics might highlight other therapeutic indications for this compound in the future. Ethanol's low cost and wide availability make it a valuable therapeutic agent, compared with other reference treatments. Furthermore, ethanol has a long track record of safety and effectiveness in the indications mentioned above.

INTRODUCTION

On September 21st, 2018, the World Health Organization (WHO) published its "Global Status Report on Alcohol and Health". The report provides an overview of alcohol consumption and harm worldwide. The WHO estimated that in 2016, approximately 3 million deaths (mainly in men) were attributable to alcohol consumption - corresponding to one death every 10 seconds. Consequently, with a global population of nearly 7.36 billion people that year, alcohol consumption caused one in 20 deaths. Beside the deaths, alcohol consumption generated 132.6 million disability-adjusted life years; this makes alcohol the third greatest risk for disease and disability. Deaths attributable to alcohol consumption were divided into three categories by the WHO: infectious disease, non-communicable disease, and injuries. In 2016, these categories respectively accounted for 12.9%, 28.7% and 58.4% of the deaths attributable to alcohol [1]. It is interesting to note that ethanol increases the risk of infectious diseases (such as HIV/AIDS, tuberculosis and lower respiratory tract infections) by impairing immune responses [2–4]. This effect is compounded by other factors; for example, alcohol consumption promotes unprotected sex and thus exposes users to sexually transmitted diseases. Chronic alcohol abuse is associated with poor treatment adherence and thus contributes to the development of resistance - particularly in HIV infections [4,5]. Furthermore, alcohol is a major known risk factor in different types of injury, such as road traffic injuries, drowning, burns, poisonings, and falls [6–8]. Alcohol also promotes violent attacks, homicides, and suicides [1]. Lastly, alcohol is associated with the development and/or progression of many non-communicable diseases, including cardiovascular disease, cancer, liver disease, and mental, behavioral and neurodevelopmental disorders. These diseases account for most of the deaths ascribed to alcohol [9,10]. This toxicity is directly linked to (i) ethanol's ability to distribute itself throughout all body fluids, and (ii) the toxic-generating metabolism of ethanol.

Corresponding Author: Brendan Le Daré Univ Rennes, INSERM, INRA, Institut NuMeCan (Nutrition, Metabolisms and Cancer) F-35000 Rennes, France. E-mail: brendan.le.dare@chu-rennes.fr

Interestingly, low-to-moderate alcohol consumption is associated with beneficial health effects (summarized in Table 1). The "French paradox" is founded on this phenomenon, and several meta-analyses have evidenced an inverse correlation between low-to-moderate alcohol consumption (about to one to two units per day) and mortality from cardiovascular disease [11–13]. Similarly, a meta-analysis of data from 1,902,605 participants evidenced a peak risk reduction of developing type 2 diabetes for intakes between 10 to 14 grams of alcohol (corresponding to about a single standard drink or one units) per day in women and in non-Asian populations [14]. As was seen for the cardiovascular risk, the risk of developing type 2 diabetes became higher when consumption rose above 63 grams of alcohol per day. Some studies have suggested that the effect in these moderate consumers is due to the combination of a decrease in fasting insulin concentrations with an increase in the insulin sensitivity [15]. In 2018, a meta-analysis of data on 28 million people confirmed these results and showed a beneficial effect of low-to-moderate alcohol consumption on type 2 diabetes. However, the researchers concluded that overall mortality remains unchanged, given the increase in deaths due to other causes [16]. Recent studies have tended to show that moderate alcohol consumption has a neuroprotective action, including beneficial effects in Parkinson's disease, Alzheimer's disease, and dementia. Even though the underlying mechanisms have not been fully characterized, researchers suggest that ethanol has an anti-inflammatory effect and increases neuroplasticity [17–20]. Furthermore, low-to-moderate ethanol consumption has also been linked to lower pain levels in and the delayed onset of Meniere's disease [21,22]. For several decades, several studies reported that ethanol (one to three units of alcohol per day) had beneficial effects on bone mineral density [23,24]. This is thought to be due to the higher endogenous estrogen levels induced by ethanol [25,26]. Lastly, given alcohol's influence on the immune system (and particularly its anti-inflammatory effects), some researchers have focused on the compound's effects on autoimmune diseases. Indeed, beneficial effects have been reported; it seems that the incidences of rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and thyroid disease (both hyperthyroidism and hypothyroidism) are inversely associated with low ethanol consumption (three to 30 units per week, depending on the study) [27–34]. The underlying mechanism has not yet been identified.

Table 1. The main beneficial effects attributable to low-to-moderate consumption of ethanol

Beneficial effect	Mechanism	References
Decreased mortality from cardiovascular diseases (French paradox)	Antioxidant effect Increase in high density lipoprotein level Reduction in low density lipoprotein level	[11–13]
Decrease in the risk of developing type 2 diabetes	Decrease in fasting insulin concentrations and lower insulin sensitivity	[14,15]
Neuroprotective effect (against Parkinson's disease, Alzheimer's disease, and dementia)	Anti-inflammatory effect and increased neuroplasticity	[17–20]
Osteoporosis	Ethanol-induced high levels of endogenous estrogens	[23–26]
Antalgic effects	Central Nervous System depressant effect	[21]
Delayed onset of Meniere's disease	Unknown	[22]
Autoimmune diseases (Systemic lupus, hyperthyroidism, hypothyroidism, rheumatoid arthritis)	Unknown	[27–34]

Just as ethanol has a spectrum of harmful and beneficial effects, the compound's risk-benefit ratio appears to be favorable in some indications - making alcohol a valuable therapeutic.

In this review, MEDLINE and PubMed databases were searched for relevant papers published in English between 1888 and 2018 using the following search terms: *ethanol, therapeutic, cyst, alcohol withdrawal syndrome, antiseptic, antidote, methanol, ethylene glycol, neurolysis, embolization, sclerosing agent, ablating agent, arteriovenous malformations, sclerotherapy*. Studies providing information about association between alcohol and therapeutic indications, or mechanic explanation for the association were included for review.

THERAPEUTIC USES OF ETHANOL

Interestingly, scientists in the late 19th century regarded alcohol as a therapeutic agent [35,36]. Their knowledge of ethanol's metabolism and toxicity was summed up by Fermie in 1894 by the nuanced phrase "It can save as well as destroy". The use of alcohol was advocated empirically in indications of insomnia, fever, and cholera [36].

In the late 19th century and early 20th century, alcohol was listed in the British Pharmacopoeia (as *spiritus vini gallici*). The *Lancet* and the *British Medical Journal* respectively considered that "brandy is so universally regarded as superior to all other spirits from a medicinal point of view", [37] and " no other kind of brandy corresponds better to medical necessities than pure grape brandy " [38]. At that time, alcohol was used as a cardiac stimulant, an antipyretic, a nutritional aid, a sedative, an inhalation anesthetic, and in angina [39]. Thus, even prominent scientists, such as Pasteur, recommended the use of alcohol for health purposes (Figure 1).

In the 1920s, American physicians made great efforts to obtain the right to prescribe beer, alcohol, and other alcoholic beverages to their patients for medicinal purposes. However, the Prohibition brought in by the Eighteenth Amendment put an end to these efforts. [41].

As the pathophysiology of alcohol-related disorders became better understood and better alternatives were discovered, the therapeutic use of alcohol declined during the 20th century. In 1949, the main indication for alcohol was the prevention of delirium tremens [39]. Today, ethanol is still used in evidence-based medical practice in a number of indications (reviewed below, and summarized in Table 2).

Figure 1. Promotional label of old wine brands entitled: « *Le vin est la plus saine et la plus hygiénique des boissons* » ("*Wine is the healthiest and most hygienic drink*"). Quotation from Pasteur's book "*Etudes sur le vin*" ("*Studies on wine"*) from 1866 [40].

Table 2. The main therapeutic indications of ethanol

Indication	Mechanism	References
Antiseptic	Denaturation of cytoplasmic and membrane proteins Inhibition of nucleic acid and protein synthesis	[42,43]
Alcohol withdrawal syndrome	A gamma-aminobutyric acid agonist (sedation through inhibition of the central nervous system)	[44–48]
Antidote for methanol or ethylene glycol intoxication	A competitive substrate for alcohol dehydrogenase (ADH), blocking the toxic metabolism of methanol and ethylene glycol	[49–52]
Neurolysis	Nonselective destruction of nervous tissue through the precipitation of cell membrane proteins, lipid extraction, and demyelination, leading to Wallerian degeneration	[53–61]
Embolization	Induction of thrombosis by denaturing blood proteins, denuding the vascular wall of endothelial cells, precipitating the latter's protoplasm, and segmentally fracturing the vascular wall at the internal elastic lamina	[62–74]
Sclerosing agent	**Herniated disks** Ethanol desiccates the disk, resulting in a retraction of the aqueous nucleus and thus a reduction in intradiscal pressure **Sclerotherapy of nodules** Dehydration of epithelial cells and denaturation of cyst proteins, leading to obliteration of the cyst through coagulant necrosis, reactive fibrosis, and small vessel thrombosis	[75–82]
Ablating agent	Necrosis of parts of the heart area exposed to ethanol, abolishing the arrhythmic foci	[83–92]

Antiseptic

Today, the best-known use of ethanol in therapy is certainly its external use as a disinfectant antiseptic. Indeed, ethanol (along with isopropanol and n-propanol) is the alcohol most widely used as an antimicrobial disinfectant and antiseptic. Ethanol has a broad spectrum of action against vegetative bacteria, including mycobacteria (but not sporulating bacteria), viruses, and fungi [42]. Alcohol exerts its activity by denaturing membrane and cytoplasmic proteins, interfering with cell metabolism, and thus producing cell lysis. Unlike other antiseptics, ethanol's effectiveness is not correlated linearly with its concentration. The antimicrobial activity is optimal in the 60% to 90% range but falls off markedly below 50% [42].

The medical indications in this field mainly concern skin antisepsis and hard surface disinfection. Given the absence of residual action after evaporation, ethanol is usually combined with other antiseptics (e.g. chlorhexidine and povidone iodine) [43].

Fungal resistance to alcohols by phenotypic modulation has been described for many years, although the data on bacterial and viral resistance are reassuring [42]. However, some recent studies have suggested an increase in bacterial resistance to alcohols in recent years; in particular, the *Enterococcus faecium* strains isolated in hospitals after 2010 show an isopropanol tolerance threshold 10 times greater than that measured for older strains [93].

Alcohol withdrawal syndrome

In addition to ethanol's external use, this alcohol is commonly used internally in various indications. In France, ampoules of absolute ethanol are marketed under the trade name CURETHYL® for acute adjunct therapy during alcohol withdrawal management. Depending on the type of withdrawal syndrome, several ampoules are administered a day (at decreasing doses) [44].

Despite this marketing authorization and the use of ethanol in alcohol withdrawal management, the effectiveness of this procedure is subject to

debate in the literature [45,46]. Furthermore, inconsistent pharmacokinetics and a narrow therapeutic index mean that the routine use of this drug is not recommended by some researchers [45].

Hence, benzodiazepines are still considered to be the first-line treatment for alcohol withdrawal syndrome, due to their efficacy and safety profile [48]. In the event of resistance to benzodiazepines during the management of alcohol withdrawal, Dixit et al (2016) suggested a protocol using enteral ethanol. Fifty percent of the patient's estimated ethanol intake is administered as beer or vodka via a nasogastric tube every 4 to 6 hours for 24 hours, along with lorazepam. If the symptoms persisted, the ethanol dose was increased to 100% of the estimated daily intake. Treatment was continued for a minimum of three days, until the symptoms of alcohol withdrawal syndrome had disappeared, or for a maximum of seven days [47].

Ethanol as an antidote

Ethanol undergoes intense oxidative phase I metabolism by alcohol dehydrogenase (ADH) and cytochrome P450 2E1, which gives rise to acetaldehyde. The latter is a powerful toxin, and has many harmful effects. Ultimately, acetaldehyde is metabolized to acetate and thus eliminated by acetaldehyde dehydrogenase [94].

In cases of methanol or ethylene glycol intoxication, ethanol can be used as a competitive ADH substrate in order to significantly reduce the production of the toxic metabolites of methanol (i.e. formaldehyde) and ethylene glycol (i.e. glycolic acid and oxalic acid). The treatment goal is to maintain an ethanol level of between 1 and 1.5 g/L until the serum concentration of methanol or ethylene glycol has fallen to below 0.20 g/L [49,50].

Some researchers have compared the effectiveness of ethanol and fomepizole (the second reference treatment that act by inhibiting ADH) in combating methanol poisoning. Although ethanol is associated with a higher incidence of complications and adverse effects, no differences in clinical effectiveness were found - suggesting that ethanol is still useful in this indication [51]. Rietjens et al (2014) compared the respective advantages and disadvantages of fomepizole and ethanol in the treatment of ethylene glycol and methanol poisoning. Although fomepizole is easier to handle, ethanol is still used as a first-line antidote in some medical centers due to its low cost, ready availability, and familiarity for physicians [52].

Neurolysis

Ethanol is also indicated in chemical neurolysis for analgesic purposes and in the treatment of spasticity [53]. The main analgesic indications are the destruction of scar neuroma, the treatment of cancer pain (such as neuropathic pain caused by neoplastic invasion or of paraneoplastic origin), the treatment of various viral pain manifestations (such as shingles and post-herpetic neuralgia), and treatment-refractory chronic pain and sympathetically mediated pain [54–57]. Ethanol (typically in the 50%-100% range) is injected locally into the medullary, perimedullary or peripheral target nerve with electrostimulation guidance [54,58].

Ethanol produces the nonselective destruction of nervous tissue through precipitation of cell membrane proteins, lipid compound extraction, demyelination, and Wallerian degeneration. Ethanol injection reportedly produces an initial burning sensation along the nerve's path, followed by numbness in the same areas. Adverse effects include dysesthesia, hyperesthesia, cardiac rhythm disturbance, hypotension, skin and non-target-tissue necrosis, and central nervous system excitation. Furthermore, alcohol injections can also cause a disulfiram-like reaction if the patient is taking an ADH inhibitor [57]. In rare instances, celiac plexus neurolysis can result in paraplegia due to (i) diffusion of the neurolytic agent into arteries supplying the spinal cord, and (ii) the contraction of lumbar segmental arteries in response to ethanol and phenol [59].

Unfortunately, the effectiveness of chemical neurolysis has never been evaluated in a randomized, controlled trial. In 2001, Furlan et al. reviewed chemical neurolysis (using alcohol or phenol) for the treatment of neuropathic pain in a total of 66 patients [60]. The results were contrasting: 44% of the patients experienced meaningful pain relief, whereas 19% experienced non-meaningful relief. For the remaining 37%, poor outcome reporting prevented any conclusions from being drawn. Interestingly, some researchers have compared the effectiveness of alcohol neurolysis with that of other treatments in certain indications. In the case of splanchnic nerve neurolysis, Koyyalangunta et al (2016) compared ethanol and phenol in terms of effectiveness, complications, and the duration of a beneficial effect; there were no differences between these two compounds, suggesting that the choice of neurolytic medication can be based on the clinician's judgement and product availability [61].

Embolization

Absolute ethanol has been used as a chemoembolization agent for many years, due to its thrombotic effect. Furthermore, technical progress in interventional radiology has enabled highly selective access to many anatomical areas [62]. Guidelines on ethanol chemoembolization (a technique mainly used in Japan, despite its off-label status) were published in 2016 [63]. Ethanol induces thrombosis by denaturing blood proteins, denuding the vascular wall of endothelial cells, precipitating the latter's protoplasm, and segmentally fracturing the vascular wall at the internal elastic lamina [64]. A 5- to 30-minute balloon occlusion can be used to control the blood flow during the procedure [63]. Based on this observation, percutaneous alcohol injections have two main therapeutic indications: the treatment of arteriovenous malformations, and tumor embolization.

There are literature reports on the ethanol embolization of various arteriovenous malformations (in the kidneys, jaw, periorbital area, neck, ears and the hands), and posttraumatic or congenital fistulas, with good levels of efficacy and safety [62,65–69]. Although absolute (99%) ethanol was used in most cases, more dilute (50-70%) ethanol is required for the treatment of microfistulas [67]. In a retrospective study of complications in 175 ethanol embolization procedures (mainly in the limbs, pelvic cavity, and trunk), Do et al. reported an acceptable risk of adverse effects; there were 27 (15%) minor complications (skin injury and transient peripheral nerve injury) and 5 (3%) major complications (an infection, a case of acute renal failure, a permanent nerve injury in the arm, a brain infarct, and a case of focal bladder necrosis) [67].

In the field of oncology, ethanol embolization is used (alone or in combination with ethiodized oil or polyvinyl alcohol) to treat cases of hepatocellular carcinoma [70], renal angiomyolipoma, and carcinoma [71–73]. Alcohol causes cell dehydration, coagulation necrosis, intratumor arterial thrombosis, and thus tumor ischemia. However, the combination of percutaneous ethanol injections with chemoembolization in the treatment of liver metastases does not appear to prolong patient survival [74]. In a study of 83 cases of hepatobiliary cancer, Sofue et al. reported that right portal vein embolization prior to hepatic resection is safe and effective, and reduces the risk of postoperative liver failure [70]. In 1999, Kalman et al. reviewed 3225 cases of renal cell carcinoma embolization, and found a low level of evidence among all the publications. However, complete pre-operative renal artery embolization seems to facilitates the excision of large vein-invading tumors, and palliative embolization in non-operable tumors with serious hemorrhage appears to have been successful in most cases [73]. Lastly, ethanol's properties are of value in the treatment of recurrent malignant thyroid cancers (e.g. papillary thyroid carcinoma) for which the risk of surgical complications is too high or when the patient refuses surgery [75].

Ethanol as a sclerosing agent

In the European Union, DISCOGEL® (a radiopaque gel of 96% ethanol and micronized tungsten) is marketed as a class III medical device for the treatment of certain types of herniated disk [76]. In 2018, Sayhan et al. reported that the gel provided significant, complication-free pain relief (relative to preoperative pain levels) in 33 patients with a herniated disk up to 12 months after the procedure, and was not associated with complications [76]. The device's effectiveness has been attributed to the ethanol's desiccant action, resulting in a retraction of the disk's aqueous nucleus and thus a reduction in the intradiscal pressure.

Ethanol remains the most commonly used compound for cyst sclerotherapy, due to its availability, low cost and good tolerance. The main indications are hepatic, renal and thyroid cysts [77,78]. After aspiration of the cyst content, a volume of ethanol corresponding to 50% of the aspirated cyst's volume is injected. Ethanol's sclerosing mechanism may be due to dehydration of the epithelial cell walls and the denaturation of cyst proteins. This leads to coagulant necrosis, reactive fibrosis, small vessel thrombosis, and thus obliteration of the cyst [78]. After the injection of ethanol into the cyst, the patient is turned in different directions so that the alcohol comes into contact with the whole cyst wall. After approximatively 20 minutes, the alcohol is removed by aspiration. The patient is usually followed up for three months. The sclerosis can be repeated - especially if the cyst is large.

The efficacy and safety data on percutaneous ethanol sclerotherapy are reassuring. In cases of hepatic cysts, Moorthy et al. showed that this procedure was as effective as laparoscopic unroofing, and was associated with a lower incidence of complications [79]. In cases of renal cysts, Akinci et al.'s report on 98 single-session sclerotherapies evidenced an average cyst reduction of 93% at the end of the first year. Furthermore, 17.5% of the cysts had completely

disappeared, 90% of patients reported a reduction in flank pain, and 87.5% of the hypertensive patients became normotensive [80]. Lastly, ethanol sclerotherapy seems to be effective and safe in the treatment of benign cystic thyroid nodules, after the first use of percutaneous ethanol in this indication was reported by Edmonds et al. in 1987 [81]. In a prospective study of 15 patients with predominant cystic thyroid nodules, Jayesh et al. showed that injection of 95% ethanol into the cyst with ultrasound guidance was associated with complete disappearance of the cyst in four patients, and with a significant reduction (≥ 50% of initial volume) in the cyst volume in nine patients. The two patients who failed to show a significant reduction in cyst volume had nodules ≥ 20 mL. Even though no complications were attributable to ethanol injection during the study's three-months follow-up period, mild transient pain or a burning sensation at the injection site may be experienced following sclerotherapy [78]. In some cases of thyroid nodules, ethanol ablation has been coupled with radiofrequency ablation - thus increasing the procedure's effectiveness [82].

Ethanol as an ablating agent in cardiology

Although radiofrequency catheter ablation remains the primary treatment for cardiac arrhythmias, alcohol ablation of the coronary artery seems to be a valuable alternative when the first-line treatment fails [83]. The first septal branch ablation techniques in humans appeared in 1994, and were used to treat New York Heart Association Functional Classification stage III or IV obstructive hypertrophic cardiomyopathy under echocardiographic guidance [84]. The volumes of ethanol currently used (1-2 mL) are lower than those used for embolization, and are infused over 30 to 60 seconds to avoid atrioventricular block. A balloon catheter is also kept inflated for at least 5 minutes, in order to prolong contact with the alcohol [85,86].

The main indications for alcohol found in the literature are ablation of ventricular tachycardia [87–89], ventricular fibrillation [90], and atrial fibrillation [91]. The success of these procedures are attributed to necrosis of the area of the heart area exposed to ethanol, and thus abolition of the arrhythmic foci. Accordingly, ethanol ablation is an excellent treatment option for arrhythmic foci located at deep myocardial sites, and those refractory to endocardial and epicardial ablation [83]. Although complications following ethanol ablations seem to be rare, some studies have reported a risk of atrioventricular block when the septal artery is targeted - requiring permanent pacemaker implantation in up to one third of patients [92].

CONCLUSION

Since ethanol's toxicity is closely related to its oxidative metabolism, the severity of intoxication is also closely correlated with the amount of alcohol consumed. Given that therapeutic applications of alcohol involve small amounts, the reported safety profile is good. Furthermore, the duration of exposure is relatively short, and so the chronic toxicity of ethanol reported by the WHO is not of relevance in these therapeutic settings. Ethanol's low cost and wide availability make it a valuable therapeutic agent, compared with other reference treatments. Furthermore, ethanol has a long track record of safety and effectiveness in the indications mentioned above. With the development of interventional radio technologies, and thus extremely precise access to anatomical structures, alcohol has been given new indications - particularly as an embolization, sclerosing or ablation agent. Moreover, constant progress in our knowledge of ethanol's pharmacodynamics might highlight other therapeutic indications for this compound in the future.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank English language editing and review services supplied by Biotech communication SARL and Pontchaillou University Hospital (F-35000, Rennes, France).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

REFERENCES

1. WHO | Global status report on alcohol and health 2018. WHO n.d. http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/gsr_2018/en/ (accessed February 25, 2019).
2. Imtiaz S, Shield KD, Roerecke M, Samokhvalov AV, Lönnroth K, Rehm J. Alcohol consumption as a risk factor for tuberculosis: meta-analyses and burden of disease. European Respiratory Journal 2017;50:1700216. doi:10.1183/13993003.00216-2017.
3. Simou E, Britton J, Leonardi-Bee J. Alcohol and the risk of pneumonia: a systematic review and meta-analysis. BMJ Open 2018;8:e022344. doi:10.1136/bmjopen-2018-022344.

4. Rehm J, Probst C, Shield KD, Shuper PA. Does alcohol use have a causal effect on HIV incidence and disease progression? A review of the literature and a modeling strategy for quantifying the effect. Population Health Metrics 2017;15. doi:10.1186/s12963-017-0121-9.
5. Hendershot CS, Stoner SA, Pantalone DW, Simoni JM. Alcohol Use and Antiretroviral Adherence: Review and Meta-Analysis: JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes 2009;52:180–202. doi:10.1097/QAI.0b013e3181b18b6e.
6. Rivara FP, Koepsell TD, Jurkovich GJ, Gurney JG, Soderberg R. The effects of alcohol abuse on readmission for trauma. JAMA 1993;270:1962–4.
7. Haagsma JA, Graetz N, Bolliger I, Naghavi M, Higashi H, Mullany EC, et al. The global burden of injury: incidence, mortality, disability-adjusted life years and time trends from the Global Burden of Disease study 2013. Injury Prevention 2016;22:3–18. doi:10.1136/injuryprev-2015-041616.
8. Haddon W. Advances in the epidemiology of injuries as a basis for public policy. Public Health Rep 1980;95:411–21.
9. Hay SI, Abajobir AA, Abate KH, Abbafati C, Abbas KM, Abd-Allah F, et al. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 333 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. The Lancet 2017;390:1260–344. doi:10.1016/S0140-6736(17)32130-X.
10. Whiteford HA, Degenhardt L, Rehm J, Baxter AJ, Ferrari AJ, Erskine HE, et al. Global burden of disease attributable to mental and substance use disorders: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. The Lancet 2013;382:1575–86. doi:10.1016/S0140-6736(13)61611-6.
11. Belleville J. The French paradox: possible involvement of ethanol in the protective effect against cardiovascular diseases. Nutrition 2002;18:173–7.
12. Albert CM, Manson JE, Cook NR, Ajani UA, Gaziano JM, Hennekens CH. Moderate alcohol consumption and the risk of sudden cardiac death among US male physicians. Circulation 1999;100:944–50. doi:10.1161/01.cir.100.9.944.
13. Ronksley PE, Brien SE, Turner BJ, Mukamal KJ, Ghali WA. Association of alcohol consumption with selected cardiovascular disease outcomes: a systematic review and meta-analysis. BMJ 2011;342:d671. doi:10.1136/bmj.d671.
14. Knott C, Bell S, Britton A. Alcohol Consumption and the Risk of Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Dose-Response Meta-analysis of More Than 1.9 Million Individuals From 38 Observational Studies. Diabetes Care 2015;38:1804–12. doi:10.2337/dc15-0710.
15. Schrieks IC, Heil ALJ, Hendriks HFJ, Mukamal KJ, Beulens JWJ. The effect of alcohol consumption on insulin sensitivity and glycemic status: a systematic review and meta-analysis of intervention studies. Diabetes Care 2015;38:723–32. doi:10.2337/dc14-1556.
16. Griswold MG, Fullman N, Hawley C, Arian N, Zimsen SRM, Tymeson HD, et al. Alcohol use and burden for 195 countries and territories, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. The Lancet 2018;392:1015–35. doi:10.1016/S0140-6736(18)31310-2.
17. Tizabi Y, Getachew B, Ferguson CL, Csoka AB, Thompson KM, Gomez-Paz A, et al. Low Vs. High Alcohol: Central Benefits Vs. Detriments. Neurotoxicity Research 2018. doi:10.1007/s12640-017-9859-x.
18. Yasar S. Relation between alcohol consumption in midlife and dementia in late life. BMJ 2018:k3164. doi:10.1136/bmj.k3164.
19. Peters R, Peters J, Warner J, Beckett N, Bulpitt C. Alcohol, dementia and cognitive decline in the elderly: a systematic review. Age and Ageing 2008;37:505–12. doi:10.1093/ageing/afn095.
20. Paganini-Hill A, Kawas CH, Corrada MM. Lifestyle Factors and Dementia in the Oldest-old: The 90+ Study. Alzheimer Disease & Associated Disorders 2016;30:21–6. doi:10.1097/WAD.0000000000000087.
21. Scott JR, Hassett AL, Schrepf AD, Brummett CM, Harris RE, Clauw DJ, et al. Moderate Alcohol Consumption Is Associated with Reduced Pain and Fibromyalgia Symptoms in Chronic Pain Patients. Pain Medicine 2018. doi:10.1093/pm/pny032.
22. Sánchez-Sellero I, San-Román-Rodríguez E, Santos-Pérez S, Rossi-Izquierdo M, Soto-Varela A. Alcohol consumption in Menière's disease patients. Nutritional Neuroscience 2018:1–7. doi:10.1080/1028415X.2018.1470372.
23. Holbrook TL, Barrett-Connor E. A prospective study of alcohol consumption and bone mineral density. BMJ 1993;306:1506–9. doi:10.1136/bmj.306.6891.1506.
24. Angus RM, Sambrook PN, Pocock NA, Eisman JA. Dietary intake and bone mineral density. Bone Miner 1988;4:265–77.
25. Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Kannel WB, Kiel DP. Alcohol intake and bone mineral density in elderly men and women. The Framingham Study. Am J Epidemiol 1995;142:485–92. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a117664.
26. Ganry O, Baudoin C, Fardellone P. Effect of alcohol intake on bone mineral density in elderly women: The EPIDOS Study. Epidémiologie de l'Ostéoporose. Am J Epidemiol 2000;151:773–80. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a010277.
27. Di Giuseppe D, Alfredsson L, Bottai M, Askling J, Wolk A. Long term alcohol intake and risk of rheumatoid arthritis in women: a population based cohort study. BMJ 2012;345:e4230. doi:10.1136/bmj.e4230.
28. Jin Z, Xiang C, Cai Q, Wei X, He J. Alcohol consumption as a preventive factor for developing rheumatoid arthritis: a dose-response meta-analysis

of prospective studies. Annals of the Rheumatic Diseases 2014;73:1962–7. doi:10.1136/annrheumdis-2013-203323.
29. Rajakulendran S, Gadsby K, Deighton C. Rheumatoid arthritis, alcohol, leflunomide and methotrexate. Can changes to the BSR guidelines for leflunomide and methotrexate on alcohol consumption be justified? Musculoskeletal Care 2008;6:233–46. doi:10.1002/msc.135.
30. Jonsson I-M, Verdrengh M, Brisslert M, Lindblad S, Bokarewa M, Islander U, et al. Ethanol prevents development of destructive arthritis. Proceedings of the National Academy of Sciences 2007;104:258–63. doi:10.1073/pnas.0608620104.
31. Hardy CJ, Palmer BP, Muir KR, Sutton AJ, Powell RJ. Smoking history, alcohol consumption, and systemic lupus erythematosus: a case-control study. Ann Rheum Dis 1998;57:451–5. doi:10.1136/ard.57.8.451.
32. Nagata C, Fujita S, Iwata H, Kurosawa Y, Kobayashi K, Kobayashi M, et al. Systemic lupus erythematosus: a case-control epidemiologic study in Japan. Int J Dermatol 1995;34:333–7. doi:10.1111/j.1365-4362.1995.tb03614.x.
33. Carle A, Pedersen IB, Knudsen N, Perrild H, Ovesen L, Rasmussen LB, et al. Moderate alcohol consumption may protect against overt autoimmune hypothyroidism: a population-based case-control study. European Journal of Endocrinology 2012;167:483–90. doi:10.1530/EJE-12-0356.
34. Carlé A, Bülow Pedersen I, Knudsen N, Perrild H, Ovesen L, Rasmussen LB, et al. Graves′ hyperthyroidism and moderate alcohol consumption: evidence for disease prevention. Clinical Endocrinology 2013;79:111–9. doi:10.1111/cen.12106.
35. Mellanby E. DISCUSSION ON THE VALUE OF ALCOHOL AS A THERAPEUTIC AGENT. Proc R Soc Med 1920;13:36–43.
36. Fermie A. Alcohol as a Therapeutic Agent. Ind Med Gaz 1894;29:199.
37. THE LANCET Special Analytical Commission ON BRANDY. The Lancet 1902;160:1502–18. doi:10.1016/S0140-6736(01)38315-0.
38. Reports and Analyses and Descriptions of New Inventions, in Medicine, Surgery, Dietetics, and the Allied Sciences. Br Med J 1888;2:885–6.
39. Guly H. Medicinal brandy. Resuscitation 2011;82:951–4. doi:10.1016/j.resuscitation.2011.03.005.
40. Pasteur L. Études sur le vin : Ses maladies, causes qui les provoquent, procédés nouveaux pour le conserver et le vieillir. Paris, imprimerie impériale; 1866.
41. Jacob M. Appel. “Physicians are not Bootleggers”: The Short, Peculiar Life of the Medicinal Alcohol Movement. Bulletin of the History of Medicine 2008;82:355–86. doi:10.1353/bhm.0.0005.
42. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. Clin Microbiol Rev 1999;12:147–79.
43. Centre d’appui pour la prévention des infections associées aux soins. Utilisation des antiseptiques en établissement médico-social 2016.
44. VIDAL HOPTIMAL 2018. CURETHYL (éthanol), Monographie VIDAL 2018.
45. Hodges B, Mazur JE. Intravenous Ethanol for the Treatment of Alcohol Withdrawal Syndrome in Critically Ill Patients. Pharmacotherapy 2004;24:1578–85. doi:10.1592/phco.24.16.1578.50945.
46. Dillard R, Welch T, Abdul-Hamed S, Kesey J, Dissanaike S. Ethanol Infusion for Alcohol Withdrawal Prophylaxis Does Not Cause Intoxication. The Southwest Respiratory and Critical Care Chronicles 2016;4. doi:10.12746/swrccc2016.0416.214.
47. Dixit D, Endicott J, Burry L, Ramos L, Yeung SYA, Devabhakthuni S, et al. Management of Acute Alcohol Withdrawal Syndrome in Critically Ill Patients. Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy 2016;36:797–822. doi:10.1002/phar.1770.
48. Mirijello A, D’Angelo C, Ferrulli A, Vassallo G, Antonelli M, Caputo F, et al. Identification and Management of Alcohol Withdrawal Syndrome. Drugs 2015;75:353–65. doi:10.1007/s40265-015-0358-1.
49. Jacobsen D, McMartin KE. Antidotes for methanol and ethylene glycol poisoning. J Toxicol Clin Toxicol 1997;35:127–43.
50. Beatty L, Green R, Magee K, Zed P. A systematic review of ethanol and fomepizole use in toxic alcohol ingestions. Emerg Med Int 2013;2013:638057. doi:10.1155/2013/638057.
51. Zakharov S, Pelclova D, Navratil T, Belacek J, Komarc M, Eddleston M, et al. Fomepizole *versus* ethanol in the treatment of acute methanol poisoning: Comparison of clinical effectiveness in a mass poisoning outbreak. Clinical Toxicology 2015;53:797–806. doi:10.3109/15563650.2015.1059946.
52. Rietjens SJ, de Lange DW, Meulenbelt J. Ethylene glycol or methanol intoxication: which antidote should be used, fomepizole or ethanol? Neth J Med 2014;72:73–9.
53. THERIAQUE 2018. ETHANOL AP-HP 96% SOL INJ AMP n.d.
54. Loh T-H, Patel S, Mirchandani A, Eckmann M. Brachial Plexus Chemical Neurolysis with Ethanol for Cancer Pain. Case Reports in Medicine 2018;2018:1–3. doi:10.1155/2018/8628645.
55. Mahli A, Coskun D. Neurolysis for Treatment of Infraorbital Neuropathy. Case Reports in Medicine 2017;2017:1–4. doi:10.1155/2017/2389354.
56. Brock M, Frangakis C, Georgiades CS. CT-Guided, Percutaneous Ethanol Sympatholysis for Primary Hyperhidrosis. CardioVascular and Interventional Radiology 2018;41:477–82. doi:10.1007/s00270-017-1806-y.
57. Department of Physical Medicine and Rehabilitation, Jefferson Medical College, Thomas

Jefferson University, Philadelphia, PA 19107, USA, Zhou L, Craig J, Parekh N. Current Concepts of Neurolysis and Clinical Applications. Journal of The Analgesics 2015;2:16–22. doi:10.14205/2311-0317.2014.02.02.1.
58. Viel E, Pelissier J, Pellas F, Boulay C, Eledjam J. Les traitements locaux de la spasticité : Blocs périphériques des membres pour alcoolisation ou phénolisation neurolytique. Neurochirurgie 2003;49:256–62. doi:NCHIR-05-2003-49-2-3C2-0028-3770-101019-ART14.
59. Johnson ME, Sill JC, Brown DL, Halsey TJ, Uhl CB. The effect of the neurolytic agent ethanol on cytoplasmic calcium in arterial smooth muscle and endothelium. Reg Anesth 1996;21:6–13.
60. Furlan AD, Lui PW, Mailis A. Chemical sympathectomy for neuropathic pain: does it work? Case report and systematic literature review. Clin J Pain 2001;17:327–36.
61. Koyyalagunta D, Engle MP, Yu J, Feng L, Novy DM. The Effectiveness of Alcohol Versus Phenol Based Splanchnic Nerve Neurolysis for the Treatment of Intra-Abdominal Cancer Pain. Pain Physician 2016;19:281–92.
62. Yakes WF, Luethke JM, Parker SH, Stavros AT, Rak KM, Hopper KD, et al. Ethanol embolization of vascular malformations. RadioGraphics 1990;10:787–96. doi:10.1148/radiographics.10.5.2217971.
63. Japanese Society of Interventional Radiology. Guidelines for Absolute Ethanol for Use in Vascular Embolization, 2016 edition. 2016.
64. Prasetyono TOH, Kreshanti P. Efficacy of intra-lesional alcohol injection as alternative and/or complementary treatment of vascular malformations: A systematic review. Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery 2010;63:1071–9. doi:10.1016/j.bjps.2009.04.020.
65. Su L, Jia R-B, Wang D-M, Lv M-M, Fan X. Absolute Ethanol Embolization of Arteriovenous Malformations in the Periorbital Region. CardioVascular and Interventional Radiology 2015;38:632–41. doi:10.1007/s00270-014-0993-z.
66. Fan XD, Su LX, Zheng JW, Zheng LZ, Zhang ZY. Ethanol Embolization of Arteriovenous Malformations of the Mandible. American Journal of Neuroradiology 2009;30:1178–83. doi:10.3174/ajnr.A1539.
67. Do YS, Yakes WF, Shin SW, Lee B-B, Kim D-I, Liu WC, et al. Ethanol Embolization of Arteriovenous Malformations: Interim Results. Radiology 2005;235:674–82. doi:10.1148/radiol.2352040449.
68. Su L, Wang D, Han Y, Wang Z, Zheng L, Fan X. Absolute Ethanol Embolization of Infiltrating-diffuse Extracranial Arteriovenous Malformations in the Head and Neck. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery 2015;50:114–21. doi:10.1016/j.ejvs.2015.02.020.
69. Zheng LZ, Fan XD, Zheng JW, Su LX. Ethanol Embolization of Auricular Arteriovenous Malformations: Preliminary Results of 17 Cases. American Journal of Neuroradiology 2009;30:1679–84. doi:10.3174/ajnr.A1687.
70. Sofue K, Arai Y, Shimada K, Takeuchi Y, Kobayashi T, Satake M, et al. Right portal vein embolization with absolute ethanol in major hepatic resection for hepatobiliary malignancy. British Journal of Surgery 2014;101:1122–8. doi:10.1002/bjs.9541.
71. Rimon U, Duvdevani M, Garniek A, Golan G, Bensaid P, Ramon J, et al. Ethanol and Polyvinyl Alcohol Mixture for Transcatheter Embolization of Renal Angiomyolipoma. American Journal of Roentgenology 2006;187:762–8. doi:10.2214/AJR.05.0629.
72. Sawada Y, Shimohira M, Hashizume T, Sobue R, Mori S, Nakagawa M, et al. Transcatheter Arterial Embolization for Renal Angiomyolipoma Using a Micro-balloon Catheter and a Mixture of Ethanol and Lipiodol. CardioVascular and Interventional Radiology 2017;40:1933–9. doi:10.1007/s00270-017-1731-0.
73. Kalman D, Varenhorst E. The role of arterial embolization in renal cell carcinoma. Scand J Urol Nephrol 1999;33:162–70.
74. Riemsma RP, Bala MM, Wolff R, Kleijnen J. Percutaneous ethanol injection for liver metastases. Cochrane Database of Systematic Reviews 2013. doi:10.1002/14651858.CD008717.pub2.
75. Jeong SY, Baek JH, Choi YJ, Lee JH. Ethanol and thermal ablation for malignant thyroid tumours. International Journal of Hyperthermia 2017:1–8. doi:10.1080/02656736.2017.1361048.
76. Sayhan H, Beyaz SG, Ülgen AM, Yuce MF, Tomak Y. Long-term Clinical Effects of DiscoGel for Cervical Disc Herniation. Pain Physician 2018;21:E71–8.
77. Cheng D, Amin P, Van Ha T. Percutaneous Sclerotherapy of Cystic Lesions. Seminars in Interventional Radiology 2012;29:295–300. doi:10.1055/s-0032-1330063.
78. Jayesh S, Mehta P, Cherian M, Ilayaraja V, Gupta P, Venkatesh K. Efficacy and safety of USG-guided ethanol sclerotherapy in cystic thyroid nodules. Indian Journal of Radiology and Imaging 2009;19:199. doi:10.4103/0971-3026.54879.
79. Moorthy K, Mihssin N, Houghton PW. The management of simple hepatic cysts: sclerotherapy or laparoscopic fenestration. Ann R Coll Surg Engl 2001;83:409–14.
80. Akinci D, Akhan O, Ozmen M, Gumus B, Ozkan O, Karcaaltincaba M, et al. Long-term results of single-session percutaneous drainage and ethanol sclerotherapy in simple renal cysts. European Journal of Radiology 2005;54:298–302. doi:10.1016/j.ejrad.2004.07.008.
81. Edmonds CJ, Tellez M. Treatment of thyroid cysts by aspiration and injection of sclerosant. Br Med J (Clin Res Ed) 1987;295:529. doi:10.1136/bmj.295.6597.529.
82. Park HS, Baek JH, Choi YJ, Lee JH. Innovative Techniques for Image-Guided Ablation of Benign

Thyroid Nodules: Combined Ethanol and Radiofrequency Ablation. Korean Journal of Radiology 2017;18:461. doi:10.3348/kjr.2017.18.3.461.
83. Subramanian A. Alcohol Ablation for Cardiac Arrhythmias: Is it Time to Drown the Arrhythmias? Indian Pacing Electrophysiol J 2012;12:136–7. doi:10.1016/s0972-6292(16)30520-4.
84. Sigwart U. Non-surgical myocardial reduction for hypertrophic obstructive cardiomyopathy. Lancet (London, England) 1995;346:211–4. doi:10.1016/s0140-6736(95)91267-3.
85. Kitamura M, Kubota Y, Takano H, Takayama M. Alcohol septal ablation with septal myocardial isolation using the double-balloon method for refractory hypertrophic obstructive cardiomyopathy. European Heart Journal 2014;35:241–241. doi:10.1093/eurheartj/eht321.
86. Hagège AA, Desnos M. New trends in treatment of hypertrophic cardiomyopathy. Archives of Cardiovascular Diseases 2009;102:441–7. doi:10.1016/j.acvd.2009.03.008.
87. Kreidieh B, Rodríguez-Mañero M, A. Schurmann P, Ibarra-Cortez SH, Dave AS, Valderrábano M. Retrograde Coronary Venous Ethanol Infusion for Ablation of Refractory Ventricular Tachycardia. Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology 2016;9. doi:10.1161/CIRCEP.116.004352.
88. Sacher F, Sobieszczyk P, Tedrow U, Eisenhauer AC, Field ME, Selwyn A, et al. Transcoronary ethanol ventricular tachycardia ablation in the modern electrophysiology era. Heart Rhythm 2008;5:62–8. doi:10.1016/j.hrthm.2007.09.012.
89. Brugada P, de Swart H, Smeets JL, Bär FW, Wellens HJ. Termination of tachycardias by interrupting blood flow to the arrhythmogenic area. Am J Cardiol 1988;62:387–92. doi:10.1016/0002-9149(88)90964-2.
90. Duncan E, Schilling RJ. Intracoronary ethanol ablation: A novel technique for ablation of ventricular fibrillation. Heart Rhythm 2010;7:1131–4. doi:10.1016/j.hrthm.2010.04.012.
91. Valderrábano M, Morales PF, Rodríguez-Mañero M, Lloves C, Schurmann PA, Dave AS. The Human Left Atrial Venous Circulation as a Vascular Route for Atrial Pharmacological Therapies. JACC: Clinical Electrophysiology 2017;3:1020–32. doi:10.1016/j.jacep.2017.02.022.
92. Tokuda M, Sobieszczyk P, Eisenhauer AC, Kojodjojo P, Inada K, Koplan BA, et al. Transcoronary Ethanol Ablation for Recurrent Ventricular Tachycardia After Failed Catheter Ablation: An Update. Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology 2011;4:889–96. doi:10.1161/CIRCEP.111.966283.
93. Pidot SJ, Gao W, Buultjens AH, Monk IR, Guerillot R, Carter GP, et al. Increasing tolerance of hospital *Enterococcus faecium* to handwash alcohols. Science Translational Medicine 2018;10:eaar6115. doi:10.1126/scitranslmed.aar6115.
94. Cederbaum AI. Alcohol Metabolism. Clinics in Liver Disease 2012;16:667–85. doi:10.1016/j.cld.2012.08.002.

ANNEXE 2

Le Daré B, Lagente V, Gicquel T. Ethanol and its metabolites: update on toxicity, benefits, and focus on immunomodulatory effects. Drug Metab Rev. 2019 Oct 24:1-17. doi: 10.1080/03602532.2019.1679169.

Drug Metabolism Reviews

ISSN: 0360-2532 (Print) 1097-9883 (Online) Journal homepage: https://www.tandfonline.com/loi/idmr20

Ethanol and its metabolites: update on toxicity, benefits, and focus on immunomodulatory effects

Brendan Le Daré, Vincent Lagente & Thomas Gicquel

To cite this article: Brendan Le Daré, Vincent Lagente & Thomas Gicquel (2019): Ethanol and its metabolites: update on toxicity, benefits, and focus on immunomodulatory effects, Drug Metabolism Reviews, DOI: 10.1080/03602532.2019.1679169

To link to this article: https://doi.org/10.1080/03602532.2019.1679169

Published online: 24 Oct 2019.

Submit your article to this journal

View related articles

View Crossmark data

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=idmr20

DRUG METABOLISM REVIEWS
https://doi.org/10.1080/03602532.2019.1679169

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

REVIEW ARTICLE

Check for updates

Ethanol and its metabolites: update on toxicity, benefits, and focus on immunomodulatory effects

Brendan Le Daré[a,b,c], Vincent Lagente[a] and Thomas Gicquel[a,c]

[a]Univ Rennes, INSERM, INRA, Institut NuMeCan (Nutrition, Metabolisms and Cancer), Rennes, France; [b]Pharmacy Unit, Pontchaillou University Hospital, Rennes, France; [c]Forensic and Toxicology Laboratory, Pontchaillou University Hospital, Rennes, France

ABSTRACT

This article summarizes recent experimental and epidemiological data on the toxic and beneficial effects of ethanol and its metabolites (acetaldehyde), and focuses on their immunomodulatory effects. The section dealing with the toxic effects of alcohol focuses on its chronic toxicity (liver disorders, carcinogenic effects, cardiovascular disorders, neuropsychic disorders, addiction and withdrawal syndrome, hematologic disorders, reprotoxicity, osteoporosis) although acute toxicity is considered. The role of oxidative metabolism of ethanol by alcohol dehydrogenase, cytochrome P450 2E1, and aldehyde dehydrogenase, as well as the impact of genetic polymorphism in its physiopathology are also highlighted. The section dealing with the beneficial effects of low to moderate alcohol consumption (on cardiovascular system, diabetes, the nervous system and sensory organs, autoimmune diseases, and rheumatology) highlights the importance of anti-inflammatory and immunomodulatory effects in these observations. This knowledge, enriched by a focus on the immunomodulatory effects of ethanol and its metabolites, in particular on the NLRP3 inflammasome pathway, might facilitate the development of treatments that can reduce ethanol's harmful effects or accentuate its beneficial effects.

ARTICLE HISTORY
Received 14 August 2019
Accepted 7 October 2019

KEYWORDS
Ethanol; alcohol; acetaldehyde; metabolism; toxicity; immunomodulation

1. The origin of alcoholic beverages

It is not known when humans discovered alcohol and its effects. One can nevertheless assume that as is often the case for the evolution of lifestyle factors, this was not a chance discovery. Given that ethanol can be produced by the fermentation of sugars contained in fruits, our ancestors may have consumed alcohol involuntarily by eating rotten (and thus fermented) fruits. In Neolithic times, the simultaneous appearance of agriculture and pottery may have markedly facilitated the exploitation of this natural phenomenon. Thus, the first traces of fermented beverages based on rice, honey and fruits (discovered in Henan Province, China) date back to the seventh millennium BC (McGovern et al. 2004).

In the eighteenth century, the development of new agricultural and distillation techniques led to the wide availability of spirits as consumer products. During the industrial revolution, the poor increasingly resorted to alcohol as a means of enduring their harsh working or living conditions. It was not until the end of the eighteenth century that alcohol addiction and alcohol abuse began to be perceived as physical and mental health problems. In his 1849 book *Alcoholismus Chronicus*, the Swedish physician Magnus Huss introduced the term 'alcoholism' and described a number of alcohol-related visceral or mental illnesses. The first temperance societies were founded in the following decades, on the basis of scientific publications and literary depictions of alcoholism (such as those by the novelists Zola in France and Dickens in the UK). The first centers for treating and recovering from alcoholism were also founded at around this time (Porter 1987).

Specialist in-hospital care of alcoholic patients appeared in the 1920s; for example, Sainte-Anne psychiatric hospital (Paris, France) opened a ward in 1922. The first pharmacologic treatment (apomorphine, with its emetic effects) was introduced in the 1930s. Disulfiram (discovered in 1948) is still prescribed today in out-patient treatment (Porter 1987). A large body of scientific research has now shed light on the pathophysiological mechanisms underlying acute and chronic alcoholism. However, there is also a growing body of evidences in favor of ethanol's beneficial effects in general and its anti-inflammatory and immunomodulatory effects in particular. These diverging characteristics

CONTACT Brendan Le Daré brendan.le.dare@chu-rennes.fr Univ Rennes, INSERM, INRA, Institut NuMeCan (Nutrition, Metabolisms and Cancer), Rennes F-35000, France.

© 2019 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

mean that ethanol has a 'Jekyll and Hyde' profile. Here, we review the current state of knowledge about ethanol and its harmful and beneficial effects (notably its immunomodulatory properties).

2. Search strategy

MEDLINE and PubMed databases were searched for relevant papers published in English in peer-reviewed journals between 1979 and 2019. Studies providing information about association between drinking and selected diseases or benefits, or mechanic explanation for the association were included for review.

3. The metabolism of ethanol

Given that ethanol's biological effects are closely related to its metabolism, knowledge of the latter is essential for understanding the associated pathophysiological mechanisms (Figure 1). In the first part of this section, we consider the metabolism of ethanol to acetaldehyde. In the second part, we look at the production of acetate from acetaldehyde.

Cytosolic alcohol dehydrogenase (ADH) is the major enzyme responsible for the phase I oxidative metabolism of ethanol, producing acetaldehyde and reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) (Cederbaum 2012). The enzyme is predominantly expressed by hepatocytes but is also found in the gastrointestinal tract, lung and kidneys (Crabb 1995; Edenberg 2000). In humans, seven genes (*ADH1* to *ADH7*) code, respectively, for ADH's different subunits (α, β1, β2, β3, γ1, γ2, π, χ, σ, and μ) (Cederbaum 2012). These subunits bind together in pairs to form isoenzymes classified into five classes (ADH class I to ADH class V), depending on their enzymatic proprieties (Crabb 1995). Class I ADH (formed from subunits encoded by *ADH1*, *ADH2*, and *ADH3*) has a crucial role in alcohol metabolism. Even though polymorphisms in ADH isoenzyme have been described, they do not appear to be linked to a particular alcohol-related disease or change in alcohol metabolism. However, some researchers have reported that alcohol is eliminated more slowly in the fasted state than in the fed state because of decreased ADH levels (Cederbaum 2012).

The microsomal pathway (involving the cytochrome P450 (CYP) family) is responsible for about 10% of the

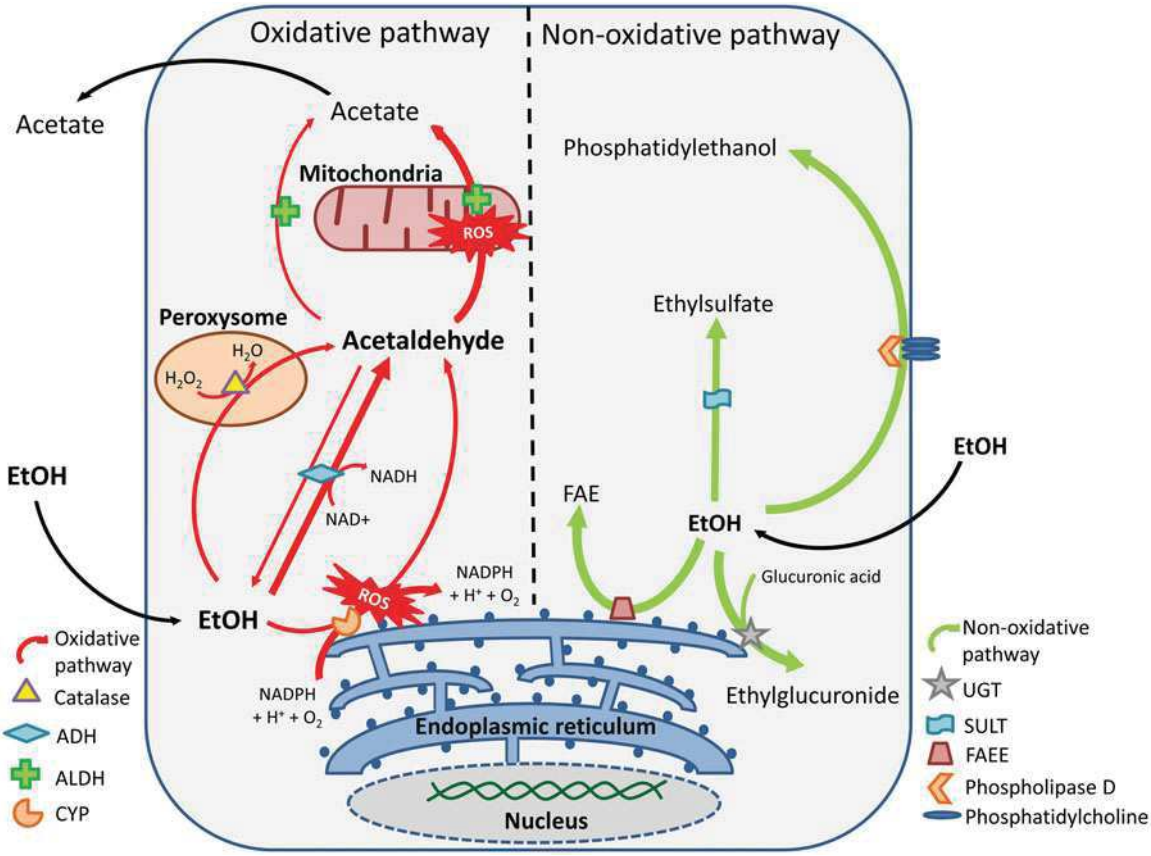


Figure 1. Oxidative and non-oxidative ethanol metabolic pathways in the hepatocyte. ADH: alcohol dehydrogenase; ALDH: aldehyde dehydrogenase; CYP: cytochrome P450; EtOH: ethanol; FAE: fatty acid ester; FAEE: fatty acid ethyl ester; SULT: sulfotransferase; UGT: uridine diphosphate glucuronyltransferase.

body's ethanol metabolism (Hamitouche et al. 2006). Even though CYP1A2 and CYP3A4 are known to be involved, CYP2E1 is considered to be the main CYP in the first phase of ethanol metabolism (Kunitoh et al. 1996; Cederbaum 2012). This oxidative metabolic pathway takes place in the endoplasmic reticulum of hepatocytes. Using NADPH and oxygen, CYP2E1 converts ethanol into acetaldehyde and then acetaldehyde into acetate. The conversion of ethanol into acetaldehyde produces reactive oxygen species (ROS), which notably contribute to alcohol's toxicity (Ekström and Ingelman-Sundberg 1989). Furthermore, ethanol upregulates its own metabolism by protecting CYP2E1 from ubiquitination and degradation by the proteasome complex (Zhukov and Ingelman-Sundberg 1999; Lu and Cederbaum 2008). This mechanism results in elevated levels of CYP2E1 in hepatocytes, and is considered to have a major role in the ethanol tolerance seen in chronic alcohol users (Cederbaum 2012).

Catalase (an enzyme found in peroxisomes) is also known to metabolize alcohol. However, hepatic catalase does not have a significant role in ethanol metabolism. In contrast, brain catalase appears to be involved in alcohol tolerance and positive reinforcement (Cederbaum 2012).

Other minor phase II non-oxidative metabolic pathways for ethanol include glucuronidation (giving rise to ethylglucuronide) and sulfation (giving rise to ethylsulfate). Phosphatidylethanol and fatty acid ethyl esters (respectively, produced by phospholipase D and fatty acid ethyl ester synthase) also contribute to the non-oxidative metabolism of ethanol (Pichini et al. 2009; Cederbaum 2012; Schröck et al. 2018).

The acetaldehyde generated by these metabolic pathways is then oxidized by aldehyde dehydrogenase (ALDH) to form acetate. In humans, the ALDH superfamily of NAD^+-dependent enzymes is encoded by 16 genes. The cytosolic ALDH1 and mitochondrial ALDH2 isoenzymes are those primarily involved in ethanol metabolism (Vasiliou and Pappa 2000). In contrast to ADH, polymorphisms appear to have a greater influence on ALDH activity. The *ALDH2*1* allele (known to code for a highly active variant) is considered to protect against liver disease in alcoholism, whereas the enzyme encoded by *ALDH2*2* allele is an inactive enzyme (Cederbaum 2012). Furthermore, chronic ethanol consumption lowers ALDH and increases the acetaldehyde level (Lin et al. 1984). Acetate is not the final metabolite in this pathway because it be converted into CO_2, fatty acids, ketones, cholesterol or steroids (Cederbaum 2012).

The activity of the various isoforms of ADH and ALDH regulates acetaldehyde concentrations, and constitutes a risk factor in the development of alcoholism (Agarwal and Goedde 1989). Indeed, the effects of ethanol intolerance (such as nausea, dysphagia, headache, and the vasodilation responsible for facial flush in particular) have been attributed to the concentration of acetaldehyde. The accumulation of this metabolite in individuals with inactive or poorly active ALDH isoenzymes may explain the cultural barriers to drinking large amounts of alcohol seen in some societies, which thus protect against alcoholism. This is particularly the case in eastern Asia, where 15–40% of the population has inactive ALDH2 isoenzymes and thus acetaldehyde levels that are 5–20 times higher than in individuals with active isoenzyme (Cederbaum 2012).

4. The toxicity of ethanol

According to the World Health Organization, alcohol consumption is a causal factor in more than 60 major types of diseases and injuries, and results in approximately 2.5 million deaths each year (World Health Organization 2011). Thus, approximately 4.5% of the global burden of disease and injury is attributable to alcohol. Furthermore, this morbidity and mortality caused by alcohol consumption has socioeconomic impacts, including the medical costs borne by governments, and the financial and psychological burden to families (World Health Organization 2011). By convention, ethanol's toxicity is subdivided into acute toxicity and chronic toxicity. Here, we review the main acute and chronic outcomes of ethanol consumption, and describe the relationship between dose and overall mortality.

4.1. Overall mortality as a function of dose

Many researchers have reported that low levels of alcohol intake are associated with a lower risk of mortality (Keller 2016). Jayasekara et al.'s (2014) meta-analysis of 62,950 study participants found that ethanol's protective effect is observed for intakes of 1–29 g/day (corresponding to zero to three standard units of alcohol per day), with a relative risk (RR) [95% confidence interval (CI)] of 0.90 [0.81, 0.99]. Conversely, alcohol consumptions of between 30 and 59 g/day and over 60 g/day were associated with RR [95%CI] of mortality of 1.19 [0.89, 1.58] and 1.52 [0.78, 2.98], respectively (Jayasekara et al. 2014). In a study of 380,395 people, Bergmann et al. (2013) found that limiting alcohol consumption to below five alcoholic units per day was associated with a lower risk of death (mainly due to less cardiovascular disease), whereas the consumption of

five or more alcoholic drinks per day was associated with a twofold to fivefold greater risk of death (mainly due to alcohol-related cancer) (Bergmann et al. 2013). A meta-analysis linking moderate ethanol consumption to lower all-cause mortality was consistent with these results (Gmel et al. 2003; Di Castelnuovo 2006).

Despite the growing body of evidence for a protective effect of low to moderate alcohol consumption, the results are subject to debate. For example, Goulden's (2016) study of 24,029 individuals over the age of 50 years did not reveal an association between all-cause mortality and moderate alcohol consumption (Goulden 2016). Likewise, a recent study of 28 million individuals found that all-cause mortality rose with increasing levels of consumption; the researchers concluded that the level of alcohol consumption minimizing health loss is zero (Griswold et al. 2018).

Thus, the evidence is inconclusive as to whether moderate alcohol consumption has a protective effect. However, all researchers agree that excessive alcohol consumption increases all-cause mortality. The dose at which excess mortality is observed varies from one study to another but ranges from 30 to 40 g/day – corresponding to three to four standard units of alcohol (Bergmann et al. 2013; Jayasekara et al. 2014).

4.2. Acute toxicity

The clinical manifestations of acute alcohol intoxication are well known, and are closely related to those of alcoholism. The initial neuropsychic symptoms (intellectual and psychic excitation) are followed by a cerebellar syndrome accompanying marked drunkenness, and then by a variably deep coma that may be life-threatening (through paralysis of the respiratory centers) (Wimer et al. 1983; Girre et al. 1995).

In humans, the first symptoms (decreased motor coordination, longer reaction time, and impaired judgment) can be observed at a blood alcohol concentration of 0.2 g/L. These effects disappear quickly after the end of the exposure (Bismuth et al. 2000). Curiously, the acute intoxicant effects of a given blood alcohol concentration are more intense when the level is rising than when it is falling (the so-called 'Mellanby effect'). By extension, this term is used to refer to the phenomenon of rapid ethanol tolerance because the neuropsychic effects are less intense when the concentration is falling (Wang et al. 1993; Holland and Ferner 2017).

Ethanol's depressant neuropsychic effects have been well documented, and are related to the compound's interaction with gamma-aminobutyric acid (GABA)-A receptors (Davies 2003). These receptors belong to a family of ligand-dependent transmembrane ion channels that enable rapid neuronal responses within the mammalian central nervous system. Most GABA-A receptors are postsynaptic, although some subtypes are located outside the synapses (Davies 2003).

The GABA-A receptors are heteropentamers, and are composed differently from among the 19 known subunits (α1-6, β1-4, γ1-3, δ, ε, π, ρ1-2, and θ) (Davies 2003). Most of the GABA-A receptors in the brain comprise two α subunits, two β subunits and one γ subunit; as such, they offer binding sites for many drugs, including as barbiturates, benzodiazepines, and certain anesthetics. Upon activation of the GABA-A receptor by an agonist, the resulting influx of chlorine ions creates a hyperpolarizing electrochemical gradient and decreases the action potential (Davies 2003). Gamma-aminobutyric acid is classified as an inhibitory neurotransmitter because of its receptor's effects on the postsynaptic neuron. Thus, the binding of ethanol to the α-subunit of the GABA-A receptor inhibits the postsynaptic neuron by allosteric modulation, and is thus responsible for central depression.

In addition to these effects on GABA-A receptors, ethanol antagonizes N-methyl-D-aspartate receptors, α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors, and kainate receptors (Valenzuela et al. 1998; Läck et al. 2008). Since glutamate is an excitatory neurotransmitter, blockade of these receptors heightens ethanol's depressant action on the central nervous system (Hoffman et al. 1989). Lastly, ethanol has also been shown to interact with glycine receptors, neuronal nicotinic receptors, and serotonin type 3 receptors (Davies 2003; Ding et al. 2015).

4.3. Chronic toxicity

Chronic ethanol exposure is toxic for many different organs, and notably affects the digestive tract (steatosis, hepatic cirrhosis, chronic gastritis, and pancreatitis), the nervous system (polyneuritis, cerebellar atrophy, and memory disorders) and the cardiovascular system. Ethanol also has chronic hematologic, carcinogenic and reprotoxic effects. In the following section, we review the pathophysiological effects of ethanol and its metabolites on these various organ systems.

4.3.1. Liver disorders

In the early stages of ethanol-related liver disease, the ROS generated by ethanol metabolism are responsible for a rapid increase in the fluidity of the hepatocyte cell membrane. In turn, this leads to elevated cytoplasmic levels of low-molecular-weight iron and thus even

greater ROS production. This phenomenon can then induce lipid peroxidation and apoptosis (Sergent et al. 2005).

Liver injury due to ethanol can be divided into three phases. The first phase (hepatic steatosis) involves the accumulation of lipids in hepatocytes. It is relatively benign, and usually reversible. The pathophysiology of steatosis is closely related to the oxidative metabolism of ethanol. By inducing lipolysis in adipocytes, chronic alcohol consumption increases the fraction of free fatty acids captured by the liver (Wei et al. 2013; Osna et al. 2017). Furthermore, acetaldehyde increases the expression of sterol regulatory element-binding protein transcription factor which upregulates lipogenesis genes (Osna et al. 2017).

In the second phase, steatohepatitis follows steatosis. The lipids accumulated in the hepatocytes undergo peroxidation and oxidative damage. Complex interactions involving the effects of acetaldehyde, ROS, intestinal lipopolysaccharide-mediated lesions and endoplasmic reticulum stress are responsible for infiltration of the liver by immune system cells (such as neutrophils) and activation of Kupffer cells (the liver's resident macrophages) (Osna et al. 2017). The resulting massive release of pro-inflammatory cytokines is directly responsible for hepatocyte death and the maintenance of alcoholic hepatitis (Duddempudi 2012).

The third phase reflects the fibrotic progression of inflammatory steatohepatitis. The regeneration of hepatocytes is severely compromised, and hepatic lesions lead to the activation of hepatic stellate cells – the main sources of extracellular matrix deposition that characterizes fibrosis. The progression of fibrosis during ethanol-induced chronic inflammation leads to the progressive replacement of the hepatic parenchyma by scar tissue, which compromises the liver's metabolic and homeostatic functions (Osna et al. 2017). Ultimately, severe complications develop, such as hepatocellular carcinoma – the second leading cause of cancer death – and portal hypertension (Grewal and Viswanathen 2012; Zhou et al. 2016).

4.3.2. Carcinogenic effects

According to Seitz and Stickel (2007), 3.6% of cancers worldwide are due to chronic alcohol consumption. This causal relationship is particularly strong for tumors of the upper digestive tract (such as cancers of the mouth, pharynx, larynx, and esophagus), liver tumors, colonic tumors, and breast tumors (Seitz and Stickel 2007; Zhou et al. 2016).

Once again, acetaldehyde has been incriminated in the pathophysiology of these cancers. Indeed, this initial metabolite of ethanol can bind to proteins and alter their structures and functions – particularly for enzymes involved in DNA repair and glutathione (Garro et al. 1986). Furthermore, acetaldehyde can bind to DNA and form adducts (Wang et al. 2000). Lastly, carriers of an allele coding for inactive ALDH2*2 have an increased risk of esophageal cancer, due to overexposure to this metabolite (Seitz and Stickel 2007).

Thus, the mechanisms of ethanol-induced hepatocarcinogenesis are closely related to ethanol's metabolic pathways; they involve the induction of hepatic cirrhosis, increased oxidative stress, and alterations in methylation. Lastly, retinoic acid (which is essential for proliferation and cell differentiation) is metabolized abnormally after CYP2E1 expression has been upregulated by ethanol (Seitz and Stickel 2007).

In chronic alcohol users, a meta-analysis found that the risk of breast cancer increase with a dose-response relation giving a relative risk of 1.11 (CI = 1.07–1.16), 1.24 (CI = 1.15–1.34), and 1.38 (CI = 1.23–1.55) with the consumption of one, two or three drinks a day, respectively (Longnecker 1994). This risk is linked to the ethanol-induced increase in estradiol levels. Since steroid hormones, including estrogens are metabolized by ADH (McEvily et al. 1988), the effect might be due to competition between estrogen and ethanol, resulting in impaired metabolism of estrogens (Seitz and Stickel 2007; Al-Sader et al. 2009). These data are supported by Hines et al. (2000) findings, showing a positive correlation between alcohol consumption and bioavailable estradiol in a prospective study involving 1086 individuals (Hines et al. 2000). In addition, ethanol can stimulate the transcriptional activity of estrogen receptor in human breast cancer cells which is related to increased breast cancer risk (Fan et al. 2000).

Furthermore, ethanol alters methyl group transfers. Gene methylation is crucial in the regulation of gene expression: hypermethylation tends to decrease gene expression, whereas hypomethylation increases it. Thus, the induction of oncogenes or the repression of tumor suppressor genes appear to be key steps in ethanol-induced cancer. These mechanisms would be associated with frequent malnutrition of alcoholics, leading to vitamins deficiencies (folate, vitamin B6), which are cofactors of methyl group transfer. Conversely, an excess of vitamin A has been associated with an increased risk of alcohol-associated tumors (Seitz and Stickel 2007).

Lastly, the results of animal experiments have shown that a large amount of acetaldehyde is produced by colonic bacteria after alcohol consumption (Jokelainen et al. 1996). Furthermore, elevated colonic acetaldehyde

concentrations (due to the inhibition of ALDH) have been linked to the induction of colonic carcinogenesis (Seitz et al. 1990).

4.3.3. Cardiovascular disorders

High-dose ethanol consumption has been linked to various cardiovascular disorders, such as hypertension, atrial fibrillation, atherosclerosis, and alcoholic cardiomyopathies (Girre et al. 1995; Bismuth et al. 2000; Zhou et al. 2016; Obad et al. 2018).

Although the mechanisms underlying this toxicity are not fully understood, the metabolites of ethanol seem to be intricately involved. Indeed, myocardial damage appears to be associated with acetaldehyde accumulation (Guo et al. 2012). The stress imposed on myocytes by the increase in pro-inflammatory cytokines, ROS, mitochondrial dysfunctions and endoplasmic reticulum stress are known to be involved in myocyte hypertrophy, which in turn is responsible for altering the heart's contractile performance (Machackova et al. 2006). The cardiovascular events associated with excessive alcohol consumption can therefore lead to cardiac arrest (Haddad et al. 2008). The pathophysiological mechanisms potentially involved in cardiovascular disease are summarized in Table 1.

4.3.4. Neuropsychic disorders

The toxic effects of ethanol and its metabolites on brain tissue vary according to the region of the brain, age, the dose, and the duration of exposure. Both neurons and glial cells are affected. The major complications include alteration of astrocyte and oligodendrocyte functions, resulting in reduced synaptogenesis and cell survival.

The diencephalon, cerebral cortex, hippocampus, and white matter corresponding to myelin, are also targets for the toxicity of ethanol and its metabolites. This toxicity results in atrophy of the brain, although the underlying mechanism is not yet fully understood (de la Monte 1988; Bühler and Mann 2011; Konrad et al. 2012). These various neurotoxic consequences are aggravated by the thiamin (vitamin B1) deficiency caused by ethanol's inhibition of its absorption and physiological action (Vetreno et al. 2011).

Furthermore, there is growing evidence of a link between the alcohol-induced loss of liver function and neurotoxicity. First, reduced ethanol metabolism in the liver is responsible for overexposure of the brain to this toxic compound. Secondly, liver damage leads to the production of metabolic and inflammatory mediators that damage the brain. This relationship is most notable in the context of hepatic encephalopathy (De la Monte et al. 2009; Chen et al. 2012). Lastly, by jeopardizing the tight junctions of the intestinal mucosa, ethanol allows lipopolysaccharide (a Gram-negative bacterial endotoxin) to enter systemic circulation. As a result, lipopolysaccharide binds to TLR4 receptors on liver macrophages and promotes pro-inflammatory response via cytokines, chemokines, proteases and ROS production. These cytokines are known to cross the blood brain barrier and activate the brain's resident macrophages (microglia), increasing neurotoxicity (Mayfield et al. 2013).

In light of these effects, it is not surprising that chronic alcohol consumption is responsible for severe cognitive impairment, including dementia. The most

Table 1. Mechanisms potentially linking alcohol consumption with cardiovascular pathologies.

Cardiovascular diseases	Potential mechanisms	References
Heart failure	Cardiac fibrosis Vitamin deficiency and malnutrition Decrease in contractile proteins, and myocyte loss Mitochondrial dysfunction Impaired calcium homeostasis Oxidative stress Activation of neurohormonal systems Coronary heart disease	Faris et al. (2003), Urbano-Márquez and Fernández-Solà (2004), Fernandezsola et al. (2006), Gürtl et al. (2009), and Laonigro et al. (2009)
Alcoholic cardiomyopathy	Decrease in nNOS expression Increased pro-inflammatory effects Neurohormonal activation Metabolic changes Acetaldehyde accumulation Altered protein synthesis Elevated of brain natriuretic peptide Genetically related factors	Machackova et al. (2006), Guo et al. (2012), Ji (2012), Panchenko et al. (2015), and Silva et al. (2015)
Atrial fibrillation	Increase in ROS	Steinbigler et al. (2003)
Atherosclerosis	Activation of the innate and adaptive immune systems Presence of mediators of inflammation (TNF, IFNɤ)	Hansson et al. (2002)
Hypertension	Increased secretion of catecholamines Decrease in nNOS expression	Lopes da Silva et al. (2013) and Silva et al. (2015)

common types of alcohol-related dementia are Wernicke-Korsakoff syndrome and Marchiafava-Bignami disease (Charness 1993; Victor 1994). Today, the frontal, cerebellar and/or temporal brain atrophy induced by ethanol consumption can be readily detected by medical imaging techniques (Matsui et al. 2012).

4.3.5. Addiction and withdrawal syndrome

In the field of addiction, 'conventional' products act on a specific target: opiate receptors for heroin, cannabinoid CB1 receptors for cannabis, nicotinic receptors for tobacco, and monoamine transporters for cocaine (Hamon 2014). In contrast, ethanol acts on many levels. As mentioned above, ethanol facilitates GABAergic transmission via GABA-A receptors and decreases glutaminergic neurotransmission (Hoffman et al. 1989; Valenzuela et al. 1998; Läck et al. 2008; Uusi-Oukari and Korpi 2010).

Like other addictogenic compounds, alcohol activates the reward circuit and thus the release of dopamine into the mesocorticolimbic system. This system consists of dopaminergic neurons whose cell bodies are located in the ventral tegmental area and whose axons project into the nucleus accumbens, amygdala, and frontal cortex (Inserm 2012). Although dopamine has a key role in the mechanism of dependence, other neurotransmitters (such as GABA, glutamate, serotonin, norepinephrine, and opioid peptides) are also involved (Inserm 2012).

The repeated intake of alcohol leads to tolerance and adaptive processes that decrease the effectiveness of GABAergic neurotransmission and facilitate glutaminergic neurotransmission. In turn, these processes lead to neuronal hyperexcitability – a characteristic of alcohol dependence (Hamon 2014).

The respective roles of ethanol and its metabolites in the mechanism of alcohol addiction are still unclear but acetaldehyde has its own psychoactive effects and rewarding proprieties (Brancato et al. 2017).

Chronic exposure to ethanol results in higher membrane levels of saturated fatty acids and cholesterol, which decrease the membrane's fluidity (i.e. the opposite of the fluidifying effects of acute ethanol consumption on the hepatocyte membrane described above). As a result, a sharp decrease in alcohol consumption causes temporary membrane hyper-rigidity and disrupts cellular homeostasis (Littleton 1998). In cases of sudden alcohol withdrawal, clinical alcohol withdrawal syndrome is characterized by hypertension, tachycardia, hallucinations, agitation, fever, tremor, seizures, and hyperexcitation, and may progress to delirium tremens (Tetrault and O'Connor 2008).

4.3.6. Hematologic disorders

Several hematological disorders are promoted or accentuated by alcohol consumption: leukopenia, anemia, thrombocytopenia, myelodysplasia, and acute leukemia (Girre et al. 1995; Bismuth et al. 2000). Recently, Smith et al. (2015) hypothesized that an ALDH polymorphism predisposes to these hematological disorders. Since the ALDH1A1 isoform protein is present in hematopoietic stem cells, overexposure to acetaldehyde may explain the increased risk of impaired hematopoiesis associated with the inhibition of DNA repair (Smith et al. 2015).

4.3.7. Reprotoxicity

Ethanol consumption disrupts the menstrual cycle in women and decreases male fertility, including testicular atrophy, reduced libido, and decreased testosterone. Furthermore, a decrease in the likelihood of a clinical pregnancy per cycle was observed from five units per week upwards (Council of the Netherlands TH 2000; ANSES 2010).

During pregnancy, ethanol consumption is responsible in a dose-dependent manner for multiple congenital anomalies, such as growth restriction, central nervous system impairments, and malformations. These manifestations are referred to collectively as fetal alcohol syndrome (FAS), and give rise to a particular facies with narrow palpebral fissures, a flat mid-face, a short nose, a smooth philtrum, a thin upper lip, epicanthus, a flat nasal bridge, minor ear abnormalities, and micrognathia (Wattendorf and Muenke 2005).

The pathogenesis of FAS is related to the pharmacokinetics and metabolism of ethanol. It is well known that ethanol crosses the placenta, and distributes into the fetal compartment. Furthermore, ethanol is eliminated slowly by the fetus, leading to greater exposure (Heller and Burd 2014). Furthermore, several characteristics make the fetus more fragile to alterations in oxidative metabolism. CYP2E1 protein is produced earlier than ADH during gestation (Hines and McCarver 2002; Arfsten et al. 2004), and the induction of placental CYP2E1 by ethanol (Rasheed et al. 1997) means that CYP becomes the major metabolic pathway for ethanol. Ethanol's teratogenic effects are thought to be due to ROS production (leading to mitochondrial damage, brain lipid peroxidation, and a decrease in endogenous antioxidant levels), apoptosis (leading to disrupted neuron-neuron adhesion), placenta vasoconstriction, and inhibition of cofactors required for fetal growth and development (Gupta et al. 2016).

Acetaldehyde is also directly involved in the induction of FAS. It is now known that retinoic acid regulates

various embryonic and differentiation processes (Shabtai and Fainsod 2018). However, retinoic acid is obtained from retinaldehyde, which itself is obtained from vitamin A. Through competition with retinaldehyde dehydrogenase, acetaldehyde inhibits the production of retinoic acid and leads to characteristics developmental malformations (Shabtai and Fainsod 2018; Shabtai et al. 2018). Furthermore, the administration of acetaldehyde to pregnant mice had teratogenic effects – suggesting that this metabolite of ethanol has a direct role (O'Shea and Kaufman 1979).

Maternal consumption of 10–20 g of alcohol per day (corresponding to one to two standard units) has been shown to induce intellectual and behavioral delays – especially if the infant is breastfed (Bonnard et al. 2011).

4.3.8. Osteoporosis

It is well known that chronic high-level ethanol consumption is associated with osteoporosis and osteoporotic fractures (Diamond et al. 1989; Schapira 1990). The underlying mechanism has been linked to elevated p21 expression, which suppresses osteoblast differentiation and mineralization and disturbs remodeling (Maurel et al. 2012; Mikosch 2014). Furthermore, the observation that protein-disrupting ALDH2 polymorphisms accentuate this toxicity suggests that acetaldehyde has a direct role (Shimizu et al. 2011; Tsuchiya et al. 2013).

It is now clear than acetaldehyde and oxidative stress generated by ethanol metabolism have key roles in the pathophysiology underlying alcohol's various toxic effects. The molecular and pathophysiological effects of acetaldehyde are summarized in Figure 2. Thus, acetaldehyde appears to have only harmful effects, whereas ethanol's effects are both beneficial and harmful.

5. Benefits of ethanol

Despite Burton and Sheron's (2018) statement that 'no level of alcohol consumption improves health' (Burton and Sheron 2018) and the many harmful effects of ethanol consumption, it nevertheless appears that light to moderate alcohol consumption does have beneficial effects.

5.1. The cardiovascular system

There is evidence of an inverse correlation between low to moderate alcohol consumption (corresponding to one to two units per day) and mortality from cardiovascular disease; this gives rise to the 'French paradox' (Albert et al. 1999; Belleville 2002; Ronksley et al. 2011). However, high alcohol consumption increases the risk of mortality from other causes and wipes out the beneficial effects – giving results in a 'J' shaped curve for the relationship between mortality and alcohol consumption (Klatsky et al. 1992). At present, there is no consensus on whether the protective cardiovascular effects of

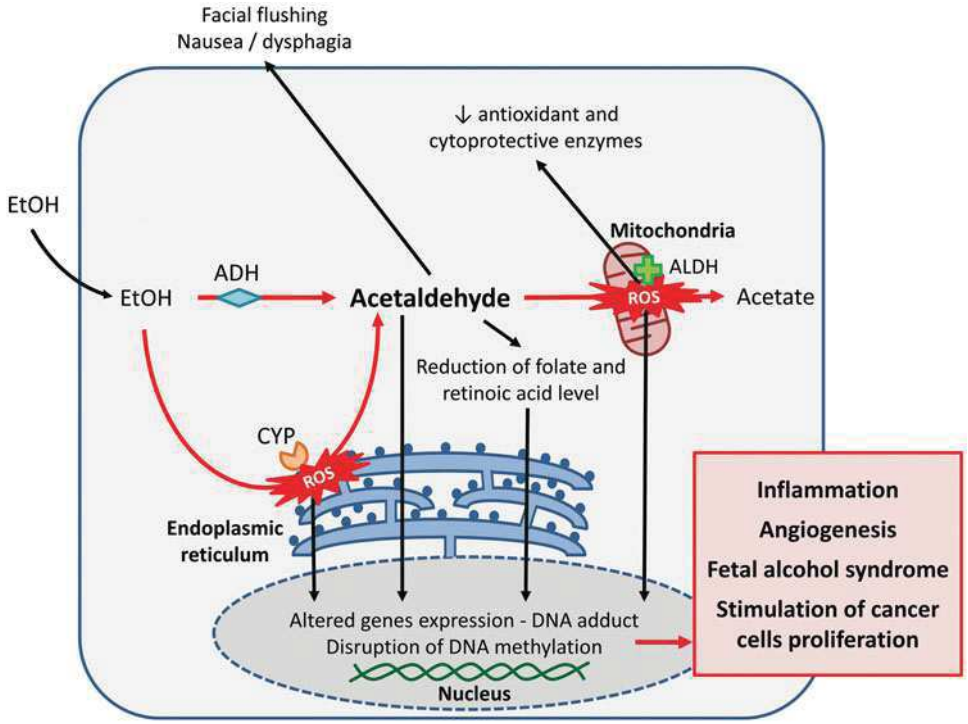


Figure 2. Molecular and pathophysiological effects of acetaldehyde.

ethanol are restricted to one or more types of alcoholic beverage drink (i.e. wine, beer or spirits) (Bau et al. 2007). However, many studies have found that wine had a greater beneficial effect on cardiovascular events. Rodrigues et al. (Rodrigues et al. 2018) found that wine consumption was associated with less harmful findings in cardiac structure. Wine's particular protective effect is linked to the anti-inflammatory, antioxidant and hypotensive properties of polyphenols (Das et al. 2007; Arranz et al. 2012). In parallel, ethanol *per se* has been linked to elevated high-density lipoprotein (HDL) cholesterol levels, reduced low-density lipoprotein (LDL) cholesterol levels, and reduced blood coagulation (Agarwal 2002). Moderate long-term alcohol consumption was also found to be associated with low blood triglyceride levels and elevated lipoprotein lipase activity (Kovář and Zemánková 2015). A review of wine's metabolic effects has been published (Markoski et al. 2016).

Gil-Bernabe et al. (2011) found that moderate alcohol consumption reduces atherosclerosis by regulating fibroblasts' production of CXCL12 (stromal cell-derived factor-1). Furthermore, Nurmi et al.'s (2013) work on the underlying pathophysiological mechanisms prompted the suggestion that the NLRP3 inflammasome is a key player in the protective cardiovascular effect of moderate alcohol consumption. Indeed, acute exposure to ethanol was found to inhibit the NLRP3 inflammasome in macrophages, leading to an anti-inflammatory effect (Nurmi et al. 2013). These results were confirmed by Hoyt et al. (2016).

The procyanidin compounds in wine have also been found to inhibit the NLRP3 inflammasome; this suggests that wine has a stronger anti-inflammatory effect than other beverages. Given the presence of many pharmacologically active compounds other than ethanol in alcoholic beverages, it is hard to predict the effects of these mixtures (Liu et al. 2017).

5.2. Diabetes

The positive impact of moderate alcohol consumption on the cardiovascular system appears to be coupled with beneficial effects on diabetes mellitus. In Knott et al.'s (2015) meta-analysis of 1,902,605 participants, consumption of less than 63 g of alcohol per day in women and in non-Asian populations was associated with a decrease in the risk of developing type 2 diabetes mellitus (Knott et al. 2015). The risk of diabetes increased for alcohol consumption levels above this threshold. In mechanistic terms, some researchers have attributed these observations to a decrease in fasting insulin concentrations, an increase in the insulin sensitivity in moderate alcohol consumers (Kawamoto et al. 2009; Schrieks et al. 2015; Zhou et al. 2016) and an increase of estradiol in women (Rohwer et al. 2015). Furthermore, alcohol consumption appears to have beneficial effects on lipid metabolism by raising levels of HDL and apolipoproteins A1 and A2 (Fragopoulou et al. 2018). However, these findings must be considered with caution since detailed mechanisms are still poorly understood (Polsky and Akturk 2017). Moreover, alcohol consumption, even moderate, is associated with impaired self-care behavior including glucose self-monitoring and exercise (Howard et al. 2004; Engler et al. 2013). Lastly, interactions are well known between alcohol and diabetes medications such as sulfonylureas for which the risk of hypoglycemia is increased (Shai et al. 2004).

5.3. The nervous system and sensory organs

5.3.1. Neuroprotection and dementia

Interestingly, ethanol appears to have a neuroprotective effect. For example, Tizabi et al.'s (2018) studies in *in vitro* models of Parkinson's and Alzheimer disease evidenced a protective effect of low ethanol consumption (Tizabi et al. 2018). The underlying mechanisms were related to low levels of pro-inflammatory cytokines (TNF-α and IL-1β) and elevated levels of brain-derived neurotrophic factor and the anti-inflammatory cytokine IL-10 – resulting in greater neuroplasticity and neuroprotection. Furthermore, preclinical studies in an animal model have shown that a low blood ethanol concentration has an antidepressant effect (Müller et al. 2017).

In a broader context, a recent prospective study of 9087 participants aged between 35 and 55 at baseline found that moderate alcohol consumption was associated with a lower risk of dementia. Over the 23-year study, teetotalers and those who consumed more than 14 units of alcohol per week had a higher risk of dementia (hazard ratio [95%CI] = 1.47 [1.15; 1.89]). People consuming between one and 14 units of alcohol per week were therefore protected against this risk (Yasar 2018). These results were supported by those of Peters et al. (2008).

Consistently, Paganini-Hill et al. (2016) found that moderate drinkers participating in the 90+ Study presented a decreased risk of dementia.

5.3.2. Chronic pain

On the same lines, Scott et al.'s (2018) study of 2583 patients with chronic pain found that moderate alcohol consumption was associated with lower pain levels,

fewer painful body areas, and less intense somatic and mood symptoms (Scott et al. 2018). Physical function also appeared to be improved by moderate alcohol consumption (Scott et al. 2018).

5.3.3. Anxiolytic effects

As mentioned above, ethanol depresses the central nervous system by interacting with GABA and N-methyl-D-aspartate receptors. This depressant effect triggers an anxiolytic effect and behavioral disinhibition at ethanol blood concentrations between 5 and 10 mM, with an effect on the hippocampus and the amygdala in particular (Harrison et al. 2017). Interestingly, ethanol's anxiolytic effects (i.e. making people more likely to start a conversation) have been linked to language abilities. Indeed, consumption of a small amount of ethanol was found to have beneficial effects on the pronunciation of a recently learned foreign language (Renner et al. 2018).

5.4. Autoimmune diseases

Of all ethanol's beneficial effects, those affecting the immune system are the least well understood, and there is no consensus on the pathophysiologic mechanisms. The following section summarizes the literature data in this field.

5.4.1. Rheumatoid arthritis

In Di Giuseppe et al.'s (2012) study of 34,141 women (197 of whom presented with rheumatoid arthritis), the consumption of at least three units of alcohol per week halved the incidence of the disease (relative to teetotalers) (Di Giuseppe et al. 2012). Consistently, a 2014 meta-analysis found that low to moderate alcohol consumption in women prevents the onset of rheumatoid arthritis in a time-, dose-dependent, and sex-dependent manner (Jin et al. 2014). Even after the development of rheumatoid arthritis, the effects of alcohol consumption should still be considered – especially for the avoidance of drug interactions. According to the results of a study published in 2008, alcohol consumption does not increase the hepatic toxicity of methotrexate and leflunomide – both of which are widely prescribed to patients with rheumatoid arthritis. Hence, the British Society for Rheumatology guidelines suggests that alcohol consumption well within national limits is appropriate (Rajakulendran et al. 2008).

Furthermore, the frequent consumption of low amounts of alcohol was found to interact with the innate immune response by delaying the onset and stopping the progression of collagen-induced arthritis (Jonsson et al. 2007).

5.4.2. Systemic lupus erythematosus

Two studies have reported that alcohol has beneficial effects in patients with systemic lupus erythematosus; the consumption of no more than 30 units per week was inversely correlated with the development of this disease (Nagata et al. 1995; Hardy et al. 1998).

5.4.3. Thyroid disorders

Alcohol consumption was found to protect against the development of autoimmune hypothyroidism, independently of sex or the type of alcoholic beverage (Carle et al. 2012). Interestingly, Carlé et al. (2013) also reported that moderate alcohol consumption is associated with a dose-dependent reduction in the risk of developing of Grave's hyperthyroidism.

Ethanol's beneficial action on the symptoms of these autoimmune diseases highlights an interesting spectrum of immune effects. However, alcohol does not appears to be of value in all immune diseases, for example, Skaaby et al. (2018) did not observe a causal relationship between alcohol consumption and the prevalence of asthma or allergic disease (Skaaby et al. 2018).

5.5. Rheumatology

Over the last few decades, several studies have described beneficial effects of ethanol on bone mineral density in general and in the trochanteric region of the proximal femur in particular (Angus et al. 1988; Holbrook and Barrett-Connor 1993). Furthermore, Felson et al. found that at least 7 oz/week (approximately 200 mL/week) of alcohol was associated with high bone density in postmenopausal women. The researchers concluded that these results might be related to the elevated endogenous estrogen levels induced by ethanol, and ruled out a direct effect of alcohol (Felson et al. 1995). Consistent with these results, Ganry et al.'s analysis of the 'Epidémiologie de l'Ostéoporose' (EPIDOS) study found that trochanteric bone mineral density was higher in elderly women with moderate alcohol consumption (one to three glasses of wine per day) than in teetotalers (Ganry et al. 2000).

5.6. Cancer

Although alcohol is known to be a carcinogenic agent in humans (see above), moderate wine consumption may decrease the risk of several cancers (including

colon, lung, ovarian and prostate cancer, basal cell carcinoma, and esophageal adenocarcinoma) (Bianchini and Vainio 2003; Schoonen et al. 2005; Anderson et al. 2009; Klarich et al. 2015; Zhou et al. 2016). These proprieties are mostly related to resveratrol, an antioxidant agent that inhibits the metabolic activation of carcinogens, decreases cell proliferation, induces apoptosis and exerts anti-inflammatory effects. The mechanisms underlying the beneficial effects of ethanol are summarized in Table 2.

6. The immunomodulatory effects of ethanol

Alcohol has contrasting effects on the body. Most of alcohol's toxic effects are linked to acetaldehyde (the first oxidative metabolite of ethanol), whereas most of its beneficial effects appear to be related to the properties of ethanol *per se*. Thus, ethanol can be likened to Robert Louis Stevenson's literary character Dr Jekyll, with acetaldehyde as Mister Hyde.

Of all ethanol's effects on the body, those on the immune system are particularly contrasting: the adverse effects are associated with pro-inflammatory activities, whereas the beneficial effects are associated with anti-inflammatory activities (in cardiovascular disease, cancer, and neuroprotection) and immune system modulation (in rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, hyperthyroidism, and hypothyroidism).

The immune system is conventionally divided into innate and adaptive mechanisms, and alcohol is known to influence both. Barr et al.'s (2016) reviews of the effects of ethanol on the immune system found that ethanol had dose-dependent effects on adaptive immune responses; moderate alcohol consumption increased T and B lymphocyte counts, whereas chronic heavy consumption was associated with a falls in cell counts (Barr et al. 2016). In addition, McClintick et al. (2019) showed that ethanol exposure on lymphoblastoid cells induce a robust immune response after 24 h exposure (including neuroinflammation and KFκB pathway, IL-6, IL-2, and IL-8 activation), but decreased in intensity after 48 h exposure (partially explained by a reversal of interferon signaling) (McClintick et al. 2019). Furthermore, some researchers have reported that moderate alcohol consumption is associated with lower levels of immunoglobulins G, M and A (Gonzalez-Quintela et al. 2007; Romeo et al. 2007). These findings may explain the above-mentioned beneficial effect of low to moderate alcohol consumption on autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, hyperthyroidism, and hypothyroidism.

In contrast, ethanol's harmful and beneficial effects on the cardiovascular system, nervous system, rheumatism, and cancer do not appear to interact with the adaptive immune response. One can therefore hypothesize that the duality of ethanol's effects (leading to anti-inflammatory and pro-inflammatory responses) particularly involves the innate immune response. In the literature, a brief exposure to ethanol was found to modulate the function of innate immune cells (including monocytes) via the inhibition of NF-κB and then a reduction in TNF-α, IL-6, and IL-1β

Table 2. Diseases in which moderate alcohol consumption appears to have beneficial effects.

Disease	Potential mechanisms	References
Cardiovascular mortality	Antioxidant and hypotensive responses Elevated HDL cholesterol Low LDL cholesterol and reduced blood coagulation Inhibition of the NLRP3 inflammasome	Agarwal (2002), Das et al. (2007), Gil-Bernabe et al. (2011), Arranz et al. (2012), Nurmi et al. (2013), Kovář and Zemánková (2015), Hoyt et al. (2016), Markoski et al. (2016), Liu et al. (2017), and Rodrigues et al. (2018)
Type 2 diabetes	Decrease in fasting insulin concentrations and lower insulin sensitivity	Knott et al. (2015), Schrieks et al. (2015), and Fragopoulou et al. (2018)
Neuroprotection	Decrease in pro-inflammatory cytokine levels (TNF-α; IL-1β) Elevated neurotrophic factors (BDNF) Elevated anti-inflammatory cytokine levels (IL-10)	Müller et al. (2017)
Dementia	Mechanism unknown	Peters et al. (2008), Paganini-Hill et al. (2016), and Yasar (2018)
Chronic pain	Central nervous system depressant effect	Scott et al. (2018)
Meniere's disease	Mechanism unknown	Sánchez-Sellero et al. (2018)
Rheumatoid arthritis	Interaction with the innate immune response, delaying the onset of collagen-induced arthritis and stopping its progression	Jonsson et al. (2007), Rajakulendran et al. (2008), Di Giuseppe et al. (2012), and Jin et al. (2014)
Systemic lupus erythematosus	Mechanism unknown	Nagata et al. (1995) and Hardy et al. (1998)
Hyperthyroidism	Mechanism unknown	Carlé et al. (2013)
Hypothyroidism	Mechanism unknown	Carle et al. (2012)
Osteoporosis	Elevated endogenous estrogen levels induced by ethanol	Angus et al. (1988),, Holbrook and Barrett-Connor (1993), Felson et al. (1995), and Ganry et al. (2000)
Cancers	Resveratrol inhibits the metabolic activation of carcinogens, decreases cell proliferation, induces apoptosis and exerts anti-inflammatory activities	Bianchini and Vainio (2003), Schoonen et al. (2005), Anderson et al. (2009), and Klarich et al. (2015)

production (Muralidharan et al. 2014). Conversely, Sureshchandra et al. (2019a, 2019b) showed that chronic alcohol drinking, regardless of dose alters resting transcriptomes of peripherical blood mononuclear cells, with the largest impact seen in innate immune cells. Interestingly, the pro-inflammatory impact of drinking was significant only with chronic heavy alcohol drinking. These transcriptional changes are being claimed to be partially explained by alterations in microRNA profiles (Sureshchandra et al. 2019a). Furthermore, expansion of granulocytic-myeloid-derived suppressor cells (one of the major components in the immune suppressive network in both innate and adaptive immune responses) in response to ethanol consumption has been highlighted to play a protective role in acute alcoholic liver damage (Li et al. 2018). Conversely, prolonged exposure to alcohol in humans was associated with elevated blood levels of IL-6 and IL-1β (Pang et al. 2011). Lastly, it has been reported that splenic macrophages from chronic heavy alcohol drinking animals generated a larger inflammatory response to lipopolysaccharide, both at protein and gene expression levels. By increasing levels of H3K4me3 (a histone mark of active promoters), as well as chromatin accessibility at promoters and intergenic regions that regulate inflammatory responses, alcohol is thought to alter the immune fitness of tissue-resident macrophages *via* epigenetic mechanisms (Sureshchandra et al. 2019b). Recent studies have highlighted the NRLP3 inflammasome (a cytosolic complex of the innate immune system mainly expressed by myeloid cells like monocytes and macrophages) as an important inhibitory target of ethanol (Nurmi et al. 2013). This inflammasome is a potent means of immune defense, and triggers the production of IL-1β and IL-18 in response to danger and pathogen signals. Activation of NRLP3 inflammasome requires the assembly of three effectors: (i) NLRP3, (ii) the apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC, an adaptor protein), and (iii) procaspase 1 (Keyel 2014). Interestingly, ethanol was found to interact with the NRLP3 inflammasome by activating the phosphorylation and thus inhibition of the ASC adaptor protein (Hoyt et al. 2016). Hence, acute ethanol exposure has an anti-inflammatory effect.

As described above, high levels of alcohol consumption are responsible for many toxic effects. The oxidative metabolic production of acetaldehyde is the cornerstone of this toxicity. Remarkably, oxidative stress and acetaldehyde were found to activate the NRLP3 inflammasome, which has a key role in the pro-inflammatory effect of chronic ethanol consumption (Hoyt et al. 2017). This sterile inflammation mechanism may override ethanol's beneficial effects on the immune system and accentuate its toxicity. Furthermore, purinergic receptors (which are also able to activate the NLRP3 inflammasome (Gicquel et al. 2017)) are affected by ethanol treatment. It was recently reported that 24 h of ethanol exposure was enough to modulate purinergic receptor levels (including P2X7R upregulation in human macrophages) and thus interleukin production – highlighting a new target for ethanol (Le Daré et al. 2018). Taken as a whole, these results suggest that purinergic receptor and NLRP3 inflammasome antagonists may be of value in the treatment of ethanol-related disease.

7. Conclusion

Alcohol consumption has both toxic and beneficial effects; ethanol can be likened to Doctor Jekyll, whereas acetaldehyde is Mister Hyde. The detrimental effects associated with high ethanol consumption are probably due to the high resulting concentrations of acetaldehyde. Taken as a whole, the risk-benefit ratio of ethanol remains negative in terms of public health, particularly in view of the carcinogenic effects.

Although a variety of mechanisms underlie the pathologic and beneficial effects of alcohol consumption, it appears that most of ethanol's effects on the body relate to the immune system. Both innate and adaptive immune responses are affected by ethanol, leading to a spectrum of clinical presentations. Modulation of adaptive immunity might be associated with reductions in the incidence and severity of autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, hyperthyroidism, and hypothyroidism. The inhibition of innate immunity by low to moderate alcohol consumption has been linked to beneficial effects, whereas high consumption is associated with detrimental effects (through pro-inflammatory activities). Although the specific mechanisms have yet to be characterized, the modulation of cytokine production via the NF-κB or NLRP3 pathways appears to be the cornerstone of ethanol's immunomodulatory effects.

Further investigations are thus required in order to clarify the biological effects attributable to ethanol and acetaldehyde, and thus characterize the complex interactions between alcohol and the immune system. This knowledge might facilitate the development of treatments that can reduce ethanol's harmful effects or accentuate its beneficial effects.

Acknowledgements

We wish to thank Doctor David Fraser for the English revision; the kind support and enriching discussions provided by Professor Isabelle Morel are also acknowledged.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

ORCID

Brendan Le Daré http://orcid.org/0000-0002-5907-2450

References

Agarwal DP. 2002. Cardioprotective effects of light-moderate consumption of alcohol: a review of putative mechanisms. Alcohol Alcohol. 37(5):409–415.

Agarwal DP, Goedde HW. 1989. Human aldehyde dehydrogenases: their role in alcoholism. Alcohol. 6(6):517–523.

Albert CM, Manson JE, Cook NR, Ajani UA, Gaziano JM, Hennekens CH. 1999. Moderate alcohol consumption and the risk of sudden cardiac death among US male physicians. Circulation. 100(9):944–950.

Al-Sader H, Abdul JH, Allawi Z, Haba Y. 2009. Alcohol and breast cancer: the mechanisms explained. J Clin Med Res. 1(3):125–131.

Anderson LA, Cantwell MM, Watson RGP, Johnston BT, Murphy SJ, Ferguson HR, McGuigan J, Comber H, Reynolds JV, Murray LJ. 2009. The association between alcohol and reflux esophagitis, barrett's esophagus, and esophageal adenocarcinoma. Gastroenterology. 136(3):799–805.

Angus RM, Sambrook PN, Pocock NA, Eisman JA. 1988. Dietary intake and bone mineral density. Bone Miner. 4(3): 265–277.

ANSES. 2010. Evaluation des risques de l'éthanol en population professionnelle | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail [Internet]. [accessed 2019 Oct 16]. https://www.anses.fr/fr/content/evaluation-des-risques-de-l%E2%80%99%C3%A9thanol-en-population-professionnelle-0

Arfsten DP, Silbergeld EK, Loffredo CA. 2004. Fetal *ADH2*3*, maternal alcohol consumption, and fetal growth. Int J Toxicol. 23(1):47–54.

Arranz S, Chiva-Blanch G, Valderas-Martínez P, Medina-Remón A, Lamuela-Raventós RM, Estruch R. 2012. Wine, beer, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease and cancer. Nutrients. 4(7):759–781.

Barr T, Helms C, Grant K, Messaoudi I. 2016. Opposing effects of alcohol on the immune system. Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiat. 65:242–251.

Bau PFD, Bau CHD, Rosito GA, Manfroi WC, Fuchs FD. 2007. Alcohol consumption, cardiovascular health, and endothelial function markers. Alcohol. 41(7):479–488.

Belleville J. 2002. The French paradox: possible involvement of ethanol in the protective effect against cardiovascular diseases. Nutrition. 18(2):173–177.

Bergmann MM, Rehm J, Klipstein-Grobusch K, Boeing H, Schutze M, Drogan D, Overvad K, Tjonneland A, Halkjaer J, Fagherazzi G. 2013. The association of pattern of lifetime alcohol use and cause of death in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. Int J Epidemiol. 42(6):1772–1790.

Bianchini F, Vainio H. 2003. Wine and resveratrol: mechanisms of cancer prevention? Eur J Cancer Prev. 12(5): 417–425.

Bismuth C, Baud F, Conso F, Dally S, Frejaville JP, Garnier R. 2000. Toxicologie clinique. Paris: Médecine-Sciences Flammarion.

Bonnard N, Falcy M, Jargot D, Pasquier E. 2011. Ethanol – Fiche toxicologique n°48 [Internet]. Institut National de Recherche et de Sécurité [accessed 2018 Jul 3]. Available from: http://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX_48&section=bibliographieAuteurs

Brancato A, Lavanco G, Cavallaro A, Plescia F, Cannizzaro C. 2017. Acetaldehyde motivation and stress: behavioral evidence of an addictive ménage à trois. Front Behav Neurosci. 11:23.

Bühler M, Mann K. 2011. Alcohol and the human brain: a systematic review of different neuroimaging methods: alcohol and the human brain. Alcohol Clin Exp Res. 35(10): 1771–1793.

Burton R, Sheron N. 2018. No level of alcohol consumption improves health. The Lancet. 392(10152):987–988.

Carlé A, Bülow Pedersen I, Knudsen N, Perrild H, Ovesen L, Rasmussen LB, Jørgensen T, Laurberg P. 2013. Graves' hyperthyroidism and moderate alcohol consumption: evidence for disease prevention. Clin Endocrinol. 79(1): 111–119.

Carle A, Pedersen IB, Knudsen N, Perrild H, Ovesen L, Rasmussen LB, Jørgensen T, Laurberg P. 2012. Moderate alcohol consumption may protect against overt autoimmune hypothyroidism: a population-based case-control study. Eur J Endocrinol. 167(4):483–490.

Cederbaum AI. 2012. Alcohol metabolism. Clin Liver Dis. 16(4):667–685.

Charness ME. 1993. Brain lesions in alcoholics. Alcohol Clin Exp Res. 17(1):2–11.

Chen C-H, Walker J, Momenan R, Rawlings R, Heilig M, Hommer DW. 2012. Relationship between liver function and brain shrinkage in patients with alcohol dependence: relationship between liver function and brain shrinkage. Alcohol Clin Exp Res. 36(4):625–632.

Council of the Netherlands TH. 2000. Ethanol, evaluation of the effects on reproduction, recommendation for classification. Committee for Compounds toxic to reproduction, a committee of the Health.

Crabb DW. 1995. Ethanol oxidizing enzymes: roles in alcohol metabolism and alcoholic liver disease. Prog Liver Dis. 13: 151–172.

Das S, Santani DD, Dhalla NS. 2007. Experimental evidence for the cardioprotective effects of red wine. Exp Clin Cardiol. 12(1):5–10.

Davies M. 2003. The role of GABAA receptors in mediating the effects of alcohol in the central nervous system. J Psychiat Neurosci. 28(4):263–274.

De la Monte S, Longato L, Tong M, DeNucci S, Wands J. 2009. The liver-brain axis of alcohol-mediated neurodegeneration: role of toxic lipids. Int J Environ Res Pub Health. 6(7):2055–2075.

de la Monte SM. 1988. Disproportionate atrophy of cerebral white matter in chronic alcoholics. Arch Neurol. 45(9): 990–992.

Di Castelnuovo A. 2006. Alcohol dosing and total mortality in men and women: an updated meta-analysis of 34 prospective studies. Arch Intern Med. 166(22):2437.

Di Giuseppe D, Alfredsson L, Bottai M, Askling J, Wolk A. 2012. Long term alcohol intake and risk of rheumatoid

arthritis in women: a population based cohort study. BMJ. 345:e4230.
Diamond T, Stiel D, Lunzer M, Wilkinson M, Posen S. 1989. Ethanol reduces bone formation and may cause osteoporosis. Am J Med. 86(3):282–288.
Ding Z-M, Ingraham CM, Rodd ZA, McBride WJ. 2015. The reinforcing effects of ethanol within the nucleus accumbens shell involve activation of local GABA and serotonin receptors. J Psychopharmacol. 29(6):725–733.
Duddempudi AT. 2012. Immunology in alcoholic liver disease. Clin Liver Dis. 16(4):687–698.
Edenberg HJ. 2000. Regulation of the mammalian alcohol dehydrogenase genes. Prog Nucl Acid Res Mol Biol. 64: 295–341.
Ekström G, Ingelman-Sundberg M. 1989. Rat liver microsomal NADPH-supported oxidase activity and lipid peroxidation dependent on ethanol-inducible cytochrome P-450 (P-450IIE1). Biochem Pharmacol. 38(8):1313–1319.
Engler PA, Ramsey SE, Smith RJ. 2013. Alcohol use of diabetes patients: the need for assessment and intervention. Acta Diabetol. 50(2):93–99.
Fan S, Meng Q, Gao B, Grossman J, Yadegari M, Goldberg ID, Rosen EM. 2000. Alcohol stimulates estrogen receptor signaling in human breast cancer cell lines. Cancer Res. 60(20):5635–5639.
Faris RF, Henein MY, Coats A. 2003. Influence of gender and reported alcohol intake on mortality in nonischemic dilated cardiomyopathy. Heart Dis. 5(2):89–94.
Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Kannel WB, Kiel DP. 1995. Alcohol intake and bone mineral density in elderly men and women. The Framingham Study. Am J Epidemiol. 142(5):485–492.
Fernandezsola J, Fatjo F, Sacanella E, Estruch R, Bosch X, Urbanomarquez A, Nicolas J. 2006. Evidence of apoptosis in alcoholic cardiomyopathy. Hum Pathol. 37(8):1100–1110.
Fragopoulou E, Choleva M, Antonopoulou S, Demopoulos CA. 2018. Wine and its metabolic effects. A comprehensive review of clinical trials. Metabolism. 83:102–119.
Ganry O, Baudoin C, Fardellone P. 2000. Effect of alcohol intake on bone mineral density in elderly women: the EPIDOS Study. Epidémiologie de l'Ostéoporose. Am J Epidemiol. 151(8):773–780.
Garro AJ, Espina N, Farinati F, Salvagnini M. 1986. The effects of chronic ethanol consumption on carcinogen metabolism and on O6-methylguanine transferase-mediated repair of alkylated DNA. Alcohol Clin Exp Res. 10(s1):73S–77S.
Gicquel T, Le Daré B, Boichot E, Lagente V. 2017. Purinergic receptors: new targets for the treatment of gout and fibrosis. Fundam Clin Pharmacol. 31(2):136–146.
Gil-Bernabe P, Boveda-Ruiz D, D'Alessandro-Gabazza C, Toda M, Miyake Y, Mifuji-Moroka R, Iwasa M, Morser J, Gabazza EC, Takei Y, et al. 2011. Atherosclerosis amelioration by moderate alcohol consumption is associated with increased circulating levels of stromal cell-derived factor-1. Circ J. 75(9):2269–2279.
Girre C, Hispard E, Tuszynski T. 1995. Toxicité de l'éthanol. Encyclopédie Médico-Chirurgicale Toxicologie-Pathologie professionnelle. Paris: Elsevier.
Gmel G, Gutjahr E, Rehm J. 2003. How stable is the risk curve between alcohol and all-cause mortality and what factors influence the shape? A precision-weighted hierarchical meta-analysis. Eur J Epidemiol. 18(7):631–642.
Gonzalez-Quintela A, Alende R, Gude F, Campos J, Rey J, Meijide LM, Fernandez-Merino C, Vidal C. 2007. Serum levels of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) in a general adult population and their relationship with alcohol consumption, smoking and common metabolic abnormalities: serum immunoglobulin levels in adults. Clin Exp Immunol. 151(1):42–50.
Goulden R. 2016. Moderate alcohol consumption is not associated with reduced all-cause mortality. Am J Med. 129(2): 180–186.
Grewal P, Viswanathen VA. 2012. Liver cancer and alcohol. Clin Liver Dis. 16(4):839–850.
Griswold MG, Fullman N, Hawley C, Arian N, Zimsen SRM, Tymeson HD, Venkateswaran V, Tapp AD, Forouzanfar MH, Salama JS, et al. 2018. Alcohol use and burden for 195 countries and territories, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. The Lancet. 392(10152):1015–1035.
Guo R, Hu N, Kandadi MR, Ren J. 2012. Facilitated ethanol metabolism promotes cardiomyocyte contractile dysfunction through autophagy in murine hearts. Autophagy. 8(4):593–608.
Gupta KK, Gupta VK, Shirasaka T. 2016. An update on fetal alcohol syndrome-pathogenesis, risks, and treatment. Alcohol Clin Exp Res. 40(8):1594–1602.
Gürtl B, Kratky D, Guelly C, Zhang L, Gorkiewicz G, Das SK, Tamilarasan KP, Hoefler G. 2009. Apoptosis and fibrosis are early features of heart failure in an animal model of metabolic cardiomyopathy: animal model of metabolic cardiomyopathy. Int J Exp Pathol. 90(3):338–346.
Haddad GE, Saunders L, Carles M, Crosby SD, del Monte F, Macgillivray TE, Semigran MJ, Dec GW, Hajjar RJ, Doye AA, et al. 2008. Fingerprint profile of alcohol-associated heart failure in human hearts. Alcohol Clin Exp Res. 32(5): 814–821.
Hamitouche S, Poupon J, Dreano Y, Amet Y, Lucas D. 2006. Ethanol oxidation into acetaldehyde by 16 recombinant human cytochrome P450 isoforms: role of CYP2C isoforms in human liver microsomes. Toxicol Lett. 167(3):221–230.
Hamon M. 2014. Bases neurobiologiques des traitements de l'alcoolo-dépendance – Quelles perspectives?. Eur Psychiat. 29(8):539.
Hansson GK, Libby P, SchöNbeck U, Yan Z-Q. 2002. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. Circ Res. 91(4):281–291.
Hardy CJ, Palmer BP, Muir KR, Sutton AJ, Powell RJ. 1998. Smoking history, alcohol consumption, and systemic lupus erythematosus: a case-control study. Ann Rheum Dis. 57(8):451–455.
Harrison NL, Skelly MJ, Grosserode EK, Lowes DC, Zeric T, Phister S, Salling MC. 2017. Effects of acute alcohol on excitability in the CNS. Neuropharmacology. 122:36–45.
Heller M, Burd L. 2014. Review of ethanol dispersion, distribution, and elimination from the fetal compartment: fetal alcohol exposure. Birth Defects Res Part A. 100(4):277–283.
Hines LM, Hankinson SE, Smith-Warner SA, Spiegelman D, Kelsey KT, Colditz GA, Willett WC, Hunter DJ. 2000. A prospective study of the effect of alcohol consumption and ADH3 genotype on plasma steroid hormone levels and breast cancer risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 9(10):1099–1105.

Hines RN, McCarver DG. 2002. The ontogeny of human drug-metabolizing enzymes: phase I oxidative enzymes. J Pharmacol Exp Ther. 300(2):355–360.
Hoffman PL, Rabe CS, Moses F, Tabakoff B. 1989. N-methyl-D-aspartate receptors and ethanol: Inhibition of calcium flux and cyclic GMP production. J Neurochem. 52(6):1937–1940.
Holbrook TL, Barrett-Connor E. 1993. A prospective study of alcohol consumption and bone mineral density. BMJ. 306(6891):1506–1509.
Holland MG, Ferner RE. 2017. A systematic review of the evidence for acute tolerance to alcohol – the "Mellanby effect". Clin Toxicol. 55(6):545–556.
Howard AA, Arnsten JH, Gourevitch MN. 2004. Effect of alcohol consumption on diabetes mellitus: a systematic review. Ann Intern Med. 140(3):211.
Hoyt LR, Ather JL, Randall MJ, DePuccio DP, Landry CC, Wewers MD, Gavrilin MA, Poynter ME. 2016. Ethanol and other short-chain alcohols inhibit nlrp3 inflammasome activation through protein tyrosine phosphatase stimulation. J Immunol. 197(4):1322–1334.
Hoyt LR, Randall MJ, Ather JL, DePuccio DP, Landry CC, Qian XI, Janssen-Heininger YM, van der Vliet A, Dixon AE, Amiel E, Poynter ME. 2017. Mitochondrial ROS induced by chronic ethanol exposure promote hyper-activation of the NLRP3 inflammasome. Redox Biol. 12:883–896.
Inserm. 2012. Médicaments psychotropes: Consommations et pharmacodépendances [Internet]. Paris: Les éditions Inserm [accessed 2018 Aug 9]. Available from: http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/2072/?sequence=30&wb48617274=5B7365DD
Jayasekara H, English DR, Room R, MacInnis RJ. 2014. Alcohol consumption over time and risk of death: a systematic review and meta-analysis. Am J Epidemiol. 179(9):1049–1059.
Ji C. 2012. Mechanisms of alcohol-induced endoplasmic reticulum stress and organ injuries. Biochem Res Int. 2012:1–12.
Jin Z, Xiang C, Cai Q, Wei X, He J. 2014. Alcohol consumption as a preventive factor for developing rheumatoid arthritis: a dose-response meta-analysis of prospective studies. Ann Rheum Dis. 73(11):1962–1967.
Jokelainen K, Matysiak-Budnik T, Mäkisalo H, Höckerstedt K, Salaspuro M. 1996. High intracolonic acetaldehyde values produced by a bacteriocolonic pathway for ethanol oxidation in piglets. Gut. 39(1):100–104.
Jonsson I-M, Verdrengh M, Brisslert M, Lindblad S, Bokarewa M, Islander U, Carlsten H, Ohlsson C, Nandakumar KS, Holmdahl R, et al. 2007. Ethanol prevents development of destructive arthritis. Proc Natl Acad Sci. 104(1):258–263.
Kawamoto R, Kohara K, Tabara Y, Miki T, Ohtsuka N, Kusunoki T, Abe M. 2009. Alcohol consumption is associated with decreased insulin resistance independent of body mass index in Japanese community-dwelling men. Tohoku J Exp Med. 218(4):331–337.
Keller DL. 2016. Benefits of moderate alcohol consumption not disproven. Am J Med. 129(8):e149.
Keyel PA. 2014. How is inflammation initiated? Individual influences of IL-1, IL-18 and HMGB1. Cytokine. 69(1):136–145.
Klarich DS, Brasser SM, Hong MY. 2015. Moderate alcohol consumption and colorectal cancer risk. Alcohol Clin Exp Res. 39(8):1280–1291.
Klatsky AL, Armstrong MA, Friedman GD. 1992. Alcohol and mortality. Ann Intern Med. 117(8):646–654.
Knott C, Bell S, Britton A. 2015. Alcohol consumption and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and dose-response meta-analysis of more than 1.9 million individuals from 38 observational studies. Diab Care. 38(9):1804–1812.
Konrad A, Vucurevic G, Lorscheider M, Bernow N, Thümmel M, Chai C, Pfeifer P, Stoeter P, Scheurich A, Fehr C. 2012. Broad disruption of brain white matter microstructure and relationship with neuropsychological performance in male patients with severe alcohol dependence. Alcohol Alcohol. 47(2):118–126.
Kovář J, Zemánková K. 2015. Moderate alcohol consumption and triglyceridemia. Physiol Res. 64:371–375.
Kunitoh S, Asai H, Imaoka S, Funae Y, Monna T. 1996. Metabolism of acetaldehyde to acetate by rat hepatic P-450s: presence of different metabolic pathway from acetaldehyde dehydrogenase system. Alcohol Clin Exp Res. 20(s1):22A–24A.
Läck AK, Ariwodola OJ, Chappell AM, Weiner JL, McCool BA. 2008. Ethanol inhibition of kainate receptor-mediated excitatory neurotransmission in the rat basolateral nucleus of the amygdala. Neuropharmacology. 55(5):661–668.
Laonigro I, Correale M, Di Biase M, Altomare E. 2009. Alcohol abuse and heart failure. Eur J Heart Fail. 11(5):453–462.
Le Daré B, Victoni T, Bodin A, Vlach M, Vene E, Loyer P. 2018. Ethanol upregulates the P2X7 purinergic receptor in human macrophages. Fundam Clin Pharmacol. 33(1):63–74.
Li S, Wang N, Tan H-Y, Hong M, Yuen M-F, Li H, Feng Y. 2018. Expansion of granulocytic, myeloid-derived suppressor cells in response to ethanol-induced acute liver damage. Front Immunol. 9:1524.
Lin CC, Potter JJ, Mezey E. 1984. Erythrocyte aldehyde dehydrogenase activity in alcoholism. Alcohol Clin Exp Res. 8(6):539–541.
Littleton J. 1998. Neurochemical mechanisms underlying alcohol withdrawal. Alcohol Health Res World. 22(1):13–24.
Liu H-J, Pan X-X, Liu B-Q, Gui X, Hu L, Jiang C-Y, Yuan H, Yi-Xin F, Yu-Lin T, Wen-Tao L. 2017. Grape seed-derived procyanidins alleviate gout pain via NLRP3 inflammasome suppression. J Neuroinflamm. 14(1):74.
Longnecker MP. 1994. Alcoholic beverage consumption in relation to risk of breast cancer: meta-analysis and review. Cancer Causes Control. 5(1):73–82.
Lopes da Silva A, Ruginsk SG, Uchoa ET, Crestani CC, Scopinho AA, Correa FMA, De Martinis BS, Elias LLK, Resstel LB, Antunes-Rodrigues J, et al. 2013. Time-course of neuroendocrine changes and its correlation with hypertension induced by ethanol consumption. Alcohol Alcohol. 48(4):495–504.
Lu Y, Cederbaum AI. 2008. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. Free Rad Biol Med. 44(5):723–738.
Machackova J, Barta J, Dhalla NS. 2006. Myofibrillar remodeling in cardiac hypertrophy, heart failure and cardiomyopathies. Can J Cardiol. 22(11):953–968.
Markoski MM, Garavaglia J, Oliveira A, Olivaes J, Marcadenti A. 2016. Molecular properties of red wine compounds and cardiometabolic benefits. Nutr Metab Insights. 9:NMI.S32909.

Matsui T, Sakurai H, Toyama T, Yoshimura A, Matsushita S, Higuchi S. 2012. Clinical application of neuroimaging to alcohol-related dementia. Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi. 47(3):125–134.

Maurel DB, Boisseau N, Benhamou CL, Jaffre C. 2012. Alcohol and bone: review of dose effects and mechanisms. Osteoporos Int. 23(1):1–16.

Mayfield J, Ferguson L, Harris RA. 2013. Neuroimmune signaling: a key component of alcohol abuse. Curr Opin Neurobiol. 23(4):513–520.

McClintick JN, Tischfield JA, Deng L, Kapoor M, Xuei X, Edenberg HJ. 2019. Ethanol activates immune response in lymphoblastoid cells. Alcohol. 79:81–91.

McEvily AJ, Holmquist B, Auld DS, Vallee BL. 1988. 3.beta.-Hydroxy-5.beta.-steroid dehydrogenase activity of human liver alcohol dehydrogenase is specific to.gamma.-subunits. Biochemistry. 27(12):4284–4288.

McGovern PE, Zhang J, Tang J, Zhang Z, Hall GR, Moreau RA, Nunez A, Butrym ED, Richards MP, Wang C-S, et al. 2004. Fermented beverages of pre- and proto-historic China. Proc Natl Acad Sci. 101(51):17593–17598.

Mikosch P. 2014. Alcohol and bone. Wien Med Wochenschr. 164(1–2):15–24.

Müller CP, Kalinichenko LS, Tiesel J, Witt M, Stöckl T, Sprenger E, Fuchser J, Beckmann J, Praetner M, Huber SE, et al. 2017. Paradoxical antidepressant effects of alcohol are related to acid sphingomyelinase and its control of sphingolipid homeostasis. Acta Neuropathol. 133(3):463–483.

Muralidharan S, Ambade A, Fulham MA, Deshpande J, Catalano D, Mandrekar P. 2014. Moderate alcohol induces stress proteins HSF1 and hsp70 and inhibits proinflammatory cytokines resulting in endotoxin tolerance. J Immunol. 193(4):1975–1987.

Nagata C, Fujita S, Iwata H, Kurosawa Y, Kobayashi K, Kobayashi M, Motegi K, Omura T, Yamamoto M, Nose T, et al. 1995. Systemic lupus erythematosus: a case-control epidemiologic study in Japan. Int J Dermatol. 34(5):333–337.

Nurmi K, Virkanen J, Rajamäki K, Niemi K, Kovanen PT, Eklund KK. 2013. Ethanol inhibits activation of NLRP3 and AIM2 inflammasomes in human macrophages – a novel anti-inflammatory action of alcohol. PLoS ONE. 8(11):e78537.

O'Shea KS, Kaufman MH. 1979. The teratogenic effect of acetaldehyde: implications for the study of the fetal alcohol syndrome. J Anat. 128:65–76.

Obad A, Peeran A, Little JI, Haddad GE, Tarzami ST. 2018. Alcohol-mediated organ damages: heart and brain. Front Pharmacol. 9:81.

Osna NA, Donohue TM, Kharbanda KK. 2017. Alcoholic liver disease: pathogenesis and current management. Alcohol Res. 38(2):147–161.

Paganini-Hill A, Kawas CH, Corrada MM. 2016. Lifestyle factors and dementia in the oldest-old: the 90+ study. Alzheimer Dis Assoc Disord. 30(1):21–26.

Panchenko LF, Moiseev VS, Pirozhkov SV, Terebilina NN, Naumova TA, Baronets VI, Goncharov AS. 2015. Blood content of markers of inflammation and cytokines in patients with alcoholic cardiomyopathy and ischemic heart disease at various stages of heart failure. Kardiologiia. 55(3):41–48.

Pang M, Bala S, Kodys K, Catalano D, Szabo G. 2011. Inhibition of TLR8- and TLR4-induced Type I IFN induction by alcohol is different from its effects on inflammatory cytokine production in monocytes. BMC Immunol. 12(1):55.

Peters R, Peters J, Warner J, Beckett N, Bulpitt C. 2008. Alcohol, dementia and cognitive decline in the elderly: a systematic review. Age Ageing. 37(5):505–512.

Pichini S, Morini L, Marchei E, Palmi I, Rotolo MC, Vagnarelli F, Garcia-Algar O, Vall O, Zuccaro P. 2009. Ethylglucuronide and ethylsulfate in meconium to assess gestational ethanol exposure: preliminary results in two Mediterranean cohorts. Can J Clin Pharmacol. 16(2):e370–e375.

Polsky S, Akturk HK. 2017. Alcohol consumption, diabetes risk, and cardiovascular disease within diabetes. Curr Diab Rep. 17(12):136

Porter R. 1987. Jean-Charles Sournia, Histoire de l'alcoolisme, Paris, Flammarion, 1986, 8vo, pp. 323, Fr. 125.00 (paperback). Med Hist. 31(3):372–373.

Rajakulendran S, Gadsby K, Deighton C. 2008. Rheumatoid arthritis, alcohol, leflunomide and methotrexate. Can changes to the BSR guidelines for leflunomide and methotrexate on alcohol consumption be justified? Musculoskelet Care. 6(4):233–246.

Rasheed A, Hines RN, McCarver-May DG. 1997. Variation in induction of human placental CYP2E1: possible role in susceptibility to fetal alcohol syndrome? Toxicol Appl Pharmacol. 144(2):396–400.

Renner F, Kersbergen I, Field M, Werthmann J. 2018. Dutch courage? Effects of acute alcohol consumption on self-ratings and observer ratings of foreign language skills. J Psychopharmacol. 32(1):116–122.

Rodrigues P, Santos-Ribeiro S, Teodoro T, Gomes FV, Leal I, Reis JP, Goff DC, Gonçalves A, Lima JAC. 2018. Association between alcohol intake and cardiac remodeling. J Am Coll Cardiol. 72(13):1452–1462.

Rohwer RD, Liu S, You N-C, Buring JE, Manson JE, Song Y. 2015. Interrelationship between alcohol intake and endogenous sex-steroid hormones on diabetes risk in postmenopausal women. J Am Coll Nutr. 34(4):273–280.

Romeo J, Wärnberg J, Díaz LE, González-Gross M, Marcos A. 2007. Effects of moderate beer consumption on first-line immunity of healthy adults. J Physiol Biochem. 63(2):153–159.

Ronksley PE, Brien SE, Turner BJ, Mukamal KJ, Ghali WA. 2011. Association of alcohol consumption with selected cardiovascular disease outcomes: a systematic review and meta-analysis. BMJ. 342:d671.

Sánchez-Sellero I, San-Román-Rodríguez E, Santos-Pérez S, Rossi-Izquierdo M, Soto-Varela A. 2018. Alcohol consumption in Menière's disease patients. Nutr Neurosci. 1–7. DOI: 10.1080/1028415X.2018.1470372

Schapira D. 1990. Alcohol abuse and osteoporosis. Semin Arthritis Rheum. 19(6):371–376.

Schoonen WM, Salinas CA, Kiemeney LALM, Stanford JL. 2005. Alcohol consumption and risk of prostate cancer in middle-aged men. Int J Cancer. 113(1):133–140.

Schrieks IC, Heil ALJ, Hendriks HFJ, Mukamal KJ, Beulens JWJ. 2015. The effect of alcohol consumption on insulin sensitivity and glycemic status: a systematic review and meta-analysis of intervention studies. Diab Care. 38(4):723–732.

Schröck A, Henzi A, Bütikofer P, König S, Weinmann W. 2018. Determination of the formation rate of phosphatidylethanol by phospholipase D (PLD) in blood and test of two selective PLD inhibitors. Alcohol. 73:1–7.

Scott J, Hassett AL, Schrepf AD, Brummett CM, Harris RE, Clauw DJ, Harte SE. 2018. Moderate alcohol consumption is associated with reduced pain and fibromyalgia symptoms in chronic pain patients. Pain Med. 19(12):2515.

Seitz HK, Simanowski UA, Garzon FT, Rideout JM, Peters TJ, Koch A, Berger MR, Einecke H, Maiwald M. 1990. Possible role of acetaldehyde in ethanol-related rectal cocarcinogenesis in the rat. Gastroenterology. 98(2):406–413.

Seitz HK, Stickel F. 2007. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. Nat Rev Cancer. 7(8): 599–612.

Sergent O, Pereira M, Belhomme C, Chevanne M, Huc L, Lagadic-Gossmann D. 2005. Role for membrane fluidity in ethanol-induced oxidative stress of primary rat hepatocytes. J Pharmacol Exp Ther. 313(1):104–111.

Shabtai Y, Bendelac L, Jubran H, Hirschberg J, Fainsod A. 2018. Acetaldehyde inhibits retinoic acid biosynthesis to mediate alcohol teratogenicity. Sci Rep. 8(1):347.

Shabtai Y, Fainsod A. 2018. Competition between ethanol clearance and retinoic acid biosynthesis in the induction of fetal alcohol syndrome. Biochem Cell Biol. 96(2):148–160.

Shai I, Rimm EB, Schulze MB, Rifai N, Stampfer MJ, Hu FB. 2004. Moderate alcohol intake and markers of inflammation and endothelial dysfunction among diabetic men. Diabetologia. 47(10):1760–1767.

Shimizu Y, Sakai A, Menuki K, Mori T, Isse T, Oyama T, Kawamoto T, Nakamura T. 2011. Reduced bone formation in alcohol-induced osteopenia is associated with elevated p21 expression in bone marrow cells in aldehyde dehydrogenase 2-disrupted mice. Bone. 48(5):1075–1086.

Silva SM, Silva S, Meireles M, Leal S. 2015. nNOS is involved in cardiac remodeling induced by chronic ethanol consumption. Toxicology. 329:98–105.

Skaaby T, Kilpeläinen TO, Taylor AE, Mahendran Y, Wong A, Ahluwalia TS, Paternoster L, Trompet S, Stott DJ, Flexeder C. et al. 2018. Association of alcohol consumption with allergic disease and asthma: a multicenter Mendelian Randomization analysis. Addiction. 114(2):216–225.

Smith C, Gasparetto M, Jordan C, Pollyea DA, Vasiliou V. 2015. The effects of alcohol and aldehyde dehydrogenases on disorders of hematopoiesis. In: Vasiliou V, Zakhari S, Seitz HK, Hoek JB, editors. Biological basis of alcohol-induced cancer. Cham: Springer International Publishing; p. 349–359.

Steinbigler P, Haberl R, König B, Steinbeck G. 2003. P-wave signal averaging identifies patients prone to alcohol-induced paroxysmal atrial fibrillation. Am J Cardiol. 91(4):491–494.

Sureshchandra S, Raus A, Jankeel A, Ligh BJK, Walter NAR, Newman N, Grant KA, Messaoudi I. 2019a. Dose-dependent effects of chronic alcohol drinking on peripheral immune responses. Sci Rep. 9(1):7847.

Sureshchandra S, Stull C, Ligh BJK, Nguyen SB, Grant KA, Messaoudi I. 2019b. Chronic heavy drinking drives distinct transcriptional and epigenetic changes in splenic macrophages. EBioMedicine. 43:594–606.

Tetrault JM, O'Connor PG. 2008. Substance abuse and withdrawal in the critical care setting. Crit Care Clin. 24(4): 767–788.

Tizabi Y, Getachew B, Ferguson CL, Csoka AB, Thompson KM, Gomez-Paz A, Ruda-Kucerova J, Taylor RE. 2018. Low vs. high alcohol: central benefits vs. detriments. Neurotox Res. 34(4):860.

Tsuchiya T, Sakai A, Menuki K, Mori T, Takeuchi Y, Kanoh S, Utsunomiya H, Murai T, Isse T, Kawamoto T, Nakamura T. 2013. Disruption of aldehyde dehydrogenase 2 gene results in altered cortical bone structure and increased cortical bone mineral density in the femoral diaphysis of mice. Bone. 53(2):358–368.

Urbano-Márquez A, Fernández-Solà J. 2004. Effects of alcohol on skeletal and cardiac muscle: alcoholic Myopathy. Muscle Nerve. 30(6):689–707.

Uusi-Oukari M, Korpi ER. 2010. Regulation of GABAA receptor subunit expression by pharmacological agents. Pharmacol Rev. 62(1):97–135.

Valenzuela CF, Bhave S, Hoffman P, Harris RA. 1998. Acute effects of ethanol on pharmacologically isolated kainate receptors in cerebellar granule neurons: comparison with NMDA and AMPA receptors. J Neurochem. 71(4):1777–1780.

Vasiliou V, Pappa A. 2000. Polymorphisms of human aldehyde dehydrogenases. Pharmacology. 61(3):192–198.

Vetreno RP, Hall JM, Savage LM. 2011. Alcohol-related amnesia and dementia: animal models have revealed the contributions of different etiological factors on neuropathology, neurochemical dysfunction and cognitive impairment. Neurobiol Learn Memory. 96(4):596–608.

Victor M. 1994. Alcoholic dementia. Can J Neurol Sci. 21(2): 88–99.

Wang M, McIntee EJ, Cheng G, Shi Y, Villalta PW, Hecht SS. 2000. Identification of DNA adducts of acetaldehyde. Chem Res Toxicol. 13(11):1149–1157.

Wang MQ, Nicholson ME, Mahoney BS, Li Y, Perko MA. 1993. Proprioceptive responses under rising and falling BACs: a test of the Mellanby effect. Percept Mot Skills. 77(1): 83–88.

Wattendorf DJ, Muenke M. 2005. Fetal alcohol spectrum disorders. Am Fam Phys. 72(2):279–282.

Wei X, Shi X, Zhong W, Zhao Y, Tang Y, Sun W, Yin X, Bogdanov B, Kim S, McClain C, et al. 2013. Chronic alcohol exposure disturbs lipid homeostasis at the adipose tissue-liver axis in mice: analysis of triacylglycerols using high-resolution mass spectrometry in combination with in vivo metabolite deuterium labeling. PLoS ONE. 8(2):e55382.

Wimer W, Russel J, Kaplan H. 1983. Alcohols toxicology. Park Ridge: Noyes Data Corp.

World Health Organization. 2011. Global status report on alcohol and health [Internet] [accessed 2018 Sept 22]. Available from: http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/msbgsruprofiles.pdf

Yasar S. 2018. Relation between alcohol consumption in midlife and dementia in late life. BMJ. 362:k3164.

Zhou Y, Zheng J, Li S, Zhou T, Zhang P, Li H-B. 2016. Alcoholic beverage consumption and chronic diseases. Int J Environ Res Pub Health. 13(6):522.

Zhukov A, Ingelman-Sundberg M. 1999. Relationship between cytochrome P450 catalytic cycling and stability: fast degradation of ethanol-inducible cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in hepatoma cells is abolished by inactivation of its electron donor NADPH-cytochrome P450 reductase. Biochem J. 340(Pt 2):453–458.

ANNEXE 3

Hugbart C, Verres Y, Le Daré B, Bucher S, Vène E, Bodin A, Lagente V, Fromenty B, Bouvet R, Morel I, Loyer P, Gicquel T. Non-oxidative ethanol metabolism in human hepatic cells in vitro: Involvement of uridine diphospho-glucuronosyltransferase 1A9 in ethylglucuronide production. Toxicol In Vitro. 2020 Apr 10;66:104842.

Toxicology in Vitro 66 (2020) 104842

Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology in Vitro

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxinvit

Non-oxidative ethanol metabolism in human hepatic cells *in vitro*: Involvement of uridine diphospho-glucuronosyltransferase 1A9 in ethylglucuronide production

Chloé Hugbart[a,b], Yann Verres[a], Brendan Le Daré[a,c], Simon Bucher[a], Elise Vène[a], Aude Bodin[a], Vincent Lagente[a], Bernard Fromenty[a], Renaud Bouvet[b,d], Isabelle Morel[a,c], Pascal Loyer[a,*], Thomas Gicquel[a,c,*]

[a] Univ Rennes, INSERM, INRAE, Institut NuMeCan (Nutrition, Metabolisms and Cancer) UMR-A 1341, UMR-S 1241, F-35000 Rennes, France
[b] CHU Rennes, Service de médecine légale, F-35000 Rennes, France
[c] CHU Rennes, Laboratoire de toxicologie médico-légale, F-35000 Rennes, France
[d] Univ Rennes, IDPSP-EA 4640, F-35000 Rennes, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Ethanol
Ethylglucuronide
Ethylsulfate
Hepatocytes
Uridine diphospho-glucuronosyltransferase
Sulfotransferase

ABSTRACT

Ethanol is the most frequently psychoactive substance used in the world, leading to major public health problems with several millions of deaths attributed to alcohol consumption each year. Metabolism of ethanol occurs mainly in the liver *via* the predominant oxidative metabolism pathway involving phase I enzymes including alcohol dehydrogenases (ADH), cytochrome P450 (CYP) 2E1 and catalase. In a lesser extent, an alternative non-oxidative pathway also contributes to the metabolism of ethanol, which involves the uridine diphospho-glucuronosyltransferase (UGT) and sulfotransferase (SULT) phase II enzymes. Using liquid chromatography-high resolution mass spectrometry, ethylglucuronide (EtG) and ethylsulfate (EtS) produced respectively by UGT and SULT conjugation and detected in various biological samples are direct markers of alcohol consumption. We report herein the efficient non-oxidative metabolic pathway of ethanol in human differentiated HepaRG cells compared to primary human hepatocytes (HH). We showed dose- and time-dependent production of EtS and EtG after ethanol (25 or 50 mM) treatment in culture media of differentiated HepaRG cells and HH and a significant induction of CYP2E1 mRNA expression upon acute ethanol exposure in HepaRG cells. These differentiated hepatoma cells thus represent a suitable *in vitro* human liver cell model to explore ethanol metabolism and more particularly EtG and EtS production. In addition, using recombinant HepG2 cells expressing different UGT1A genes, we found that UGT1A9 was the major UGT involved in ethanol glucuronidation.

1. Introduction

Ethanol is the most consumed legal drug worldwide and is considered to be the third leading cause of death in the United States (Nutt et al., 2007). Chronic excessive consumption of ethanol is associated with multi-organ toxicities, including hepatic, neurologic, cardiovascular or hematologic disorders (Bühler and Mann, 2011; Smith et al., 2015; Osna et al., 2017; Obad et al., 2018; Le Daré et al., 2019). Alcohol is also involved in carcinogenesis of mouth, esophageal, hepatic, colic and breast cancer (Seitz and Stickel, 2007). Thus, the mortality attributed to alcohol is mainly related to cancer, cirrhosis, road accidents, psychoses, and dependencies (Guérin et al., 2013).

In humans, ethanol is mainly metabolized through oxidative pathways in hepatocytes. Ethanol is initially oxidized into acetaldehyde by three enzymatic pathways located in different cellular compartments. This predominant phase I metabolism occurs in the cytosol *via* alcohol dehydrogenases (ADHs) but ethanol can also be metabolized by cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in the endoplasmic reticulum membrane (and to a lesser extent in mitochondria) and by catalase located in peroxisomes. Acetaldehyde is then oxidized by acetaldehyde

Abbreviations: BSA, bovine serum albumin; CYP, cytochrome P450; LC-HRMS, liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry; UGT, UDP-glucuronosyltransferase; SULT, sulfotransferase; CHZ, chlorzoxazone; EtG, ethylglucuronide; EtS, ethylsulfate; CHZ-O-Glc, CHZ-O-glucuronide; OH-CHZ, 6-hydroxy-CHZ; HH, human hepatocytes

* Corresponding authors at: Univ Rennes, INSERM, INRAE, Institut NuMeCan (Nutrition, Metabolisms and Cancer), 2 Rue Henri le Guilloux, 35000 Rennes, France
E-mail addresses: pascal.loyer@univ-rennes1.fr (P. Loyer), thomas.gicquel@chu-rennes.fr (T. Gicquel).

https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104842
Received 28 October 2019; Received in revised form 27 March 2020; Accepted 2 April 2020
Available online 10 April 2020
0887-2333/ © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

dehydrogenase (ALDH), xanthine oxidase (XO) and aldehyde oxidase (AO) to produce acetate, which is released into the bloodstream and finally oxidized in carbon dioxide and water by tricarboxylic acid cycle (Zakhari, 2006; Cederbaum, 2012) (Supporting information 1A). Interestingly, ADH and ALDH show different characteristics depending on their genetic variants, which influence ethanol consumption and metabolism (Edenberg, 2007). For example, ADH genotypes have been associated with differences in alcohol consumption and subjects with an ADH2*2 allele (highly active enzyme) have a decreased risk of alcoholism (Borràs et al., 2000). Also, in eastern Asia, 15–40% of the population have inactive ALDH2 isoenzymes and thus acetaldehyde levels are 5 to 20 times higher in these subjects than in individuals with active isoenzymes (Cederbaum, 2012). Therefore, the resulting accumulation of acetaldehyde would be responsible for the lower tolerance to alcohol in these populations compared to the Caucasian population.

Besides this oxidative pathway, ethanol undergoes metabolism through the so-called non-oxidative pathway generating fatty acid ethyl esters (FAEE), phosphatidylethanol (PEth), ethylsulfate (EtS) and ethylglucuronide (EtG) (Kaphalia et al., 2004; Foti and Fisher, 2005; Helander and Beck, 2005). EtG and EtS are stable, non-volatile and water-soluble phase II metabolites produced by direct conjugation of ethanol to glucuronic acid *via* uridine diphospho-glucuronosyltransferases (UGTs) and to sulfate *via* cytosolic sulfotransferases (SULTs), respectively (Cabarcos et al., 2015) (Supporting information 1B). Notably, phase II conjugation enzymes exhibit a low affinity towards ethanol, which limits the contribution of this alternative pathway in the overall metabolism of this molecule (Cederbaum, 2012). Although EtG and EtS are minor metabolites corresponding to less than 1% of ethanol excreted in urine (Dahl et al., 2002; Ingall, 2012; Cabarcos et al., 2015), these stable compounds are reliable markers of ethanol consumption, particularly interesting given their sensitivity and specificity.

Indeed, their detection in blood or urine confirms recent ethanol consumption even at low doses (Foti and Fisher, 2005; Helander and Beck, 2005). Detection and quantification of these biomarkers are routinely used in clinical practice for evaluation, screening and diagnosis of patients with excessive ethanol consumption, as well as for monitoring abstinence (Ingall, 2012) and forensic sciences (Andresen-Streichert et al., 2018).

While many reports described the detection of EtG and EtS in hair and biological fluids for clinical use and forensic medicine, intrinsic or exogenous factors that may modulate ethanol metabolism and production of EtG and EtS are not well characterized. Among these putative factors, genetic polymorphisms of metabolic enzymes, chronic or occasional consumption, nutritional factors, co-exposure to xenobiotics and liver diseases are thought to regulate the non-oxidative metabolic pathways of ethanol as observed for most other xenobiotics. Similarly, identity of the liver enzymes involved in the non-oxidative transformation of ethanol remains debated. For instance, contradictory data have been reported regarding UGT family members exhibiting the highest catalytic activities for EtG production. While several UGTs are obviously involved in the production of EtG, it was first described that UGT1A1 and 2B7 were the most prevalent isoforms generating EtG in cell free assay using recombinant UGTs (Foti and Fisher, 2005). However, patients suffering from Gilbert's syndrome, a congenital metabolic disorder characterized with a decrease in UGT1A1 expression, show no differences in EtG formation following exposure to ethanol (Huppertz et al., 2015). Conversely, high rates of ethanol glucuronidation by UGT1A9 were reported using recombinant UGTs (Schwab and Skopp, 2014). These discrepancies indicate that additional studies are required to better identify the UGT family members involved in EtG production.

Human hepatocytes in primary culture are considered as a suitable *in vitro* model to study hepatic metabolism of xenobiotics. However, hepatocytes isolated from patients present important differences in metabolic activities and lose their phenotype over time (including their capacity for drug metabolism and toxicity). Therefore, studies often combined different hepatic cell models including human hepatocytes in both 2D and 3D culture conditions and human hepatoma cell lines such as the differentiated HepaRG cells.

The HepaRG hepatoma cell line has emerged as a suitable alternative model to the use of human hepatocytes (Rogue et al., 2012). These cells differentiate into cholangiocyte- and hepatocyte-like cells in appropriate culture conditions (Cerec et al., 2007) and express most of the liver specific functions including the major CYPs (Aninat et al., 2006) and UGTs (Quesnot et al., 2018). In this context, the aim of this work was to evaluate the differentiated HepaRG cells for studying non-oxidative ethanol metabolism upon a single exposure that would mimic acute ethanol exposure in humans. For this purpose, we compared this metabolic pathway between HepaRG cells and human hepatocytes in primary culture through the quantification of EtG and EtS metabolites using Liquid Chromatography–High resolution–Mass spectrometry (LC-HRMS) following cell exposure to 25 and 50 mM ethanol corresponding to 1.15 and 2.30 g/L, respectively. Furthermore, expression of different SULT and UGT genes were investigated to study the capacity of ethanol to modulate their expression. Then, we brought further evidence that UGT1A1, UGT1A6 and more particularly UGT1A9, play a predominant role in EtG production.

2. Material and methods

2.1. Reagents

Ethanol and propan-1-ol were purchased from VWR International (Fontenay-sous-bois, France). EtG, EtS and their deuterated analogs (EtG-D5 and EtS-D5) were obtained from Promochem (Molsheim, France). Chlorzoxazone (CHZ) and 6-hydroxychlorzoxazone (OH-CHZ) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO). Chlorzoxazone β-d-Glucuronide (CHZ-O-Glc) was from Toronto Research Chemistry (Canada). Methanol was obtained from Fisher Scientific UK (Loughborough, UK). Phosphate-buffered saline (PBS), trypsin-EDTA and glutamine were purchased from Life Technologies (Paisley, UK). William's E medium (ref: 12551032) and William's E Medium without phenol red (ref: A12176–01) were purchased from Gibco (Thermo Fisher Scientific, Illkirch France). Penicillin and streptomycin were obtained from Life Technologies (Grand Island, NY). Fetal Bovine Serum (FBS) was purchased from Eurobio (Courtaboeuf, France) and from Hyclone™ GE Healthcare Life Sciences (Logan, UT). Hydrocortisone hemisuccinate was from Serb (Paris, France). Dimethyl sulfoxide (DMSO), formic acid, Minimum Essential Medium (MEM) culture medium and insulin were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO).

2.2. Cell cultures

2.2.1. HepaRG cells

Progenitor HepaRG cells were cultured as previously described (Aninat et al., 2006). Briefly, proliferating progenitor HepaRG cells were seeded at a density of 2.6×10^4 cells/cm^2 in 12-well plates and expanded in the following culture medium: William's E medium (A12176–01, Gibco) supplemented with 10% FBS, 50 U/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin, 5 µg/mL insulin, 2 mM glutamine, 50 µM sodium hydrocortisone hemisuccinate. After 2 weeks, cells were quiescent and further cultured during two more weeks in the same medium supplemented with 2% DMSO in order to enhance differentiation and to obtain higher expression levels of liver specific functions in differentiated HepaRG hepatocyte-like cells. After 4 weeks, the cultures are differentiated in both cholangiocyte- and hepatocyte like cells (Cerec et al., 2007). The detection of ethylglucuronide and ethylsulfate was performed using this coculture model. To detect CHZ metabolites, cultures enriched in hepatocyte-like cells were used as previously described (Cerec et al., 2007; Corlu and Loyer, 2015).

2.2.2. Primary human hepatocytes

Primary human hepatocytes (HH) were obtained from the processing of biological samples through the Centre de Ressources Biologiques (CRB) Santé of Rennes BB-0033-00,056 under French legal guidelines and fulfilled the requirements of the institutional ethics committee. Cells were isolated by collagenase-perfusion of liver biopsies from adult donors (Guguen-Guillouzo et al., 1982) and these cells were plated at a density of $1.5 \times 10^5/cm^2$ and cultured in the same William's E medium than HepaRG cells supplemented with 2% of DMSO. Cells were used 4 days after plating.

2.2.3. Parental and recombinant HepG2 cells

HepG2 cells, obtained from American Tissue Culture Collection (ATCC, Los Altos, CA, USA) were seeded at a density of 6.6 × 104 cells/cm^2 in 12-well plates in MEM Eagle medium supplemented with 10% FBS, 50 UI/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin and 4 mM L-glutamine. The recombinant cells were derived from parental cells by transduction with lentiviral transgenes encoding the human CYP2E1, UGT1A1, UGT1A6 and UGT1A9 proteins, as previously described (Quesnot et al., 2018). All HepG2 cells were used 4 days after seeding.

2.2.4. Ethanol treatment

Ethanol was added at different times in culture medium of cells located in 2 wells at the center of 12-well plates while the other wells were kept empty. One mL of medium containing ethanol (25 mM and 50 mM corresponding respectively to 1.15 g/L and 2.30 g/L) was incubated with cells in incubator under 95% air/5% CO_2 at 37 °C. After treatment, supernatants were collected in order to be analyzed.

2.3. Ethanol quantification

Ethanol concentrations in culture medium of cells were quantified by headspace gas chromatography – flame ionization detector (HS-GC-FID). Analyses were performed on a Thermo Scientific TRACE 2000 GC including a TriPlus Headspace autosampler (Thermo Scientific). Data acquisition, peak integration and calibration were performed using the ChromQuest 5.0 software (ThermoScientific, San Jose, CA). Briefly, 200 µL of sample and 200 µL of propan-1-ol (internal standard) were added in headspace crimp vials and incubated during 20 min at 80 °C. GC separation was performed on a Innowax column (30 m × 0.25 mm; 0.25 µm) (Interchim, Montluçon, France) at 40 °C with N_2 as mobile phase and detected at 250 °C by FID. This method quantified simultaneously ethanol, methanol and acetaldehyde in samples. Quality controls were passed each day.

2.4. Quantification of EtG and EtS

Culture medium of cells (90 µL) were supplemented with internal standards (EtG-D5, EtS-D5) and treated with 1000 µL of methanol. Samples were then vortexed, centrifugated for 10 min at 3000 *g* and supernatants were evaporated to dryness at 50 °C under a stream of nitrogen. Residues were dissolved in 100 µL of water and transferred for LC-HRMS analysis (Q Exactive®, Thermo Fisher Scientific). LC separation was performed using a C18 Accucore column (100 mm × 2.1, 2.6 µm) (ThermoScientific). The mobile phase used was H_2O LC-MS grade containing 0.1% (*v*/v) formic acid and was delivered at a flow rate of 500 µL/min during 3 min in a thermostated column at 30 °C. Data were acquired in negative heated electrospray ionization mode coupled to Targeted SIM (Single Ion Monitoring) mode. The measured accurate *m/z* values of the ions were 124.9910, 130.0225, 221.0679 and 226.0994 for EtS, EtS-D5, EtG, and EtG-D5, respectively. Quantification was performed by extracting the exact mass of each of the protonated species using a 5 ppm extraction window. LC-HRMS method parameters are further detailed in the Supporting information 2.

2.5. Quantification of CHZ and its metabolites

To quantify CHZ and its metabolites, William's E medium without red phenol was used. To quantify OH-CHZ, enzymatic hydrolysis of CHZ-O-Glc was performed for 2 h at 37 °C and pH 5 with 200 IU of β-glucuronidase (Sigma Aldrich G0251).

Samples were analyzed by high pressure liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) detection at λ = 284 nm by injecting samples (40 µL) on an Agilent Series 1100 (Waldbronn, Germany) equipment with a 75 × 3 mm Ace Excel 2 Super C18 column (ThermoFisher Scientific). Elution was performed with a constant flow rate of 0.7 mL/min using a linear gradient elution from 2 to 60% of acetonitrile for 10 min. The eluents were 0.1% acetic acid in water with 0.25% (m/v) of triethylamine hydrochloride.

2.5.1. Incubation medium used in experiments involving CHZ

In order to investigate UGT1A and CYP2E1 catalytic activity by competition between ethanol and CHZ, HepaRG cells were incubated with 300 µM CHZ in William's E culture medium without phenol red during 4 h prior to detection of the CHZ glucuronide (CHZ-O-Glc) with direct injection of culture media in HPLC column. HepaRG cells were incubated for 8 h with 300 µM CHZ and without or with 50 mM ethanol, and the CHZ-O-Glc production was analyzed by HPLC.

2.5.2. Pre-incubation medium of ethanol: Induction of CYP2E1 activity

In order to induce CYP2E1 expression prior to the evaluation of its activity in the presence of CHZ with or without ethanol, HepaRG cells were incubated during 48 h with William's E medium (1 ×) (A12176–01, Gibco) supplemented with 10% FBS, 50 U/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin, 5 µg/mL insulin, 2 mM glutamine, 50 µM sodium hydrocortisone hemisuccinate and 1% DMSO. Then, cells were incubated with 300 µM CHZ in William's E culture medium without phenol red alone during 4 h prior to detection of CHZ-O-Glc with direct injection of culture media in HPLC column.

2.6. Real-time quantitative Reverse Transcription PCR (RT-qPCR) analysis

After cells lysis, total RNAs were isolated using a Macherey-Nagel NucleoSpin® RNAII kit, according to the manufacturer's protocol. Total RNAs (0.5 µg) were reverse-transcribed into first-strand cDNAs using a High-Capacity cDNA Achieve Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA), according to the manufacturer's instructions. RNA quantity and purity were assessed with a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nyxor Biotech, Paris, France). Real-time qPCR was performed using the fluorescent dye SYBR Green method, with SYBR Green PCR Master Mix in 384-well plates and the StepOnePlus™ system (Applied Biosystems). Human GAPDH was used as the reference gene. Relative quantification values were expressed using the $2^{\Delta\Delta Ct}$ method as fold changes of the target gene, normalized to the reference gene, and related to the expression level in control experiments (arbitrarily set to 1). The sequences of the forward and reverse primers used in this study are available in the Supporting information 3.

2.7. Statistical analysis

The results were expressed as means ± standard error of the mean (SEM). Intergroup differences as a function of the treatment were analyzed in a one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's post-hoc test. When two parameters were concomitantly studied, intergroup differences were tested in a two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc correction. All analyses were performed using Prism 5.0 software (Graphpad Software, La Jolla, CA). For each analysis, two sided *p* value less than 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. HepaRG cells as a cellular model to study ethanol metabolism

In order to study the non-oxidative metabolism of ethanol, we have chosen a model of acute ethanol exposure of differentiated HepaRG cells and HH since these two cell models are metabolically competent. Two different concentrations of ethanol (25 and 50 mM) were used. HepaRG cells were exposed for 8, 24, 48 and 72 h while hepatocytes were treated for 24 and 48 h because of their limited availability. Cells exposed to ethanol were maintained in a CO_2 incubator dedicated to this treatment while control cells were cultured in a separate incubator to avoid ethanol dispersion and cross-contamination between conditions.

We first evaluated four models of ethanol evaporation using 12-well plates with different settings in absence of cells (Supporting information 4). Model 1: wells with medium containing ethanol surrounded by empty wells. Model 2: wells with medium containing ethanol surrounded by wells containing PBS. Model 3: wells with medium containing ethanol surrounded by PBS supplemented with ethanol at the same concentration. Model 4: same model as model 3 but with plates sealed with parafilm. Ethanol evaporation was very different depending on the models (Supporting Information 4), although models 1 and 2 exhibited the same profile with ~20% of the initial ethanol concentration at 24 h, ~10% at 48 h and < 5% at 72 h. In model 3, ethanol evaporation was slowed down with ~75% of the initial ethanol levels at 24 h and ~ 40% at 72 h. In model 4, evaporation was even more slowed down in sealed wells. Indeed, ~30% of ethanol disappeared from the medium within 48 h and then the concentration remained stable.

We then performed experiments using the different models with HepaRG cells in the central wells. Indeed, considering the large variations between the different models regarding the remaining ethanol content in the culture media, we assessed LDH release and cellular ATP content in HepaRG cells cultured according to models 1, 3 and 4. We did not observe any LDH release from HepaRG cells at any time points or any concentrations (data not shown) suggesting no significant cytolysis. However, ethanol exposure induced a slight but significant decrease in cellular ATP content regardless of the different ethanol concentrations found in the culture media after evaporation in the 3 experimental settings (Supporting information 5).

In our study, *in vitro* ethanol concentrations of 25 mM (1.15 g/L) and 50 mM (2.3 g/L) were compatible with blood alcohol concentrations found in acute human consumption (Jones, 2010). In addition, evidence-based survey showed that human ethanol elimination rate ranged from 10 to 35 mg/100 mL/h (Jones, 2010), which leads to estimate the entire elimination of 2.3 g/L blood alcohol within ~23 h. Using model 1, in which ethanol decay resembled to that observed *in vivo* (Jones, 2010), we next studied ethanol elimination in absence and presence of HepaRG cells (Fig. 1A, B) and HH (Fig. 1C, D). In these conditions, our data showed that the decrease in ethanol content in the culture medium was mainly due to evaporation, although a significant reduction in ethanol concentrations was observed in culture wells containing cells compared to wells without cells. The decay curves were similar for both cell types and ethanol concentrations (25 and 50 mM) with a 4- to 5-fold decrease in ethanol contents at 24 h. At 48 h, ethanol concentration was < 3 mM and ethanol was barely detectable at 72 h. Taking into consideration our *in vitro* data and previous clinical investigations (Pizon et al., 2007; Jones, 2010), further experiments were carried out using experimental model 1.

It has been established many years ago that CYP2E1, mainly expressed in hepatocytes, is an ethanol-inducible CYP oxidizing ethanol *in vivo* (Koop, 1992; Ingelman-Sundberg et al., 1993). Similarly, ethanol increases CYP2E1 expression and activity in HH in primary culture (Mahli et al., 2019) and in HepaRG cells (Do et al., 2013). Hence, we next determined whether acute ethanol exposure induced CYP2E1 expression and activity. We observed that *CYP2E1* mRNA expression was induced in a dose-dependent manner after ethanol treatment (25 or 50 mM) at 8 and 24 h in HepaRG cells (Fig. 1E). We also verified whether the increase in *CYP2E1* mRNA levels correlated with enhanced catalytic activity by detecting the 2 main CHZ metabolites produced *via* CYP2E1-dependent oxidation (Quesnot et al., 2018). We found an increase in the amounts of OH-CHZ and its down-stream metabolite CHZ-O-Glc in the culture media of HepaRG cells following a 24 h ethanol treatment (Fig. 1F).

3.2. Production of EtG and EtS by HepaRG cells and HH

In order to demonstrate that differentiated HepaRG cells and HH *in vitro* can produce phase II metabolites of ethanol (EtS and EtG) upon an acute exposure, we developed and validated an original LC-HRMS method to detect and quantify these metabolites in cell culture media (Supporting information 2). Using this approach, we showed that both EtS and EtG were detected as early as 8 h in media of HepaRG cells exposed to ethanol and accumulated in a time- and dose-dependent manner in both cell types (Fig. 2). In particular, concentrations of these metabolites were almost twice as high upon 50 mM ethanol treatment as compared to 25 mM ethanol. The profiles of metabolite's accumulation appeared quite similar between HepaRG (Fig. 2A, C) cells and HH (Fig. 2B, D). For 25 mM ethanol, we observed an equal production of metabolites in both cell types with 1 µM of EtG and 0.5 µM of EtS at 24 h. For exposure to 50 mM ethanol, both cell models produced ~1 µM of EtS while EtG concentration reached 1.7 and 3 µM in HH and HepaRG cells, respectively. The rapid accumulation of metabolites found within the first 24 h of ethanol exposure followed by the relative steady amounts of EtG and EtS after 24 h was correlated to the strong decrease in ethanol concentration in the culture media due to the evaporation of ethanol at 37 °C (Fig. 1).

To further determine whether the amounts of EtG and EtS correlated with the remaining concentrations of ethanol in the culture media, we measured EtG and EtS levels in media of HepaRG cells treated for 72 h with 25 and 50 mM ethanol using models 1, 3 and 4. Indeed, ethanol concentrations in these models remained much higher over the 3-day treatment because of less evaporation (Supporting Information 4). As expected, EtG and EtS concentrations were higher in these models than in model 1 (Fig. 2E, F). Finally, we also demonstrated the production of EtG and EtS by precision cut liver slices (PCLS) prepared from a human liver biopsy and treated with ethanol for 48 h and confirmed that the amounts of both metabolites were higher when PCLS were cultured in sealed flasks that maintained elevated levels of ethanol during the incubation time (Supporting information 7).

3.3. SULT and UGT expression

It has been previously reported that ethanol induces different SULT and UGT gene family members in rat liver *in vivo* and in primary rat hepatocytes (Farinati et al., 1989; Kardon et al., 2000; Li et al., 2000). To confirm that HepaRG cells express most of the hepatocyte specific functions (Rogue et al., 2012) in our culture conditions, we first compared the relative mRNA levels of several ADHs, ALDHs, SULTs, and UGTs as well as CYP2E1 between HH and differentiated HepaRG cells (Supporting information 6). As previously reported (Rogue et al., 2012), all the genes expressed in HH were also detected in HepaRG cells confirming their high levels of differentiation.

We next studied the expression of different SULTs and UGTs at the mRNA levels between untreated and ethanol-treated differentiated HepaRG cells (Figs. 3 and 4). At 8 h, we did not observe any elevation of mRNA SULT expression (*SULT1A1, SULT1B1, SULT1E1, SULT2A1*) in ethanol-treated HepaRG cells compared to untreated cells while at 24 h, mRNA SULT expression of these different SULTs was slightly increased after ethanol treatment compared to the control cells (Fig. 3). Similarly, the mRNA levels of *UGT1A1*, *UGT1A6* and *UGT2B15* were slightly but significantly more elevated in ethanol-treated cells than in control

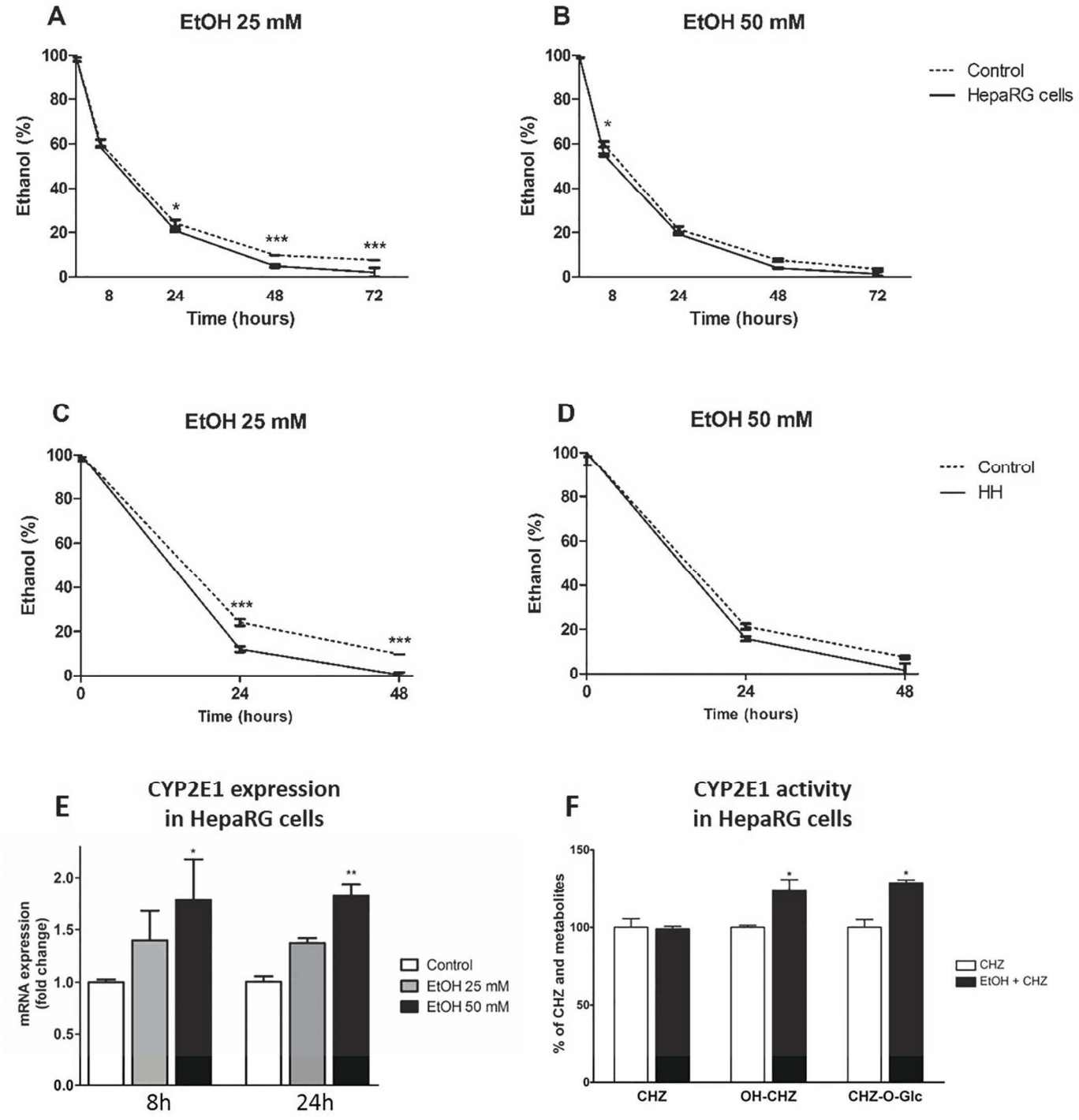
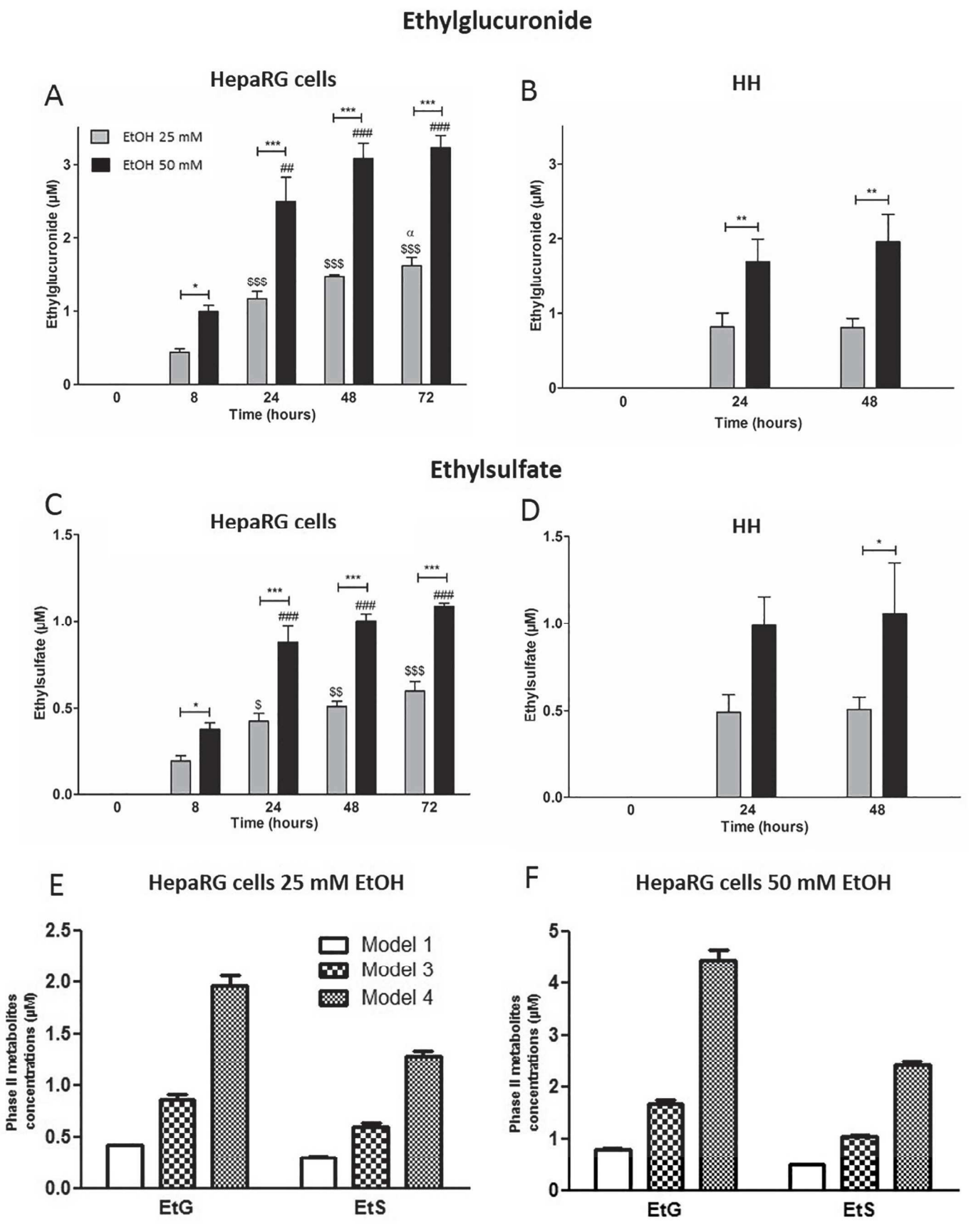


Fig. 1. Evaporation of ethanol (EtOH) in culture multiwell plates in absence and presence of cells and effect of ethanol (EtOH) on CYP2E1 expression and activity in differentiated HepaRG cells and Human Hepatocytes in primary culture (HH). Evaluation of ethanol elimination from culture media in 12 culture well-plates in absence (dashed line) or presence (plain line) of differentiated HepaRG cells (A, B) and human hepatocytes (HH: C, D) at 25 and 50 mM of ethanol in open multiwell plates with only 2 central wells containing ethanol (Model 1, Supporting information 4). Statistics: $^{***}p < .001$, $^{*}p < .05$ for ethanol (EtOH) concentrations in cultures of HepaRG cells and HH compared to control cultures without cells at each time.

Differentiated HepaRG cells and HH were incubated during different times (8, 24, 48 or 72 h) with EtOH (25 or 50 mM). The effects of EtOH treatment on CYP2E1 expression was analyzed by RT-qPCR at 8 and 24 h of treatment in differentiated HepaRG cells (E). The effect of EtOH (50 mM) on CYP2E1 activity was measured in differentiated HepaRG cells using the chlorzoxazone (CHZ) as a substrate and by detecting its primary metabolite, the 6-hydroxychlorzoxazone (OH-CHZ), and the secondary metabolite, the chlorzoxazone O-Glucuronide (CHZ-O-Glc) by HPLC-UV in culture media at 4 h of 50 mM EtOH incubation (control amount corresponds to 100%) (F). The data are expressed as the mean ± SEM for three independent experiments performed in triplicate. Statistics: $^{**}p < .01$ and $^{*}p < .05$ for cultures exposed to ethanol treatment compared with the control cultures (E) or CHZ (F).



(caption on next page)

Fig. 2. Ethylglucuronide (EtG) and ethylsulfate (EtS) production by differentiated HepaRG cells and Human Hepatocytes in primary cultures (HH) incubated with ethanol (EtOH). Differentiated HepaRG cells and HH were incubated during different times (8, 24, 48 or 72 h) with EtOH (25 or 50 mM) in open multiwell plates with only 2 central wells containing ethanol (Model 1, Supporting information 4). Concentrations of metabolites EtG (A, B) and EtS (C, D) were measured by LC-HRMS in the culture media of these cells. Differentiated HepaRG cells were also incubated during 72 h with EtOH at 25 mM (E) and 50 mM (F) in other multiwell plates settings (model 1, 3 and 4, Supporting Information 4) to obtain various remaining concentrations of ethanol within the wells containing cells and concentrations of metabolites EtG and EtS were measured. Results are expressed in µM and the data are expressed as the mean ± SEM for three independent experiments performed in triplicate. Statistics: ***p < .001 **p < .01 and *p < .05 for cultures exposed to 25 mM EtOH treatment compared with 50 mM EtOH treatment at each time. ###p < .001 and ##p < .01 for cultures exposed to 50 mM EtOH treatment compared with 8 h at 50 mM EtOH treatment. $$$p < .001 $$p < .01 and $p < .05 for cultures exposed to 25 mM EtOH treatment compared with 8 h at 25 mM EtOH treatment. αp < .05 for cultures exposed to 25 mM EtOH treatment compared with 24 h at 25 mM EtOH treatment. Statistics (E, F): Results are expressed in µM and the data are expressed as the mean ± SD of one experiment performed in quadruplicate.

cultures while no significant differences were found for *UGT1A9*, *UGT2A3*, *UGT2B4* and *UGT2B7* (Fig. 4). The overall SULT and UGT induction remained rather weak in our acute condition of ethanol treatment of HepaRG cells.

3.4. Ethanol and CHZ are competitors for CYP2E1 and UGT enzymatic activities

Previous studies have reported that UGT1A1, UGT1A9 and UGT2B7 catalyzed the formation of EtG using recombinant UGTs (Foti and Fisher, 2005; Schwab and Skopp, 2014) while patients suffering from Gilbert's syndrome who have much lower expression in UGT1A1 show no differences in EtG formation following exposure to ethanol (Huppertz et al., 2015). We have recently demonstrated that CHZ [5-chloro-2(3*H*)-benzoxazolone], a centrally acting myorelaxant indicated for musculoskeletal pain (Chou et al., 2004), produced CHZ-O-Glc following the CYP2E1-mediated formation of OH-CHZ (Quesnot et al., 2018). Moreover, CHZ-O-Glc synthesis is catalyzed by UGT1A1, UGT1A6 and UGT1A9 but not by UGT2B7 (Quesnot et al., 2018). Thus, we investigated whether ethanol could modulate the UGT-mediated metabolism of CHZ, postulating that a decrease in CHZ-O-Glc production in presence of ethanol would further indicate that UGT1A enzymes generate EtG.

HepaRG cells were incubated for 8 h with 300 µM CHZ and without

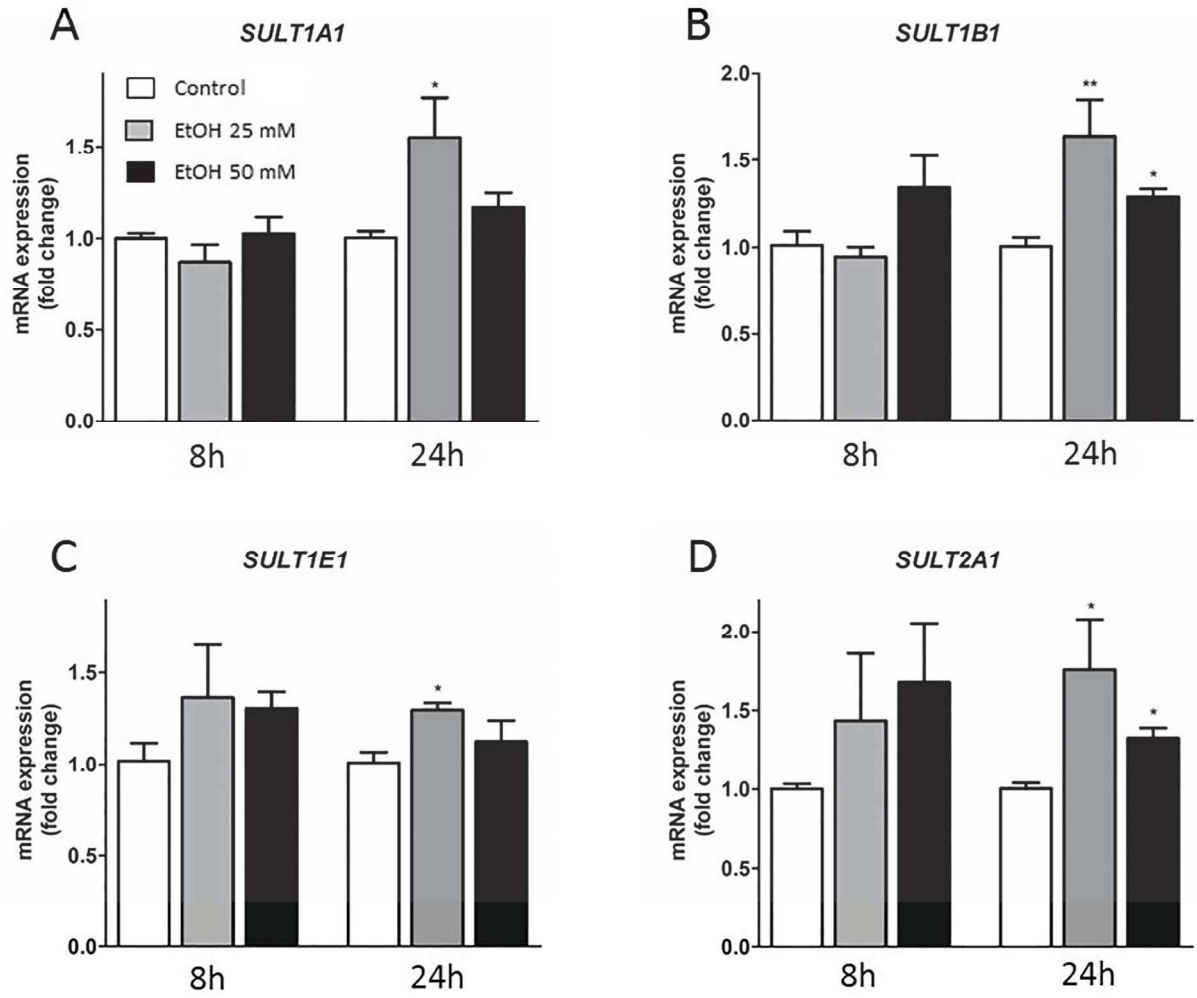
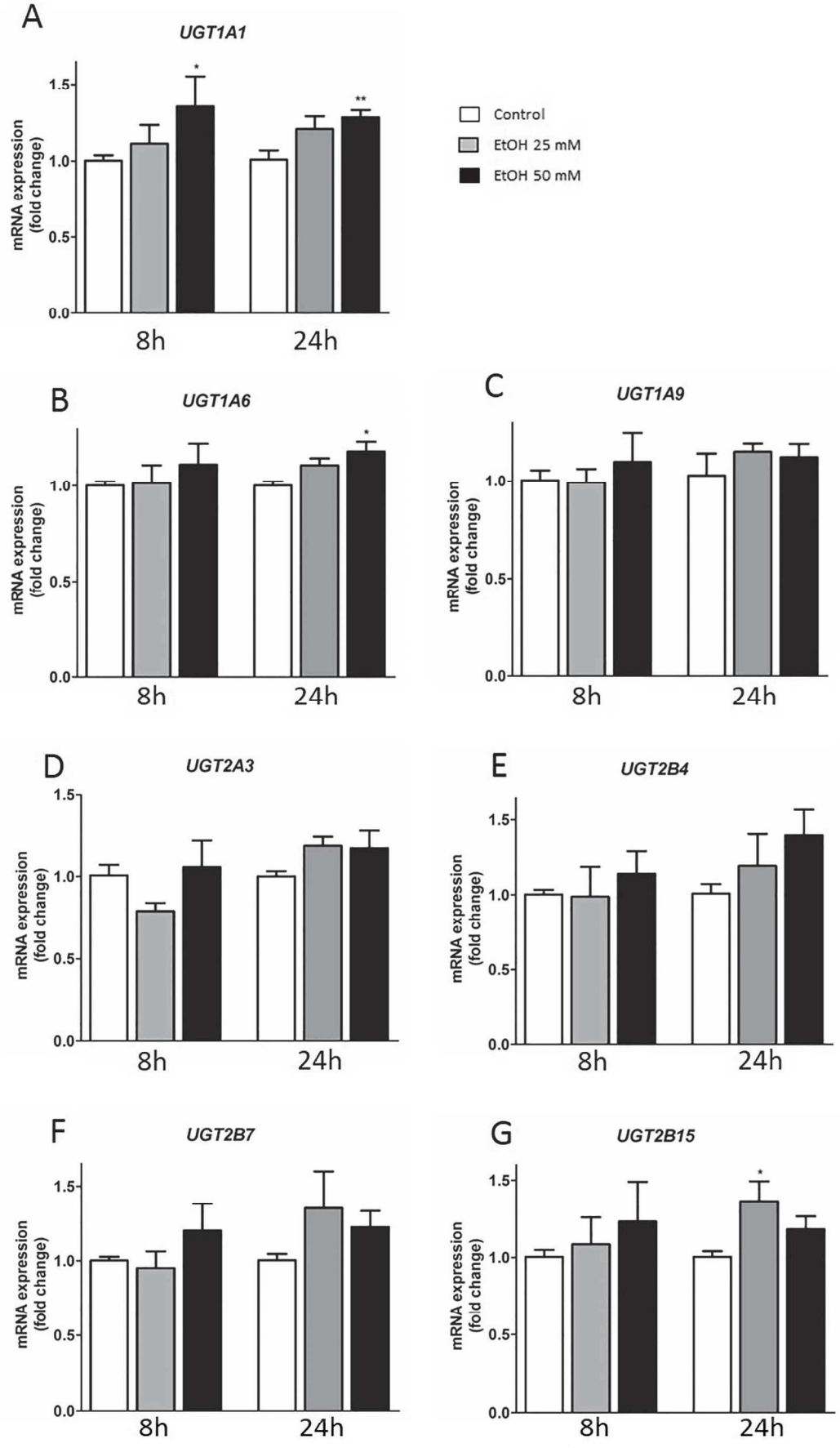


Fig. 3. Expression of sulfotransferases (SULTs) in differentiated HepaRG cells. Cells were cultured in medium alone (Control) or medium supplemented with ethanol (EtOH) at 25 mM and 50 mM for 8 or 24 h. The mRNA expression levels of *SULT1A1* (A), *SULT1B1* (B), *SULT1E1* (C) and *SULT2A1* (D) were determined using RT-qPCR. Results are normalized to GAPDH gene expression. The data are expressed as the mean ± SEM for three independent experiments performed in triplicate. Statistics: **p < .01 and *p < .05 for cultures exposed to ethanol treatment compared with the control cultures.



(caption on next page)

Fig. 4. Expression of uridine diphosphate-glucuronosyltransferases (UGT) in differentiated HepaRG cells. Cells were cultured in medium alone (control) or medium supplemented with 25 mM or 50 mM ethanol (EtOH) at for 8 or 24 h. The mRNA expression levels of *UGT1A1* (A), *UGT1A6* (B), *UGT1A9* (C), *UGT2A3* (D), *UGT2B4* (E), *UGT2B7* (F) and *UGT2B15* (G) were determined using RT-qPCR. Results are normalized to GAPDH gene expression. The data are expressed as the mean ± SEM for three independent experiments performed in triplicate. Statistics: $^{**}p < .01$, $^{*}p < .05$ for cultures exposed to ethanol treatment compared with the control cultures.

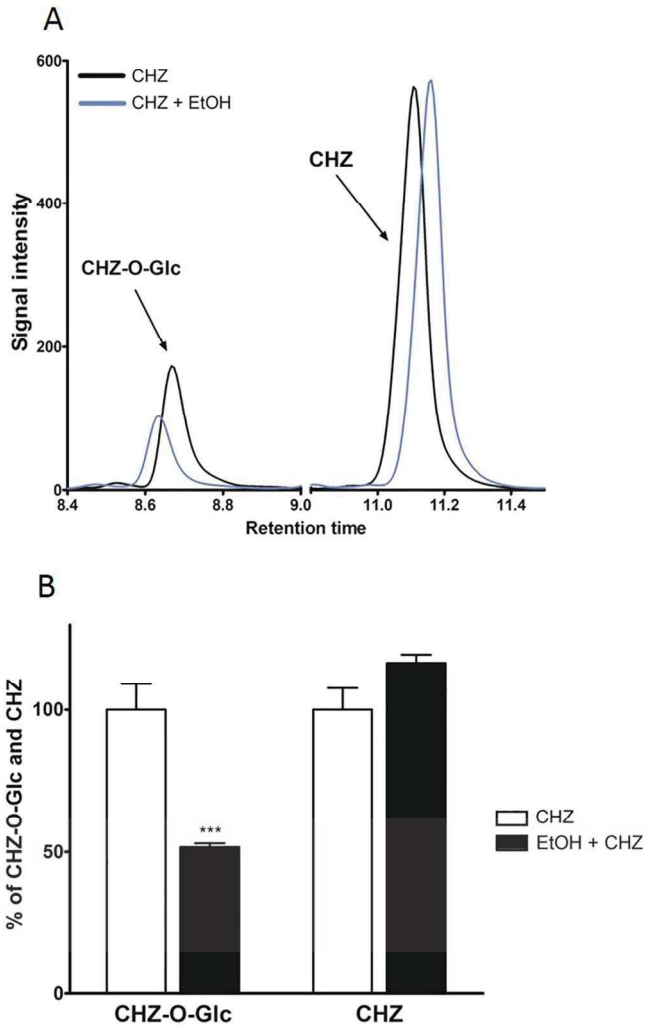


Fig. 5. UGT enzymatic activity in differentiated HepaRG cells treated by ethanol. Cells were incubated with incubation medium (William's E medium without red phenol) containing 300 µM of chlorzoxazone (CHZ) or incubation medium (William's E medium without red phenol) supplemented with both CHZ (300 µM) and ethanol (EtOH) at 50 mM for 4 h. The production of the CHZ-derived glucuronide (CHZ-O-Glc), reflecting UGT1A catalytic activity was analyzed by HPLC. Typical HPLC chromatograms (Fig. 5A) showing the peaks of CHZ-O-Glc and CHZ in culture media of cells incubated with CHZ and CHZ + EtOH. Peak area quantification of CHZ and CHZ-O-Glc (B) as the mean ± SEM for three independent experiments performed in triplicate. Results are expressed as percent of control cultures (with CHZ) set at 100%. Statistics: $^{***}p < .001$ for cultures exposed to CHZ treatment compared with the cultures co-incubated with CHZ and EtOH. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

or with 50 mM ethanol, and CHZ-O-Glc production (reflecting UGT1A activity) was analyzed by HPLC (Fig. 5). The HPLC chromatograms (Fig. 5A) showed that the peak of CHZ-O-Glc was higher in culture media of cells treated with CHZ only compared to cells co-incubated with both ethanol and CHZ. Peak area quantification indicated that co-incubation with 50 mM ethanol reduced by 50% the production of CHZ-O-Glc (Fig. 5B). Conversely, CHZ concentration was higher in culture media of cells co-incubated with ethanol and CHZ compared to cells incubated with CHZ only (Fig. 5B). Together, these data demonstrated that ethanol was a competitor of CHZ for glucuronide conjugation and strongly suggested that UGT1A enzymes are involved in EtG synthesis.

3.5. Glucuronidation of ethanol by UGT1 subfamily

In order to determine the UGT1A family members involved in EtG production, we took advantage of the different recombinant HepG2 cell lines recently established in our laboratory respectively expressing *UGT1A1, UGT1A6* and *UGT1A9* (Quesnot et al., 2018) in order to compare the production of EtG in each of these cell lines. The parental HepG2 cells are hepatic cells expressing very low levels of these UGTs (Quesnot et al., 2018) and presenting reduced xenobiotic metabolism (Donato et al., 2015). The enforced expression of one UGT gene thus allows to determine the involvement of the corresponding enzyme in EtG production.

We first confirmed that the recombinant HepG2 cell lines expressed high levels of the three *UGT1A1, UGT1A6* and *UGT1A9* genes at the mRNA level (Fig. 6A-C). As expected, each individual recombinant cell line expressed very high mRNA levels of one UGT gene. We also set up a RT-qPCR condition using "panUGT1A" primers that totally match with conserved sequences of UGT1A1, UGT1A6 and UGT1A9 in order to compare whether the overall expression of these UGTs was similar in the different recombinant cell lines (Fig. 6D). We found that *UGT1A1, UGT1A6* and *UGT1A9* mRNA levels were not significantly different using the "panUGT1A" primers indicating that the overall expression of these different UGTs in the three cell lines was relatively similar. As negative control, we used parental HepG2 cells (control) and the recombinant CYP2E1 HepG2 cell line (Quesnot et al., 2018) that expresses very high levels of CYP2E1 mRNAs and low amounts of the *UGT1A1, UGT1A6* and *UGT1A9* genes (Fig. 6E). Using these cell lines, we did not detect by LC-HRMS any EtG in the culture media of the parental and CYP2E1 HepG2 cells after 24 h of 50 mM ethanol treatment (Fig. 6F), while the glucuronide was found in the supernatants of UGT expressing cells with the highest amounts detected for the *UGT1A9* recombinant cells.

4. Discussion

In this study, we have further characterized the *in vitro* human HepaRG hepatoma cells with the goal to investigate ethanol metabolism, and more particularly the production of EtG and EtS metabolites.

Our first effort was to develop a model of ethanol acute exposure that would resemble the physiological ethanol elimination in humans by controlling ethanol concentration in the culture wells. To this end, we choose 25 and 50 mM in culture media corresponding to blood concentrations of 1.15 and 2.3 g/L during an acute ethanol intoxication in human. Ethanol is a highly volatile molecule that disappears from the culture medium at 37 °C through evaporation in air, thus contaminating adjacent wells of the same culture plate (Blein et al., 1991; Borgs et al., 1993). Hence, in order to avoid contamination by ethanol between wells, we have chosen 12-well culture plates where only the two central wells were filled, while peripheral wells were left empty (model 1, Supporting Information 4). In addition, other models were tested concerning the peripheral wells such as (i) wells containing PBS, (ii) wells containing PBS with ethanol and (iii) wells containing PBS with ethanol in culture plates sealed with parafilm (Models 2 to 4, Supporting

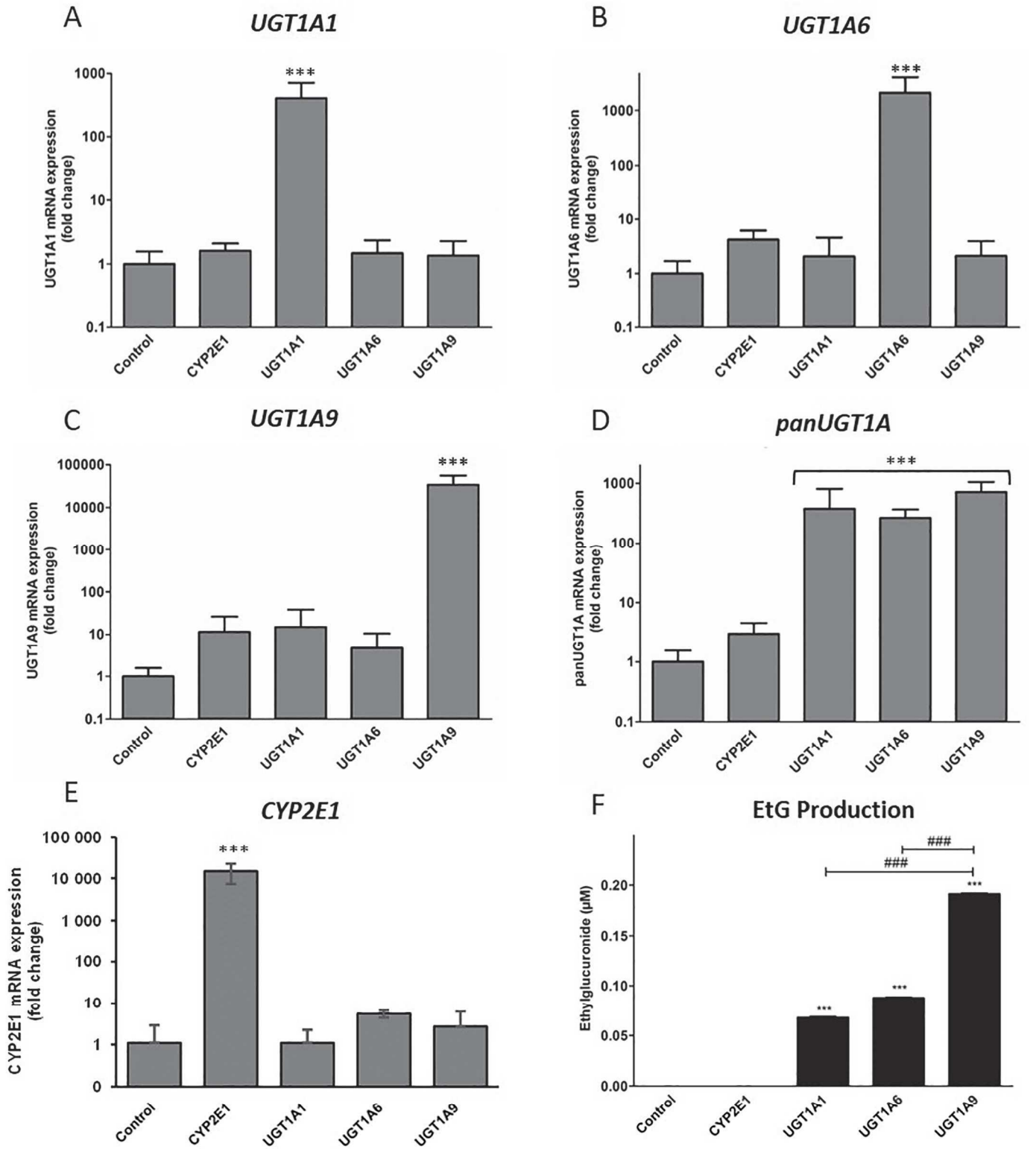


Fig. 6. Glucuroconjugation of ethanol in recombinant HepG2 cells expressing UGT1A genes. The mRNA expression levels of *UGT1A1* (A), *UGT1A6* (B), *UGT1A9* (C), *panUGT1A1* (D) and *CYP2E1* (E) were determined using RT-qPCR in parental and recombinant HepG2 cells expression *UGT1A1*, *UGT1A6* or *UGT1A9* proteins. Results were normalized to GAPDH gene expression. Cells were incubated with ethanol at 50 mM for 24 h and EtG concentrations were measured by LC-HRMS in the culture media of these cells (F). The data are expressed as the mean ± SEM for three independent experiments performed in triplicate. Statistics: ***$p < .001$ for cultures compared to control cultures. ###$p < .001$ for cultures compared to other cultures.

information 4). However, Model 1 seemed the most appropriate since the decay profile of ethanol concentration was fast and comparable to the *in vivo* ethanolemia decay profile following acute ethanol exposure in humans (Pizon et al., 2007; Jones, 2010). Indeed, at the chosen concentrations, we observed a complete disappearance of ethanol at 48 h using the GC-FID analytic method, as observed in humans (Jones, 2010). In addition, no cytotoxicity was observed at any time points or for any concentrations in both HepaRG cells and HH. However, while

the LDH release assay showed no cytolysis, cellular ATP content was moderately decreased. This suggests that ethanol could affect energy metabolism and oxidative phosphorylation without inducing major cell death, even when ethanol concentrations remain high over 72 h. Reduced cellular ATP most probably reflects the various deleterious effects of ethanol on mitochondrial function, including fatty acid oxidation and oxidative phosphorylation (Fromenty and Pessayre, 1995).

In the selected model of ethanol exposure, alcohol decay was largely due to the evaporation under our conditions of culture since less than 10% difference in ethanol concentrations was observed between wells with and without cells (HH or HepaRG). Next, we set up a reliable analytic method to detect ethanol metabolites in culture media of hepatic cells to demonstrate that HepaRG cells are competent for ethanol metabolism. After 48 h with 50 mM ethanol, the production of phase II metabolites represented only few µM of EtG and EtS, *i.e* less than 1% of the initial ethanol concentration, in agreement with previous data reporting phase II metabolism *in vivo* (Dahl et al., 2002; Cabarcos et al., 2015).

Regarding the oxidative metabolism, we first looked at the CYP2E1 expression in HepaRG cells following exposure to ethanol. CYP2E1 is considered as the main CYP responsible for microsomal and mitochondrial ethanol metabolism into acetaldehyde, which has been associated with alcohol-induced liver damage (Lieber, 2005; Knockaert et al., 2011). In addition, CYP2E1 expression is known to be induced by ethanol consumption (Gonzalez et al., 1991; Takahashi et al., 1993; Zhukov and Ingelman-Sundberg, 1999; Balusikova and Kovar, 2013). Herein, we report a moderate but significant induction of *CYP2E1* mRNA expression after an acute ethanol treatment in a dose-dependent manner demonstrating that differentiated HepaRG cells have kept an ethanol-inducible CYP2E1 gene expression. Moreover, we showed for the first time an ethanol-mediated induction of CYP2E1 catalytic activity in human hepatoma cells. Since induction of CYP2E1 mRNA is predominantly described during chronic exposure to ethanol, it may be postulated that the early increase in activity of this enzyme is more likely attributed to the stabilization of CYP2E1 mRNA and/or protein by ethanol (Zhukov and Ingelman-Sundberg, 1999).

The oxidative metabolism of ethanol was difficult to study under our culture conditions. Indeed, ethanol is oxidized to acetaldehyde by ADH and CYP2E1, then further metabolized to acetate by ALDH (Cederbaum, 2012). Although both HepaRG cells and HH express these enzymes (Quesnot et al., 2018), we did not detect acetaldehyde nor acetate by our methods most likely because of too low concentrations in the culture medium. Acetaldehyde has a boiling point at only 20.2 °C and the capacity of ALDH to remove acetaldehyde notably exceeds the capacity of its generation by the different pathways of alcohol oxidation. The absence of acetate detection can also be explained by its rapid metabolism to CO_2, fatty acid, cholesterol or ketone bodies (Cederbaum, 2012).

Because our knowledge on the enzymes involved in the conjugation of ethanol is incomplete and partly controversial (Stachel and Skopp, 2015), we investigated the non-oxidative metabolism of ethanol. EtG and EtS are non-volatile and water-soluble non-oxidative metabolites formed in the liver and excreted in urine. These markers have also been shown to be stable *in vitro* (Walsham and Sherwood, 2014). Following a single exposure of both HepaRG cells and HH to ethanol, we detected ethanol-related phase II-metabolites using an innovative and fully validated LC-HRMS method. To our knowledge, this is the first quantification by LC-MS of EtG and EtS in culture media that revealed the non-oxidative production of ethanol metabolites in a dose and time dependent manner in metabolically active hepatic cells *in vitro*. These results also suggested that UGTs and SULTs were not saturated for 25 and 50 mM ethanol since the amounts of both metabolites were much higher in culture settings that maintained elevated amounts of ethanol over 3 days of treatment. The amount of EtG produced was greater than EtS, similar to what has been found *in vivo* (Halter et al., 2008; Kummer et al., 2013). In addition, the EtS/EtG ratio (molar concentration) was lower for HepaRG cells (0.36) than for human hepatocytes (0.59). *In vivo*, in urine, this ratio has previously been found to be less than 1 (Halter et al., 2008; Winkler et al., 2013). Altogether, these results would suggest that UGTs have higher metabolic activity towards ethanol than SULTs both *in vivo* and in the *in vitro* models of hepatocytes used in this study.

SULT1A1 and SULT2A1 are the main SULT isoforms expressed in liver (Riches et al., 2009; Kurogi et al., 2012; Stachel and Skopp, 2016). Here, we confirmed that *SULT1A1* and *SULT2A1* mRNA are expressed at comparable levels between HepaRG and HH. Furthermore, *SULT1A1, SULT1B1, SULT1E1* and *SUL2A1* mRNA expression was slightly induced after 24 h-ethanol treatment in HepaRG cells. The phase II-UGT enzymes are also expressed at high levels in liver, especially UGT2B4, UGT2B15, UGT1A9 and UGT2B7 (Ohno and Nakajin, 2009). Our results also confirmed similar UGT mRNA expression levels between HepaRG cells and HH. UGT mRNA expression was barely induced by ethanol excepted *UGT2B15* at 25 mM after 24 h, *UGT1A1* at 50 mM after 8 and 24 h and *UGT1A6* at 50 mM after 24 h. To our knowledge, there are no data available on the effect of ethanol on UGT expression in human. Only one study showed induction of UGT1A1 expression after chronic ethanol exposure in rats (Kardon et al., 2000).

Several UGTs are most likely involved in the production of EtG but contradictory data have been published regarding the most prevalent isoforms generating EtG. In cell free assays using recombinant UGTs, UGT1A1, 1A9 and 2B7 were identified as the most implicated enzymes (Foti and Fisher, 2005; Ohno and Nakajin, 2009; Court et al., 2012; Al Saabi et al., 2013; Schwab and Skopp, 2014; Stachel and Skopp, 2016). To further identify which UGTs can catalyze ethanol glucuronidation, we used recombinant HepG2 cells expressing CYP2E1, UGT1A1, UGT1A6 and UGT1A9. Our results demonstrated that recombinant HepG2 cells expressing UGT1A1, UGT1A6 and UGT1A9 were able to metabolize ethanol in EtG while native HepG2 cells and HepG2 cells expressing CYP2E1 did not produce this glucuronide. Furthermore, the UGT1A9 isoform seems to be the most active in ethanol glucuronidation in agreement with a previous study showing that UGT1A9 and UGT2B7 appeared to be the main isoforms producing EtG in recombinant microsomes (Stachel and Skopp, 2015). Further experiments would be required to establish additional recombinant HepG2 cells expressing other UGTs and SULTs and to study their involvement in EtG and EtS production.

Our results also demonstrated that HepaRG cells represent a suitable hepatic cell model to study ethanol metabolism. Indeed, we showed that expression of phase I and phase II genes and ethanol metabolism are very similar between these cells and HH. After characterizing this experimental model, we would like to extend this study to the metabolism of ethanol in pathological conditions observed in humans. Indeed, our laboratory has developed culture conditions of HepaRG cells to induce steatosis (Michaut et al., 2016), inflammation (Al-Attrache et al., 2016) and cholestasis (Bachour-El Azzi et al., 2014; Sharanek et al., 2016). These diseases are frequently related to, or associated with, alcohol consumption. Thus, our models will allow a better understanding of the metabolism, and therefore the toxicity of ethanol in different pathological conditions in human hepatocytes.

Authorship contributions

Participated in research design: Hugbart Chloé, Le Daré Brendan, Vène Elise, Lagente Vincent, Fromenty Bernard, Bouvet Renaud, Morel Isabelle, Loyer Pascal, Gicquel Thomas.

Conducted experiments: Hugbart Chloé, Verres Yann, Le Daré Brendan, Bucher Simon, Vène Elise, Bodin Aude, Gicquel Thomas.

Performed data analysis: Hugbart Chloé, Verres Yann, Le Daré Brendan, Gicquel Thomas.

Wrote or contributed to the writing of the manuscript: Hugbart Chloé, Loyer Pascal, Le Daré Brendan, Gicquel Thomas.

Declaration of Competing Interest

Authors declare that they have no conflicts of interest that might be relevant to the content of the manuscript.

Acknowledgments

We thank Drs. Dounia Le Guillou and Jacques Le Seyec for their helpful contribution. The authors would also like to thank the Centre de Ressources Biologiques (CRB) Santé of Rennes for providing human hepatocytes. The authors received no specific funding for this work.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104842.

References

Al Saabi, A., Allorge, D., Sauvage, F.-L., Tournel, G., Gaulier, J.M., Marquet, P., et al., 2013 Mar 1. Involvement of UDP-Glucuronosyltransferases UGT1A9 and UGT2B7 in ethanol Glucuronidation, and interactions with common drugs of abuse. Drug Metab. Dispos. 41 (3), 568–574.

Al-Attrache, H., Sharanek, A., Burban, A., Burbank, M., Gicquel, T., Abdel-Razzak, Z., et al., 2016 Sep. Differential sensitivity of metabolically competent and non-competent HepaRG cells to apoptosis induced by diclofenac combined or not with TNF-α Toxicol. Lett. 258, 71–86.

Andresen-Streichert, H., Müller, A., Glahn, A., Skopp, G., Sterneck, M., 2018 May 4. Alcohol biomarkers in clinical and forensic contexts. Dtsch Aerzteblatt Online [Internet] 115 (18), 309–315.

Aninat, C., Piton, A., Glaise, D., Le Charpentier, T., Langouët, S., Morel, F., et al., 2006 Jan. Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. Drug Metab Dispos Biol Fate Chem. 34 (1), 75–83.

Bachour-El Azzi, P., Sharanek, A., Abdel-Razzak, Z., Antherieu, S., Al-Attrache, H., Savary, C.C., et al., 2014 Aug 8. Impact of inflammation on chlorpromazine-induced cytotoxicity and Cholestatic features in HepaRG cells. Drug Metab. Dispos. 42 (9), 1556–1566.

Balusikova, K., Kovar, J., 2013 Sep. Alcohol dehydrogenase and cytochrome P450 2E1 can be induced by long-term exposure to ethanol in cultured liver HEP-G2 cells. In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. 49 (8), 619–625.

Blein, O., Ronot, X., Adolphe, M., 1991 May. Cross contamination associated with the use of multiwell culture plates for cytotoxicity assessment of volatile chemicals. Cytotechnology. 6 (1), 79–82.

Borgs, P., Way, D.L., Witte, M.H., Witte, C.L., 1993 Feb. Effective stabilization of ethanol levels in multiple-well tissue culture plates. Alcohol. 10 (1), 31–35.

Borràs, E., Coutelle, C., Rosell, A., Fernández-Muixi, F., Broch, M., Crosas, B., et al., 2000 Apr. Genetic polymorphism of alcohol dehydrogenase in europeans: TheADH2*2 allele decreases the risk for alcoholism and is associated withADH3*1. Hepatology. 31 (4), 984–989.

Bühler, M., Mann, K., 2011 Oct. Alcohol and the human brain: a systematic review of different neuroimaging methods: alcohol and the human brain. Alcohol. Clin. Exp. Res. 35 (10), 1771–1793.

Cabarcos, P., Álvarez, I., Tabernero, M.J., Bermejo, A.M., 2015 Jul. Determination of direct alcohol markers: a review. Anal. Bioanal. Chem. 407 (17), 4907–4925.

Cederbaum, A.I., 2012 Nov. Alcohol metabolism. Clin Liver Dis. 16 (4), 667–685.

Cerec, V., Glaise, D., Garnier, D., Morosan, S., Turlin, B., Drenou, B., et al., 2007 Apr. Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor. Hepatology. 45 (4), 957–967.

Chou, R., Peterson, K., Helfand, M., 2004 Aug. Comparative efficacy and safety of skeletal muscle relaxants for spasticity and musculoskeletal conditions: a systematic review. J. Pain Symptom Manag. 28 (2), 140–175.

Corlu, A., Loyer, P., 2015. Culture conditions promoting hepatocyte proliferation and cell cycle synchronization. In: Vinken, M., Rogiers, V. (Eds.), Protocols in In Vitro Hepatocyte Research [Internet]. Springer New York, New York, NY, pp. 27–51 [cited 2020 Mar 27].

Court, M.H., Zhang, X., Ding, X., Yee, K.K., Hesse, L.M., Finel, M., 2012 Mar. Quantitative distribution of mRNAs encoding the 19 human UDP-glucuronosyltransferase enzymes in 26 adult and 3 fetal tissues. Xenobiotica. 42 (3), 266–277.

Dahl, H., Stephanson, N., Beck, O., Helander, A., 2002 May 1. Comparison of urinary excretion characteristics of ethanol and ethyl glucuronide. J. Anal. Toxicol. 26 (4), 201–204.

Do, T.H.T., Gaboriau, F., Cannie, I., Batusanski, F., Ropert, M., Moirand, R., et al., 2013 Nov. Iron-mediated effect of alcohol on hepatocyte differentiation in HepaRG cells. Chem. Biol. Interact. 206 (2), 117–125.

Donato MT, Tolosa L, Gómez-Lechón MJ. Culture and functional characterization of human hepatoma HepG2 cells. In: Vinken M, Rogiers V, editors. Protocols in In Vitro Hepatocyte Research [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2015 [cited 2019 Jul 19]. p. 77–93.

Edenberg, H.J., 2007. The genetics of alcohol metabolism: role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase variants. Alcohol Res Health J Natl Inst Alcohol Abuse Alcohol. 30 (1), 5–13.

Farinati, F., Lieber, C.S., Garro, A.J., 1989 Jun. Effects of chronic ethanol consumption on carcinogen activating and detoxifying systems in rat upper alimentary tract tissue. Alcohol. Clin. Exp. Res. 13 (3), 357–360.

Foti, R.S., Fisher, M.B., 2005 Oct. Assessment of UDP-glucuronosyltransferase catalyzed formation of ethyl glucuronide in human liver microsomes and recombinant UGTs. Forensic Sci. Int. 153 (2–3), 109–116.

Fromenty, B., Pessayre, D., 1995 Jan. Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. Pharmacol. Ther. 67 (1), 101–154.

Gonzalez, F.J., Ueno, T., Umeno, M., Song, B.J., Veech, R.L., Gelboin, H.V., 1991. Microsomal ethanol oxidizing system: transcriptional and posttranscriptional regulation of cytochrome P450, CYP2E1. Alcohol Alcohol Oxf Oxfs Suppl. 1, 97–101.

Guérin, S., Laplanche, A., Dunant, A., Hill, C., 2013 Aug. Alcohol-attributable mortality in France. Eur. J. Pub. Health 23 (4), 588–593.

Guguen-Guillouzo, C., Campion, J.P., Brissot, P., Glaise, D., Launois, B., Bourel, M., et al., 1982 Jun. High yield preparation of isolated human adult hepatocytes by enzymatic perfusion of the liver. Cell Biol Int Rep. 6 (6), 625–628.

Halter, C.C., Dresen, S., Auwaerter, V., Wurst, F.M., Weinmann, W., 2008 Mar. Kinetics in serum and urinary excretion of ethyl sulfate and ethyl glucuronide after medium dose ethanol intake. Int. J. Legal Med. 122 (2), 123–128.

Helander, A., Beck, O., 2005 Jul 1. Ethyl sulfate: a metabolite of ethanol in humans and a potential biomarker of acute alcohol intake. J. Anal. Toxicol. 29 (5), 270–274.

Huppertz, L.M., Gunsilius, L., Lardi, C., Weinmann, W., Thierauf-Emberger, A., 2015 Sep. Influence of Gilbert's syndrome on the formation of ethyl glucuronide. Int. J. Legal Med. 129 (5), 1005–1010.

Ingall, G.B., 2012 Sep. Alcohol biomarkers. Clin. Lab. Med. 32 (3), 391–406.

Ingelman-Sundberg, M., Johansson, I., Yin, H., Terelius, Y., Eliasson, E., Clot, P., et al., 1993 Dec. Ethanol-inducible cytochrome P4502E1: genetic polymorphism, regulation, and possible role in the etiology of alcohol-induced liver disease. Alcohol. 10 (6), 447–452.

Jones, A.W., 2010 Jul. Evidence-based survey of the elimination rates of ethanol from blood with applications in forensic casework. Forensic Sci. Int. 200 (1–3), 1–20.

Kaphalia, B.S., Cai, P., Khan, M.F., Okorodudu, A.O., Ansari, G., A, S., 2004 Nov. Fatty acid ethyl esters: markers of alcohol abuse and alcoholism. Alcohol. 34 (2–3), 151–158.

Kardon, T., Coffey, M.J., Bánhegyi, G., Conley, A.A., Burchell, B., Mandl, J., et al., 2000 Jul. Transcriptional induction of bilirubin UDP-glucuronosyltransrase by ethanol in rat liver. Alcohol. 21 (3), 251–257.

Knockaert, L., Descatoire, V., Vadrot, N., Fromenty, B., Robin, M.-A., 2011 Mar. Mitochondrial CYP2E1 is sufficient to mediate oxidative stress and cytotoxicity induced by ethanol and acetaminophen. Toxicol. in Vitro 25 (2), 475–484.

Koop, D.R., 1992 Jan 6. Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1. FASEB J. 6 (2), 724–730.

Kummer, N., Wille, S., Di Fazio, V., Lambert, W., Samyn, N., 2013 Jun. A fully validated method for the quantification of ethyl glucuronide and ethyl sulphate in urine by UPLC–ESI-MS/MS applied in a prospective alcohol self-monitoring study. J. Chromatogr. B 929, 149–154.

Kurogi, K., Davidson, G.M., Mohammed, Y.I., Williams, F.E., Liu, M., Sakakibara, Y., et al., 2012. Ethanol sulfation by the human cytosolic sulfotransferases: a systematic analysis. Biol. Pharm. Bull. 35 (12), 2180–2185.

Le Daré, B., Lagente, V., Gicquel, T., 2019 Oct 2. Ethanol and its metabolites: update on toxicity, benefits, and focus on immunomodulatory effects. Drug Metab. Rev. 51 (4), 545–561.

Li, Y.Q., Prentice, D.A., Howard, M.L., Mashford, M.L., Wilson, J.S., Desmond, P.V., 2000 Jan. Alcohol up-regulates udp-glucuronosyltransferase mrna expression in rat liver and in primary rat hepatocyte culture. Life Sci. 66 (7), 575–584.

Lieber, C.S., 2005. Pathogenesis and treatment of alcoholic liver disease: progress over the last 50 years. Rocz Akad Med W Bialymstoku 1995 50, 7–20.

Mahli, A., Erwin Thasler, W., Hellerbrand, C., 2019 Mar 24. Establishment of a *p* -nitrophenol oxidation-based assay for the analysis of CYP2E1 activity in intact hepatocytes *in vitro*. Toxicol. Mech. Methods 29 (3), 219–223.

Michaut, A., Le Guillou, D., Moreau, C., Bucher, S., McGill, M.R., Martinais, S., et al., 2016 Feb. A cellular model to study drug-induced liver injury in nonalcoholic fatty liver disease: application to acetaminophen. Toxicol. Appl. Pharmacol. 292, 40–55.

Nutt, D., King, L.A., Saulsbury, W., Blakemore, C., 2007 Mar. Development of a rational scale to assess the harm of drugs of potential misuse. Lancet 369 (9566), 1047–1053.

Obad, A., Peeran, A., Little, J.I., Haddad, G.E., Tarzami, S.T., 2018 Feb 13. Alcohol-Mediated Organ Damages: Heart and Brain. Front Pharmacol [Internet] 9 [cited 2018 Jul 25].

Ohno, S., Nakajin, S., 2009 Jan 1. Determination of mRNA expression of human UDP-glucuronosyltransferases and application for localization in various human tissues by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Drug Metab. Dispos. 37 (1), 32–40.

Osna, N.A., Donohue, T.M., Kharbanda, K.K., 2017. Alcoholic liver disease: pathogenesis and current management. Alcohol Res Curr Rev. 38 (2), 147–161.

Pizon, A.F., Becker, C.E., Bikin, D., 2007 Jun. The clinical significance of variations in ethanol toxicokinetics. J Med Toxicol. 3 (2), 63–72.

Quesnot, N., Bucher, S., Gade, C., Vlach, M., Vene, E., Valença, S., et al., 2018 Oct. Production of chlorzoxazone glucuronides via cytochrome P4502E1 dependent and independent pathways in human hepatocytes. Arch. Toxicol. 92 (10), 3077–3091.

Riches, Z., Stanley, E.L., Bloomer, J.C., Coughtrie, M.W.H., 2009 Nov 1. Quantitative Evaluation of the Expression and Activity of Five Major Sulfotransferases (SULTs) in Human Tissues: The SULT "Pie." Drug Metab. Dispos. 37 (11), 2255–2261.

Rogue, A., Lambert, C., Spire, C., Claude, N., Guillouzo, A., 2012 Jan 1. Interindividual variability in gene expression profiles in human hepatocytes and comparison with HepaRG cells. Drug Metab. Dispos. 40 (1), 151–158.

Schwab, N., Skopp, G., 2014 Apr. Identification and preliminary characterization of UDP-glucuronosyltransferases catalyzing formation of ethyl glucuronide. Anal. Bioanal. Chem. 406 (9–10), 2325–2332.
Seitz, H.K., Stickel, F., 2007 Aug. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. Nat. Rev. Cancer 7 (8), 599–612.
Sharanek, A., Burban, A., Burbank, M., Le Guevel, R., Li, R., Guillouzo, A., et al., 2016 Jul. Rho-kinase/myosin light chain kinase pathway plays a key role in the impairment of bile canaliculi dynamics induced by cholestatic drugs. Sci Rep [Internet] 6 (1) [cited 2019 Jul 19].
Smith, C., Gasparetto, M., Jordan, C., Pollyea, D.A., Vasiliou, V., 2015. The effects of alcohol and aldehyde dehydrogenases on disorders of hematopoiesis. In: Vasiliou, V., Zakhari, S., Seitz, H.K., Hock, J.B. (Eds.), Biological Basis of Alcohol-Induced Cancer [Internet]. Cham: Springer International Publishing, pp. 349–359 [cited 2018 Jul 25].
Stachel, N., Skopp, G., 2015 Feb. In vitro characterization of glucuronosyl- and sulfotransferases involved in the conjugation of ethanol. Arch. Kriminol. 235 (1–2), 29–42.
Stachel, N., Skopp, G., 2016 Aug. Formation and inhibition of ethyl glucuronide and ethyl sulfate. Forensic Sci. Int. 265, 61–64.
Takahashi, T., Lasker, J.M., Rosman, A.S., Lieber, C.S., 1993 Feb. Induction of cytochrome P-4502E1 in the human liver by ethanol is caused by a corresponding increase in encoding messenger RNA. Hepatology. 17 (2), 236–245.
Walsham, N.E., Sherwood, R.A., 2014. Ethyl glucuronide and ethyl sulfate. In: Advances in Clinical Chemistry [Internet]. Elsevier, pp. 47–71 [cited 2019 Jul 19].
Winkler, M., Skopp, G., Alt, A., Miltner, E., Jochum, Th., Daenhardt, C., et al., 2013 Jul. Comparison of direct and indirect alcohol markers with PEth in blood and urine in alcohol dependent inpatients during detoxication. Int. J. Legal Med. 127 (4), 761–768.
Zakhari, S., 2006. Overview: How Is Alcohol Metabolized by the Body? 29(4). pp. 10.
Zhukov, A., Ingelman-Sundberg, M., 1999 Jun 1. Relationship between cytochrome P450 catalytic cycling and stability: fast degradation of ethanol-inducible cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in hepatoma cells is abolished by inactivation of its electron donor NADPH-cytochrome P450 reductase. Biochem. J. 340 (Pt 2), 453–458.

ANNEXE 4

Allard S, Le Daré B, Allard P-M, Morel I, Gicquel T. Comparative molecular networking analysis of a Rauwolfia plant powder and biological matrices in a fatal ingestion case. Forensic Toxicol.2020

Forensic Toxicology
https://doi.org/10.1007/s11419-020-00531-0

ORIGINAL ARTICLE

Comparative molecular networking analysis of a *Rauwolfia* plant powder and biological matrices in a fatal ingestion case

Sophie Allard[1] · Brendan Le Daré[1,2] · Pierre-Marie Allard[3] · Isabelle Morel[1,2] · Thomas Gicquel[1,2]

Received: 29 January 2020 / Accepted: 26 March 2020
© Japanese Association of Forensic Toxicology 2020

Abstract

Purpose Identifying xenobiotics involved in deaths remains a challenge in toxicology, especially when they are missing from the usual suspect databases. The tool development for the rapid processing of untargeted screening data is a valuable asset. In recent years, the molecular networking has been developed in various fields, including toxicology, because of its ability to graphically display and compare complex data acquired from tandem mass spectrometry. Here, we report a case of fatal poisoning by ingestion of an unknown powder (labelled as *Tabernanthe iboga*) and apply molecular networking to tentatively identify the plant involved in a woman's death.

Methods The supposedly ingested powder, an authentic *Tabernanthe iboga* root powder and postmortemed biological samples (peripheral blood and bile) were extracted and analyzed according to a screening method using high resolution liquid chromatography hyphenated to tandem mass spectrometry (Q-Exactive®).

Results Analysis of these four matrices by molecular networking revealed a cluster of nodes composed of indolomonoterpenic alkaloids, a characteristic of the *Apocynaceae* family (ibogaine, ibogamine, ajmaline, reserpiline, yohimbine). Analysis of the spectral annotations of the supposedly ingested powder also shows a majority of occurrences related to the genus *Rauwolfia*, which differed from the authentic *Tabernanthe iboga* root powder.

Conclusions Molecular networking allowed us to discard the *Tabernanthe iboga* identification hypothesis and suggest an alternate *Apocynaceae* species, most likely belonging to the *Rauwolfia* genus. In addition, eleven putative compounds could be detected by the molecular networking, many of which seemed to be metabolites of the major components in the *Rauwolfia* genus.

Keywords Molecular networking analysis · Cluster of nodes · *Iboga* and *Rauwolfia* · Non-targeted profiling · Putative metabolite identification · Application in forensic toxicology

Introduction

Tabernanthe iboga (*T. iboga*) is a shrub of the *Apocynaceae* family native from Gabon and northern Congo. In these countries, indigenous tribes have used the roots since immemorial times in initiation rituals and medicinal practices. These roots have anorexigen and nervous system stimulating properties that warriors and hunters used to stay awake during guarding nights [1, 2]. Also, this plant is endowed with aphrodisiac properties for important sociological role of these tribes [2]. Chemical analysis of the roots allowed to isolate its main active indole alkaloid, ibogaine [3]. In recent years, this substance has been proposed to combat addictions to alcohol, opiates, and cocaine [1, 4]. The administration of its derivatives is being studied as a substitution treatment for opiates and tobacco [5, 6]. Although no high-level evidence-based studies

Electronic supplementary material The online version of this article (https://doi.org/10.1007/s11419-020-00531-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Brendan Le Daré
brendan.le.dare@chu-rennes.fr

[1] Laboratoire de Toxicologie Biologique Et Medico-légale, CHU Pontchaillou, Rennes University Hospital, 2 Rue Henri Le Guilloux, 35000 Rennes, France

[2] Univ Rennes, INSERM, INRAE, CHU Rennes, Institut NuMeCan (Nutrition, Metabolism and Cancer), 35000 Rennes, France

[3] Institute of Pharmaceutical Sciences of Western Switzerland (ISPSO) , Centre Médical Universitaire (CMU), University of Geneva, Geneva, Switzerland

Published online: 18 April 2020

have been conducted, the use of this plant has increased in recent years because of its availability on the Internet. However, purchasing health products on the Internet is associated with various risks. Misuse is one of them, due to the lack of medical monitoring, and exposes the user to a risk of toxicity. In the literature, 27 cases of death have been reported following the use of ibogaine or *T. iboga* to treat addictions [7–13]. Besides, a risk of purchasing falsified products exists, exposing the user to consume a different product than expected [14–16]. In this context, our laboratory reported in 2016 a case of death following the ingestion of a powder sold under the name of *T. iboga* [17].

Molecular networking is a bioinformatic approach that allows the graphical representation of complex data acquired by tandem mass spectrometry (MS/MS) [18]. The spectral similarities between product ion spectra obtained by non-targeted MS/MS analyses can be displayed. A molecular network represents ions and their fragmentation spectra as interconnected nodes according to their spectral similarity. This tool further facilitates sample comparison, and allows creating a multi-matrix network in a semiquantitative way. Molecular networking has already shown its interest in plant species profiling [19], in metabolomics [20], in the dereplication of naturally produced substances [21], or in the analysis of drug metabolism for clinical or forensic purposes [22, 23].

We applied this approach to investigate mass spectrometry profiles acquired to document a case of fatal poisoning following the ingestion of a powder labelled as *T. iboga* already published by our laboratory [17]. The aim was to document the chemistry and eventually identify the plant involved in the patient's death and to explore possible structural relationships between the metabolites found in the biological fluids and those from the supposedly ingested vegetable powder analyzed.

Case report

The dead body of a 30-year-old white woman being treated with methadone maintenance was found in the caravan where she lived. A small bag of powder labelled "Top quality Tabernanthe Iboga, 50 g, Gabon, Africa" (presented in Fig. 1) was found in her caravan. The powder was reportedly consumed orally for 3 days to treat opioid withdrawal symptoms. Case history and autopsy findings were previously described [17].

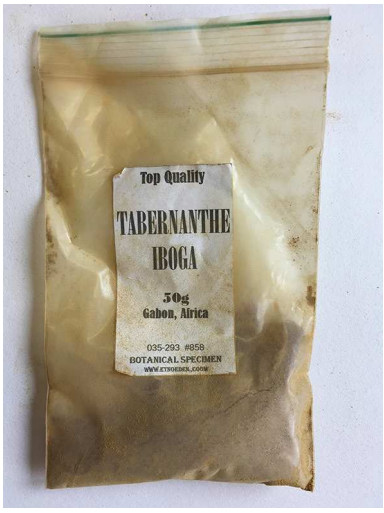


Fig. 1 Label on the plastic bag containing a brownish powder found in the woman's caravan

Material and methods

Toxicological analysis

Peripheral blood and bile samples were collected during the autopsy for toxicological analysis. Blood and bile were extracted by liquid-liquid extraction as previously described [17]. A small bag of powder labeled "Top quality Tabernanthe Iboga, 50 g, Gabon, Africa" (Fig. 1) was collected in the woman's caravan. An authentic *T. iboga* powder was donated by Dr. Alexandre Maciuk for comparison with the supposedly ingested powder and biological matrices. Powders were simply macerated in methanol (5 mg/5 mL), sonicated, centrifuged and supernatants were injected after dilution 100 times.

These four samples were analyzed by liquid chromatography (LC)–mass spectrometry (MS) using a Q Exactive™ Orbitrap mass spectrometer coupled with an Accela 1250 pump (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) using a heated electrospray ionization (ESI) source (HESI-II) as already described [17, 24]. LC separation was performed on a Hypersil GOLD PFP column (150 × 2.1 mm, 5 µm) (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA). The mobile phases were composed of 10 mM ammonium acetate and 0.1% formic acid in water (A), and 0.1% formic acid in acetonitrile (B). An LC gradient was performed from 95 to 5% A for 20 min, followed by a 7 min plateau with 5% A; and then a 5 min re-equilibration step. The flow rate was 200 µL/min, the column temperature was 25 °C, the injection volume was 20 µL, and the samples were maintained at 15 °C in the autosampler. The mass spectrometer operated alternately in positive and negative ESI modes during the same run. The range for acquisition was *m/z*

80–800 in positive mode and *m/z* 150–800 in negative mode. Ion precursor selection was performed in a data-dependent mode, where the most intense ions from the previous scan were selected for fragmentation. Full scan (MS^1) data were acquired for each ionization mode at a resolution of 70,000 full width at half maximum (FWHM), with an automatic gain control (AGC) target of 1e6, and a maximum injection time of 250 ms. The source parameters were as follows: source voltage, + 4.0 and – 4.5 kV; sheath gas flow, 35 units; auxiliary gas flow, 15 units; sweep gas flow, 2.5 units; capillary temperature, 300 °C; and S-Lens RF level, 50 units. MS/MS data were acquired in profile mode at a resolution of 17,500 FWHM with an AGC target of 1e6, a maximum injection time 250 ms, a TopN of 8 in positive mode and 3 in negative mode, an isolation window of *m/z* 3, a normalized collision energy of 70, and a dynamic exclusion time of 10 s. MS data were recorded as profiles.

Data acquisition, calibration, and instrument control were managed using Xcalibur® 2.1 software (Thermo Scientific).

Mass spectrometry data pretreatment and molecular networking

Data acquisition, processing (i.e., MS data conversion, preprocessing, MS^1 annotation, and generation of molecular networks), visualization and network analysis have been described elsewhere [22]. Briefly, raw data were converted to an open MS format (.mzXML) with ProteoWizard's MSConvert module [25]. Converted files were then preprocessed (deconvolution, alignment, de-isotoping, gap-filling, and MS^1 annotation) with MZmine 2 software [26]. The .mgf output file was then loaded onto the Global Natural Products Social (GNPS) networking web-based platform for generation of the multi-matrix molecular network [18]. Full data processed through the GNPS platform are accessible through this link: https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=e289e8c823d744b4a93e2e7f271e74b3. Due to the use of high resolution data, the basic parameters were modified to *m/z* 0.02 for the mass tolerance of precursor and fragment ions used for MS/MS spectral library searching, and *m/z* 0.02 for the mass tolerance of fragment ions used for molecular networking. The minimum cluster size was set to 1. Furthermore, links between nodes were created when the cosine score was greater than 0.7, and the minimum number of common fragment ions shared by two MS/MS spectra was 6. Links between two nodes were only kept in the network if each node was in the top 10 most similar nodes. The molecular network was visualized using Cytoscape 3.5.1 software free of charge [27]. Nodes were annotated by comparison with reference standards or by spectral matching with the curated GNPS and mzCloud online mass spectral libraries [28].

Results

Overall network description

The molecular network (Fig. 2) displayed all the MS/MS data acquired during analysis. A specific color was assigned to each matrix (peripheral blood in red, bile in khaki, supposedly ingested powder in pink, and authentic *T. iboga* powder in blue). Nodes were linked together in clusters according to their spectral similarities (Fig. 2a). The size of each node was related to the area of the corresponding peak in the femoral blood sample.

Cluster analysis

Visual analysis of the multi-matrix molecular network (blood, bile, supposedly ingested powder and *T. iboga* root powder) shows a cluster of nodes from both biological fluids and plant extracts, suggesting the presence of structurally close molecules in the four samples (Fig. 2b). Visual analysis of this cluster showed that the nodes belonging to the authentic *T. iboga* powder (*m/z* 281.202 and 327.207) were not shared by the other three matrices. Taken together, these results suggested a different chemical composition between the authentic *T. iboga* powder and the supposedly ingested powder. In addition, we observed nodes shared by the peripheral blood, bile and supposedly ingested powder matrices, but absent of *T. iboga* root powder (*m/z* 355.202; 401.207; 415.223; 413.207 and 327.207). These results showed that the molecules present in the unknown powder were also present in the biological matrices; the unknown powder was therefore ingested by the woman. Also, we observed one last node *m/z* 411.192 at 10.4 min shared by peripheral blood, bile and ingested powder matrices outside the cluster (Fig. 2c).

Annotation step

Following the node annotation step, we found a cluster containing indolomonoterpenic alkaloids and chemically related compounds (Fig. 2b). Three annotated nodes as ibogaine (*m/z* 311.212), ibogamine (*m/z* 281.201) and iboluteine (*m/z* 327.207) were found in *T. iboga* powder but were absent from the biological matrices and ingested powder. Conversely, annotated nodes as ajmaline (*m/z* 327.206), reserpic acid (*m/z* 400.199), reserpine (*m/z* 609.280), reserpic acid methyl ester (*m/z* 414.215), reserpiline (*m/z* 412.199), and yohimbine (*m/z* 355.205) were shared among the bile, blood and ingested powder, but absent from the *T. iboga* powder.

These results must be interpreted taking into account the limitations associated with tandem mass spectrometry. Since molecular networks are built upon fragmentation spectrum

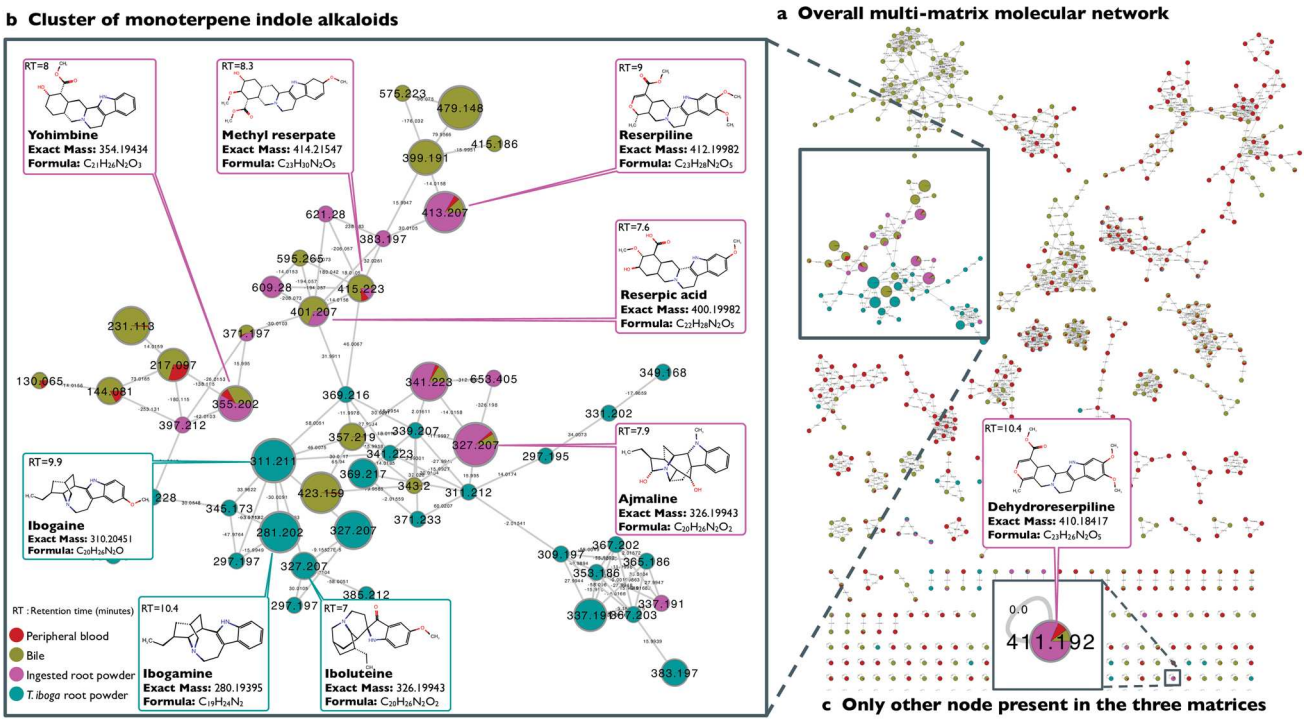


Fig. 2 **a** Overall multi-matrix molecular network. Each matrix is depicted in a specific color: peripheral blood in red, bile in khaki, ingested root powder in pink and *T. iboga* root powder in blue. **b** A cluster containing indolomonoterpenic alkaloids. Nodes are labelled with the exact protonated mass (*m/z*), chemical structures and the links. **c** Only other node contained in the three matrices (peripheral blood, bile and ingested root powder) (color figure online)

similarity calculation, structurally close structures are not necessarily grouped in the same cluster if their fragmentation spectra are sufficiently different. This example was perfectly illustrated here, Fig. 2 containing an isolated node, not grouped within the indolomonoterpenic alkaloid cluster, despite its presence in peripheral blood, bile and ingested root powder (Fig. 2c; Supplementary Fig. S1). This compound, putatively identified as dehydroreserpiline, revealed a structure extremely similar to reserpiline. Thus, structural similarity is not necessarily associated with spectral similarity since a minimal difference in structure can significantly impact the fragmentation spectrum.

Biotransformation reactions

The links between the nodes showed mass shifts that could correspond to biotransformation reactions, as previously published and presented in supplementary Table S1 [23]. For example, nodes linked to reserpine (*m/z* 609.280) found compounds that could correspond to methyl reserpate (*m/z* 415.223) and desmethylreserpine, also called pseudoreserpine (*m/z* 595.265), which is consistent with literature data [29–31]. We also observed in the Fig. 3 that a mass shift of − 14.0158 connected reserpiline to an unknown node (*m/z* 399.1912) which could correspond to a demethylation reaction. These results suggested that this molecule could be demethylreserpiline. The latter was connected to three nodes by mass shifts of + 176.032, + 79.9565 and + 15.9951 which could correspond, respectively, to glucuronyl conjugation, sulfation and hydroxylation reactions. Interestingly, these four potential metabolites were only found to be present in the bile sample (khaki nodes in Fig. 3).

Discussion

Here, we have reported the use of molecular networking for the comparison of human biological and plant matrices to identify the plant involved in a woman's death.

The graphical representation of the molecular network allowed us to quickly and efficiently compare the different matrices by visualizing both similarities and differences. The organization of the data according to their spectral similarities allowed us to compare many molecules signatures whether they were reported or not in the literature. Even before identifying the ingested powder, this tool gave us valuable information to discriminate this powder from the authentic *T. iboga* powder. Here, the similarities of nodes

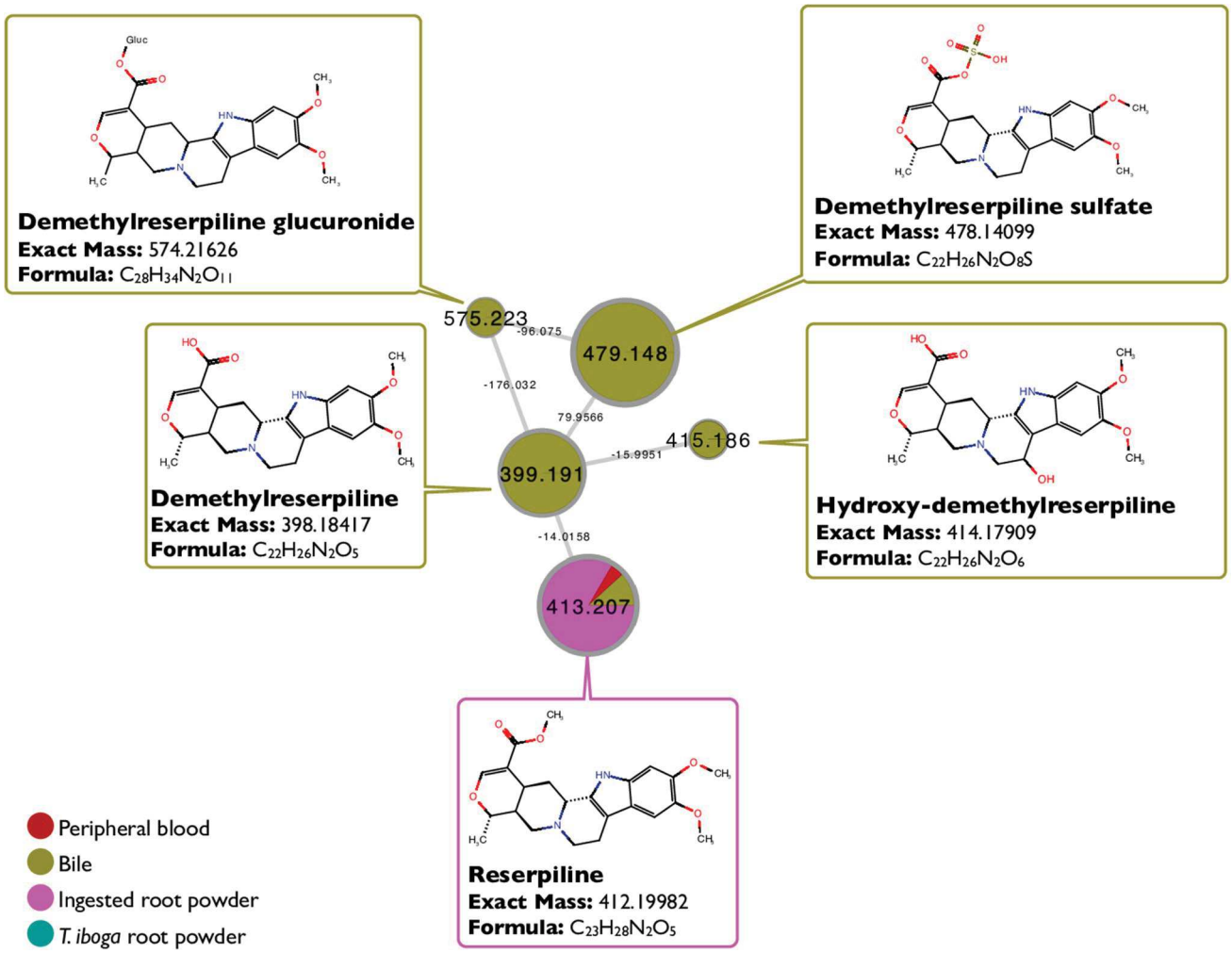


Fig. 3 Biotransformation reactions associated with reserpiline. Each matrix is depicted in a specific color: peripheral blood in red, bile in khaki, and ingested root powder in pink (color figure online)

between the biological matrices and the supposedly ingested powder objectified an ingestion of the latter by the victim.

The data displayed by the molecular network did not objectify occurrence of common molecules between *T. iboga* authentic powder and biological matrices. Thus, it can be reasonably and quickly concluded that the ingested powder is not *T. iboga*.

The GNPS platform, which has been greatly developed in the field of natural products research in recent years, has curated MS/MS databases of natural products and synthetic compounds [18–21]. Recently a database specific to monoterpenic indole alkaloids has been constructed and uploaded to the servers [32]. Here, the cluster was mainly composed of indolomonoterpenic type alkaloids, which allowed an orientation towards the *Apocynaceae* family. Most of *Iboga* specific alkaloids (ibogaine, ibogamine and ibuteine) were only found in the authentic *Iboga* powder sample. Furthermore, the annotation of both the ingested powder and the biological matrices nodes revealed ajmaline, reserpiline, and yohimbine, suggesting that the ingested powder comes from a *Rauwolfia* genus plant [33].

This indolomonoterpenic alkaloid cluster showed more nodes belonging to bile than to blood and revealed structurally similar molecules. Although this approach is only semiquantitative, nodes belonging to both blood and bile indicated a greater amount of the compounds in the latter matrix. Due to their absence in the other matrices (ingested powder, and authentic *T. iboga* powder), their MS/MS spectra and mass shifts corresponding to biotransformation, these molecules were labelled as potential human metabolites of alkaloids of the *Rauwolfia* genus. Consistently, Vanbinst et al. [34] reported bile as a matrix accumulating many metabolites. In case of reserpiline, the propagation of information in association with the exact mass and MS/MS spectra allowed us to detect and identify putative metabolites only present in bile (demethylation, glucuronidation,

sulfation and hydroxylation products) (Fig. 3). To the best of our knowledge, these metabolites have not previously been described in the literature. Table 1 reports putative identified compounds or metabolites contained in the molecular network.

Previously, we had discriminated the ingested powder with the authentic *T. iboga* powder using usual methods, i.e., macroscopic (mainly color, and odor) and microscopic means of recognition allowing the comparison of plants according to their main characteristics (sclereids, sensor hairs, vessels, stomata, pollen grains, epidermis, crystals etc.…). In addition, we performed high-performance thin-layer chromatography on purified powder extracts to compare the chemical compositions of the ingested powder with the authentic *T. iboga* powder using standards such as ajmaline and yohimbine [17]. Unlike drugs for which metabolism is at least partially explored, a large part of plant specialized metabolites are not identified today. An approach by assay of a molecule and its metabolites, as in the case of drug poisoning, is therefore more tedious, may

Table 1 Putative identified compounds or metabolites contained in the molecular network

t_R (min)	Observed *m/z* $[M+H]^+$	Theoretical *m/z* $[M+H]^+$	Molecular formula	Δ exact mass error	ESI-HRMS/MS data (*m/z*)	Putative compound identification
6.1	575.2230	575.2240	$C_{28}H_{34}N_2O_{11}$	− 0.0010	55.05; 70.07; 119.07; 130.06; 144.08; 147.07; 158.06; 175.06; 190.09	Demethylreserpiline glucuronide
6.6	479.1480	479.1488	$C_{22}H_{26}N_2O_8S$	− 0.0008	56.05; 119.07; 130.06; 144.08; 147.07; 158.06; 175.06; 190.09; 201.08	Demethylreserpiline sulfate
6.7	399.1914	399.1920	$C_{22}H_{26}N_2O_5$	− 0.0006	56.05; 70.07; 103.05; 119.07; 130.06; 144.08; 147.07; 158.08; 175.06; 190.09	Demethylreserpiline
7	327.2073	327.2072	$C_{20}H_{26}N_2O_2$	+ 0.0001	79.05; 93.07; 122.10; 147.07; 160.08; 176.07; 190.09; 202.09; 224.11; 239.12; 266.15	Iboluteine
7.1	415.1865	415.1869	$C_{22}H_{26}N_2O_6$	− 0.0004	56.05; 91.05; 108.08; 118.06; 135.07; 146.06; 163.06; 174.06; 176.03; 191.06; 206.08	Hydroxy-demethylreserpiline
7.6	401.2072	401.2076	$C_{22}H_{28}N_2O_5$	− 0.0004	79.05; 91.05; 94.07; 105.07; 131.07; 143.07; 159.07; 174.09	Reserpic acid
8.3	415.2228	415.2232	$C_{23}H_{30}N_2O_5$	− 0.0004	56.05; 67.05; 79.05; 81.07; 91.05; 105.07; 131.07; 143.07; 159.07; 174.09	Methyl reserpate
9	413.2076	413.2076	$C_{23}H_{28}N_2O_5$	+ 0.0000	56.05; 130.06; 132.08; 144.08; 146.08; 160.08; 173.08; 188.07; 204.10	Reserpiline
9.9	311.2110	311.2123	$C_{20}H_{26}N_2O$	− 0.0013	67.05; 79.05; 93.07; 159.07; 160.08; 174.09; 188.11; 198.09; 212.11; 224.11; 238.12; 296.19; 311.21	Ibogaine
10.4	281.2019	281.2017	$C_{19}H_{24}N_2$	+ 0.0002	67.05; 79.05; 93.07; 122.10; 144.08; 158.10; 170.10; 182.10; 194.10; 208.11; 281.20	Ibogamine
10.4	411.1915	411.1919	$C_{23}H_{26}N_2O_5$	− 0.0004	55.05; 160.08; 172.08; 184.08; 198.08; 202.09; 213.10; 225.10; 229.10; 241.10; 253.10; 257.13; 265.13; 269.13; 279.08; 281.09; 293.13; 295.11; 309.09; 323.10; 395.16	Dehydroreserpiline

t_R retention time, *ESI-HR MS/MS* electrospray ionization-high resolution tandem mass spectrometry

require the development of original assay methods, and is also limited by the need for standards.

Molecular networking presents several advantages. Firstly, the unified graphical representation of multiple metadata (exact mass, retention time, annotations, semi-quantitative information, mass shifts, and structural relationships/metabolic pathways) is a great strength, allowing easy sample comparison. Furthermore, it improves the annotation and classification of previously described metabolites, and facilitates the putative identification of new metabolites by visualizing structural relationships. Secondly, this data processing method is complementary to usual approaches in forensics and analytical toxicology (particularly intoxication from natural products), and enables the grouping of structurally related compounds without requiring prior knowledge on their fragmentation behavior. Additional identification evidence can thus be provided without standard requirement. Thirdly, the "spectral tolerance" implied by spectral similarity allows this approach to accommodate datasets produced by different mass spectrometers, ionization modes and LC-based methods. Lastly, as these free tools are becoming more user-friendly, their use is now democratized.

In contrast, limitations of such bioinformatics approaches include the need for an expertise in mass spectrometry and analytical settings being essential to high quality data acquisition. As an example, since variations in collision energy are likely to change the fragmentation spectra, the spectral clustering and acquisition parameters must be optimized. Also, along with these analytical settings, MZmine data preprocessing requires careful adjustments of the parameters at each step. Lastly, it requires thorough manual interpretation and validation of the obtained molecular network, which remains essential for the reliable evaluation of the proposed metabolite structures.

Here, we have reported a proof of concept for the use of molecular networking in the identification of a plant that caused death, corroborating our previous results [17]. These results illustrate the advantages of the molecular networking in clinical and forensic toxicology.

Conclusions

The molecular networking approach is perfectly suited for the analysis of complex data obtained from non-targeted profiling methods acquired by high resolution mass spectrometry. This spectral data visualization tool allows key information to be obtained even before the annotation step. In addition, the first uses of the molecular network in the field of natural products research led to the development of valuable libraries in this field. Such spectral libraries made it possible to discard the *T. iboga* identification hypothesis and suggested alternate apocynaceous plant, most likely belonging to the *Rauwolfia* genus, involved in this woman's death. The similar progress is being achieved in the fields of clinical and forensic toxicology using the molecular networking approach.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors. The data are from work ordered by the courts. In France, there is therefore no authorization to request or information to give to the family, as the published data do not allow any identification.

References

1. Carai MAM, Agabio R, Bombardelli E, Bourov I, Gessa GL, Lobina C, Morazzoni P, Pani M, Reali R, Vacca G, Colombo G (2000) Potential use of medicinal plants in the treatment of alcoholism. Fitoterapia 71(Suppl 1):S38–S42. https://doi.org/10.1016/S0367-326X(00)00178-7
2. Pope HG (1969) *Tabernanthe iboga*: an African narcotic plant of social importance. Econ Bot 23:174–184
3. Dybowski J, Landrin Ed (1901) Sur l'Iboga, sur ses propiétés excitantes, sa composition, et sur l'alcaloïde nouveau qu'il renferme, l'ibogaïn, l'ibogaïne. Comptes rendus 133:748–750
4. Mash DC, Kovera CA, Buck BE, Norenber MD, Shapshak P, Hearn WL, Sanchez-Ramos J (2006) Medication development of ibogaine as a pharmacotherapy for drug dependence. Ann NY Acad Sci 844:274–292. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb08242.x
5. Glue P, Cape G, Tunnicliff D, Lockhart M, Lam F, Hung N, Hung CT, Harland S, Devane J, Crockett RS, Howes J, Darpo B, Zhou M, Weis H, Friedhoff L (2016) Ascending single-dose, double-blind, placebo-controlled safety study of noribogaine in opioid-dependent patients. Clin Pharmacol Drug Dev 5:460–468. https://doi.org/10.1002/cpdd.254
6. Chang Q, Hanania T, Mash DC, Maillet EL (2015) Noribogaine reduces nicotine self-administration in rats. J Psychopharmacol 29:704–711. https://doi.org/10.1177/0269881115584461 (**open access article**)
7. Mazoyer C, Carlier J, Boucher A, Péoc'h M, Lemeur C, Gaillard Y (2013) Fatal case of a 27-year-old male after taking iboga in withdrawal treatment: GC-MS/MS determination of ibogaine and ibogamine in iboga roots and postmortem biological material. J Forensic Sci 58:1666–1672. https://doi.org/10.1111/1556-4029.12250
8. Papadodima SA, Dona A, Evaggelakos CI, Goutas N, Athanaselis SA (2013) Ibogaine related sudden death: a case report. J Forensic Legal Med 20:809–811. https://doi.org/10.1016/j.jflm.2013.06.032
9. Alper KR, Stajić M, Gill JR (2012) Fatalities temporally associated with the ingestion of ibogaine. J Forensic Sci 57:398–412. https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2011.02008.x
10. Kontrimavičiūtė V, Mathieu O, Mathieu-Daudé J-C, Vainauskas P, Casper T, Baccino E, Bressolle FMM (2006) Distribution of

ibogaine and noribogaine in a man following a poisoning involving root bark of the *Tabernanthe iboga* shrub. J Anal Toxicol 30:434–440. https://doi.org/10.1093/jat/30.7.434
11. Jalal S, Daher E, Hilu R (2013) A case of death due to ibogaine use for heroin addiction: case report. Am J Addict 22:302–302. https://doi.org/10.1111/j.1521-0391.2012.00330.x
12. Maas U, Strubelt S (2006) Fatalities after taking ibogaine in addiction treatment could be related to sudden cardiac death caused by autonomic dysfunction. Med Hypotheses 67:960–964. https://doi.org/10.1016/j.mehy.2006.02.050
13. Chèze M, Lenoan A, Deveaux M, Pépin G (2008) Determination of ibogaine and noribogaine in biological fluids and hair by LC–MS/MS after *Tabernanthe iboga* abuse. Forensic Sci Int 176:58–66. https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2007.08.013
14. Mackey TK, Aung P, Liang BA (2015) Illicit Internet availability of drugs subject to recall and patient safety consequences. Int J Clin Pharm 37:1076–1085. https://doi.org/10.1007/s11096-015-0154-8
15. Mackey TK, Liang BA (2013) Improving global health governance to combat counterfeit medicines: a proposal for a UNODC-WHO-Interpol trilateral mechanism. BMC Med 11:233. https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-233 (**open access article**)
16. Jeong S, Ji E (2017) Global perspectives on ensuring the safety of pharmaceutical products in the distribution process. Int J Clin Pharmacol Ther 56:12–23. https://doi.org/10.5414/CP203151
17. Gicquel T, Hugbart C, Le Devehat F, Lepage S, Baert A, Bouvet R, Morel I (2016) Death related to consumption of *Rauvolfia* sp. powder mislabeled as *Tabernanthe iboga*. Forensic Sci Int 266:e38–e42. https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.06.014
18. Wang M, Carver JJ, Phelan VV, Sanchez LM, Garg N, Peng Y, Nguyen DD, Watrous J, Kapono CA, Luzzatto-Knaan T et al (2016) Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. Nat Biotechnol 34:828–837. https://doi.org/10.1038/nbt.3597
19. Zhou S, Allard P-M, Wolfrum C, Ke C, Tang C, Ye Y, Wolfender J-L (2019) Identification of chemotypes in bitter melon by metabolomics: a plant with potential benefit for management of diabetes in traditional Chinese medicine. Metabolomics 15:104. https://doi.org/10.1007/s11306-019-1565-7
20. Allard P-M, Genta-Jouve G, Wolfender J-L (2017) Deep metabolome annotation in natural products research: towards a virtuous cycle in metabolite identification. Curr Opin Chem Biol 36:40–49. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.12.022
21. Allard P-M, Péresse T, Bisson J, Gindro K, Marcourt L, Pham VC, Roussi F, Litaudon M, Wolfender J-L (2016) Integration of molecular networking and *in-silico* MS/MS fragmentation for natural products dereplication. Anal Chem 88:3317–3323. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04804
22. Allard S, Allard P-M, Morel I, Gicquel T (2019) Application of a molecular networking approach for clinical and forensic toxicology exemplified in three cases involving 3-MeO-PCP, doxylamine, and chlormequat. Drug Test Anal 11:669–677. https://doi.org/10.1002/dta.2550
23. Le Daré B, Allard S, Bouvet R, Baert A, Allard P-M, Morel I, Gicquel T (2020) A case of fatal acebutolol poisoning: an illustration of the potential of molecular networking. Int J Legal Med 134:251–256. https://doi.org/10.1007/s00414-019-02062-9
24. Boumrah Y, Gicquel T, Hugbart C, Baert A, Morel I, Bouvet R (2016) Suicide by self-injection of chlormequat trademark C5SUN®. Forensic Sci Int 263:e9–e13. https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.03.007
25. Kessner D, Chambers M, Burke R, Agus D, Mallick P (2008) ProteoWizard: open source software for rapid proteomics tools development. Bioinformatics 24:2534–2536. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn323
26. Pluskal T, Castillo S, Villar-Briones A, Orešič M (2010) MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. BMC Bioinformatics 11:395. https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-395 (**open access article**)
27. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T (2003) Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. Genome Res 13:2498–2504. https://doi.org/10.1101/gr.1239303 (**open access article**)
28. HighChem LLC (2019) mzCloud—advanced mass spectral database. https://www.mzcloud.org/. Accessed 12 Nov 2018
29. Maass AR, Jenkins B, Shen Y, Tannenbaum P (1969) Studies on absorption, excretion, and metabolism of ^{3}H-reserpine in man. Clin Pharmacol Ther 10:366–371. https://doi.org/10.1002/cpt1969103366
30. Zsotér TT, Johnson GE, DeVeber GA, Paul H (1973) Excretion and metabolism of reserpine in renal failure. Clin Pharmacol Ther 14:325–330. https://doi.org/10.1002/cpt1973143325
31. Muhtadi FJ (1984) Reserpine. Anal Profiles Drug Subst 13:737–765. https://doi.org/10.1016/S0099-5428(08)60207-5
32. Fox Ramos AE, Le Pogam P, Fox Alcover C, N'Nang EO, Cauchie G, Hazni H, Awang K, Bréard D, Echavarren AM, Frédérich M et al (2019) Collected mass spectrometry data on monoterpene indole alkaloids from natural product chemistry research. Sci Data 6:15. https://doi.org/10.1038/s41597-019-0028-3 (**open access article**)
33. Lewis JJ (1956) The Rauwolfia alkaloids. J Pharm Pharmacol 8:465–494. https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1956.tb12180.x
34. Vanbinst R, Koenig J, Di Fazio V, Hassoun A (2002) Bile analysis of drugs in postmortem cases. Forensic Sci Int 128:35–40. https://doi.org/10.1016/S0379-0738(02)00161-5

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Titre : Xénobiotiques hépatotoxiques : études de métabolisme et mécanismes d'action

Mots clés : Xénobiotiques hépatotoxiques ; macrophages ; hépatocytes ; éthanol ; amanitines ; réseau moléculaire.

Résumé : La toxicité hépatique des xénobiotiques constitue un sujet extrêmement riche, au vu des multiples mécanismes et acteurs impliqués. Ce travail de toxicologie translationnelle a pour but d'améliorer la compréhension des mécanismes hépatotoxiques de l'éthanol et des amanitines, puissantes toxines de champignons, afin d'apporter de nouveaux éléments permettant d'optimiser les prises en charge thérapeutiques des patients intoxiqués. Dans un premier temps, nous apportons des éléments supplémentaires de compréhension sur les mécanismes de réponse des macrophages à l'éthanol. Ces interactions xénobiotiques – cellules, montrées à travers l'exemple de l'induction des récepteurs P2X7, semblent participer à la sévérité des atteintes hépatiques alcooliques, et témoignent de la plasticité des macrophages en situation pathologique. Ces résultats suggèrent notamment l'intérêt du développement des antagonistes des récepteurs P2X7 dans le traitement des alcoolopathies.

Dans un deuxième temps, nous appliquons l'outil de réseau moléculaire, permettant la visualisation de données complexes acquises par LC-MS/MS, à l'étude du métabolisme de xénobiotiques. L'exemple du métabolisme de l'acébutolol dans le cadre d'une intoxication médicamenteuse volontaire d'une part, et l'étude du métabolisme de la quétiapine de manière *in vitro* d'autre part, ont apporté des preuves consistantes sur l'intérêt du réseau moléculaire dans ce contexte. Dans un troisième et dernier temps, l'application du réseau moléculaire nous a permis d'écarter l'hypothèse d'un métabolisme des amanitines *in vivo* et *in vitro*. Par ailleurs, nos résultats montrent que le modèle cellulaire de cellules hépatiques HepaRG différenciés constitue un modèle pertinent dans l'étude des amanitines, et objectivent l'implication de la production des ROS mitochondriaux dans la toxicité de ces substances.

Title : Xenobiotic-induced hepatotoxicity : metabolism studies and mechanisms of action.

Keywords : Hepatotoxic xenobiotics ; macrophages ; hepatocytes ; ethanol ; amanitins ; molecular network.

Abstract : Xenobiotic-induced hepatotoxicity is an extremely rich subject, given the multiple mechanisms and actors involved. This translational work aims to improve ethanol and amanitins (powerful fungal toxins) hepatotoxic mechanisms understanding, in order to provide new elements to optimize the therapeutic management of intoxicated patients. In a first step, we provide additional elements of understanding on macrophages response mechanisms to ethanol. These xenobiotic-cell interactions, shown through the P2X7 receptor induction example, seem to contribute in alcoholic liver damage severity, and testify to the macrophages plasticity in pathological situations. These results suggest in particular the interest of P2X7 receptor antagonist's development in the treatment of alcoholism.

In a second step, we are applied molecular networking, which allows the visualization of complex data acquired by LC-MS/MS, to xenobiotic metabolism study. The acebutolol metabolism example, in the context of voluntary drug intoxication on the one hand, and the *in vitro* quetiapine metabolism study on the other hand, have provided consistent evidence concerning molecular network interest in this context. In a third and final step, the molecular network application allowed us to rule out the hypothesis of an *in vivo* and *in vitro* amanitins metabolism. Moreover, our results show that the hepatocyte-like cellular model of differentiated HepaRG is a relevant model in amanitins study, and show the mitochondrial ROS production implication in these substances toxicity.