



HAL
open science

Impact de perturbateurs endocriniens sur la stéatose hépatique et sa progression pathologique

Hélène Le Mentec

► **To cite this version:**

Hélène Le Mentec. Impact de perturbateurs endocriniens sur la stéatose hépatique et sa progression pathologique. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2023. Français. NNT : 2023URENB008 . tel-04136205

HAL Id: tel-04136205

<https://theses.hal.science/tel-04136205v1>

Submitted on 21 Jun 2023

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

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

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES

ECOLE DOCTORALE N° 637
Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité : Toxicologie

Par

Hélène Le Mentec

Impact des perturbateurs endocriniens sur la stéatose hépatique et sa progression pathologique

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 16 Février 2023

Unité de recherche : UMR INSERM U1085 / IRSET Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail

Rapporteurs avant soutenance :

Brigitte LE MAGUERESSE
Xavier COUSIN

Directrice de recherche INSERM, UMR INSERM 1060, Lyon
Chargé de recherche INRAE, UMR Marbec, Palavas-les-Flots

Composition du Jury :

Président :

Thierry CHARLIER

Professeur, Université de Rennes 1, UMR INSERM 1085, Rennes

Examineurs :

Brigitte LE MAGUERESSE
Xavier COUSIN
Sandrine ELLERO-SIMATOS
Thierry CHARLIER

Directrice de recherche INSERM, UMR INSERM 1060, Lyon
Chargé de recherche INRAE, UMR Marbec, Palavas-les-Flots
Chargée de recherche INRAE, UMR 1331, Toulouse
Professeur, Université de Rennes 1, UMR INSERM 1085, Rennes

Dir. de thèse :

Dominique LAGADIC-GOSSMANN

Directrice de recherche CNRS, UMR INSERM 1085, Rennes

Co-dir. de thèse :

Normand PODECHARD

Maitre de conférences, Université de Rennes 1, UMR INSERM 1085, Rennes

Remerciements

Dans un premier temps, j'adresse mes sincères remerciements à l'ensemble des membres de mon jury de thèse pour avoir acceptés d'évaluer ce travail : au Dr Brigitte Le Magueresse et au Dr Xavier Cousin, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de cette thèse ; au Dr Sandrine Ellero et au Pr Thierry Charlier, pour m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury en tant qu'examineurs. Je vous remercie sincèrement pour le temps que vous m'avez accordé dans l'évaluation de ce travail.

Bien évidemment, je souhaite remercier chaleureusement mes deux directeurs de thèse : le Dr Dominique Lagadic-Gossmann et le Dr Normand Podechard. Je vous remercie de m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet, en me proposant cette thèse il y a un plus de 3 ans. Merci pour votre soutien, votre accompagnement et votre grande expertise scientifique apportée tout au long de ces trois années. Dominique, je vous remercie pour votre optimisme et vos précieux conseils au cours de cette thèse. Je tenais particulièrement à vous exprimer toute ma reconnaissance pour m'avoir ouvert les portes de l'équipe 3 et plus largement de la recherche en toxicologie en 2017. Mon expérience au sein de votre équipe a été extrêmement enrichissante autant d'un point de vue scientifique que professionnel. J'ai énormément appris à vos côtés et je vous suis très reconnaissante pour tout ce que vous m'avez apporté. Normand, je te remercie pour ton encadrement pendant ces 3 ans, tes encouragements et ta disponibilité ; en ayant toujours su m'octroyer un peu de temps même en période intense de travail ou d'enseignement pour toi. Merci de m'avoir initié aux zebrafish, moi qui disais que je ne bossais jamais sur de l'*in vivo*. Merci de m'avoir guidé, tout en me laissant une part de liberté, me permettant ainsi de m'épanouir et de mener mes recherches de manière autonome. Et merci tout particulièrement de m'avoir épaulée pendant cette fin de thèse, qui n'a pas été une partie facile. Ma thèse étant finie tu vas pouvoir te consacrer à plein temps à ton HDR maintenant !!

Mes remerciements s'adressent également au Dr Anja Knoll-Gellida et au Dr Etienne Blanc qui ont eu la gentillesse d'accepter de faire partie de mon comité de suivi de thèse. Je vous remercie pour votre accompagnement et vos conseils tout au long de ce projet, ainsi que pour l'intérêt que vous avez manifesté à l'égard de mon travail.

Je souhaite remercier toutes les personnes avec qui j'ai eu le plaisir de collaborer durant cette thèse. En premier lieu, le Pr Patrick Babin et la Dr Sara Kassir du laboratoire MRGM de Bordeaux, pour leur expertise sur le poisson-zèbre ainsi que leur accueil au sein de leur laboratoire pour l'apprentissage du ZOT. Je remercie également Céline Monvoisin de l'UMR 1236-MOBIDIC de Rennes pour le temps qu'elle m'a accordé pour les manips de Fluidigm ; ainsi que Rémy Le Guevel de la plateforme ImPACcell de Rennes pour les manips de Zebtox. Enfin, un très grand merci à Marie-Madeleine Gueguen pour sa gentillesse, son énergie et pour tout le travail accompli à l'animalerie. Merci pour ton aide, tant pour les zebras que pour le soutien moral apporté. J'ai toujours eu beaucoup de plaisir à discuter avec toi, de la thèse ou autre, et ce, toujours dans la bonne humeur.

Je souhaite également remercier les personnes, de passage mais qui ont grandement contribué à ce travail : Joanna Letourneur, Camille Chauvin, Antoine Legrand et tout particulièrement Emmanuelle Monniez, avec qui le confocal aurait pu devenir notre deuxième maison.

Je remercie également l'ensemble de nos partenaires du projet Oberon, pour nos réunions et le partage de nos résultats qui ont permis d'enrichir ce projet et mes connaissances, toujours dans une ambiance chaleureuse et conviviale.

Je tiens également à remercier tous les membres de l'équipe 3 de l'IRSET « Stress, Membrane et Signalisation ». Après plus de 5 ans passés au sein de l'équipe, j'ai eu l'opportunité de pouvoir travailler avec presque chacun d'entre vous. Je remercie, notamment, Isabelle Gallais, pour son aide et sa gentillesse, merci de m'avoir tout appris sur le Seahorse et la culture des CT; mais aussi le Pr Odile Sergent, pour sa rigueur scientifique ; ainsi que le Dr Eric Le Ferrec, pour sa disponibilité et sa bienveillance, j'ai toujours eu beaucoup de plaisir à échanger avec toi, que ce soit de sciences ou autres. Enfin, j'adresse un grand merci au Dr Lydie Sparfel pour m'avoir fait confiance lors de ce premier poste et m'avoir permis d'associer mon domaine de prédilection, l'immunologie, avec un autre que je maîtrisais un peu moins, la toxico. Je te remercie pour ton dynamisme, ton enthousiasme, ta gentillesse et également toutes les connaissances scientifiques que tu as pu partager avec moi. Je me suis beaucoup épanoui en travaillant à tes côtés et je te remercie sincèrement pour cela. Par contre, j'ai peut-être un léger traumatisme des manip de migration lymphocytaire trans-endothéliale et des journées entières de comptage ...

Je tiens aussi à remercier Sophie Guinard, pour son aide administrative ; ainsi que Maryline Piron pour sa gentillesse et son efficacité permettant le bon fonctionnement du labo.

J'adresse un très grand MERCI à mes collègues de bureaux : Rima, avant tout, avec qui j'ai partagé ces 3 années de thèse. Merci pour ton entraide tout au long de nos thèses, de m'avoir épaulé dans les différentes phases et surtout à la fin durant l'écriture. A mon tour de te soutenir dans cette dernière ligne droite !! On aurait pu « disparaître » des tonnes de fois, mais on a tenu !!!! Ce fut un plaisir de bosser et d'avancer avec toi, vraiment ! J'ai aimé nos rituels quotidiens plus que nécessaire du Tea Time, des nombreux goûter ou des discussions jusqu'à tard dans la journée (... ou presque nuit !). Le DOCTEUR Jeremy, à l'initiative de nombreuses pauses et de nombreuses sorties. Merci d'avoir supporté mes « râles » de fin de thèse et de m'avoir amené des kinder bueno plus d'une fois. Merci pour la bonne ambiance que tu as su mettre au bureau dès ton arrivée ! Florian pour avoir partagé tes infos et potins toujours en dernier avec nous... Je ne doute pas de ta réussite et que tu mèneras à bien cette thèse. Et Joan dernier arrivant mais à qui je souhaite le meilleur dans la réalisation de sa thèse. Merci à vous d'avoir agrémente les journées de potins, de gâteaux et de bonbons (parfois trop) et de bonne humeur. Honnêtement ce fut un plaisir de partager votre bureau dans cette bonne ambiance. Il va m'être difficile de léguer mon bureau...

Je remercie bien évidemment toute la team des potins de l'irset, ingénieurs, doctorants, post-docs..., merci pour tous les bons moments passés qui furent sans nul doute nécessaires pour tenir psychologiquement. Merci d'avoir accompagné ces dernières années de rires, de grandes tablées du midi, de pauses café, de concours de gâteaux, de raclettes, de soirées fils rouges, de Tivoli et de maux de crâne le lendemain. Vous êtes nombreux, mais merci à Anna (Carrey), Ghania, Marie C, Marie K, Marie L, Melany, Célia, Stéphanie, Laura, Tom, Sophie, Jane, Charbel, Valentin, Stéphanie M, Noémie. Et mention spéciale pour Claudie, que je remercie également pour avoir laissé du temps à Normand ces derniers mois !!

Je remercie également Marie, qui a été l'une des premières à me dire qu'elle me voyait en thèse. Merci d'être passée par là avant moi et de m'avoir assuré que tout était normal dans les moments où je souhaitais arrêter. Et merci pour tout le reste, nos longs debriefs de tout, ton soutien et ton amitié !

Et enfin, et pas des moindres :

A vous, mes EC³ : Merci de votre présence et de votre soutien dans les joies comme dans les peines. Il est clair que vous m'avez manqué et que parfois notre éloignement forcé a été trop pesant. Alors merci d'avoir compris, et d'avoir toujours été là ! Merci de votre accompagnement précieux dans ce projet qu'est la thèse et dans l'ensemble de mes projets de vie. Chloë, Chloé, Clémence et Elsa, les filles, vous êtes clairement les

paillettes de ma vie ! Et MERCI à mes Mimis d'être la meilleure équipe de foot qui existe! Je vous aime comme Mumu aime le poulet aux fèves, comme le Bien aime la Veillance!

Papa et Maman, merci pour tout ! De m'avoir soutenue, poussée, encouragée, et ce depuis toujours. Merci pour vos valeurs inculquées, vos conseils, et la force que vous m'avez donné. Je suis convaincue qu'on n'entreprend pas cette aventure qu'est la thèse sans être accompagnée et soutenue : vous êtes mon accompagnement et mon soutien indéfectible au jour le jour. Cet accomplissement je vous le dois !

Rémi, je ne saurais clore mes remerciements sans te témoigner ma plus profonde reconnaissance. Merci pour ton soutien inconditionnel, ta patience, ta compréhension et tes encouragements au quotidien. Je sais qu'en acceptant cette thèse, c'est aussi notre vie que j'ai mis entre parenthèse, et encore plus sur la fin ; alors merci d'avoir accepté ça, de m'avoir épaulé et soutenue dans les moments de doute, là ou des fois j'aurais pu baisser les bras. Merci d'être un tel pilier, de me faire tant rire au quotidien et de faire que tout soit plus simple à tes côtés.

Table des matières

LISTE DES ABBREVIATIONS	13
LISTE DES FIGURES	17
LISTE DES TABLEAUX.....	20
AVANT PROPOS	21
PARTIE 1 : INTRODUCTION	23
CHAPITRE 1 : LES NAFLD	25
I. Rappel sur les fonctions métaboliques du foie	25
i. Le foie et sa composition.....	25
ii. Les fonctions métaboliques du foie	27
a. La détoxification des xénobiotiques.....	27
b. Le métabolisme énergétique	29
II. Généralités sur les NAFLD	31
i. Définitions et aspects cliniques des NAFLD (histologie et pathogénèse)	31
ii. Diagnostic des NAFLD	32
a. Biomarqueurs pour le diagnostic des NAFLD	33
b. Techniques d'imageries utilisées pour le diagnostic des NAFLD	34
iii. Epidémiologie et étiologie.....	34
a. Prévalence	34
b. Facteurs de risques	35
1. Les maladies métaboliques	36
2. Facteurs génétiques	37
3. Facteurs ethniques, âge, sexe.....	38
4. Alimentation.....	39
5. Contaminants environnementaux et médicaments	39
iv. Traitements des NAFLD	40
a. Changement des habitudes de vies	40
b. Traitements médicamenteux.....	40
III. Mécanismes et pathogénèse des NAFLD	41
i. La stéatose :.....	41
a. Augmentation des capacités d'absorption des AG par afflux d'AG exogènes.....	42
1. AG exogènes provenant de la lipolyse du tissu adipeux	43
2. AG exogènes provenant de l'alimentation	44
3. Elévation des capacités d'absorption suite à l'afflux d'AG exogènes	44

b.	Augmentation de la lipogenèse de novo	45
1.	La lipogenèse de novo	45
2.	Régulation de la lipogénèse de novo dans la stéatose	48
c.	Saturation des capacités de dégradation des AG via la β-oxydation	49
1.	La β -oxydation	49
2.	Altération de la β -oxydation dans la stéatose hépatique	51
d.	Altération de l'export des AG et accumulation des gouttelettes lipidiques	52
1.	Augmentation de la synthèse des TG et formation des GL	52
2.	Diminution de l'export des TG sous forme de VLDL	53
ii.	La stéatohépatite.....	54
a.	L'inflammation	54
b.	La mort cellulaire	56
iii.	Progression des NAFLD.....	57
a.	Développement de la fibrose	57
b.	Progression vers le carcinome hépatocellulaire	57
IV.	Principale voie génomique impliquée dans les NAFLD : les récepteurs nucléaires	58
i.	Les récepteurs PPARs	59
ii.	Les récepteurs xénosenseurs : PXR, CAR, AhR	61
iii.	Les récepteurs LXR et FXR	62
V.	Principale voie non génomique impliquée dans les NAFLD : la lipotoxicité	64
i.	Altération de l'homéostasie des lipides et lipotoxicité	64
a.	Les acides gras libres	65
b.	Le diacylglycérol	66
c.	Le cholestérol	66
d.	Céramides et autres sphingolipides	67
1.	Métabolisme des sphingolipides.....	67
2.	Les céramides dans les NAFLD	68
ii.	Rôle de la lipotoxicité dans les lésions hépatiques associées aux NAFLD.....	69
a.	Impact de la lipotoxicité sur le stress oxydant	70
1.	Mécanisme de production des ERO	70
2.	Causes du stress oxydant dans les NAFLD.....	71
3.	Effet du stress oxydant dans les NAFLD	72
b.	Impact de la lipotoxicité sur stress du réticulum endoplasmique	73
c.	Impact de la lipotoxicité sur la mort des hépatocytes : la lipoapoptose	74
d.	Impact de la lipotoxicité sur l'inflammation	76
e.	Impact de la lipotoxicité sur le remodelage membranaire	77
1.	La fluidité membranaire.....	77
2.	Le remodelage membranaire	77
3.	Effets des lipides sur la fluidité membranaire dans les NAFLD	77

VI. Autres mécanismes impliqués dans la pathogénèse des NAFLD	78
i. Rôle du microbiote intestinal dans la progression des NAFLD.....	79
a. La dysbiose intestinale dans les NAFLD	79
b. Rôle de la dysbiose dans l'évolution pathologique des NAFLD	79
ii. Facteurs épigénétiques : méthylation de l'ADN, miR.....	81
CHAPITRE II : LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS ET LES TAFLD	83
I. Les NAFLD et contaminants environnementaux : TAFLD	83
II. Origine des PE et exposition humaine	84
i. Classes de PE en fonction de leurs utilisations.....	86
a. Les bisphénols	86
c. Les parabènes.....	88
d. Les composés perfluorés (PFAS)	88
e. Les insecticides organochlorés.....	89
f. Les biocides : la tributylène	89
g. Les métaux lourds.....	90
h. Autres PE	90
ii. Caractéristiques.....	90
III. Les PE perturbateurs métaboliques impliqués dans les TAFLD	93
i. Exposition directe.....	93
ii. Exposition indirecte : développementale et transgénérationnelle.....	94
iii. PE et mécanismes impliqués dans le développement des TAFLD.....	97
a. Effets obésogènes.....	97
b. Effets des perturbateurs métaboliques	98
1. Effets des PE médiés par les récepteurs nucléaires.....	98
2. Mécanismes impliqués dans le développement de la stéatose par les PE.....	100
3. Mécanismes impliqués dans la transition de la stéatose vers la NASH par les PE	102
4. Autres mécanismes induits par les PE impliqués dans la pathogénèse des NAFLD : cas du rythme circadien et du système endocannabinoïde	105
5. Effet des co-expositions (HFD/PE) et des mélanges de PE	106
IV. Ligne directrice pour l'évaluation des PE par l'OCDE	107
V. Modèles d'évaluation du risque lié aux PE dans les NAFLD/TAFLD	109
CHAPITRE III : LE POISSON-ZEBRE (DANIO RERIO)	113
I. Caractéristiques générales sur le poisson-zèbre	113
i. Historique	113
ii. Développement.....	114
iii. Elevage.....	115

II. Avantages et limitations de l'utilisation du poisson-zèbre	115
i. Avantages	116
a. Elevage	116
b. Similarité avec l'Homme	116
c. Homologies génétiques	118
d. Manipulation génétique	118
e. Application du poisson-zèbre dans le domaine de la toxicologie	118
1. Considérations éthiques	119
2. Evaluation spécifique des effets de PE	119
ii. Limitations.....	121
III. Le foie du poisson-zèbre	122
i. Développement hépatique.....	123
ii. Comparaison anatomique et histologique avec le foie de mammifère	124
IV. Intérêt du modèle de poisson-zèbre pour l'étude des NAFLD et TAFLD	125
i. Métabolisme des xénobiotiques (enzymes de phase I, II, III)	125
ii. Métabolisme des lipides.....	126
iii. Régulation transcriptionnelle (récepteurs nucléaires).....	127
iv. Utilisation du modèle poisson-zèbre pour l'étude des maladies hépatiques humaines et l'hépatotoxicité	128
v. Modèles poisson-zèbre développés pour l'étude des NAFLD/TAFLD	129
a. Pathogénèse des NAFLD chez le poisson-zèbre	129
b. Modèles de NAFLD induits par l'alimentation	130
c. Modèles mutants/transgéniques	131
d. Etude des PE dans l'induction des NAFLD	132
PARTIE 2 : CADRE ET OBJECTIFS	135
PARTIE 3 : LES RESULTATS	139
I. Développement du « Steatosis Assay on Zebrafish » et étude mécanistique des effets pro-stéatogènes du DDE	141
i. Article	141
ii. Résultats complémentaires et discussions de l'article.....	183
a. Mise au point du test StAZ	183
1. Elevage, expositions et contraintes	183
2. Methodes de coloration et d'analyse	185
b. Mode d'action et effets du DDE – Etude de l'expression génique	190
1. Effet du DDE dans le métabolisme des lipides	190
2. Effet du DDE dans l'inflammation	192

c.	Implication de SCD1 dans la stéatose	193
d.	Remodelage membranaire	194
1.	Origine du remodelage membranaire	195
2.	Conséquences du remodelage membranaire sur la stéatose	196
3.	Conséquences du remodelage membranaire sur l'apoptose	196
4.	Conséquences du remodelage membranaire sur l'inflammation	197
II.	Développement du test ShAZ (« Steatohepatitis Assay on Zebrafish »)	198
i.	Description du test ShAZ	198
ii.	Mise au point du test.....	199
iii.	Mise en évidence des dommages hépatiques	201
iv.	Evaluation du stress oxydant.....	203
v.	Evaluation de la mort cellulaire.....	207
vi.	Evaluation de l'inflammation	210
III.	Validation inter-laboratoire du test obésogène : « Zebrafish Obesogenic Test »	212
i.	Contexte	212
ii.	Mise en place du Zebrafish Obesogenic Test	213
iii.	Résultats	214
iv.	Discussion	215
 PARTIE 4 : DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION		 219
I.	Perspectives concernant l'utilisation des tests StAZ et ShAZ	219
II.	Le projet Oberon : développer des approches intégrées des tests et de l'évaluation (IATA)	220
III.	Etude de nouveaux biomarqueurs dans la pathogénèse des NAFLD	222
i.	Le fer libre.....	222
ii.	Les vésicules extracellulaires.....	223
IV.	Conclusion générale	225
 BIBLIOGRAPHIE		 229
 ANNEXE		 303
 Liste des publications et des communications		 313

Liste des abbréviations

4-HNE	4-hydroxy-2-nonéol	ChREBP	<i>Carbohydrate response element-binding protein</i>
ABC	<i>ATP-Binding Cassette</i>	CK-18	Cytokératine-18
ACC	Acétyl-CoA carboxylase	CL	Cholestérol libre
AG	Acide Gras	CM-H₂DCFDA	Chloromethyl 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
AGCC	Acide gras à chaîne courte	CPT1	Carnitine palmitoyltransférase 1
AGCL	Acide gras à chaîne longue	CYP450	Cytochrome P450
AGCM	Acide gras à chaîne moyenne	D2T	Diabète de type 2
AGCTL	Acide gras à chaîne très longue	DAG	Diacylglycérol
AGI	Acide gras insaturé	DAMP	<i>Damage Associated Molecular Pattern Molecule</i>
AGL	Acide gras libre	DBP	Dibutyl phtalate
AGMI	Acide gras mono-insaturé	DDE	Dichlorodiphényldichloroéthylène
AGPAT	1-acylglycerol-3-phosphate acyltransférase	DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
AGPI	Acide gras poly-insaturé	DEHP	Di(2-ethylhexyl) phtalate
AGS	Acide gras saturé	DES	Dihydrocéramide désaturase
AhR	<i>Aryl hydrocarbon receptor</i>	DG	Diacylglycérol
ALAT	Alanine Aminotransférase	DGAT	Diacylglycerol acyltransferase
AOP	<i>Adverse Outcomes Pathways</i>	DHE	Dihydroéthidium
ApoB	Apolipoprotéine B	DMSO	Diméthylsulfoxyde
ARNm	Acide ribonucléique messenger	EC	Esters de cholestérol
ASAT	Aspartate transaminase	ELOVL	Acyl-CoA élongase
ATGL	<i>Adipose Triglyceride Lipase</i>	EM	Enzyme malique
ATP	Adénosine triphosphate	EMTX	Enzymes du métabolisme et des transporteurs des xénobiotiques
B[a]P	Benzo[a]pyrène	FABP	<i>Fatty acid binding proteins</i>
BPA	Bisphénol A	FADS	<i>Fatty acid desaturase</i>
BPF	Bisphénol F	FAS	<i>Fatty acid synthase</i>
BPS	Bisphénol S	FAT/CD36	<i>Fatty acid translocase cluster of differentiation 36</i>
BtP	Butyl-parabène	FATP	<i>Fatty acid transporters proteins</i>
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer-binding protein</i>	FGF21	<i>Fibroblast Growth Factor 21</i>
CAR	Récepteur constitutif de l'androstane	FXR	<i>Farnesoïde X receptor</i>
CAT	Catalase	G6P	Glucose-6-phosphate
CB1R	Récepteur des cannabinoïdes 1	GL	Goutelettes lipidiques
CdCl₂	Chlorure de Cadmium	GLP-1	<i>Glucagon-like peptide-1</i>
CerS	Céramide synthase	GP	<i>General polarization</i>
CHC	Carcinome hépatocellulaire	GPAT	Glycerol-3-phosphate acyltransférase
CHOP	<i>CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein</i>		

GPX	<i>Glutathion peroxydase</i>	OCDE	Organisation de Coopération et de Développement Economique
GSH	Glutathion	ORO	<i>Oil Red O</i>
GST	Glutathion S-Transférases	OXPHOS	Phosphorylation oxydative
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques	PCB	Polychlorobiphényle
HES	Hématoxyline éosine safranine	PE	Perturbateur endocrinien
HFD	<i>High fat diet</i>	PFC	Composés perfluorés
HMGCR	HMGCoA-réductase	PFOA	Acide perfluorooctanoïque
hpf	heures post-fécondation	PFOS	Acide perfluorooctanesulfonique
HSL	<i>Hormone-Sensitive Lipase</i>	PGC-1α	<i>PPARγ coactivator-1</i>
IL-	Interleukine	PLA2	Phospholipase A2
IMC	Indice de masse corporelle	PLIN	Pénilipine
iOc	<i>Instant Océan</i>	PNPLA3	<i>Patatin-like phospholipase domain containing 3</i>
IRE1α	<i>Inositol-requiring enzyme 1α</i>	POP	Polluants organiques persistants
JNK	<i>c-Jun N terminal kinase</i>	PPAR	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i>
jpf	Jours post-fécondation	PUMA	<i>p53 Upregulated Modulator of Apoptosis</i>
KDSR	<i>3-kéto-dihydrosphingosine</i>	PXR	<i>Pregnane X Receptor</i>
LC50	Concentration létale 50%	RE	Réticulum Endoplasmique
LCAD	<i>Long-chain acyl-CoA dehydrogenase</i>	REACH	<i>Registration, Evaluation, Autorisation and Restriction of Chemicals</i>
LDN	Lipogenèse de novo	RT-qPCR	<i>Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
LPA	Acide lysophosphatidique	RXR	<i>Retinoid X receptor</i>
LPC	Lysophosphatidylcholine	S1P	Sphingosine-1-phosphate
LPCAT	Lysophosphatidylcholine acyltransférases	SCAD	<i>Short-chain acyl-CoA dehydrogenase</i>
LPL	Lipoprotéine lipase	SCD	Stéroyl-CoA désaturase
LPS	Lipopolysaccharide	SE	Système endocannabinoïde
LXR	<i>Liver X Receptor</i>	ShAZ	<i>Steatohepatitis Assay on Zebrafish</i>
MCAD	<i>Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase</i>	SIRT	Sirtuine
MCD	<i>Methionine Choline Deficient</i>	Smase	<i>Neutral sphingomyelinase</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemo-attractant Protein-1</i>	SMet	Syndrome métabolique
MDA	Malondialdéhyde	SOD	Superoxyde Dismutase
MEHP	Mono(2-éthylhexyl)phtalate	SPT	Serine palmitoyl-CoA transférase
miR	microARN	SREBP	<i>Sterol Regulatory Element Binding Protein</i>
MTTP	<i>Microsomal triglyceride transfer protein</i>	StAZ	<i>Steatosis Assay on Zebrafish</i>
NAFLD	<i>Non-Alcoholic Fatty Liver Diseases</i>	SULT	Sulfotransférases
NASH	<i>Non-Alcoholic Steatohepatitis</i>	TAA	Thioacétamide
NF-κB	<i>Nuclear Factor-kappa B</i>	TAFLD	<i>Toxicant-Associated Fatty Liver Disease</i>
NLRP3	<i>NOD-Like Receptor Pyrin domain-containing 3</i>		
NR	<i>Nile Red</i>		

TAG	Triacylglycérol
TASH	<i>Toxicant-Associated Steatohepatitis</i>
TBT	Tributyltine
TCDD	2,3,7,8-Tétrachlorodibenzo-p- dioxine
TG	Triglycérides
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TRAIL	<i>TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i>
UGT	UDP-Glucuronyl Transférase
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
VE	Vésicules extracellulaires
VLCAD	<i>Very Long-chain acyl-CoA dehydrogenase</i>
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i>
ZOT	<i>Zebrafish Obesogenic Test</i>

Liste des Figures

- Figure 1** : Schéma de l'architecture cellulaire d'un lobule hépatique et de la zonation hépatique
- Figure 2** : Métabolisme hépatique des xénobiotiques
- Figure 3** : Représentation schématique des voies métaboliques hépatiques contrôlant l'homéostasie glucido-lipidique en période post-prandiale et en période de jeûne
- Figure 4** : Représentation schématique de l'évolution des NAFLD
- Figure 5** : Coupes histologiques de foies issues de biopsies de personnes atteintes de stéatose et de steatohépatite avec présence ou non de fibrose
- Figure 6** : Carte géographique de l'épidémie des NAFLD
- Figure 7** : Facteurs de risque prédisposant au développement de NAFLD
- Figure 8** : Modifications métaboliques à l'origine du développement de la stéatose hépatique
- Figure 9** : Altérations du tissu adipeux à l'origine d'une augmentation de la lipolyse
- Figure 10** : Schéma de la lipogénèse *de novo* et de la synthèse des triglycérides
- Figure 11** : Schéma de la β -oxydation mitochondriale des AG
- Figure 12** : Biogenèse des gouttelettes lipidiques (GL) à la membrane du réticulum endoplasmique.
- Figure 13** : Accumulation d'espèces lipidiques lipotoxiques et effets sur le foie
- Figure 14** : Voies de biosynthèse des sphingolipides menant à la production de céramides
- Figure 15** : Effets lipotoxiques médiés par les espèces lipidiques toxiques intervenant dans la progression des NAFLD
- Figure 16** : Mécanismes de production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) au cours du stress oxydant et principaux effets
- Figure 17** : Effets médiés par les lipides sur la mort cellulaire : la lipoapoptose
- Figure 18** : Rôle de la dysbiose du microbiote intestinal dans la pathogenèse des NAFLD
- Figure 19** : Courbes monotones décrivant une dose/réponse linéaire et proportionnelle *versus* courbes non monotone caractéristiques des PE
- Figure 20** : Sources de contaminations de la vie quotidienne des populations
- Figure 21** : Périodes d'expositions aux PE au cours de la vie (directe et indirecte)
- Figure 22** : Interaction entre les PE et les récepteurs nucléaires intervenant dans la pathogénèse des NAFLD
- Figure 23** : Mécanismes moléculaires impliqués dans l'accumulation de lipides hépatiques induits par l'exposition aux PE

Figure 24 : Effets des PE dans la progression pathologique des NAFLD

Figure 25 : Nombre d'articles scientifiques portant sur le poisson-zèbre de 1940 à nos jours

Figure 26 : Schéma récapitulatif des grandes étapes de développement du poisson-zèbre de la fécondation jusqu'au stade adulte

Figure 27 : Schéma représentant l'anatomie des larves de poisson-zèbre

Figure 28 : Développement du foie chez le poisson-zèbre transgénique Lipan

Figure 29 : Comparaison de l'anatomie cellulaire et architecturale du foie entre le poisson-zèbre et l'Homme

Figure 30 : Illustration des changements phénotypiques lors d'une exposition à des composés hépatotoxiques

Figure 31 : Projet Oberon. Etude intégrative visant à développer des batteries de tests pour l'étude des effets de PE dans les maladies métaboliques

Figure 32 : Accumulation de lipides dans la cavité viscérale des poisson-zèbres mise en évidence par la coloration Oil Red O

Figure 33 : Accumulation de lipides hépatiques et présence de GL mises en évidence par la coloration Nile Red

Figure 34 : Effets du DDE sur l'expression des ARNm des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides caractéristiques de la stéatose

Figure 35 : Effet du DDE sur l'expression des ARNm des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides

Figure 36 : Effet du DDE sur l'expression des ARNm des gènes impliqués dans l'inflammation

Figure 37 : Design expérimental du protocole ShAZ

Figure 38 : Induction de la stéatose hépatique chez les larves de poisson-zèbre âgées de 7jpf après 48h d'alimentation avec un régime riche en graisse

Figure 39 : Evaluation de la toxicité des PE sur les larves de poisson-zèbre stéatosées à 11jpf

Figure 40 : Effets du BPA et du DEHP sur l'expression des gènes reflétant une hépatotoxicité sur les larves de poisson-zèbre à 11jpf

Figure 41 : Quantification des atteintes hépatiques par analyse histologique en coloration HES après exposition des poissons-zèbres aux BPA et au DEHP à 11jpf

Figure 42 : Effets du BPA et du DEHP sur l'expression des gènes impliqués dans la réponse antioxydante sur les larves de poisson-zèbre à 11jpf

Figure 43 : Mise en évidence de la peroxydation lipidique dans le foie de poisson-zèbre exposé au DDE et au DEHP

Figure 44 : Effets du BPA et du DEHP sur l'expression du gène casp3a impliqué dans la mort cellulaire par apoptose sur les larves de poisson-zèbre à 11jpf

Figure 45 : Effets du BPA et du DEHP sur l'expression des gènes impliqués dans l'inflammation sur les larves de poisson-zèbre à 11jpf

Figure 46 : Schéma présentant le déroulé temporel du test obésogène (ZOT)

Figure 47 : Pourcentage de variation d'adiposité mesurée grâce au test ZOT chez les poissons-zèbres juvéniles exposés pendant 24h au solvant DMSO ou à la TBT

Figure 48 : Images obtenues au microscope à fluorescence au cours du test ZOT sur un poisson-zèbre juvénile avant (A) et après (B) exposition au DMSO pendant 24h à jeûn

Figure 49 : Images obtenues au microscope à fluorescence au cours du test ZOT sur un poisson-zèbre juvénile avant (A) et après (B) exposition à la TBT pendant 24h à jeûn

Figure 50 : Représentation des évènements biologiques menant à la construction d'une AOP

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Différents types de mort cellulaire identifiés dans le contexte des NAFLD

Tableau 2 : Effet des récepteurs métaboliques sur les mécanismes contribuant au développement des NAFLD

Tableau 3 : Les différentes familles de PE selon leurs principaux usages/sources de contamination

Tableau 4 : Principe des 3Rs mis en place par la réglementation REACH dans le cadre de l'expérimentation animale dans l'évaluation des risques liés aux substances chimiques

Tableau 5 : Tests proposés par l'OCDE sur le modèle *in vivo* du poisson-zèbre pour évaluer la toxicité et la perturbation endocrinienne de substances chimiques

Tableau 9 : Liste non exhaustive des sondes fluorescentes pouvant être utilisées pour étudier le stress oxydant par la mise en évidence des ERO ou de la peroxydation lipidique

Tableau 10 : Statistiques descriptives sur la variation d'adiposité mesurée dans le cadre du test ZOT des poissons-zèbres juvéniles exposés pendant 24h au solvant DMSO ou à la TBT

Tableau 11 : Proposition de combinaison entre souches transgéniques et marquages pour un test ShAZ intégrant l'évaluation simultanée des 3 caractéristiques de la stéatohépatite

Tableaux en Annexe

Tableau S1 : Modèles NAFLD de poisson-zèbre induits par l'alimentation

Tableau S2 : Modèles mutants et transgéniques développés pour l'étude des NAFLD

Tableau S3 : Etudes de l'impact des PE dans les NAFLD portant sur le modèle du poisson-zèbre

Tableau S4 : Liste et caractéristique des 10 PE utilisés dans le projet Oberon

AVANT PROPOS

Les maladies non-alcooliques du foie ou NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease) représentent les atteintes hépatiques les plus fréquentes dans le monde. Leur prévalence est en constante augmentation en parallèle de l'augmentation de l'obésité, premier facteur de risque pour ces maladies (Estes et al., 2018; Younossi, 2019). A l'heure actuelle, elles affectent environ 25 % de la population mondiale et jusqu'à 80% des personnes obèses ou en surpoids (Dai et al., 2017; Younossi, 2019). Les NAFLD sont des pathologies évolutives dont le premier stade est la stéatose hépatique, caractérisée par l'enrichissement des hépatocytes en triglycérides stockées au sein de gouttelettes lipidiques. D'un point de vue clinique, la stéatose est considérée comme bénigne, mais elle peut cependant sensibiliser le foie aux agressions ultérieures, pouvant évoluer vers des stades plus sévères de la maladie. En effet, 10 à 30% des personnes atteintes de stéatose vont développer une steatohépatite ou NASH (« Non-Alcoholic Steatohepatitis »), caractérisée par une mort des hépatocytes et une inflammation hépatique. En outre, la NASH est un stade propice au développement de fibrose, de cirrhose et finalement au carcinome hépatocellulaire (CHC) (Chalasan et al., 2018; Younossi, 2019). De ce fait, les NAFLD sont devenues la première cause de développement de CHC ces dernières années et sont associées à une augmentation du risque de mortalité (Chalasan et al., 2018; Younossi and Henry, 2016).

Malgré l'attention grandissante portée sur les NAFLD, les causes et les mécanismes responsables de la transition de la stéatose hépatique vers la NASH restent encore à préciser. L'identification des facteurs impliqués est donc un véritable enjeu de santé publique, ce qui pourrait permettre de réduire l'incidence des pathologies menant au CHC.

Récemment, de nombreuses études ont mis en évidence que l'exposition aux toxiques environnementaux pourrait agir comme un nouveau facteur de risque pour le développement de NAFLD (Al-Eryani et al., 2015; Wahlang et al., 2019). Parmi ces polluants, les perturbateurs endocriniens sont particulièrement préoccupants, du fait de leur présence ubiquitaire dans l'environnement qui nous entoure (alimentation, eau, revêtements, plastiques, textiles, pesticides, cosmétiques, pollution atmosphérique, etc.) et de leur rôle fortement suspecté dans le développement des maladies métaboliques telles que les NAFLD, mais également l'obésité et le diabète (Foulds et al., 2017; Heindel et al., 2017; Wahlang et al., 2013).

Conformément au cadre réglementaire mis en place au sein de l'Union Européenne (UE) pour réduire l'utilisation de certains PE et protéger les consommateurs, de nouvelles méthodes plus efficaces permettant de prédire correctement les effets de PE sont nécessaires, et en particulier pour évaluer leurs effets sur les maladies métaboliques. Dans ce contexte, le projet Européen Oberon a été initié pour fournir une **batterie de tests standardisés permettant d'identifier et de caractériser les effets des PE sur les maladies métaboliques telles que l'obésité, le diabète et les NAFLD** (Audouze et al., 2020). Cette approche multidisciplinaire combine des tests expérimentaux sur modèles *in vitro* (cellules 2D, 3D) et *in vivo* (poisson-zèbre) ; des technologies omiques à haut débit ; de l'épidémiologie et des études de biosurveillance humaine ; ainsi que des modèles de

prédictions informatiques avancés (*in silico*). Le but final de ce projet vise à une meilleure évaluation des risques et la prise de décisions quant à la réglementation des PE.

Dans ce contexte, cette thèse s'est donc intéressée à développer des tests biologiques sur modèle *in vivo* (la larve de poisson-zèbre) permettant d'évaluer la capacité des PE à induire l'initiation des NAFLD, *i.e.* la stéatose (1er test : StAZ, Steatosis Assay on Zebrafish), ainsi que leur progression vers le stade pathologique de la NASH (2nd test : ShAZ, Steatohepatitis Assay on Zebrafish), tout en caractérisant leurs mécanismes d'actions dans l'initiation de ces pathologies.

La première partie de cette thèse est une synthèse bibliographique, où seront présentés en détail les NAFLD, puis les perturbateurs endocriniens et leur implication dans les NAFLD, pour finir sur une présentation du modèle *in vivo* choisi : le poisson-zèbre. Par la suite, les résultats seront séparés en trois parties ; une première présentant le développement du premier test utilisé pour évaluer la capacité des PE à initier la stéatose ainsi que l'étude des modes d'actions des PE impliqués ; une seconde partie introduisant le développement du second test visant à évaluer la capacité des PE à induire la progression pathologique de la stéatose vers la NASH, ainsi que certains mécanismes d'actions ciblés, et enfin une troisième partie s'intéressant à la validation d'un test déjà développé par d'autres partenaires du projet, visant à évaluer la capacité des PE à induire une autre maladie métabolique, l'obésité. Enfin, une discussion générale portant sur l'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse sera réalisée, et des perspectives concernant les futurs travaux seront intégrées.

PARTIE 1 : INTRODUCTION

Chapitre 1 : Les NAFLD

I. Rappel sur les fonctions métaboliques du foie

Le foie joue un rôle essentiel dans de nombreux processus physiologiques dont les fonctions principales sont : le maintien de l'homéostasie glucido-lipidique, la synthèse de protéines sanguines, la détoxification des composés endogènes et des xénobiotiques, ainsi que la production de la bile intervenant dans la digestion. En plus d'assurer la synthèse de glucides, lipides, de protéines et d'hormones, il est aussi un lieu de stockage des vitamines et du glycogène.

i. Le foie et sa composition

Le foie est l'organe le plus volumineux de l'organisme humain, situé dans la cavité abdominale ; il fait partie du système digestif. Il est divisé en 4 lobes hépatiques, étant chacun subdivisé en millions d'unités fonctionnelles appelées lobules hépatiques. Chaque lobule est constitué de milliers de cellules hépatiques divisées en deux groupes. Les cellules parenchymateuses sont les hépatocytes, et les cellules non parenchymateuses comprennent les cholangiocytes, les cellules endothéliales sinusoidales, les cellules étoilées et les cellules de Kupffer (Figure 1).

Les **hépatocytes**, représentent 80% des cellules hépatiques (Watt et al., 2019) et sont organisées en travées hépatocytaires le long des sinusoides. Ces cellules possèdent des microvillosités sur les faces orientées vers les sinusoides afin d'améliorer les échanges avec le sang. L'hépatocyte assure l'essentiel des fonctions métaboliques et de détoxification et possède une forte capacité de régénération et de renouvellement. Ce sont aussi les cellules productrices de bile qui est ensuite transportée par les canalicules biliaires jusqu'au canal biliaire, rattaché au foie, et qui va aider à la digestion des aliments dans l'intestin.

Les **cholangiocytes** sont les cellules épithéliales bordant les canaux biliaires contribuant au transport de la bile.

Les **cellules sinusoidales** sont des cellules endothéliales qui bordent la paroi du vaisseau sanguin. Elles possèdent des fenestrations permettant les échanges entre le sang et les hépatocytes et qui agissent également comme un filtre entre ces deux éléments.

Les **cellules étoilées** sont localisées dans les espaces formés entre les cellules endothéliales et les hépatocytes, appelés espace de Disse et servant de drainage lymphatique. Elles assurent le rôle de stockage de vitamine A et ont des fonctions immunitaires. Ces cellules ont également un rôle physiologique, notamment lors du processus inflammatoire, au cours duquel leur activation de manière chronique conduit à la production de tissus fibreux (matrice extracellulaire).

Les **cellules de Kupffer** sont les macrophages résidents, accolés aux cellules endothéliales. Ils ont un rôle important dans la phagocytose d'agents biologiques ayant traversé la barrière intestinale.

D'autres cellules du système immunitaire résident dans le foie, comme les lymphocytes Natural Killer ainsi qu'une petite proportion de cellules dendritiques (Nemeth et al., 2009). Ces cellules immunitaires assurent une surveillance et une défense continue du foie face aux agents pathogènes pouvant arriver de la circulation systémique.

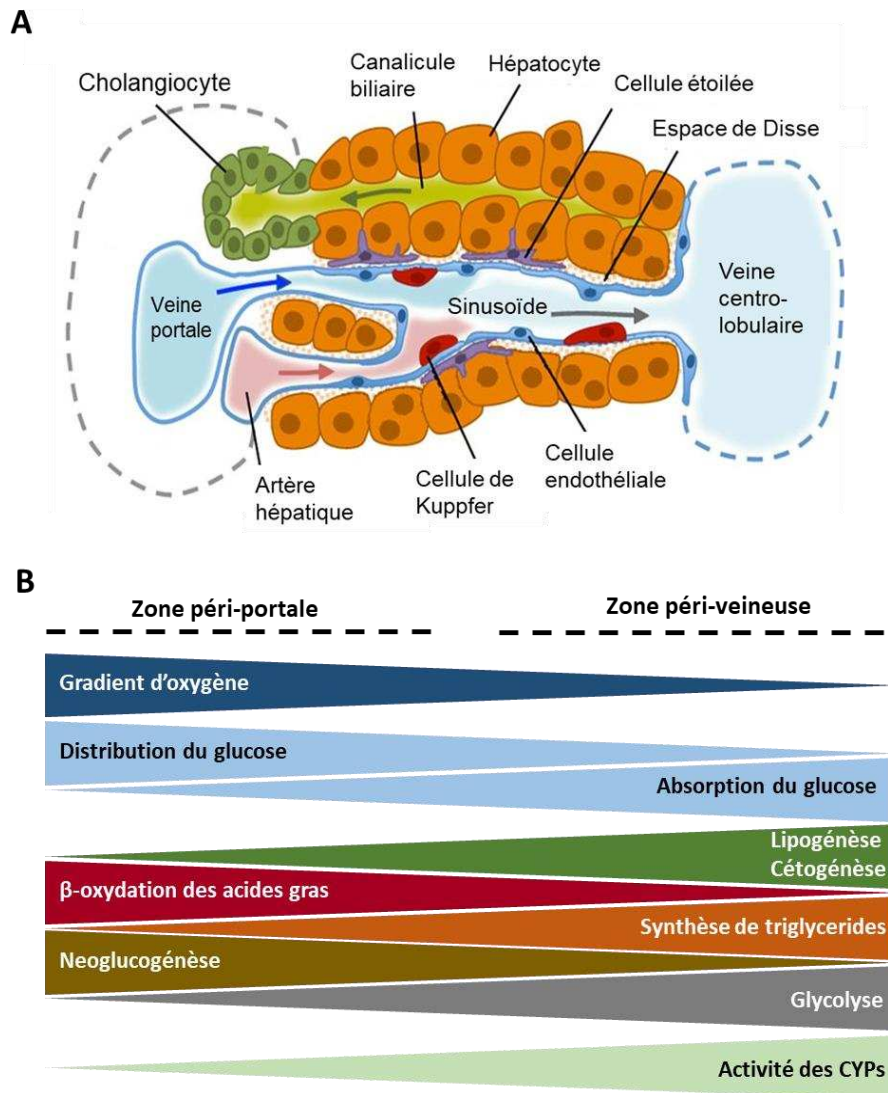


Figure 1 : Schéma de l'architecture cellulaire d'un lobule hépatique (A) (adapté de Gordillo et al., 2015) et de la zonation hépatique selon le gradient d'oxygène (B) (adapté de Kietzmann et al., 2017 et de Cunningham et al., 2021)

Le foie est un organe très vascularisé, traversé par 1,4 litres de sang en moyenne chaque minute. Il est alimenté en sang par deux principaux vaisseaux sanguins : la veine porte (70-75% du flux) qui amène le sang riche en nutriments du système digestif et l'artère hépatique (25-30% du flux) qui amène le sang riche en oxygène provenant du cœur (Abdel-Misih and Bloomston, 2010). Le sang circule ensuite dans le lobule à travers les sinusoides situés entre les travées d'hépatocytes, jusqu'à la circulation systémique par l'intermédiaire de la veine centrolobulaire. Les régions entourant les artères hépatiques et veines portes sont dites « péri-portales », alors que les zones entourant la veine centrale sont dites « péri-veineuses » (Figure 1).

L'organisation fonctionnelle du tissu hépatique est calquée sur l'architecture de la microcirculation hépatique. Le flux sanguin à travers le lobule hépatique génère des gradients d'oxygène, de nutriments et d'hormones différents, exposant les hépatocytes de chaque zone à différentes conditions métaboliques. Ainsi, en fonction de leur position dans le parenchyme hépatique, les hépatocytes diffèrent par leurs activités métaboliques. Cette compartimentation métabolique permet une distribution hétérogène des enzymes hépatiques, permettant le fonctionnement simultané de voies métaboliques opposées au sein du lobule hépatique. Ce principe est appelé la zonation métabolique (Figure 1B) (Cunningham and Porat-Shliom, 2021; Jungermann and Sasse, 1978; Kietzmann, 2017). La zone péri-portale, zone où le sang riche en oxygène arrive par l'artère hépatique, est spécialisée dans le métabolisme oxydatif, le catabolisme des acides gras et la néoglucogenèse. Alors que la zone péri-veineuse, zone où l'oxygénation est plus faible, assure préférentiellement la glycolyse, la synthèse des acides gras et la cétogenèse. Elle assure également l'essentiel des fonctions de biotransformation des xénobiotiques (Birchmeier, 2016). Les facteurs pouvant influencer cette zonation sont multiples mais la voie de signalisation Wnt/ β -caténine a été décrite comme étant l'un des régulateurs centraux de la fonction hépatique (Kietzmann, 2017; Monga, 2014). L'examen de la zonation hépatique est également essentiel pour la compréhension des maladies du foie, dont beaucoup se développent de façon non uniforme à travers le lobule. C'est le cas par exemple des maladies non alcooliques du foie, dont la progression pathologique se produit de manière zonée et est initiée au niveau de la zone péri-veineuse (Chalasan et al., 2008).

ii. Les fonctions métaboliques du foie

Si le foie remplit de nombreuses fonctions métaboliques, seules les deux principales seront décrites dans cette section : la détoxification des xénobiotiques et le métabolisme énergétique.

a. **La détoxification des xénobiotiques**

L'une des fonctions majeures du foie est le métabolisme et l'élimination des xénobiotiques, processus appelé détoxification. Sous le terme xénobiotiques sont regroupés diverses molécules chimiques d'origine exogène, que ce soit l'alcool, les médicaments, les contaminants alimentaires ou les polluants environnementaux, qui peuvent s'accumuler et/ou entraîner une toxicité pour l'organisme. Leur détoxification est donc vitale et réalisée grâce aux enzymes du métabolisme et des transporteurs des xénobiotiques (EMTX) présents dans le foie. Après l'entrée des xénobiotiques dans la cellule hépatique, que ce soit par diffusion simple ou par l'intermédiaire de transporteurs membranaires, les EMTX vont prendre en charge ces composés, souvent lipophiles, pour les convertir en métabolites plus hydrophiles. Ce processus facilite leur excrétion par les fluides biologiques et permet ainsi leur élimination.

Ce processus de détoxification comprend 3 phases et aboutit donc à l'élimination du composé exogène (Figure 2).

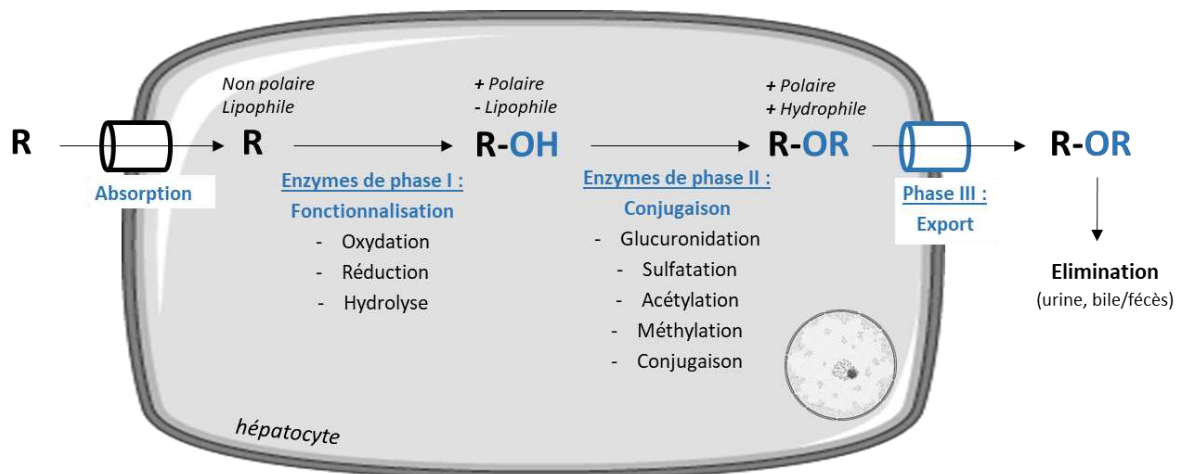


Figure 2 : Métabolisme hépatique des xénobiotiques. Les xénobiotiques (R) de nature non polaire et lipophiles sont captés du sang vers le foie par différents transporteurs. Ils vont subir des réactions de fonctionnalisation afin de les rendre plus polaires et moins lipophiles (Phase I). Puis ils sont conjugués avec différents groupements afin de les rendre plus hydrophiles (Phase II) pour faciliter leur export (Phase III) hors de l'hépatocyte, où ils rejoindront la bile ou le sérum pour être éliminés dans les fèces ou l'urine.

La **phase I** correspond à l'étape de fonctionnalisation des xénobiotiques. Les principales réactions catalysées par les enzymes de phases I sont l'oxydation, la réduction et l'hydrolyse du composé de départ. L'oxydation des xénobiotiques, par des mono-oxygénases, est la principale réaction réalisée. Elle est prise en charge par les cytochromes P450 (CYP450), qui représentent plus des $\frac{3}{4}$ des enzymes de phase I (Guengerich, 2008). Ces CYP450, une superfamille comprenant 57 gènes, diffèrent dans leur capacité à se lier et à métaboliser des xénobiotiques spécifiques. Plus particulièrement ce sont les CYP450 appartenant aux familles CYP1, CYP2 et CYP3 qui sont les plus impliquées dans la détoxification des xénobiotiques (Gueguen et al., 2006). Cependant au cours de la phase I, les CYP450 peuvent générer des métabolites réactifs et plus toxiques que le composé initial. En effet, ces métabolites réactifs sont électrophiles et peuvent réagir de façon covalente avec les sites nucléophiles des protéines ou des acides nucléiques. Ce phénomène de « bioactivation » peut être à l'origine d'effets toxiques variés allant de l'hépatotoxicité à la cancérogénèse (Guengerich, 2008).

La **phase II** du métabolisme correspond à l'étape de conjugaison des composés. Les principales enzymes de conjugaison sont les UDP-Glycosyl-transférases (UGTs), les Sulfotransférases (SULTs) et les Glutathion-S-transférases (GSTs). Ces enzymes permettent la conjugaison du groupement réactif (aldéhyde ou alcool) formés lors de l'étape de fonctionnalisation avec des groupements polaires comme l'acide glucuronique, l'acide sulfurique ou le glutathion (par les UGTs, SULTs et GSTs respectivement). Ces réactions de conjugaison permettent, dans la majorité des cas, de former des métabolites inactifs ayant une plus grande solubilité, ce qui favorise leur excrétion.

Enfin, la **phase III** permet l'efflux des métabolites hors de la cellule par des transporteurs actifs membranaires de la famille ATP-Binding Casette (ABC), pour qu'ils soient éliminés dans la circulation sanguine puis dans la bile ou l'urine.

b. Le métabolisme énergétique

Le foie permet d'assurer l'homéostasie énergétique. Avec le tissu adipeux et le pancréas, ils régulent le métabolisme glucido-lipidique de l'organisme. Le foie traite les nutriments absorbés par l'intestin et arrivant par la veine porte, afin de les stocker ou de les distribuer aux autres organes en fonction de l'état nutritionnel (après un repas/à jeûn) et de l'activité physique. Le glucose représente un des principaux carburants énergétiques pour le foie.

Après un repas, le sang arrivant au foie est riche en glucose, acides aminés et lipides, entraînant une augmentation de la glycémie. L'organisme va alors transformer et stocker le glucose et les lipides absorbés sous forme de glycogène et de triglycérides (TG) respectivement. Le glucose, entre dans les hépatocytes via le transporteur GLUT2 puis est directement phosphorylé en glucose-6-phosphate (G6P) par la glucokinase (GCK) avant d'emprunter différentes voies (Figure 3) :

- (1) la glycogénogenèse transforme le glucose pour le stocker sous forme de glycogène.
- (2) la glycolyse métabolise le glucose en pyruvate, qui est ensuite converti en acétyl-CoA avant d'entrer dans le cycle de Krebs et d'activer la phosphorylation oxydative au sein des mitochondries, permettant de générer de l'énergie sous forme d'adénine triphosphate (ATP). L'acétyl-CoA produit est également le métabolite précurseur essentiel à la lipogenèse *de novo*.
- (3) la voie des pentoses phosphates, permet la production de pentoses-phosphates indispensables à la biosynthèse d'acides nucléiques et de NADPH, co-enzyme essentielle notamment pour la synthèse des acides gras (AG).
- (4) la lipogenèse *de novo* (LDN) permet de produire des AG à partir des produits glycolytiques.

Les différents acides gras formés peuvent ensuite être estérifiés avec le glycérol-3-phosphate pour former des triglycérides (TG) ou avec du cholestérol pour former des esters de cholestérols. Les TG et les esters de cholestérols sont stockés dans les gouttelettes lipidiques au sein des hépatocytes ou bien sont sécrétés dans la circulation sous forme de lipoprotéines VLDL (very low density lipoprotein) qui seront stockés dans le tissu adipeux blanc (Bideyan et al., 2021; Rui, 2014).

En période de jeûne, la diminution de la glycémie oriente l'organisme vers la production d'énergie à partir des ressources stockées, qui vont être utilisées pour alimenter les organes périphériques afin de maintenir leur homéostasie énergétique. Dans un premier temps, le foie libère du glucose dans la circulation à partir des stocks de glycogène lors de la glycogénolyse. Dans un second temps, le foie va favoriser la synthèse du glucose *de novo* à partir de substrats non glucidiques comme le lactate, le glycérol et les acides aminés lors de la néoglucogenèse. Durant cette phase de jeûne, les TG du tissu adipeux blanc sont hydrolysés en acides gras lors de la lipolyse. Ces AG sont ensuite captés par le foie et oxydés par la β -oxydation mitochondriale, qui fournit de l'énergie aux hépatocytes et permet de générer de l'acétyl-CoA. Celui-ci sert de substrat à la cétogenèse mitochondriale pour former des corps cétoniques, qui serviront de carburant métabolique aux tissus extra-hépatiques (Bideyan et al., 2021; Rui, 2014).

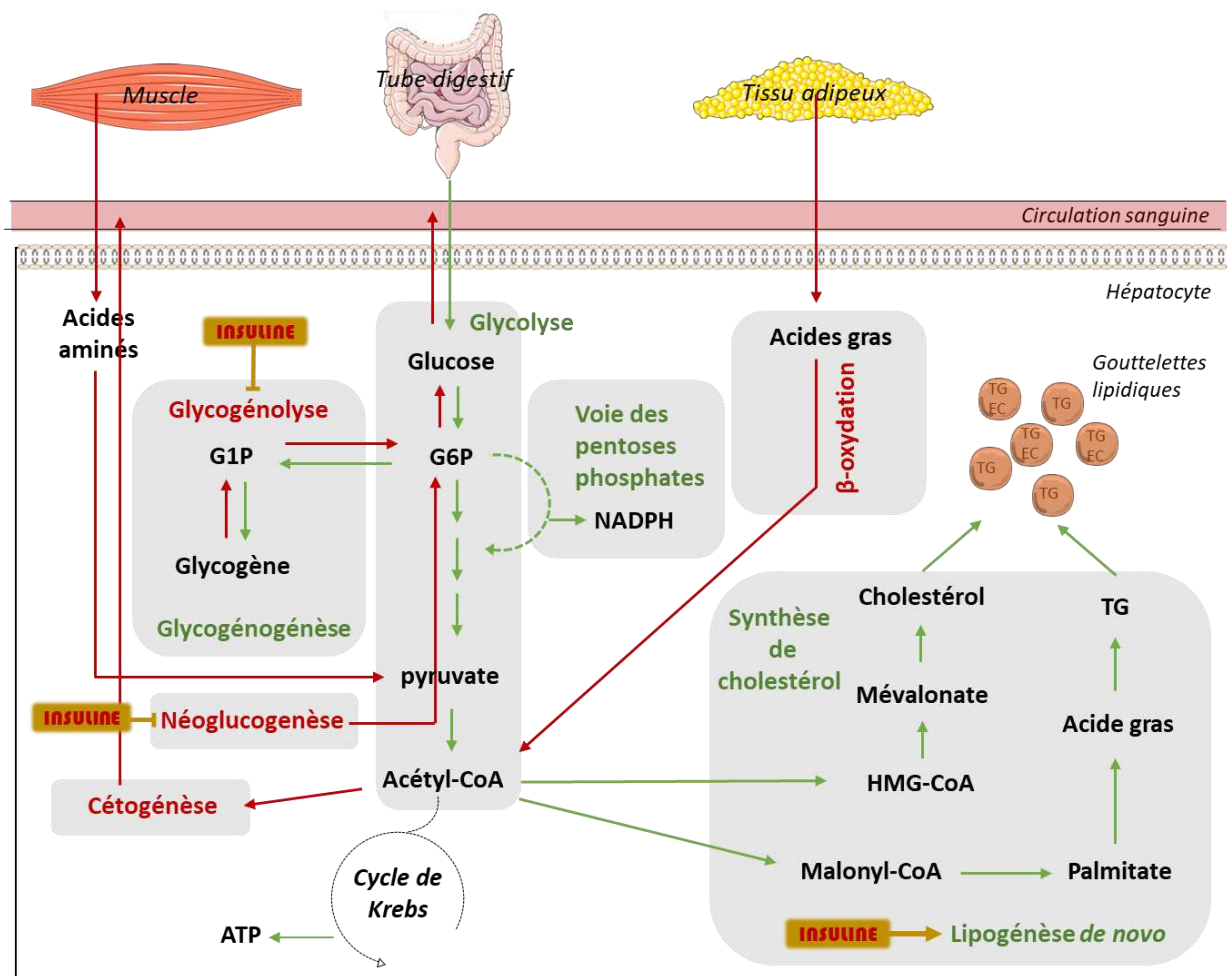


Figure 3 : Représentation schématique (non exhaustive) des voies métaboliques hépatiques contrôlant l'homéostasie glucido-lipidique en période post-prandiale (après alimentation, en vert) et en période de jeûne (en rouge).

La transition métabolique entre les périodes d'apports alimentaires et de jeûne est finement régulée par une balance hormonale insuline/glucagon au niveau du pancréas. Cette balance est responsable du maintien permanent de la glycémie par action au niveau des hépatocytes. Au niveau du pancréas, une augmentation de la glycémie entraîne une augmentation de la sécrétion d'insuline par les cellules β et une diminution de la synthèse de glucagon par les cellules α , menant à l'inhibition de la production de glucose hépatique (par la glycogénolyse et par la néoglucogenèse) et favorisant la synthèse de TG. Une diminution de la glycémie entraîne une inversion de ce rapport insuline/glucagon.

Le maintien de cette homéostasie énergétique met en jeu différentes voies métaboliques telles que la lipolyse du tissu adipeux, l'absorption des acides gras, la lipogénèse *de novo* (LDN), la synthèse des triglycérides, la β -oxydation mitochondriale, l'export des triglycérides par les VLDL qui seront discutées plus en détails dans cette thèse (*Chapitre 1 : Les NAFLD, III Mécanismes et pathogénèse des NAFLD*). Des perturbations de ces voies métaboliques peuvent conduire à l'apparition de maladies métaboliques telles que l'obésité, le diabète de type 2 ou encore les maladies non alcooliques du foie ou NAFLD.

II. Généralités sur les NAFLD

i. Définitions et aspects cliniques des NAFLD (histologie et pathogénèse)

Les maladies non-alcooliques du foie gras, ou NAFLD pour « Non-Alcoholic Fatty Liver Disease » sont la composante hépatique d'un ensemble de dysfonctions métaboliques confirmées en absence d'une consommation excessive d'alcool (≥ 30 g par jour pour les hommes et ≥ 20 g par jour pour les femmes), de traitements médicamenteux ou d'autres maladies hépatiques chroniques (EASL–EASD–EASO Guidelines, 2016).

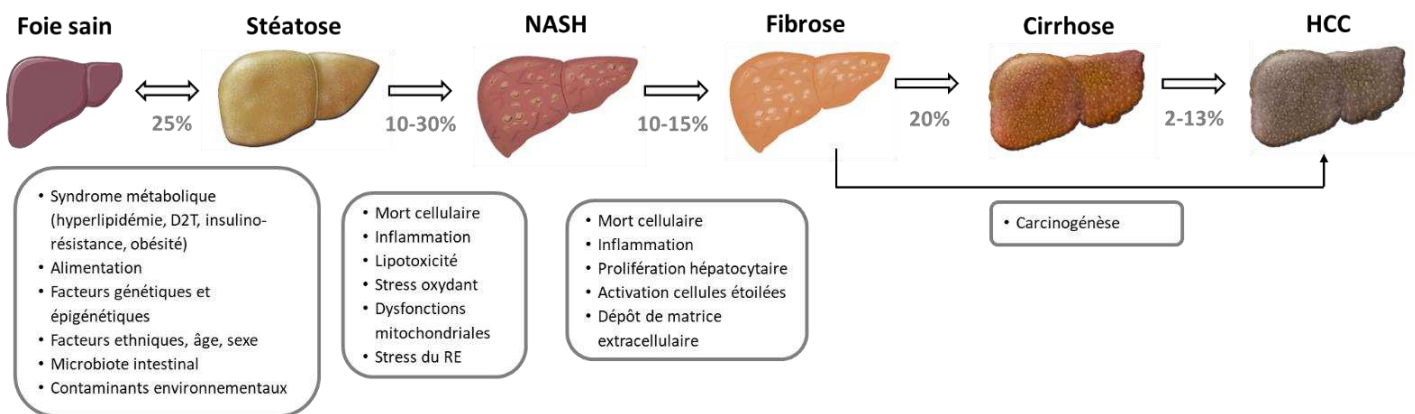


Figure 4 : Représentation schématique de l'évolution des NAFLD, avec les facteurs de prédispositions associés au développement des NAFLD, ainsi que les principaux mécanismes responsables de la progression pathologique des différents stades de NAFLD.

Les NAFLD englobent un large spectre d'atteinte hépatiques (Figure 4). La première est la stéatose hépatique (NAFL : Non-Alcoholic Fatty Liver), caractérisée par une accumulation excessive de triglycérides, sous forme de gouttelettes lipidiques au sein des hépatocytes, très généralement accompagnée d'une hépatomégalie (augmentation du volume du foie). Celle-ci doit impacter au moins 5% des hépatocytes pour être cliniquement considérée comme significative (Brown and Kleiner, 2016). Histologiquement, la stéatose hépatique peut être classée en 2 types : macrovésiculaire et microvésiculaire. La stéatose macrovésiculaire est la forme prédominante chez l'Homme. Elle présente de larges gouttelettes lipidiques qui occupent l'intégralité du cytoplasme de la cellule, provoquant le déplacement du noyau qui se retrouve accolé à la membrane plasmique (Figure 5A). La stéatose microvésiculaire, forme moins fréquente (présente dans environ 10% des biopsies de patients atteints de NAFLD) est caractérisée par une accumulation de gouttelettes lipidiques de plus petites tailles dans le cytoplasme, avec un noyau central. Elle est souvent observée dans des hépatocytes isolés mais n'est jamais diffuse. Cependant elle est associée à des formes plus sévères de NAFLD (Tandra et al., 2011).

Si la simple stéatose hépatique est identifiée comme étant un état bénin et réversible, elle peut dans 10 à 30% des cas, évoluer vers un état pathologique du foie, appelé stéatohépatite, ou NASH (« Non-Alcoholic Steatohepatitis ») (Marchesini et al., 2001; Younossi, 2018). En plus de l'accumulation excessive de lipides, la NASH est caractérisée par un statut inflammatoire du foie

et la mort des hépatocytes. D'un point de vue histologique, la NASH se définit par la présence d'une stéatose macrovésiculaire, d'une dégénérescence des hépatocytes avec un gonflement et un arrondissement des cellules, d'une inflammation diffuse caractérisée par des infiltrats inflammatoires (lymphocytes, neutrophiles, éosinophiles, cellules de Kupffer), ainsi que par la présence de corps apoptotiques et de corps de Mallory-Denk (filaments intermédiaires de kératine endommagés dans les cellules hépatiques) (Brown and Kleiner, 2016; Takahashi and Fukusato, 2014) (Figure 5B). La NASH peut être ou non accompagnée de fibrose, caractérisée par un dépôt excessif de collagène et d'autres protéines de la matrice extracellulaire, généralement le long des sinusoides des hépatocytes (Figure 5C). La fibrose serait présente chez 41% des patients atteints de NASH (Makri et al., 2021) et a été décrite comme le facteur prédictif le plus important de mortalité dans les NAFLD (Dulai et al., 2017). La NASH est une maladie évolutive et favorise le développement des stades avancés irréversibles que sont la cirrhose (dans 10 à 20% des cas) ou le carcinome hépatocellulaire (CHC) (Chalasani et al., 2018), qui sont associés à un risque accru de morbidité et de mortalité (Esteban and Asgharpour, 2022).

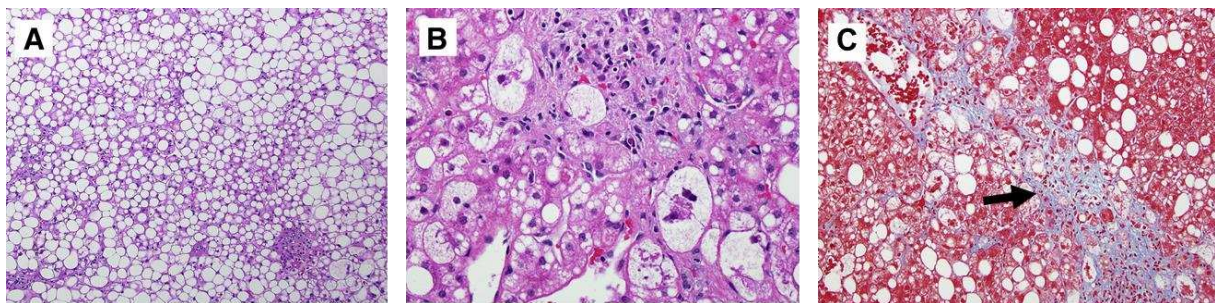


Figure 5 : Coupes histologiques de foies issues de biopsies de personnes atteintes de stéatose (A) et de steatohépatite avec présence ou non de fibrose (B ; C) (Adapté de Brown et Kleiner., 2015) A : Stéatose caractérisée par la présence de gouttelettes lipidiques ; marquage à l'hématoxyline-éosine, $\times 10$; B : NASH caractérisée par la présence supplémentaire d'hépatocytes ballonnés ; marquage à l'hématoxyline-éosine, $\times 40$; C : NASH avec présence de fibrose péri-sinusoidale (indiquée par la flèche) ; marquage au trichrome de Masson, $\times 10$ (Brown et Kleiner, 2016)

ii. Diagnostic des NAFLD

La pathogénèse des NAFLD est asymptomatique et le diagnostic compliqué, car les techniques utilisées en routine (tests sérologiques, techniques d'imageries) ne permettent pas toujours de distinguer la stéatose de la NASH. Or, il est primordial de pouvoir diagnostiquer la stéatose, au stade réversible de la maladie pour pouvoir anticiper les effets irréversibles des stades avancés. Ainsi, la méthode de référence pour le diagnostic des NAFLD est la biopsie hépatique permettant de qualifier et d'évaluer la sévérité de la maladie (Chalasani et al., 2018; EASL-EASD-EASO, Guidelines, 2016). Cette méthode permet de quantifier les caractéristiques histologiques de la stéatose (présence de gouttelettes lipidiques) et de la NASH (inflammation, ballonnements des hépatocytes, présence de corps de Mallory-Denk et fibrose), permettant de statuer et graduer la NAFLD (Chalasani et al., 2018). Cependant la biopsie est une technique invasive qui présente des risques de complications (Polyzos and Mantzoros, 2016). Plusieurs méthodes non invasives tentent de remplacer la biopsie pour le diagnostic des différents stades de NAFLD comme l'utilisation de biomarqueurs ou de nouvelles techniques d'imageries.

a. Biomarqueurs pour le diagnostic des NAFLD

Ainsi, au cours des dernières années, des recommandations européennes ont appuyé l'utilisation de méthodes non invasives comme les biomarqueurs sériques et l'utilisation des scores/indices pour diagnostiquer la stéatose hépatique. Par exemple, l'indice de foie gras (FLI) prend en compte l'indice de masse corporelle (IMC), la circonférence de la taille, le taux de triglycérides sériques et le dosage de la gamma-glutamyl transférase (GGT), transaminase hépatique. A ces paramètres peuvent s'ajouter le dosage des ASAT (aspartate transaminases) et ALAT (alanine aminotransaminases), la présence d'autres maladies métaboliques telles que le diabète de type 2, le taux d'insuline, le sexe, etc. Cependant l'utilisation de ces scores n'est pas toujours en mesure de discriminer les différents niveaux de stéatose et le dosage des enzymes hépatiques transaminases n'est pas toujours un indicateur fiable et précis de NAFLD. En effet, même si des taux anormalement élevés d'enzymes hépatiques sont fréquemment signalés chez les patients atteints de NAFLD (Skelly et al., 2001), ces enzymes peuvent aussi être retrouvées à des taux normaux, ou même diminuées (Ma et al., 2020).

Concernant la NASH, d'autres biomarqueurs peuvent être utilisés. L'apoptose joue un rôle fondamental dans les dommages hépatiques observés dans la NASH, ainsi la cytokératine-18 (CK-18) est l'un des biomarqueurs les plus utilisés pour détecter la présence de NASH. La CK-18 est une protéine constituant les filaments intermédiaires de cytokératine dans les hépatocytes, clivée par la caspase 3 au cours de l'apoptose et dont les fragments sont libérés dans la circulation sanguine, reflétant ainsi les niveaux d'apoptose hépatique. Cette substance a été décrite comme significativement plus élevée chez les patients atteints de NASH et pouvant servir de biomarqueur non invasif prometteur pour la prédiction de la gravité des NAFLD (Hadizadeh et al., 2017; Malik et al., 2009). Une étude a démontré que, associé à d'autres indicateurs comme la FGF21 (hépatokine sécrétée dont l'expression est corrélée aux taux de TG hépatiques), la sensibilité et la spécificité de diagnostic étaient améliorées (Shen et al. 2012; Li et al. 2010). La NASH étant caractérisée par un état inflammatoire chronique, plusieurs études ont évalué des marqueurs de l'inflammation, comme la protéine C-réactive ou la ferritine pour lesquels de fortes concentrations ont été associées à la NASH (Tsai and Lee, 2018).

Pour le diagnostic de la fibrose, des biomarqueurs liés à la fibrogénèse et/ou la fibrinolyse peuvent être dosés, comme les niveaux d'acide hyaluronique ou encore le pro-collagène III (Pro-C3), qui témoignent du renouvellement de la matrice extracellulaire. Des études ont montré l'association entre l'augmentation de ces marqueurs dans le sang et la présence de NASH et de fibrose, permettant le diagnostic de la sévérité des NAFLD (ElGhandour et al., 2021; Leeming et al., 2017; Suzuki et al., 2005). Indirectement la diminution de plaquettes ou d'albumine peut être utilisée pour prédire le grade de fibrose hépatique (Papatheodoridi and Cholongitas, 2018).

Avec l'amélioration des technologies, de nouvelles études ont émergé notamment sur les multiples biomarqueurs circulants, comme les microARN (miR), petites molécules d'ARN non codants endogènes (Kim et al., 2021). Certains miR, comme le miR-122 et le miR34a liés au métabolisme des lipides ont déjà été décrits comme des biomarqueurs prometteurs de diagnostic pour les NAFLD (Cai et al., 2019; Cermelli et al., 2011).

b. Techniques d'imageries utilisées pour le diagnostic des NAFLD

Une variété d'outil d'imagerie peut également être utilisée en clinique pour le diagnostic des NAFLD. L'échographie apparaît comme la méthode de dépistage de première intention et la plus utilisée pour diagnostiquer la stéatose hépatique (EASL–EASD–EASO Guidelines, 2016). Elle permet d'observer l'homogénéité des tissus hépatiques et de détecter l'hépatomégalie. Mais même si cette technique est largement disponible et simple à réaliser, elle manque de sensibilité sur les stéatoses inférieures à 30% et ne distingue pas la stéatose de la NASH, car elle est incapable de diagnostiquer l'inflammation et la fibrose (Hernaez et al., 2011). L'imagerie par résonance magnétique (IRM) et la spectroscopie par résonance magnétique (MRS) sont les méthodes non invasives qui offrent la plus grande sensibilité et spécificité pour le diagnostic des NAFLD. Elles permettent de cartographier la graisse hépatique et de détecter les différents grades de stéatose. Ces techniques sont en passe de devenir l'examen de référence malgré le fait qu'elles restent très onéreuses et inaccessibles dans une pratique clinique quotidienne (Patel et al., 2016; Perumpail et al., 2017; Piazzolla and Mangia, 2020; Tang et al., 2013). L'élastographie, quant à elle, permet d'évaluer les stades avancés des NAFLD et particulièrement la présence de fibrose, en mesurant la rigidité du foie (Chen et al. 2011; Tsai et Lee 2018).

iii. Epidémiologie et étiologie

a. Prévalence

Les NAFLD constituent un problème majeur de santé publique puisqu'elles représentent la cause la plus fréquente de pathologies hépatiques dans le monde. Même si on considère que l'incidence réelle des NAFLD est sous-évaluée du fait des difficultés de diagnostics, on estime qu'en 2019, environ 25% de la population générale était atteinte de NAFLD (Younossi, 2019). Cette incidence varie en fonction des différentes régions du globe, principalement liées aux différences d'apport calorique, d'activité physique, de distribution de graisse corporelle, du statut socio-économique ou encore des prédispositions génétiques (Figure 6). En Europe, la prévalence est estimée à 23,7% et les dernières données issues de la cohorte CONSTANCE estiment que 18,2% de la population française serait atteinte de stéatose hépatique (Nabi et al., 2020).

Cette prévalence peut fortement augmenter lorsque les individus présentent un facteur de risque métabolique tel que la présence d'un syndrome métabolique, d'une obésité, d'un diabète de type 2, d'une insulino-résistance ou encore d'une dyslipidémie. Ainsi la prévalence des NAFLD peut augmenter jusqu'à 60% chez les personnes atteintes de diabètes et jusqu'à 90% chez les personnes atteintes d'obésité (Dai et al. 2017; Polyzos, Kountouras, et Mantzoros 2019; Younossi et al. 2016; Younossi, et al. 2019).

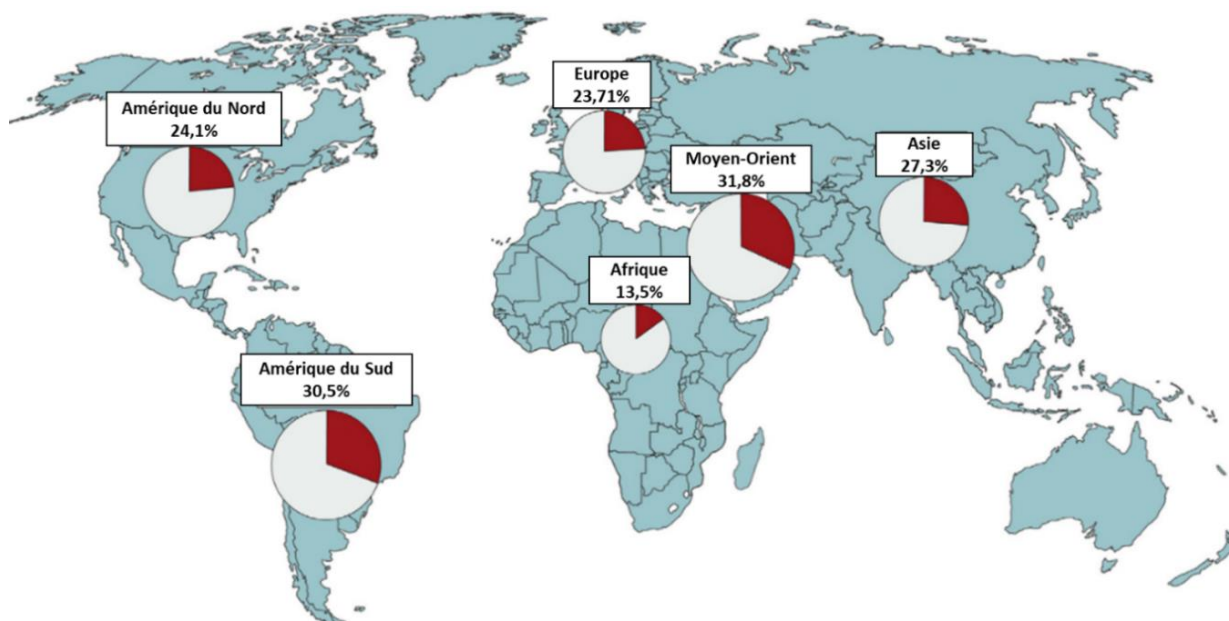


Figure 6 : Carte géographique de l'épidémie des NAFLD (Adapté de Younossi et al., 2019)

Concernant la NASH, 1,5 à 6,5% de la population générale serait concernée (Younossi, 2019). La NASH est actuellement la deuxième cause de transplantation hépatique aux Etats-Unis, dont les NAFLD représentent 75,1% des cas de maladies chroniques. Sur la base de l'augmentation de la fréquence de la NAFLD au cours de la dernière décennie, on s'attend à ce que la NASH, devienne la cause la plus courante de transplantation hépatique entre 2020 et 2025, dépassant l'hépatite C (Charlton et al. 2011; Perumpail et al. 2017). Selon les prévisions, la prévalence des NAFLD pourrait augmenter de 21% d'ici à 2030 et celle des NASH augmenterait de 63%, faisant de la NAFLD la maladie hépatique chronique la plus courante (Estes et al. 2018; Younossi et Henry 2016). En parallèle, l'incidence du HCC est en constante augmentation avec 25% des cas de HCC provenant des NAFLD (Michelotti et al., 2013). Bien que le risque de mortalité liée au foie soit accru chez les patients atteints de NAFLD, la principale cause de décès est la maladie cardiovasculaire (Younossi, Golabi, et al. 2019).

b. Facteurs de risques

Différents facteurs de risques peuvent expliquer le développement des NAFLD. Parmi eux, les maladies métaboliques, les facteurs génétiques, l'ethnicité ainsi que le sexe, l'âge, l'alimentation et l'exposition aux contaminants environnementaux.

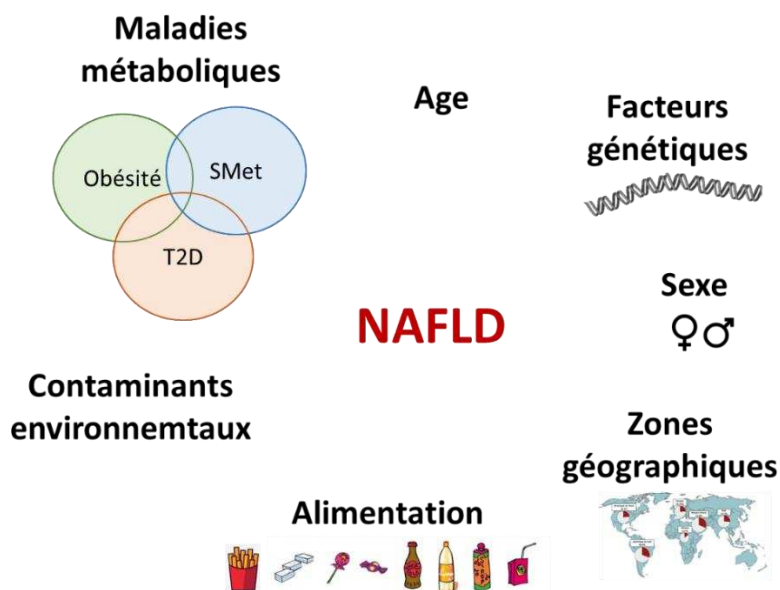


Figure 7 : Facteurs de risque prédisposant au développement de NAFLD

1. Les maladies métaboliques

Les NAFLD sont étroitement associées aux maladies métaboliques telles que le syndrome métabolique, l'obésité, le diabète de type 2, l'hyperlipidémie et l'insulino-résistance ; car elles partagent des mécanismes moléculaires et cellulaires communs. Ainsi, la présence de ces maladies métaboliques constitue un facteur de risque pour le développement de NAFLD.

Le syndrome métabolique (SMet) est caractérisé par un ensemble d'anomalies métaboliques comprenant une augmentation du tour de taille (liée à l'obésité), une hyperglycémie, une dyslipidémie (taux élevé de cholestérol et/ou lipides et faible taux de lipoprotéines HDL) ainsi qu'une hypertension artérielle. La présence d'un SMet est un facteur de risque important pour la NAFLD et la NASH (Friedman et al., 2018). Ces maladies sont étroitement liées avec des caractéristiques communes (résistance à l'insuline, augmentation de TG sériques). De ce fait, si la présence d'un SMet augmente le risque de NAFLD, un traitement visant à améliorer la NAFLD peut également améliorer le SMet.

L'obésité est considérée comme le principal facteur de risque de NAFLD, puisque l'IMC et le tour de taille sont positivement corrélés, à la fois à la présence de NAFLD et à la progression de la maladie (Perumpail et al., 2017). Ainsi, il est décrit qu'environ 93% des personnes atteintes d'obésité morbide seraient atteintes de NAFLD et 24% présenteraient une NASH (Ong et al., 2005). En 2016, il était estimé que 13% de la population adulte mondiale était obèse et 39% en surpoids et cette prévalence n'a cessé d'augmenter ces dernières années conjointement à celle des NAFLD (Younossi, 2019).

Néanmoins, une proportion de patients atteints de NAFLD et présentant un IMC normal a également été décrit. En raison de l'absence de facteurs de risques évidents, cette NAFLD appelée « lean NAFLD » est sous diagnostiquée dans cette population, mais il est tout de même estimé une

prévalence globale de 5 à 26% (Wang, Dhaliwal, et Mouzaki 2019). Bien que considérée au départ comme moins impactante que la NAFLD classique, des rapports plus récents affirment que la « lean NALFD », touche majoritairement de jeunes patients, et entraînerait une plus forte morbi-mortalité avec un risque plus élevé d'évoluer vers une NASH et une fibrose avancée (Fracanzani et al., 2011).

Le diabète de type 2 (DT2) est également très fortement associé au développement et à la progression des NAFLD. En effet, jusqu'à 75% des personnes atteintes de DT2 aurait également une NAFLD (Younossi, 2019). La présence de DT2 serait également associée à un risque de développement de fibrose dans la NAFLD. Ainsi, le diabète est non seulement une comorbidité fréquente de la NAFLD mais est aussi l'un des déterminants dans la progression de la NAFLD vers la NASH (Calzadilla Bertot and Adams, 2016; Perumpail et al., 2017). De plus, la résistance à l'insuline qui se développe au cours du DT2, est également une composante majeure de la pathogénèse des NAFLD, pouvant être à la fois la cause et la conséquence des NAFLD (Tanase et al., 2020; Valenti et al., 2016). En plus de conduire à une altération de la signalisation du glucose, l'insulino-résistance favorise la lipolyse du tissu adipeux et une surproduction de glucose, entraînant respectivement une augmentation de l'afflux d'acides gras au niveau du foie et une augmentation de la lipogénèse hépatique, contribuant *in fine* au développement de NAFLD (Chao et al., 2019).

Du fait que la stéatose hépatique est le plus souvent associée à d'autres dysfonctions métaboliques, le terme de MAFLD ("Metabolism Associated Fatty Liver Disease") a émergé pour décrire les maladies du foie gras associées au métabolisme. Dans ce nouveau consensus, les critères de diagnostic ne mettent plus l'accent sur l'absence de consommation excessive d'alcool, mais plutôt sur la présence de dysfonctions métaboliques. Les critères sont basés sur la présence d'une stéatose hépatique associée à la présence d'une des trois conditions suivantes : surpoids/obésité, T2D et dérégulation métabolique (Eslam et al., 2020). Bien que ce nouveau terme soit proposé, les mécanismes d'induction et de progression des NAFLD et des MAFLD partagent les mêmes caractéristiques, au sein desquelles la résistance à l'insuline est un événement clé de la pathogénèse (Kuchay et al., 2020; Xian et al., 2021).

2. Facteurs génétiques

Les facteurs génétiques modulent le risque individuel relatif au développement de la NAFLD. Des études pan-génomiques ont permis de mettre en évidence que de nombreux gènes étaient potentiellement des facteurs de risques génétiques prédisposant à la NAFLD et sa sévérité (Del Campo et al., 2018; Jonas and Schürmann, 2020; Macaluso et al., 2015).

Parmi eux, le mieux caractérisé est la présence d'un polymorphisme mononucléotidique (variant rs738409, C>G au résidu 148) dans le gène PNPLA3 (patatin-like phospholipase domain containing 3), qui code pour l'adiponutrine, une enzyme présente dans les gouttelettes lipidiques (GL) et impliquée dans l'hydrolyse des TG. La présence de ce variant est suffisante pour induire une stéatose et implique une activité d'hydrolyse altérée entraînant la rétention des TG et des

goutelettes lipidiques dans les hépatocytes (BasuRay et al., 2019). Ainsi, ce variant a été montré comme étant le plus fortement associé à l'accumulation de graisse hépatique, à la NASH (Romeo et al., 2008), mais également au développement de fibrose hépatique, de cirrhose et de CHC (Xu et al. 2015).

Un autre gène dont le polymorphisme a été associé aux NAFLD est le gène TM6SF2 (transmembrane 6 superfamily 2), impliqué dans la sécrétion des VLDL et le transport des TG (Longo et al., 2021a). La perte de fonction due à ce variant (rs58542926, C>T au résidu 167) a été associée à une accumulation accrue de TG et une diminution de sécrétion des VLDL. La présence de ce variant a été associée à la stéatose, l'inflammation et également à l'augmentation du risque de fibrose (Perumpail et al., 2017).

D'autres variants génétiques ont été mis en évidence et bien décrits comme des variants du gène GCKR (lié à une augmentation de la glycolyse et de la LDN), du gène LYPLAL1 (lié au catabolisme des TG), ou encore du gène MBOAT7 (lié au remodelage des phospholipides membranaires) dont la présence prédispose au développement des NAFLD (Del Campo et al., 2018; Eslam et al., 2018; Jonas and Schürmann, 2020; Juanola et al., 2021).

3.Facteurs ethniques, âge, sexe

D'autres facteurs tels que les origines ethniques, l'âge et le sexe influencent également le risque de développer des NAFLD.

La prévalence des NAFLD est décrite comme étant plus élevée dans la population hispanique (45-58%) et la plus faible dans la population afro-américaine (24-35%) (Bonacini et al., 2021; Younossi, 2019). Des facteurs culturels et socio-économiques peuvent être impliqués dans ces différences notamment concernant les habitudes alimentaires et d'activité physique, ainsi que l'accès aux soins. Des variations génétiques sont également décrites, comme le variant au gène PNPLA3, détaillé précédemment, qui est détecté en plus forte proportion dans la population hispanique (49%) et en plus faible proportion dans la population afro-américaine (17%) (Bonacini et al., 2021).

La prévalence des NAFLD et de la NASH est décrite comme étant plus élevée chez les hommes (20-41%) que chez les femmes (13-23%) (Lonardo et al., 2019; Perumpail et al., 2017). Cette différence pourrait être expliquée par des différences de distribution de graisses dans le corps et l'influence des hormones stéroïdiennes (Ballestri et al., 2017). En effet, il a été décrit que les femmes présentaient un risque réduit de NAFLD pendant leur période de reproduction et qu'elles perdaient cet effet protecteur après la ménopause pour retrouver une prévalence comparable à celle des hommes. Cela pourrait notamment s'expliquer par des effets protecteurs des œstrogènes sur la voie de synthèse des lipides chez les femmes (DiStefano, 2020).

Enfin, la prévalence des NAFLD et sa sévérité augmentent avec l'âge, atteignant un pic entre 50 et 60 ans pour les hommes et après 60 ans pour les femmes (Perumpail et al., 2017). Les personnes âgées semblent avoir une prévalence de la NASH et un degré de fibrose plus élevé, qui pourrait dépendre d'une activité moindre des métalloprotéinases matricielles, entraînant une

augmentation de dépôt de collagène dans la matrice extracellulaire. De plus, l'âge avancé serait également associé à une susceptibilité accrue au stress oxydant, ainsi qu'à des modifications du système immunitaire prédisposant à des formes plus sévères de la maladie (Marchisello et al., 2019).

Une des inquiétudes majeures concerne l'augmentation de la prévalence des NAFLD dans la population pédiatrique. Selon des données épidémiologiques, la NAFLD représente la maladie hépatique la plus courante chez les enfants et les adolescents, affectant entre 3 à 10% de cette population. Cette prévalence est corrélée à l'augmentation de l'obésité infantile, qui reste le principal facteur de risque, puisque la prévalence des NAFLD peut atteindre 70% chez les enfants souffrant d'obésité (Berardis et Sokal 2014; Anderson et al. 2015; Younossi et al. 2016). De plus, cette incidence reste également préoccupante du fait que la NAFLD prédispose à des phénotypes plus agressifs de la maladie et au développement de stades plus avancés à l'âge adulte (cirrhose et HCC) (Mann et al., 2018; Vittorio and Lavine, 2020).

4. Alimentation

Au cours des dernières décennies, des changements des habitudes alimentaires sont apparus (consommation accrue de glucides, de sucres raffinés, d'additifs). En combinaison avec une diminution de l'activité physique, ils entraînent un déséquilibre entre la consommation d'énergie et les dépenses énergétiques et contribuent à l'augmentation de la prévalence de l'obésité. En raison du très fort lien existant entre l'obésité et le développement de NAFLD, il a été démontré que la composition du régime alimentaire (fructose, cholestérol, AG saturés, AG polyinsaturés $\omega 6$) et sa teneur en calories contribuaient de manière équivalente à l'épidémie des NAFLD (Sullivan, 2010). En plus d'être des facteurs de prédisposition au développement de NAFLD, les régimes riches en graisses sont également associés à une augmentation de la sévérité de la maladie. Cependant, plus que la consommation de matières grasses, il semble que les glucides soient les principaux facteurs responsables de la NAFLD, puisqu'ils fourniraient de l'acétyl-CoA pour la lipogenèse *de novo* et le squelette de glycérol pour la formation de TG (Marchisello et al., 2019).

5. Contaminants environnementaux et médicaments

La stéatose hépatique est rapportée dans différentes maladies hépatiques et peut être causée par différents facteurs de risques : l'alcool (causant la maladie alcoolique du foie – ALD/ASH), l'alimentation (causant la maladie non alcoolique du foie gras – NAFLD/NASH), les médicaments (causant les dommages hépatiques induits par les drogues -DILI). Bien que les mécanismes de la maladie puissent varier selon le type d'exposition, la pathologie hépatique qui en résulte est indiscernable d'une étiologie à l'autre.

Récemment l'exposition aux toxiques environnementaux, auxquels l'homme est exposé quotidiennement, est apparue comme étant un nouveau facteur de risque pour le développement de NAFLD. En effet de nombreux polluants ont été décrits pour induire le développement de

stéatose hépatique, de NASH, de mort cellulaire, d'inflammation ou de fibrose (Guardiola et al., 2016; Wahlang et al., 2013). Ces maladies du foie associées aux toxiques ont fait intervenir le concept plus récent de TAFLD et TASH ("Toxicant Associated Fatty Liver Disease", "Toxicant Associated Steatohepatitis"). Cette notion sera développée ultérieurement plus en détails dans le « Chapitre 2 : Les perturbateurs endocriniens et TAFLD ».

iv. Traitements des NAFLD

a. Changement des habitudes de vies

La base du traitement de la NAFLD repose tout d'abord sur des améliorations hygiéno-diététiques. De ce fait, il est possible de prévenir l'aggravation de la maladie en appliquant des mesures de prévention telle que la restriction calorique couplée à une activité physique régulière, visant à une perte de poids (EASL, guidelines, 2017). Une étude a mis en évidence que l'amplitude de la perte de poids était étroitement liée à l'amélioration des lésions histologiques. En effet, une perte de poids de 7 à 10% permettait de résorber la NASH et de réduire la fibrose (Musso et al., 2012; Vilar-Gomez et al., 2015). C'est pourquoi le diagnostic des NAFLD à des stades précoces est d'une importance particulière.

La chirurgie bariatrique peut mener à une résolution de la NASH chez les patients ainsi qu'à une amélioration progressive de la fibrose hépatique à plus long terme (Lassailly et al., 2015). Mais cette intervention n'est indiquée que chez les patients à fort IMC associé à au moins une comorbidité susceptible d'être améliorée après la chirurgie.

b. Traitements médicamenteux

Cependant lorsque la perte de poids est peu efficace ou non recommandée (dans les cas de stade avancé de la NASH avec présence de fibrose), les traitements médicamenteux peuvent être envisagés. L'objectif d'un tel traitement est d'améliorer le pronostic, c'est-à-dire de diminuer la mortalité liée à la NASH et de réduire la progression vers la cirrhose et le CHC. Actuellement, même si aucune molécule pharmaceutique n'est approuvée dans le traitement des NAFLD, plusieurs essais thérapeutiques avancés de phase III sont en cours d'évaluation dans la NASH (Lanthier, 2020; Perazzo and Dufour, 2017).

Certains traitements consistent à traiter l'hyperglycémie (la metformine), l'hypertriglycémie (les fibrates - agonistes de PPAR α) ou l'hypercholestérolémie (les statines) mais n'ont pas d'impact sur la NASH. D'autres traitements ciblent des facteurs impliqués dans l'évolution de la NASH, comme le stress oxydant ou l'insulino-résistance. C'est le cas de la vitamine E, antioxydant, qui se montre efficace sur la stéatose et l'inflammation mais pas sur la fibrose (Abdel-Maboud et al., 2020; Hadi et al., 2018; Sanyal et al., 2010) et des thiazolidinediones, activateurs du récepteur nucléaire PPAR γ qui améliorent la résistance à l'insuline et réduisent la stéatose, le ballonnement

des hépatocytes et l'activité inflammatoire dans la NASH (Musso et al., 2012; Sanyal et al., 2010; Singh et al., 2015).

Dernièrement les résultats les plus avancés concernent l'utilisation de l'acide obéticholique (agoniste du récepteur nucléaire FXR), un inhibiteur de la synthèse d'acides biliaires endogènes et de la lipogenèse, qui a notamment confirmé une régression de la stéatose, de l'inflammation et de la fibrose hépatique (Neuschwander-Tetri et al. 2015; Younossi, Ratziu, et al. 2019; Guirguis et al. 2021). Une étude de phase 3 est également en cours sur le lanifibranor, un agoniste des 3 isoformes du récepteur PPAR, montrant une amélioration de la stéatohépatite et de la fibrose (Lefere et al., 2020). Des essais de phase 3 sont également en cours sur l'aramchol, un conjugué d'acide arachidonique et cholique inhibant la stéroyl-CoA désaturase-1 (SCD1) impliquée dans la lipogenèse *de novo* des acides gras mono-insaturés. (Guirguis et al., 2021; Lanthier, 2020). Cette molécule a amélioré la stéatohépatite et la fibrose chez les rongeurs et réduit la stéatose dans un essai clinique précoce. Les résultats de la phase 2b, publiée en 2021, rapportent une réduction de la stéatose hépatique associée à une résolution de la NASH avec amélioration de la fibrose (Ratziu et al., 2021).

III. Mécanismes et pathogénèse des NAFLD

La pathogénèse des NAFLD est qualifiée de multifactorielle et complexe. Comme décrit plus haut, de nombreux facteurs génétiques, métaboliques et environnementaux coopèrent pour favoriser la stéatose et/ou la progression vers la NASH. Ce processus fait intervenir des perturbations métaboliques, telles que, des altérations du métabolisme glucido-lipidique, une insulino-résistance, une lipotoxicité, une augmentation du stress oxydant, un stress du réticulum endoplasmique, une libération de cytokines pro-inflammatoires, ou des effets pro-fibrosants (Bence and Birnbaum, 2020; Buzzetti et al., 2016; Friedman et al., 2018). Dernièrement il a été proposé que l'exposition aux contaminants environnementaux, pourraient à la fois contribuer au développement de la stéatose mais également permettre la progression des NAFLD. En interagissant directement avec les récepteurs nucléaires, ils seraient à l'origine des perturbations métaboliques citées précédemment (Armstrong and Guo, 2019; Wahlang et al., 2019).

i. La stéatose :

La caractéristique principale de la stéatose hépatique est l'accumulation de TG sous forme de GL dans les hépatocytes résultant d'un déséquilibre entre les processus d'« influx » (absorption/production) et d'« efflux » (sécrétion/utilisation) des acides gras (AG). L'origine de cette augmentation de lipides fait intervenir 4 voies principales, qui peuvent être interconnectées (Figure 8) (Foulds et al., 2017; Ipsen et al., 2018; Kawano and Cohen, 2013):

- (1) l'augmentation des capacités hépatiques d'absorption des AG par l'afflux massif d'AG libres dans le foie provenant de la lipolyse du tissu adipeux ou d'une alimentation riche en graisse ;
- (2) l'augmentation de la lipogénèse *de novo* (LDN) synthétisant des AG à partir du glucose qui peut être favorisée par l'hyperglycémie et un contexte d'insulino-résistance ;
- (3) une réduction ou une saturation de la β -oxydation des AG ;
- (4) des perturbations dans l'export des TG hépatiques *via* les VLDL.

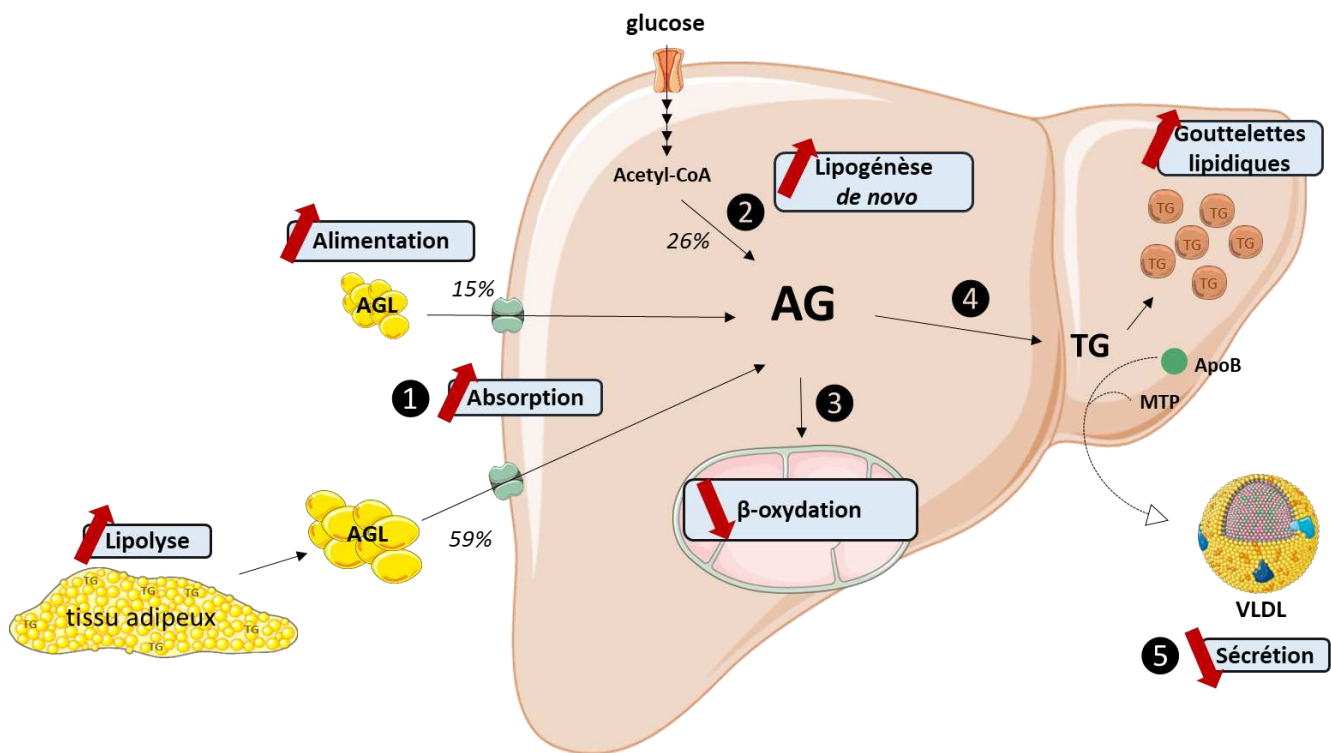


Figure 8 : Modifications métaboliques à l'origine du développement de la stéatose hépatique. La stéatose hépatique peut-être caractérisée : par une augmentation des capacités hépatiques d'absorption des acides gras libres (AGL) provenant de la lipolyse du tissu adipeux ou de l'alimentation (1) ; par l'augmentation de la lipogénèse de novo (2) ; par la synthèse des triglycérides (TG) qui s'accumulent dans les gouttelettes lipidiques (3) ; par une réduction et/ou une saturation de la β -oxydation (4) ou par une perturbation de l'export des TG via les very low density lipoprotein (VLDL) (5). Dans les NAFLD, il est estimé que 59% des AG hépatiques proviennent de la lipolyse du tissu adipeux, 26% de la LDN et 15% de l'alimentation.

a. Augmentation des capacités d'absorption des AG hépatiques par afflux d'AG exogènes

Des études démontrent que 74% des AG hépatiques proviendraient de source exogène, en particulier de la lipolyse du tissu adipeux (59%) et des AG alimentaires (15%) (Donnelly et al., 2005). En effet, les sujets atteints de NAFLD présentent une lipolyse importante du tissu adipeux et un fort taux d'AG libres plasmatiques. Ces AG peuvent être captés par le foie *via* la veine porte et participent au développement de la stéatose. Cette arrivée massive d'AG au niveau du foie est corrélée à l'augmentation des capacités d'absorption (Miquilena-Colina et al., 2011; Perla et al., 2017).

1. AG exogènes provenant de la lipolyse du tissu adipeux

La NAFLD comme décrit précédemment est fortement associée à l'obésité. Cette dernière est caractérisée par une augmentation de stockage des lipides sous forme de TG dans les adipocytes, responsable d'une hypertrophie (augmentation de la taille des adipocytes), ainsi que d'une hyperplasie du tissu adipeux (augmentation du nombre des adipocytes) (Parker, 2018). Cette augmentation du volume adipocytaire induit l'infiltration de macrophages pro-inflammatoires de type M1, à l'origine d'une inflammation du tissu adipeux (Weisberg et al., 2003). En cas de surcharge en AG, la mort des adipocytes est également observée, entraînant le recrutement de macrophages supplémentaires pour les phagocyter (Strissel et al., 2007) (Figure 9).

Ce recrutement de macrophages pro-inflammatoires au sein du tissu adipeux entraîne une augmentation de la production de molécules pro-inflammatoires appelées adipokines comme le TNF α (Tumor Necrosis Factor α), l'IL6 (Interleukine 6), la leptine, ou encore la chimiokine MCP-1 (Monocyte Chimio-attractant Protein-1). A l'inverse, une diminution d'adiponectine anti-inflammatoire est observée (Qureshi and Abrams, 2007; Tilg, 2010). Le profil inflammatoire du tissu adipeux a notamment été associé à la lipolyse des adipocytes chez l'homme et corrélé au développement et à la sévérité des NAFLD chez l'homme (du Plessis et al., 2015; Michaud et al., 2014). De ce fait, le TNF α est spécifiquement impliqué dans la lipolyse en induisant la phosphorylation des périlipines présentes à la surface des GL. Ainsi, les TG, qui ne sont plus protégés au sein des GL, peuvent alors être hydrolysés en AG libres par l'hormone sensitive lipase (HSL) et l'ATGL (Langin and Arner, 2006). Il existe une relation directe entre le flux d'AG provenant de la lipolyse du tissu adipeux et le degré de stéatose hépatique (Friedman et al., 2018; Koo, 2013). Les AG ainsi libérés massivement par cette lipolyse se retrouvent dans la circulation générale et peuvent être captés par le foie et participer à la synthèse de TG et au développement de la stéatose hépatique. Il est à noter que, dans ce contexte, la lipolyse peut être exacerbée par le développement d'une résistance à l'insuline. Du fait de l'hypertrophie des adipocytes, ils ne sont alors plus en mesure de répondre correctement à la signalisation de l'insuline, qui régule et inhibe, en temps normal l'activité de l'ATGL et de la HSL (Guilherme et al., 2008; Lomonaco et al., 2012).

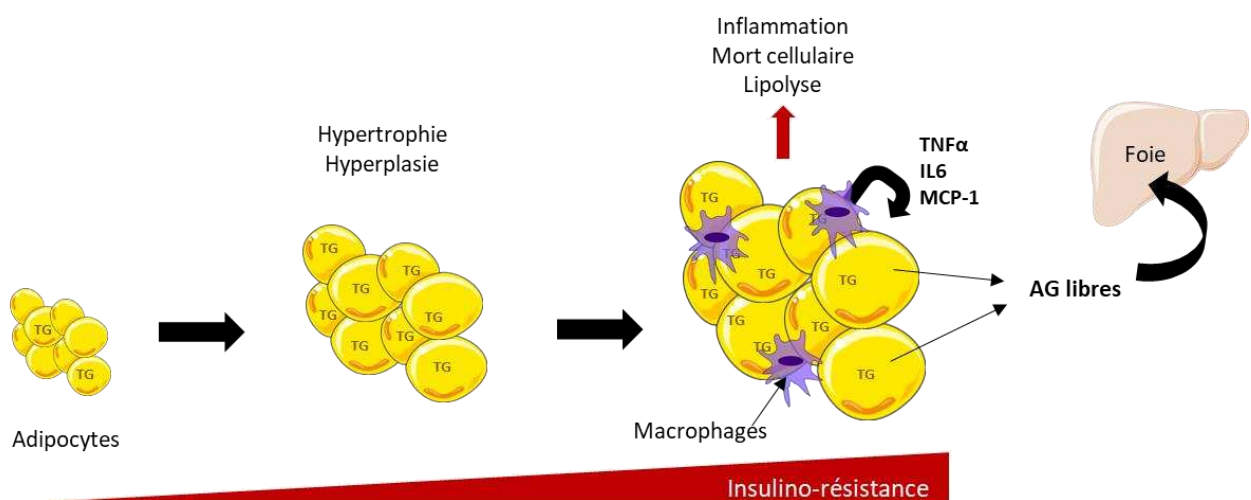


Figure 9 : Altérations du tissu adipeux à l'origine d'une augmentation de la lipolyse (adapté de Sun et al., 2011).

2. AG exogènes provenant de l'alimentation

L'alimentation et les lipides qu'elle contient sont également impliqués dans le développement des NAFLD, puisqu'il est estimé que, 15% des AG hépatiques totaux proviendraient de l'alimentation (Donnelly et al., 2005). Ainsi, l'alimentation riche en graisse peut augmenter l'apport d'AG exogènes et, de ce fait, constitue une source pour la synthèse de TG hépatiques et le développement de la stéatose.

Ces lipides alimentaires, suite à la digestion et absorption par les entérocytes, sont libérés dans la circulation sous forme de chylomicrons (lipoprotéines riches en TG), pour être distribués au tissu adipeux et aux muscles (Liu et al., 2016). Environ 80% des TG contenus dans les chylomicrons sont hydrolysés en AG libres et absorbés par le tissu adipeux et les muscles. Les 20% restants des TG présents dans les chylomicrons dits « remanents » sont dirigés vers le foie.

D'une part, ces lipoprotéines peuvent être dégradées par la lipoprotéine lipase plasmatique (LPL). La LPL, activée par l'insuline, est responsable de l'hydrolyse des TG et de la libération des AG libres. Ces AG présents dans la circulation se fixent à l'albumine et sont ensuite absorbés par les cellules hépatiques. Au niveau pathologique, il a été montré que des souris sur-exprimant la LPL au niveau hépatique développaient une stéatose et une insulino-résistance hépatique (Kim et al., 2001). Cette augmentation du taux de LPL a également été démontrée chez les patients atteints de NAFLD (Ahn et al., 2011; Pardina et al., 2009).

D'autre part, ces chylomicrons peuvent également arriver au foie et être directement internalisés par endocytose *via* le récepteur LRP (*Low-density lipoprotein receptor-related protein*). Les lipases hépatiques prennent en charge la dégradation des TG en AG et en glycérol, qui peuvent servir ensuite à la synthèse de nouveaux TG (Alves-Bezerra and Cohen, 2017; Miksztowicz et al., 2012).

3. Elévation des capacités d'absorption suite à l'afflux d'AG exogènes

L'absorption par le foie des AG circulants dépend de ses capacités de transport, qui sont décrites comme étant augmentées dans la NAFLD (Perla et al., 2017). Il existe 4 grandes familles de protéines impliquées :

(1) Les "*fatty acid transporters proteins*" (FATPs), membranaires, qui régulent l'entrée des AG à chaîne longue et à chaîne très longue¹ (Alves-Bezerra and Cohen, 2017). Parmi les FATPs, le FATP2 et FATP5 sont principalement hépatiques et impliquées dans le développement de la stéatose (Alves-Bezerra and Cohen, 2017; Doege et al., 2006; Falcon et al., 2010). Dans les hépatocytes de souris, l'inactivation de FATP2 ou la suppression génétique de FATP5 diminuent de manière significative les taux d'absorption des AG (Kawano and Cohen, 2013).

¹ Les AG sont des acides carboxyliques avec une chaîne carbonée variable comptant de 4 à plusieurs dizaines d'atomes de carbone. On les classe en fonction de leur nature (saturation vs insaturation) et de la longueur de celle-ci : les AG à chaîne courte (AGCC) ont une chaîne de 2 à 4 carbones, les AG à chaîne moyenne (AGCM) ont une chaîne de 6 à 12 carbones, les AG à chaîne longue (AGCL) ont une chaîne de 12 à 18 carbones, les AG à chaîne très longue (AGCC) ont une chaîne supérieure à 20 carbones.

(2) Les “*fatty acid translocases*” (FAT/CD36) facilitent le transport des AG à chaîne longue. Cette protéine transmembranaire est physiologiquement peu exprimée dans le foie, mais l’augmentation de son expression a été directement impliquée dans le développement de la stéatose hépatique, et positivement corrélée au contenu en TG (Greco et al., 2008; Wilson et al., 2016). Il est suggéré que la translocation de la protéine CD36 du cytoplasme à la membrane serait un évènement déclencheur dans la progression de la NAFLD (Miquilena-Colina et al., 2011). L’expression de *CD36* est fortement inductible dans le foie en cas de surcharge lipidique ou d’activation de récepteurs nucléaires tels que PPAR γ , PPAR α , LXR et PXR, AhR (qui seront décrits plus en détail dans la suite de ce manuscrit) (Alves-Bezerra and Cohen, 2017; Rada et al., 2020). Cependant, un rôle potentiel de CD36 dans la régulation de la sécrétion hépatique des VLDL a aussi été proposé. La délétion de *CD36* chez les souris obèses exacerberait la stéatose hépatique principalement en diminuant la sécrétion hépatique des VLDL (Nassir *et al.*, 2013), témoignant de l’interconnexion entre les différentes voies impliquées dans la stéatose.

(3) Les cavéolines sont des protéines localisées au niveau de microdomaines membranaires appelés cavéoles, qui contribuent au trafic des lipides et à la formation des GL (Koo, 2013). Il a été rapporté que la cavéoline 1 était augmentée dans le foie des souris atteintes de NAFLD, principalement localisée dans la zone centro-lobulaire, là où la stéatose était la plus sévère (Qiu et al., 2013). Cependant le rôle des cavéolines est questionné dans la pathogénèse des NAFLD, puisque d’autres études ont montré une diminution de l’expression de la cavéoline dans différents modèles suggérant un rôle protecteur dans l’accumulation de lipides hépatiques (Li et al., 2017).

(4) Les “*fatty acid binding proteins*” (FABPs) agissent dans le transport intracellulaire des AG hydrophobes. FABP1 et FABP5 sont les isoformes prédominantes dans le foie ; elles facilitent le transport, le stockage et l’utilisation des AG. Elles jouent également un rôle protecteur en liant les AG libres cytotoxiques et en facilitant leur oxydation ou incorporation dans les TG (Wang et al., 2015). Chez les patients atteints de NAFLD, les taux hépatiques de FABP1, FABP4 et FABP5 sont augmentés et ceux de FABP4 et 5 sont corrélés au pourcentage de graisse hépatique (Ipsen et al., 2018).

b. Augmentation de la lipogenèse *de novo*

La lipogenèse *de novo* (LDN) est une source importante d’AG dans le contexte de la stéatose hépatique, puisqu’il est estimé que 26% des AG hépatiques proviennent de la LDN (contre 5% chez un sujet sain) et plusieurs études ont montré une augmentation de son activité hépatique chez les personnes atteintes de NAFLD (Arab et al., 2018; Donnelly et al., 2005; Lambert et al., 2014).

1. La lipogenèse *de novo*

La LDN est la voie métabolique qui permet la synthèse des AG à partir d’acétyl-CoA provenant de la glycolyse (Figure 10). Fourni par le cycle de Krebs, l’acétyl-CoA est carboxylé par l’acétyl-CoA carboxylase (ACC) pour former le malonyl-CoA. Il existe deux isoformes de l’ACC : ACC1

cytosolique et ACC2 mitochondriale, qui produisent deux pools distincts de malonyl-CoA destinés respectivement à la voie de la LDN ou à l'inhibition de la β -oxydation (Abu-Elheiga et al., 2005, 2000; Goedeke et al., 2018). Par la suite, le malonyl-CoA et le NADPH sont utilisés comme précurseurs pour la formation de palmitate (acide gras saturé à 16 carbones - C16 :0) par la fatty acid synthase (FAS). Le palmitate peut alors subir des réactions d'élongations par les enzymes fatty acid elongase (ELOVL) afin de générer des acides gras à chaîne longue comme l'acide stéarique (C18 :0). Les acides gras saturés peuvent également subir des réactions de désaturation par les stearoyl-CoA-desaturase (SCD) et les fatty acid desaturase (FADS), pour former des acides gras insaturés (AGI) comme l'acide oléique ou l'acide palmitoléique. L'enzyme désaturase SCD1, principalement exprimée au niveau hépatique, joue également un rôle clé, puisque sa déplétion chez la souris entraîne la réversion de la stéatose hépatique en diminuant la lipogenèse et augmentant la β -oxydation des AG (Jiang et al., 2005).

L'ensemble des AG nouvellement formés peut ensuite être stocké sous forme de triglycérides (TG) ou d'esters de cholestérol (EC) et incorporés dans des gouttelettes lipidiques pour constituer une réserve d'énergie ; ou être exportés en dehors de la cellule par les VLDL et fournir de l'énergie aux organes extra-hépatiques. Les AG peuvent également être utilisés pour la synthèse d'autres lipides comme les phospholipides, qui sont les composants essentiels des membranes cellulaires, ainsi que de la couche externe entourant les gouttelettes lipidiques et les VLDL (Rui, 2014).

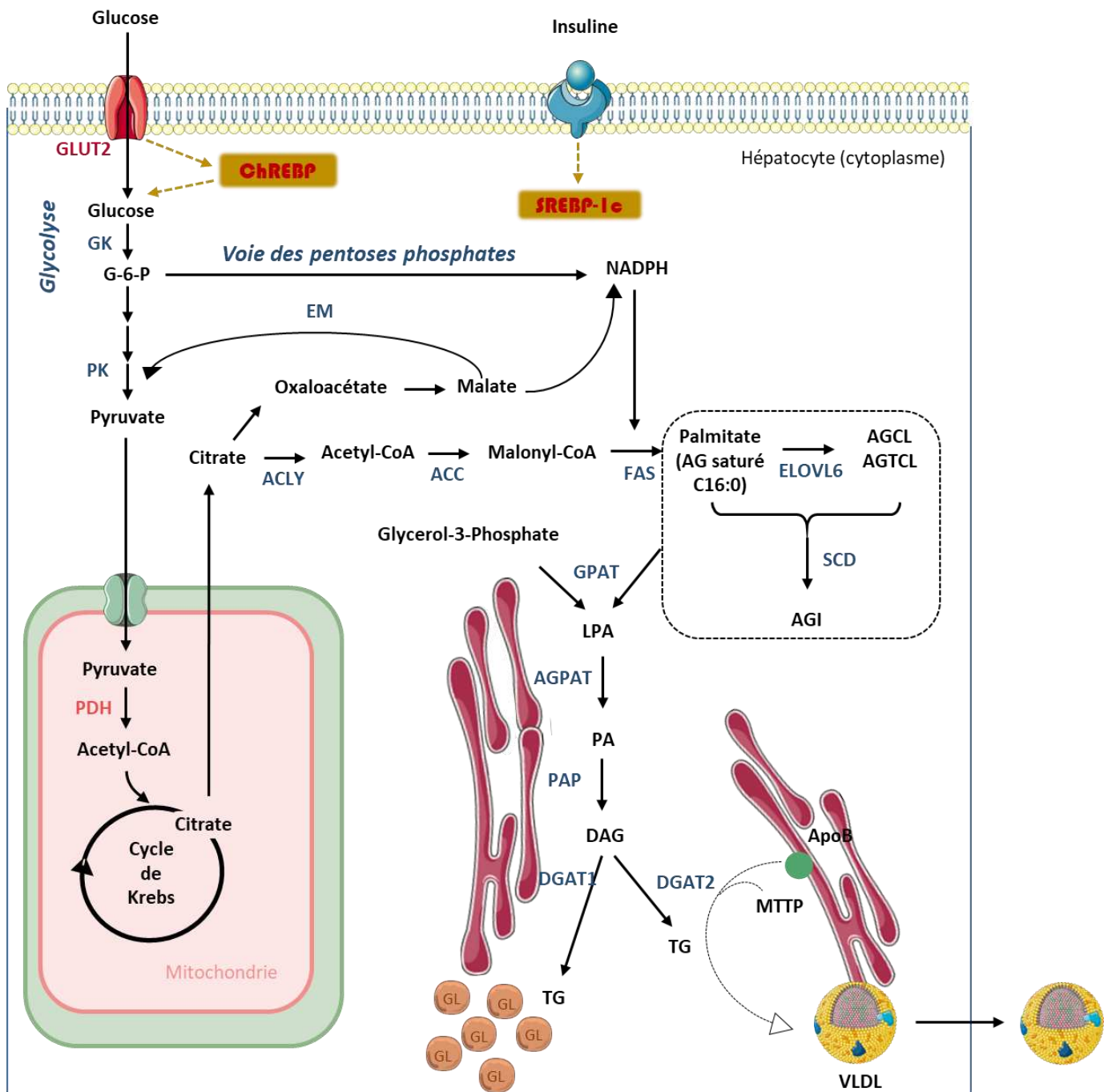


Figure 10 : Schéma de la lipogénèse *de novo* et de la synthèse des triglycérides.

Le glucose absorbé par la cellule est converti en pyruvate par la glycolyse. Celui-ci est ensuite converti en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase (PDH) dans la mitochondrie et entre dans le cycle de Krebs. L'acétyl-CoA converti en citrate qui peut sortir de la mitochondrie et servir de substrat pour les enzymes lipogéniques. Les enzymes impliquées dans la synthèse des AG saturés (AGS) ou insaturés (AGI) comprennent l'ATP-citrate lyase (ACLY), l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), fatty acid synthase (FAS), elongase of long chain fatty acids family 6 (ELOV6) et la stéroyl-CoA désaturase (SCD). Le NADPH utilisé pour la synthèse des AG provient de la voie des pentoses phosphates et de l'enzyme malique (EM). Les enzymes impliquées dans la synthèse des triglycérides (TG) comprennent la glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT), 1-acylglycérol-3-phosphate acyltransférase (AGPAT), phosphatidate phosphatase (PAP) et diacylglycérol acyltransférase (DGAT). Les TG en excès peuvent être stockés au sein des gouttelettes lipidiques (GL) ou être sécrétés dans la circulation sanguine sous forme de Very Low Density Lipoprotein (VLDL) (Adapté de (Rui, 2014; Wang et al., 2015))

2. Régulation de la lipogénèse *de novo* dans la stéatose

La LDN est principalement régulée par le glucose et l'insuline, faisant intervenir deux facteurs de transcriptions clés : SREBP-1c (*sterol regulatory element binding protein 1c*) et ChREBP (*carbohydrate response element-binding protein*).

SREBP-1c stimule la transcription de la plupart des gènes hépatiques impliqués dans la LDN (*FAS*, *ACC*, *ELOVL6*, *SCD1*) en réponse à des taux d'insuline élevé et à une alimentation riche en glucides (Bideyan et al., 2021; Ipsen et al., 2018). L'expression de SREBP1c est augmentée chez les patients atteints de NAFLD et, en accord avec son rôle lipogénique, les taux de TG hépatiques sont plus élevés chez les souris transgéniques surexprimant *SREBP1c*. En réponse à une activité de SREBP-1c élevée, l'expression des gènes cibles, comme *ACC* et *FAS* a été augmentée chez les patients et les animaux modèles atteints de NAFLD (Ipsen et al., 2018).

Les mécanismes par lesquels l'insuline favoriserait l'activation de SREBP-1c ne sont pas encore totalement compris, mais il est supposé que la protéine kinase C, le récepteur nucléaire LXR et le facteur de transcription C/EBP β seraient nécessaires à son activation (Bideyan et al., 2021; Ferré and Foufelle, 2010; Higuchi et al., 2008). De manière intéressante, dans des conditions d'insulino-résistance telles qu'elles sont décrites dans les NAFLD, des taux élevés de LDN sont observés, suggérant que l'insuline conserve sa capacité à promouvoir la LDN *via* une suractivation de SREBP-1c, tout en étant incapable de supprimer la néoglucogénèse hépatique normalement réduite en présence d'insuline (Sanders and Griffin, 2016).

Par ailleurs, une délétion de *SREBP-1c* favorise l'activation compensatoire de la deuxième isoforme de la famille des SREBPs, le *SREBP-2*, spécifiquement lié au métabolisme du cholestérol. Cela, entraîne donc une augmentation de la synthèse hépatique de cholestérol, liant la LDN au métabolisme du cholestérol (Liang et al., 2002). Enfin, la troisième isoforme *SREBP-1a* est également impliquée dans la stéatose hépatique due principalement à la surproduction d'AG majoritairement et de cholestérol (Shimano et al., 1996).

ChREBP joue un rôle important dans la lipogénèse médiée par le glucose dans le foie. A de faibles concentrations en glucose, ChREBP est maintenu sous forme inactive dans le cytoplasme par la phosphorylation médiée par la protéine kinase A (PKA) (Rui, 2014). A de fortes concentrations, il est régulé positivement par le glucose, qui induit sa déphosphorylation, entraînant alors sa translocation dans le noyau et son activité transcriptionnelle. Tout comme SREBP-1c, ce facteur de transcription entraîne l'expression de différents gènes impliqués dans la LDN (comme *ACC*, *FAS*, *SCD1*, *ELOVL*, *EM*), mais également l'expression de gènes impliqués dans la glycolyse, comme la pyruvate kinase, fournissant ainsi des substrats supplémentaires pour la synthèse d'AG et de TG (Rui, 2014). Dans la stéatose, ChREBP a été montré comme surexprimé et contribue à la pathogénèse en activant la synthèse de TG. Ainsi, une diminution de son expression induit une réduction de la teneur en TG hépatiques spécifiquement par inhibition de la lipogénèse induite par le glucose (Dentin et al., 2006). Une inactivation de *ChREBP* protégerait contre la stéatose induite par le fructose chez des souris, mais augmenterait les lésions histologiques hépatiques en raison d'une augmentation de la synthèse de cholestérol cytotoxique. L'augmentation des niveaux de ChREBP dans la NAFLD pourrait alors, certes augmenter la LDN, mais pourrait aussi constituer

un mécanisme de défense potentiel protégeant le foie contre d'autres lésions et de la progression vers la NASH (Zhang et al., 2017).

Dans un contexte de NAFLD, la réduction de l'un ou l'autre de ces facteurs de transcriptions, dont l'activité est augmentée, améliorerait la stéatose hépatique, soulignant leur importance dans la LDN et l'accumulation de TG hépatique (Titchenell et al., 2017). Cependant des études de biopsies hépatiques humaines ont suggéré que l'expression de ChREBP pouvait être diminuée chez les patients atteints de NAFLD et de NASH (Benhamed et al., 2012; Higuchi et al., 2008), plaçant alors SREBP-1c comme le principal régulateur de la LDN dans les NAFLD (Ipsen et al., 2018).

Bien que l'augmentation de la LDN contribue clairement à la stéatose hépatique et/ou à l'hypertriglycéridémie, elle peut également induire la NASH, car les niveaux élevés d'AG saturés produits peuvent entraîner une augmentation des lésions et de l'inflammation des hépatocytes (Deprince et al., 2020; Roumans et al., 2020). Cette notion sera développée dans la suite de ce manuscrit (Chapitre 1 / V. Principale voie non génomique impliquée dans les NAFLD : la lipotoxicité).

c. Saturation des capacités de dégradation des AG *via* la β -oxydation

1. La β -oxydation

L'oxydation des AG est la source principale d'énergie pour le foie. Les AG absorbés (provenant de la lipolyse ou de l'alimentation) ou formés au cours de la LDN peuvent être dégradés par la β -oxydation mitochondriale (Figure 11). La première étape de cette réaction est l'entrée des AG dans la mitochondrie. Les AG à chaîne courte (AGCC) et les AG à chaîne moyenne (AGCM) pénètrent librement dans les mitochondries et sont activés par l'ACS (acyl-CoA synthase) en acyl-CoA dans la matrice mitochondriale. L'entrée des AG à chaîne longue (AGCL) est plus complexe. Elle débute avec leur conversion en acyl-CoA par l'ACS dans le cytosol. Cet acyl-CoA peut ensuite entrer dans l'espace intermembranaire grâce à la carnitine acyltransférase I (CPT1), enzyme de la membrane externe mitochondriale. L'acyl-CoA est complexé à la carnitine par la carnitine-acylcarnitine translocase (CACT), ce qui permet sa translocation à travers la membrane interne mitochondriale. Enfin, dans la matrice, la CPT2 permet de régénérer l'acyl-CoA (Fromenty, 2019). Au sein de la matrice mitochondriale, chaque AG subit quatre réactions séquentielles, qui génèrent une molécule d'acétyl-CoA et un AG raccourci. La première étape de l'oxydation est catalysée par des déshydrogénases différentes, spécifiques de la longueur de la chaîne des acyl-CoA : SCAD (*Short-chain acyl-CoA dehydrogenase*), MCAD (*Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase*), LCAD (*Long-chain acyl-CoA dehydrogenase*), VLCAD (*Very Long-chain acyl-CoA dehydrogenase*). Les étapes suivantes sont catalysées par la 2-énoyl-CoA hydratase, la 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase et la 3-oxoacyl-CoA thiolase. Le cycle de β -oxydation est ainsi répété pour raccourcir les AG en plusieurs sous-unités d'acétyl-CoA (Houten et al., 2016). Ces acétyl-CoA peuvent entrer dans le cycle de Krebs pour générer de l'ATP *via* la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie. Une part significative est utilisée pour générer des corps cétoniques comme l'acétoacétate, l'acétone et le β -hydroxybutarate qui sont par la suite relargués

dans la circulation sanguine pour être utilisés par les tissus extra-hépatiques comme source d'énergie (Begrache et al., 2013). Il est à noter que les AG à chaîne très longue ne semblent pas être métabolisés dans la mitochondrie et sont plutôt oxydés dans les peroxysomes par un processus similaire (Houten et al., 2020).

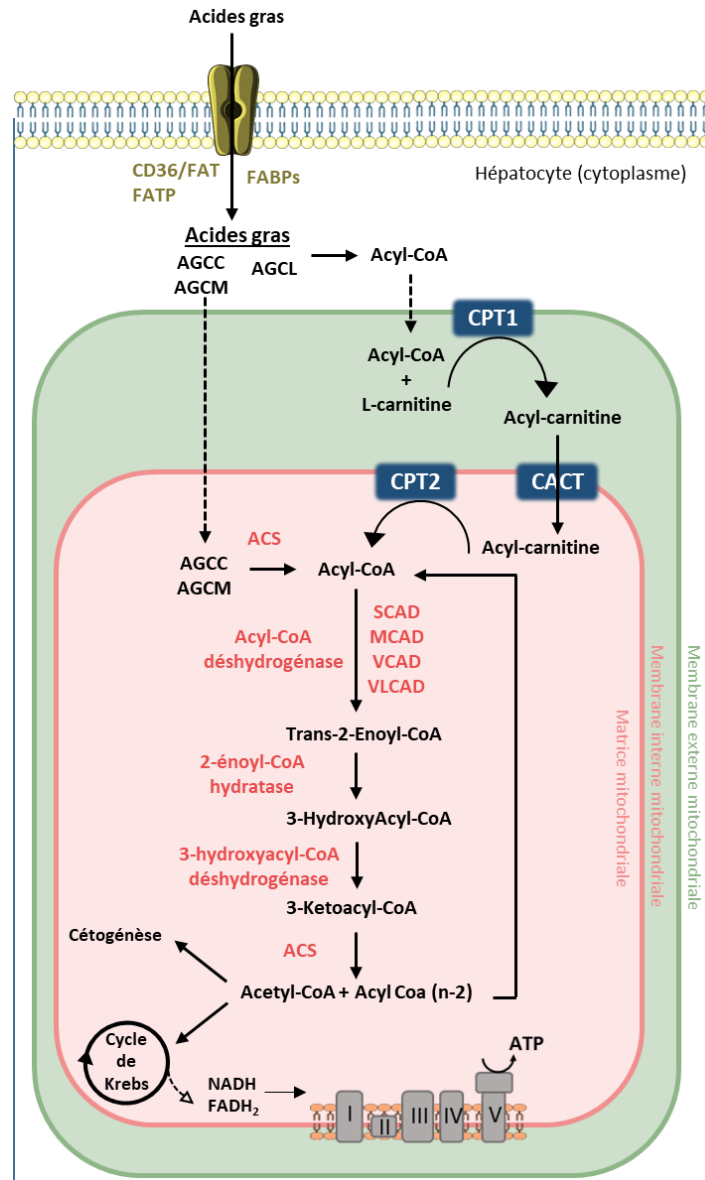


Figure 11 : Schéma de la β -oxydation mitochondriale des AG.

Le transport des AG à travers la membrane plasmique est assuré par différents transporteurs tels que CD36/FAT et les FATPs. Alors que les AG à chaîne courte (AGCC) et moyennes (AGCM) diffusent à travers la membrane mitochondriale, les AG à chaîne longue (AGCL) sont activées en acyl-CoA par l'acyl-CoA synthétase (ACS). La CPT1 convertit l'acyl-CoA en Acyl-carnitine qui peut être transporté à travers la membrane mitochondriale par la CACT. La CPT2 resynthétise l'acyl-CoA dans la matrice mitochondriale. Les acyl-CoAs sont ensuite métabolisés par des réactions successives par différentes enzymes selon la taille des acyl-CoA. Durant ces étapes, un acétyl-CoA et un acyl-CoA raccourci de deux carbones sont générés. L'acétyl-CoA peut ensuite entrer dans le cycle de Krebs ce qui permet d'alimenter la chaîne respiratoire en donneurs d'électrons pour former de l'ATP ; ou entrer dans la voie de la cétogénèse.

2. Altération de la β -oxydation dans la stéatose hépatique

Dans les NAFLD, l'altération de la β -oxydation a été démontrée dans de nombreuses études. Dans un premier temps, pour faire face à l'augmentation du taux d'AG hépatiques au cours des premiers stades de NAFLD, une stimulation adaptative « protectrice » de la β -oxydation est observée, chez les personnes atteintes de NAFLD, dans le but de limiter l'accumulation des lipides hépatiques présents en excès (Begrache et al., 2013; Chen et al., 2020; Fromenty and Roden, 2022). Cette suractivation de la β -oxydation est accompagnée de celle du cycle de Krebs, qui stimule l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale pour produire l'ATP. De plus, les AG hépatiques en excès sont, eux-mêmes, capables d'activer le facteur de transcription PPAR α , régulateur clé de l'oxydation des AG, en coopération avec son coactivateur PGC-1 α (PPAR γ coactivator-1 α) (Houten et al., 2016; Montagner et al., 2016). En effet, PPAR α favorise l'expression des gènes cibles intervenant dans l'oxydation des AG (notamment *CPT1*, *LCAD*, *MCAD*, *ACOX*) et prévient de l'accumulation de lipides hépatiques (Ipsen et al., 2018).

Cependant malgré les études suggérant une oxydation améliorée, en présence d'une surcharge en AG, l'augmentation de la β -oxydation n'est pas suffisante pour empêcher l'accumulation d'AG au sein des hépatocytes. En outre, certaines études rapportent une β -oxydation des AG diminuée dans le cadre de la stéatose et de la NASH (Begrache et al., 2013; Fromenty and Roden, 2022; Ipsen et al., 2018). Notamment, la LDN participe à l'altération de la β -oxydation, *via* SREBP-1c qui, en activant les deux isoformes de l'ACC, catalyse non seulement une étape clé de la biosynthèse des AG mais régule également le contrôle négatif de l'oxydation des AG. En effet, l'augmentation de malonyl-CoA généré par l'ACC2 diminue la β -oxydation en inhibant la CPT1, réduisant ainsi l'entrée des acides gras dans les mitochondries, et contribuant donc à l'accumulation d'AG hépatiques (Abu-Elheiga et al., 2000; Qureshi and Abrams, 2007). D'ailleurs, des niveaux réduits de L-carnitine ont été rapportés chez les patients NAFLD, ce qui peut contribuer à une réduction de l'oxydation des AG et à une altération mitochondriale ultérieure (Savic et al., 2020).

Outre les capacités d'oxydation, il semblerait que l'activité de phosphorylation oxydative (OXPHOS, dont l'étape finale est la production d'ATP à partir de la chaîne respiratoire) des mitochondries hépatiques soit augmentée chez les patients atteints de stéatose simple mais réduite dans la NASH, suggérant une diminution de la fonction mitochondriale au cours de la progression de la maladie (Koliaki et al., 2015). De plus, cette augmentation d'activité mitochondriale en premier lieu pourrait favoriser le stress oxydant dans le foie en augmentant la fuite des électrons le long de la chaîne de transport des électrons et ainsi contribuer au développement de la NASH. Tout ceci serait donc cohérent avec des capacités de β -oxydation augmentée lors des premiers stades de NAFLD pour compenser l'accumulation de lipides, suivi d'un épuisement et d'une diminution de celle-ci suite à de nombreuses dysfonctions mitochondriales (Fromenty and Roden, 2022).

d. Altération de l'export des AG *via* les VLDL et accumulation des gouttelettes lipidiques

Dans des conditions physiologiques, les AG hépatiques peuvent être estérifiés sous forme de TG puis stockés au sein des gouttelettes lipidiques (GL), ou être sécrétés dans la circulation sanguine sous forme de particules VLDL pour être acheminés vers les tissus périphériques (comme le muscle squelettique, le muscle cardiaque et le tissu adipeux) (Postic and Girard, 2008). Avec la β -oxydation, l'export des TG sous forme de VLDL est alors le seul moyen de réduire la teneur en lipides hépatiques.

1. Augmentation de la synthèse des TG et formation des GL

Les TG sont synthétisés à partir des AG provenant soit des AG issus de la circulation sanguine (lipolyse du tissu adipeux et/ou alimentation), soit des AG nouvellement synthétisés par la LDN. La première étape de synthèse des TG est catalysée par la GPAT (*glycerol-3-phosphate acyltransferase*) qui va estérifier un AG avec le glycérol-3-phosphate (G3P) issu de la glycolyse pour générer de l'acide lysophosphatidique (LPA). L'ajout d'un deuxième AG au LPA est assuré par l'AGPAT (*1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase*) pour former de l'acide phosphatidique (PA). Celui-ci sert ensuite à la synthèse de diacylglycérol (DAG) par l'action de la PAP (*phosphatidate phosphate-1*). Enfin, la DGAT (*diacylglycerol O-acyltransferase*) catalyse l'étape finale de synthèse par le transfert d'un troisième acyl-CoA sur le DAG pour former le triacylglycérol (TAG) ou triglycéride (TG). Il semblerait que l'isoforme DGAT1 oriente plutôt vers la formation de TG empaquetés dans les VLDL, alors que DGAT2 produise des TG stockés dans les GL (Figure 10) (Alves-Bezerra and Cohen, 2017; Rui, 2014).

En réponse au flux important d'AG et à la production des TG, l'accumulation des GL qui en résulte conduit au développement de la stéatose (Scorletti and Carr, 2022). Les GL sont des organites cellulaires dynamiques de stockage d'énergie. Dans les hépatocytes, les GL ont des diamètres allant de 20 nm jusqu'à 100 μ M dans des conditions stéatosiques (Guo et al., 2009). Elles sont composées d'un noyau hydrophobe de lipides neutres (principalement des TG et des esters de cholestérol en excès) entourés d'une monocouche de phospholipides. Leur biogénèse débute par l'accumulation de lipides neutres entre les bicouches de la membrane du réticulum endoplasmique (RE), entraînant un gonflement puis un bourgeonnement vers le cytoplasme (Jackson, 2019) (Figure 12). Au cours de ce processus, les GL acquièrent un certain nombre de protéines spécifiques à leur surface, comme les périlipines (Plin). Ces protéines agissent comme couche protectrice contre les lipases de l'organisme, qui hydrolysent les TG en AG et glycérol lors de la lipolyse (Itabe et al., 2017; Sztalryd and Brasaemle, 2017). On y trouve également des enzymes impliquées dans la synthèse des lipides (ACC, DGAT), des lipases et des protéines du trafic membranaire (Guo et al., 2009).

Les GL peuvent atteindre des tailles plus grandes par fusion avec d'autres gouttelettes ou par le recrutement d'enzymes spécifiques de la synthèse des TG issues du RE. La biogénèse et la croissance des GL, dépendent notamment de l'activité des enzymes GPAT4 et DGAT1 (Guo et al.,

2008). Par la suite, les GL peuvent être mobilisées pour fournir de l'énergie (par lipolyse des GL puis oxydation des AG) et des lipides pour la synthèse de phospholipides membranaires.

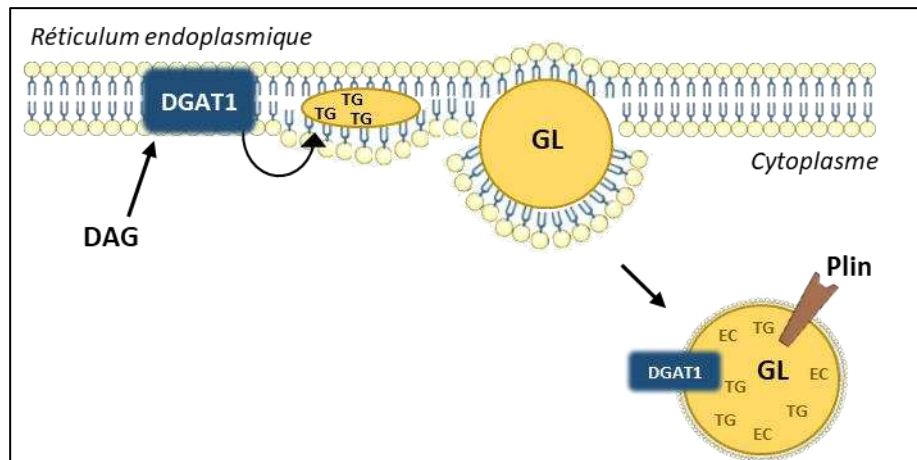


Figure 12 : Biogenèse des gouttelettes lipidiques (GL) à la membrane du réticulum endoplasmique. L'accumulation de lipides neutres, triglycérides et esters de cholestérol entre les bicouches de la membrane du réticulum endoplasmique, lieu de leur synthèse, entraînant un gonflement puis un bourgeonnement vers le cytoplasme. Au cours de ce processus, les GL acquièrent des protéines spécifiques à leur surface, telles que des enzymes de la synthèse des lipides (ACC, DGAT), ou encore des périlipines (protègent les lipides des lipases).

2. Diminution de l'export des TG sous forme de VLDL

L'assemblage des particules de VLDL est initié dans le RE et catalysé par l'enzyme MTTP (*microsomal triglyceride transfer protein*) qui permet d'assembler des TG avec des molécules apolipoprotéines B100 (ApoB100) (Hussain et al., 2003). Une molécule d'apoB100 est associée à chaque particule VLDL et est nécessaire pour l'export des VLDL, faisant de l'apoB100 et de la MTTP des composants clés de la sécrétion hépatique des VLDL et du maintien de l'homéostasie des lipides hépatiques (Berriot-Varoqueaux et al., 2000; Tanoli et al., 2004). Les pré-VLDL formés sont transportés dans l'appareil de Golgi pour être maturés puis libérés par exocytose hors de la cellule dans l'espace de Disse.

La régulation de la capacité d'assemblage des VLDL est médiée par l'insuline qui, en condition physiologique, induit la dégradation de l'ApoB100 par autophagie et régule négativement la synthèse de MTTP *via* l'inhibition du facteur de transcription FoxA2 (Kawano and Cohen, 2013). Cependant, dans les situations de résistance à l'insuline décrite chez les patients NAFLD, l'insuline continue de stimuler la LDN sans inhiber la production de VLDL. D'ailleurs, la surproduction ainsi que la sécrétion de VLDL seraient augmentées dans les cas de NAFLD, corrélées à l'augmentation des TG hépatiques (Adiels et al., 2006; Fabbrini et al., 2008). Une augmentation de synthèse d'apoB et d'activité de la MTTP, est également observée chez les patients atteints de stéatose comparé à des sujets sains (Higuchi et al., 2011). Il a notamment été suggéré que les patients atteints de NAFLD ne sécrètent pas de VLDL supplémentaires, mais plutôt de plus grandes VLDL avec une teneur en TG plus importante. Les très grosses particules de VLDL ne pouvant pas être sécrétées

si leur diamètre dépasse celui des pores endothéliaux sinusoidaux, cette limitation entrainerait donc une rétention lipidique et une NAFLD (Adiels et al., 2006; Fabbrini et al., 2008).

Cependant, alors que l'export des VLDL augmente avec la teneur des TG hépatiques dans la stéatose hépatique, lorsque les taux de TG hépatiques dépassent 10% (au stade de la NASH), la sécrétion semble atteindre un plateau, voire même une diminution, probablement parce que les capacités de sécrétion des VLDL ont été atteintes (Fabbrini et al., 2008; Ipsen et al., 2018). En effet, une étude a mis en évidence qu'une exposition modérée aux AGL entraînait une augmentation de sécrétion d'apoB100, alors qu'une exposition prolongée à une plus grande charge lipidique entraînait un stress du RE et la dégradation post-traductionnelle de l'apoB100, diminuant la sécrétion des TG et aggravant la stéatose (Ota et al., 2008). Ainsi, les taux de synthèse d'ApoB100, de MTP et de VLDL sériques seraient plus faibles chez les patients atteints de NASH que les patients atteints de stéatose, entraînant une diminution de l'export des AG sous forme de VLDL chez ses patients (Charlton et al., 2002; Kawano and Cohen, 2013). Enfin, cette diminution de sécrétion des VLDL entraîne une surcharge de lipides hépatiques contribuant à la stéatose mais également à la lipotoxicité et aux lésions hépatiques favorisant la progression de la maladie (Heeren and Scheja, 2021). Ce processus indique donc que les altérations de l'assemblage et de l'export des VLDL constituent un mécanisme important dans la progression de la stéatose vers la NASH. Enfin, la diminution de sécrétion des VLDL peut également être expliquée par la perte d'hépatocytes fonctionnels.

ii. La stéatohépatite

Les principales caractéristiques de la NASH sont l'inflammation associée à la mort cellulaire des hépatocytes. Ces deux processus forment un cercle vicieux où la mort cellulaire hépatocytaire déclenche l'inflammation et les cellules immunitaires recrutées sécrètent des médiateurs (tels que TRAIL ou Fas) pouvant initier la signalisation apoptotique. Parmi les facteurs initiant ces processus, la lipotoxicité induite par l'accumulation d'AG libres (AGL) et les métabolites dérivés semble jouer un rôle primordial, notamment par l'induction d'un stress cellulaire (stress oxydant et stress du RE), favorisant les lésions hépatocytaires.

a. **L'inflammation**

L'inflammation hépatique est une réponse coordonnée aux dommages tissulaires et cellulaires et peut être provoquée par différents facteurs : l'excès de lipides, un dysfonctionnement mitochondrial (à l'origine du stress oxydant) ou des altérations du microbiome intestinal (par la production de lipopolysaccharide, LPS). En particulier, la lipotoxicité, provoquée par l'accumulation de lipides, contribue fortement et entretient l'environnement inflammatoire en déclenchant un stress hépatocytaire et la mort cellulaire. L'inflammation est ainsi, associée à la progression vers des stades plus avancés des NAFLD, et représente l'une des caractéristiques principales de la NASH (Friedman et al., 2018).

L'inflammation est médiée par un certain nombre de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires telles que le TNF α , l'IL-6 et le CCL-2, dont les niveaux sont augmentés à la fois dans le sérum et dans le foie de patients NASH. Ces médiateurs solubles peuvent être synthétisés par les cellules immunitaires, les hépatocytes ou le tissu adipeux dysfonctionnel (suite à l'infiltration de macrophages M1), et favorisent l'inflammation hépatique dans la NAFLD (Kazankov et al., 2019; Parthasarathy et al., 2020). Par exemple, dans les hépatocytes, l'accumulation d'AGL, comme le palmitate, est capable d'induire un stress du RE, conduisant à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF α (Willy et al., 2015). Il s'en suit un cercle vicieux, puisque le TNF α est capable d'activer les voies de signalisation pro-inflammatoires JNK et NF- κ B, classiquement décrites pour induire l'inflammation dans les NAFLD (Shoelson et al., 2006), augmentant la production de cytokines pro-inflammatoires et aggravant l'inflammation.

De plus, les hépatocytes endommagés, au moment de leur mort, libèrent également des molécules intracellulaires agissant comme des signaux de dangers (DAMP). Ces DAMP sont reconnus par les récepteurs PRR, présents à la surface de diverses cellules immunitaires du foie, comme les cellules de Kupffer ou les cellules étoilées, qui, une fois activées, amplifient l'inflammation (*via* une inflammation des tissus et une cicatrisation excessive) (Mihm, 2018). Les récepteurs de type TLRs sont une autre famille de récepteurs de reconnaissance des DAMPs, impliqués dans la réponse inflammatoire et les lésions hépatiques (Rivera et al., 2007; Seki et al., 2007). Il a été rapporté que les TLRs, comme le TLR2, TLR4 et TLR9, contribuaient à l'activation du système immunitaire innée, et que leurs signalisation étaient associés à l'inflammation dans la NAFLD et la NASH (Li et al., 2011; Miura et al., 2013; Roh and Seki, 2013; Shen et al., 2018). Par exemple, la fixation d'HMGB1 (*High-Mobility Group Box 1*, DAMP relargué par les hépatocytes stressés ou morts) sur le TLR4 à la surface des cellules de Kupffer induit l'activation de la voie NF- κ B et l'expression de l'IL-6 et du TNF α . En outre, HMGB1 peut aussi activer l'inflammasome NLRP3 conduisant à la sécrétion de l'IL1- β (Guicciardi et al., 2013).

Les cellules de Kupffer de type M1 (pro-inflammatoires), jouent également un rôle central dans l'inflammation du foie présente dans la NASH (Kazankov et al., 2019; Wenfeng et al., 2014). Elles sécrètent des médiateurs pro-inflammatoires et contribuent au recrutement de cellules immunitaires et à l'activation de l'inflammasome (Mridha et al., 2017; Parthasarathy et al., 2020). L'inflammasome NLRP3 correspond à un complexe de l'immunité innée qui en réponse à des signaux de dangers (LPS, DAMP, ADN mitochondrial, cytokines pro-inflammatoires) conduit à l'activation d'une caspase inflammatoire, la caspase 1 (Schroder and Tschopp, 2010; Wree et al., 2014b). L'expression des composants de l'inflammasome et l'activation de NLRP3 augmentent au cours de la NASH (Csak et al., 2014; Szabo and Petrasek, 2015; Wree et al., 2014b, 2014a). En conséquence, cela induit la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires favorisant le recrutement de cellules immunitaires comme les monocytes, macrophages ou neutrophiles, contribuant à l'environnement inflammatoire du foie associé à la NAFLD (Pal et al., 2012; Rensen et al., 2009). Notamment, l'infiltration lobulaire de lymphocytes et de macrophages est l'une des caractéristiques histologiques observée dans la NASH (Wolf et al., 2014; Yeh and Brunt, 2014). Enfin, une étude récente a identifié un sous-type de cellules de Kupffer, les KC2, qui serait particulièrement impliqué dans le métabolisme des AG dans l'obésité et le développement de la stéatose hépatique (Blériot et al., 2021).

b. La mort cellulaire

La mort cellulaire est également l'un des événements caractéristiques des stades avancés des NAFLD. Chez les personnes atteintes de NASH, la mort cellulaire est mise en évidence histologiquement par la présence d'hépatocytes « ballonnés », ce ballonnement étant dû à une distribution anormale des filaments intermédiaires induite par le stress oxydant (Liu et al., 2016). La mort cellulaire est directement liée à la lipotoxicité (décrite plus en détail dans la suite de ce chapitre) ainsi qu'à l'apparition de l'inflammation et de la fibrose dans la NASH. Dans cette pathologie, plusieurs types de morts cellulaires peuvent se produire simultanément dans les différentes cellules hépatiques et contribuer aux lésions hépatiques. Si l'apoptose et la nécrose ont été souvent décrites chez les patients atteints de NASH ; la nécroptose, la pyroptose, et la ferroptose ont également été rapportées dans les NAFLD (Tableau 1) (Puengel et al., 2022; Shojaie et al., 2020; Yu et al., 2018).

Tableau 1 : Différents types de mort cellulaire identifiés dans le contexte des NAFLD

Type de mort cellulaire		Mécanisme	Facteurs d'induction	Effet dans la NASH
Apoptose	Mort cellulaire programmée	<p><u>Voie intrinsèque</u> (mitochondriale)</p> <p><u>Voie extrinsèque</u> (médiée par les récepteurs de morts)</p> <p>➔ Activation des caspases effectrices</p> <p>(Feldstein et al., 2003; Peverill et al., 2014)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Accumulation d'AGL dans les hépatocytes - Organites endommagés : mitochondrie (libération de cytochrome c, stress oxydant) ; réticulum endoplasmique (RE) (libération de calcium, stress du RE) 	<ul style="list-style-type: none"> • Activation des cellules étoilées par corps apoptotiques et fragments ADN mitochondriaux ➔ Fibrose (Yu et al., 2018) • Activation cellules de Kupffer (<i>via</i> FasL et TNFR) par corps apoptotiques ➔ Inflammation ➔ Mort des hépatocytes (cercle vicieux) (Canbay et al., 2003; Szondi et al., 2017) • Nécrose secondaire (Guicciardi and Gores, 2010)
Nécrose	Mort cellulaire accidentelle	<p>Rupture de la perméabilité de la membrane plasmique et relargage du contenu cellulaire cytotoxique dans l'espace extracellulaire</p> <p>(Puengel et al., 2022; Shojaie et al., 2020)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Dysfonctions mitochondriales (diminution de l'ATP) - Toxines - Surcharge espèces réactives de l'oxygène (ERO) 	<ul style="list-style-type: none"> • Inflammation • Fibrose (Shen et al., 2012; Shojaie et al., 2020)
Nécroptose	Nécrose régulée	<p>Activation des kinases: RIPK1, RIPK3 et de la pseudo-kinase MLKL</p> <p>(Afonso et al., 2015; Schwabe and Luedde, 2018)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - TNFα - ERO - Voie de signalisation mTOR/Akt 	<ul style="list-style-type: none"> • Inflammation chronique (activation JNK, synthèse MCP-1, recrutement monocytes) (Gautheron et al., 2014) • Fibrose (Afonso et al., 2021; Mohammed et al., 2021)
Pyroptose	Mort cellulaire inflammatoire	<p>Activation inflammasome NLRP3 : activation caspase-1, synthèse de cytokines pro-inflammatoires IL-18 et IL-1β, et de la protéine cytosolique, gasdermine D ➔ formation de pores membranaires dans les hépatocytes</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Taux élevés de cholestérol libre (Caballero et al., 2009; Mridha et al., 2017) - LPS provenant du microbiote (Shojaie et al., 2020) 	<ul style="list-style-type: none"> • Relargage de particules de l'inflammasome : activation cellules étoilées, recrutement cellules inflammatoires ➔ Fibrose ➔ Inflammation (Gaul et al., 2021; Wree et al., 2014a; Xu et al., 2018)

Ferroptose	Nécrose régulée	Déplétion en glutathion et peroxydation lipidique dépendante du fer (Shojaie et al., 2020; Yang and Stockwell, 2016).	<ul style="list-style-type: none"> - Accumulation de fer (Nelson et al., 2011) - Hydroperoxydation des lipides membranaires (Kagan et al., 2017) 	<ul style="list-style-type: none"> • Accumulation d'ERO • Changement morphologique des mitochondries • Inflammation • Précède le développement des autres types de mort cellulaires (Li et al., 2020; J. Qi et al., 2020; Tsurusaki et al., 2019)
-------------------	-----------------	---	---	--

Dans le cas des maladies hépatiques chroniques telles que les NAFLD, c'est la chronicité de la mort cellulaire qui est préjudiciable pour le foie. En effet, la mort des hépatocytes favorise le recrutement de cellules immunitaires augmentant ainsi l'inflammation ainsi que la fibrose suite à l'activation des cellules de Kupffer et des cellules étoilées du foie.

iii. Progression des NAFLD

Les NAFLD sont des pathologies évolutives dont les stades avancés sont la fibrose, la cirrhose pouvant aller jusqu'au stade ultime du carcinome hépatocellulaire.

a. Développement de la fibrose

La fibrose est caractérisée par un dépôt excessif de collagène et d'autres protéines de la matrice extracellulaire entraînant la formation de tissu cicatriciel. Bien que la présence de fibrose ne soit pas une caractéristique pour définir la NASH, il s'agit d'un changement pathologique important car la présence de fibrose et en particulier de fibrose avancée est associée à un plus mauvais pronostic (Dulai et al., 2017; Powell et al., 2021).

Les cellules étoilées sont les cellules impliquées dans la production excessive de matrice extracellulaire et sont donc responsables du développement de la fibrose hépatique dans la NAFLD. Cette fibrogénèse est déclenchée suite à l'activation des cellules de Kupffer et à la mort des hépatocytes, qui vont produire des cytokines telles que le TGF- β ou l'IL-1 β , médiant l'activation des cellules étoilées présentes dans le foie (Dooley and ten Dijke, 2012). Les corps apoptotiques, résultant de la mort des hépatocytes, peuvent également être phagocytés par les cellules étoilées et induire leur activation (Yu et al., 2018). Une fois activées, ces cellules se différencient en myofibroblastes aux propriétés fibrogéniques. Celles-ci peuvent aggraver l'inflammation, notamment *via* le récepteur TLR4 exprimé à leur surface capable d'entraîner la libération de cytokines pro-inflammatoires, et l'activation des voies NF- κ B et JNK, contribuant ainsi au recrutement de cellules immunitaires (Yu et al., 2018).

b. Progression vers le carcinome hépatocellulaire

Il est estimé que 10 à 20% des patients atteints de NAFLD développeront des complications cirrhotiques et un carcinome hépatocellulaire (CHC) au cours des 10 à 20 ans suivant le diagnostic.

Bien que le CHC puisse survenir chez des patients non cirrhotiques (Tarao et al., 2019), la cirrhose est le facteur de risque le plus important pour le développement du CHC (Baffy, 2013; Pinyopornpanish et al., 2021; Tarao et al., 2019), puisqu'environ 60% des cas de CHC attribués aux NAFLD proviennent de patients cirrhotiques (White et al., 2012).

Au cours de la cirrhose, des cycles répétés de mort hépatocytaire et de prolifération compensatoire se succèdent créant un microenvironnement favorable au processus de cancérogénèse (Baffy, 2013). De nombreux facteurs caractéristiques de la NASH, comme la persistance de l'insulino-résistance, l'augmentation du stress métabolique et la dysbiose intestinale (*via* l'activation de la signalisation du TLR4), sont impliqués dans la carcinogénèse (Dapito et al., 2012; Huang et al., 2021). L'inflammation chronique est également entretenue par une dérégulation du système immunitaire, notamment avec la mort des lymphocytes T, diminuant ainsi les capacités de l'organisme à se défendre et accélérant la carcinogénèse (Anstee et al., 2019; Ma et al., 2016). De plus, l'inhibition du facteur FGF21, suppresseur d'inflammation, a récemment été décrite comme impliquée dans la pathogénèse de la NASH et la transition vers le CHC (Zheng et al., 2020). L'activation de la lipogenèse est l'un des événements majeurs survenant lors du CHC, produisant en excès des AGL agissant à la fois comme lipotoxiques et pro-tumorigènes (Wang et al., 2016). En effet, les AGL induisent l'activation de STAT3, facteur de transcription oncogène, et de la voie PI3k-AKT-mTOR qui favorise le développement de tumeurs, ou encore de la kinase JNK, facteur le plus activé dans le CHC impliqué dans la libération du cytochrome c mitochondrial, la mort cellulaire et la prolifération compensatoire (Longo et al., 2021b).

IV. Principale voie génomique impliquée dans les NAFLD : les récepteurs nucléaires

De nombreuses voies génomiques participent au développement des NAFLD. C'est le cas des facteurs de transcription comme, par exemple, SREBP ou ChREBP décrits précédemment et responsables de la régulation de nombreux gènes impliqués dans la LDN, contribuant ainsi au développement de la stéatose hépatique. Dans cette partie, nous nous intéresserons tout particulièrement aux récepteurs nucléaires, qui sont des facteurs de transcription activés par des ligands et qui régulent des fonctions vitales de l'organisme telles que le développement, la croissance, la reproduction et l'homéostasie énergétique. Il a été montré que plusieurs de ces récepteurs nucléaires agissent comme des récepteurs métaboliques impliqués dans le métabolisme hépatique des lipides, du glucose et des xénobiotiques, dans l'homéostasie des acides biliaires, et dans l'inflammation, pouvant donc jouer un rôle dans la physiopathologie hépatique et dans les NAFLD en particulier (Cave et al., 2016; López-Velázquez et al., 2012).

Chez l'homme, il existe 48 récepteurs nucléaires classés en 7 sous-familles (NR0-NR6) (Evans and Mangelsdorf, 2014). Les membres de la sous-famille NR1, sont particulièrement associés au contrôle de l'homéostasie énergétique. Ces récepteurs nucléaires, une fois liés à leur ligand, s'hétérodimérisent avec le récepteur X des rétinoïdes (RXR α,β,γ) pour ensuite se fixer sur des séquences spécifiques situées dans les régions régulatrices des gènes et déclencher leurs

transcriptions. Plusieurs de ces récepteurs, comme les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPARs), le récepteur du prégnane et des xénobiotiques (PXR), le récepteur constitutif de l'androstane (CAR), les récepteurs hépatiques X (LXR) et le récepteur farnésioïde X (FXR) sont des régulateurs clés de l'homéostasie énergétique en fonction des différents états physiologiques du corps (nourri/à jeûn) (Cave et al., 2016). Bien que ne faisant pas partie de la classe des récepteurs nucléaires, le cas du récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR) sera également abordé dans cette partie, du fait de son implication dans le métabolisme des lipides et qu'il possède de grandes similarités avec les récepteurs nucléaires. Par ailleurs, d'autres récepteurs nucléaires interviennent également dans la régulation du métabolisme énergétique, c'est le cas en particulier des récepteurs aux oestrogènes (Er α et Er β) (Mahboobifard et al., 2022; Palmisano et al., 2017).

De part leurs fonctions dans le métabolisme, ils sont également appelés « récepteurs métaboliques ». Ainsi, la perturbation de leur signalisation participent à la pathogénèse des NAFLD (Cave et al., 2016; López-Velázquez et al., 2012; Xiao et al., 2020). Ces dernières années, il a été proposé que l'interaction entre certains polluants environnementaux et les récepteurs nucléaires pouvaient participer à la pathogénèse des NAFLD. Cette notion sera développée dans le chapitre 2 « Perturbateurs endocriniens et TAFD ».

Tableau 2 : Effet des récepteurs métaboliques sur les mécanismes contribuant au développement des NAFLD (Bitter et al., 2015; Cave et al., 2016; Dong et al., 2009; Ducheix et al., 2013a; Lee et al., 2019; Neuschwander-Tetri et al., 2015; Spruiell et al., 2014; Sun et al., 2015; Wahli and Michalik, 2012; Xiao et al., 2020)

Effet des récepteurs métaboliques sur les mécanismes contribuant aux NAFLD						
Récepteurs	Expression	Ligand	Stéatose	LDN	β -oxydation	Inflammation
PPAR α	Foie	AG libre (AG saturés, AG mono/poly-insaturés) / Eicosanoïdes	↘	↘	↗	↘
PPAR β	Muscle	AG libre / Eicosanoïdes	↘↗	↘↗	↗	↘
PPAR γ	Tissu adipeux	AG libre (AG mono/poly-insaturés) / Prostaglandines / Eicosanoïdes	↗	↗	↗	↘
PXR	Foie / Intestin	Xénobiotiques / Stéroïdes	↗	↗	↘	↘
CAR	Foie / Intestin	Xénobiotiques / Stéroïdes	↘↗	↘	↘↗	↘↗
LXR α,β	Foie / Intestin / Reins / Tissu adipeux	Oxystérols	↗	↗	↘	↘
FXR α	Foie / intestin / Reins	Acides biliaires	↘	↘	↗	↘
AhR	Foie	Métabolites du tryptophane / de l'alimentation / Xénobiotiques (dioxine, HAP)	↗	↗	↗	↗
ER	Organes génitaux, os, foie, cerveau	Stéroïdes	↘	↘	↗	↘

i. Les récepteurs PPARs

Les PPARs sont des régulateurs majeurs du métabolisme des lipides dans de nombreux types de cellules (Bideyan et al., 2021). On trouve 3 formes du récepteur PPAR qui diffèrent dans leur

fonction et leur expression tissulaire : PPAR α principalement exprimé dans le foie ; PPAR β/δ principalement exprimé dans le muscle, le tissu adipeux et le foie et enfin PPAR γ principalement exprimé dans le tissu adipeux, le colon et les macrophages. Les AG libres et leurs dérivés (eicosanoïdes, prostaglandines, acide arachidonique) sont des ligands activateurs endogènes des PPARs, servant ainsi à contrôler leur propre métabolisme.

L'expression de PPAR α et PPAR γ est abondante dans les tissus consommant et stockant les AG, respectivement. Ainsi, PPAR α est principalement impliqué dans l'oxydation des lipides hépatiques en favorisant l'expression de gènes de la β -oxydation mitochondriale tels que les transporteurs CPT1A et CPT2, de la malonyl-CoA décarboxylase (qui dégrade le malonyl-CoA inhibiteur de CPT1), du CYP4A (qui participe à l'oxydation des AG), et d'autres enzymes déshydrogénases (LCAD, MCAD) (Bideyan et al., 2021; Ipsen et al., 2018). De plus, PPAR α est capable d'induire la transcription de l'hépatokine FGF21, hormone hépatique qui diminue la lipogenèse, augmente la β -oxydation et la cétogenèse *via* l'activation du coactivateur transcriptionnel PGC-1 α (Potthoff et al., 2009). L'activation de PPAR α par l'afflux d'AGL provenant de la lipolyse du tissu adipeux suggère donc un rôle protecteur dans les NAFLD (Montagner et al., 2016). Cependant, il est décrit comme plus faiblement exprimé dans cette pathologie, favorisant donc l'accumulation d'AG hépatique (Francque et al., 2015).

PPAR γ est le régulateur majeur de l'adipogénèse, contribuant au stockage des AG sous forme de TG dans les adipocytes (Wang et al., 2020; Yu et al., 2003). Son expression basale dans les hépatocytes est relativement faible, mais elle est fortement augmentée dans des conditions d'obésité et de NAFLD (Li et al., 2018; Xiao et al., 2020). L'expression hépatique de PPAR γ favorise la stéatose en induisant des gènes impliqués dans l'absorption, la synthèse et le stockage des lipides, ou dans la formation des GL (comme FABP4, CD36/FAT, la monoacylglycerol O-acyltransférase 1 et la perilipine 2) (Lee et al., 2012). De plus, PPAR γ peut être directement activé par SREBP-1c, fortement exprimé dans les NAFLD.

La contribution de PPAR β/δ dans le métabolisme des lipides et dans les NAFLD est plus controversée. En effet, certaines études ont montré que le récepteur était capable d'une part d'inhiber l'activation de SREBP-1c, réduisant ainsi la LDN (Flowers and Ntambi, 2008; Qin et al., 2008), et d'autre part, de favoriser l'export des VLDL (Zarei et al., 2017), améliorant *in fine* la stéatose. A l'inverse, d'autres études décrivent une augmentation des TG hépatiques suite à l'activation du récepteur (Lee et al., 2006). Cependant, son expression et son activité ont plutôt été décrites comme étant diminuées dans le foie de patients atteints de NAFLD (Zarei et al., 2017). Par ailleurs, l'activation de PPAR β/δ , en combinaison avec PPAR α , améliorerait la stéatose, l'inflammation et la fibrose (Pawlak et al., 2015).

En plus de perturber l'homéostasie lipidique, l'activation des PPAR module également l'inflammation. De manière générale, ces récepteurs sont considérés comme bénéfiques dans la NASH, de part leurs propriétés anti-inflammatoires (Cave et al., 2016; Wang et al., 2020) en diminuant l'activation des macrophages (Wettstein et al., 2017) et en inhibant les voies de signalisation pro-inflammatoire (NF- κ B et c-Jun, JNK) (Korbecki et al., 2019; Wahli and Michalik, 2012). En cohérence, PPAR α est également régulé négativement chez les patients atteints de NASH et son expression diminue avec l'augmentation de la sévérité de la maladie et avec le stade de fibrose (Francque et al., 2015; Hu et al., 2017; Tanaka et al., 2017). Les PPAR γ et PPAR β/δ sont

aussi exprimés dans les cellules étoilées et les cellules de Kupffer ; et leurs activations contribuent à la polarisation des cellules de Kupffer de type anti-inflammatoires (macrophages M2 impliqués dans la sécrétion d'IL-10 et d'IL-22, cytokines anti-inflammatoires), ainsi qu'à la diminution de gènes pro-inflammatoires et pro-fibrosants (Luo et al., 2017; Puengel et al., 2022).

ii. Les récepteurs xénosenseurs : PXR, CAR, AhR

Les récepteurs PXR, CAR et AhR forment un groupe de récepteurs aux propriétés communes. En effet ce sont tous trois, des facteurs de transcription impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques, qui régulent les transporteurs et enzymes de phase I, II et III de la détoxification. A titre d'exemple, PXR induit l'expression du CYP3A4, l'une des enzymes les plus importantes du métabolisme de détoxification des médicaments (Oladimeji and Chen, 2018; Sayaf et al., 2021). Ainsi en plus d'être activés par leurs ligands endogènes (les stéroïdes, les acides biliaires et certains dérivés du cholestérol pour le PXR ; la bilirubine, les acides biliaires et les androstanes pour le CAR ; les métabolites du tryptophane ou de l'alimentation comme les flavonoïdes pour AhR), ils sont également activés par les xénobiotiques, tels que les médicaments ou les polluants environnementaux et en particulier les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) pour AhR (Barouki et al., 2012a; Wahlang et al., 2014). Ils sont donc connus pour avoir une action protectrice contre les xénobiotiques alimentaires (Banerjee et al., 2015; Cobbina and Akhlaghi, 2017; Yamazaki et al., 2007).

Le **récepteur pregnane X (PXR)**, est majoritairement exprimé dans le foie (hépatocytes, cellules étoilées, cellules de Kupffer) et l'intestin (Banerjee et al., 2015). Si le rôle de PXR dans la stéatose hépatique est controversé (Bitter et al., 2015), la plupart des études suggèrent cependant que son activation aggrave la stéatose, l'obésité, la résistance à l'insuline et l'hypercholestérolémie (Li et al., 2015; Sayaf et al., 2021; Sookoian et al., 2010; Spruiell et al., 2014). De manière générale, l'activation de PXR a été associée à une augmentation de l'absorption hépatique d'AG (*via* les transporteurs CD36 et SLC13A5) et de la lipogenèse hépatique (*via* l'augmentation des désaturases et élongases) ; à une diminution de la β -oxydation (*via* son interaction avec le régulateur FoxA2) ; ainsi qu'à l'activation de SREBP1 et de PPAR γ (C. Y. Li et al., 2016; Negi et al., 2021; Zhou et al., 2006) ; l'ensemble de ces actions contribuant au développement de la stéatose. D'autre part, l'activation de PXR activerait une réponse anti-inflammatoire et pourrait réduire la fibrogénèse hépatique en bloquant la production des gènes pro-inflammatoires cibles de NF- κ B (telles que les cytokines pro-inflammatoires IL6, TNF α et IL-1 β) (Sun et al., 2015), et en inhibant l'activation des cellules étoilées du foie (Sayaf et al., 2021).

Le **récepteur constitutif de l'androstane (CAR)** est fortement exprimé dans le foie et l'intestin (Nishimura et al., 2004). Il est constitutivement actif, mais son activité peut être modifiée directement par sa liaison à un ligand ou indirectement par des modifications de son état de phosphorylation, régulé par PKC, ERK et PP2A (protéine kinase C ; kinase régulée par le signal extracellulaire ; protéine phosphatase 2) qui contrôlent ainsi sa translocation au noyau (Mutoh et al., 2009). L'activation de CAR favoriserait l'inhibition de la lipogenèse hépatique (*via* une inhibition des gènes SREBP-1c, SCD1 et ACC) et l'augmentation de la β -oxydation contrecarrant la

stéatose (Dong et al., 2009; J. Yan et al., 2015). Dans la NAFLD, CAR possède des propriétés anti-inflammatoires, en interagissant avec NF- κ B. Il inhibe également l'apoptose induite par le TNF α en augmentant l'expression de la protéine anti-apoptotique GADD45 β (Baskin-Bey et al., 2007; Yamamoto et al., 2010). Ainsi, son activation est décrite pour réduire la stéatose hépatique et l'inflammation tout en réduisant l'obésité, la résistance à l'insuline et l'hypercholestérolémie (Gao et al., 2009; Roth et al., 2008; Sberna et al., 2011).

Alors que la plupart des études montrent un rôle bénéfique de CAR, certaines études contradictoires démontrent que l'activation de CAR induirait une augmentation des lipides sériques, une diminution de la β -oxydation hépatique, une augmentation du stress oxydant médiée par l'augmentation de la peroxydation lipidique, ainsi qu'une augmentation de l'apoptose et de l'inflammation (Y. Li et al., 2016; Tanaka et al., 2017; Xiao et al., 2020; Y. Xu et al., 2015; Yamazaki et al., 2007). De plus, certaines études suggèrent même que l'activation de CAR serait corrélée à la progression et la sévérité des NAFLD.

En plus de son rôle principal dans le métabolisme des xénobiotiques, le **récepteur AhR** est impliqué dans le métabolisme énergétique des glucides, des lipides et du cholestérol, l'inflammation, la migration et la prolifération cellulaire (Bock, 2021). L'activation d'AhR est impliquée dans le développement de l'obésité (Moyer et al., 2016) et de la stéatose hépatique (He et al., 2013; Neuschäfer-Rube et al., 2015). En effet, son activation augmente l'absorption des AG dans le foie en induisant l'expression du transporteur CD36. AhR augmente également la concentration de citrate cytosolique (rôle central du métabolisme lipidique) et diminue l'expression de PPAR α et de SREBP-1c entraînant à la fois stéatose et lipotoxicité (Duval et al., 2017). L'activation d'AhR a aussi été décrite pour supprimer la β -oxydation peroxysomale des AG conduisant à l'accumulation de TG hépatiques (Lee et al. 2010). Fait intéressant, l'activation d'AhR jouerait un rôle déterminant dans le développement de la stéatose hépatique chez les souris mâles nourries avec un régime riche en graisses (Duval et al., 2017), une déficience en AhR empêchant la prise de poids, la stéatose et l'inflammation induites par l'alimentation (Moyer et al., 2016; Xu et al., 2015).

En plus du développement de NAFLD, l'activation d'AhR pourrait également participer à la progression de cette pathologie. En effet, son activation par des xénobiotiques a été associée à un remodelage membranaire (Tekpli et al., 2010), à un dysfonctionnement mitochondrial (Lee 2011), à une altération de l'homéostasie du fer (Fader et al., 2017) et à une inflammation (Podechard et al., 2008), (i.e. des altérations associées à la progression vers la NASH).

iii. Les récepteurs LXR et FXR

Le **récepteur hépatique X (LXR)** existe sous deux isoformes chez l'homme : LXR α qui est la forme prédominante dans le foie, également exprimée dans l'intestin, les reins et le tissu adipeux ; LXR β qui est exprimé de façon ubiquitaire (Cave et al., 2016). Ses ligands endogènes sont les oxystérols et les métabolites dérivés du cholestérol. LXR joue un rôle clé dans le métabolisme des TG et du cholestérol dans le foie (Ducheix et al., 2013a). Il active la synthèse, l'export et le stockage des TG hépatiques vers les tissus périphériques, et stimule le transport réverse du cholestérol (*via* les lipoprotéines HDL) pour protéger les tissus extrahépatiques de la toxicité d'un excès de cholestérol

(Hong and Tontonoz, 2014; Zhang et al., 2012). LXR régule également l'enzyme CYP7A1 qui permet la conversion du cholestérol en acides biliaires (López-Velázquez et al., 2012).

Chez l'homme, il a été rapporté que l'activation de LXR α jouait un rôle crucial dans le développement de la stéatose et que son expression hépatique augmentait avec la sévérité de la NAFLD (Ahn et al., 2014). En effet, LXR α est un puissant activateur de SREBP-1c, ChREBP et PPAR γ , tout comme il est capable d'induire de manière directe FAS, ACC ou encore SCD1, et de diminuer la synthèse de FGF21 ; favorisant ainsi la lipogenèse hépatique (Fan et al., 2017; Joseph et al., 2002; Keinicke et al., 2020; Talukdar and Hillgartner, 2006; Yoshikawa et al., 2001). De plus, il a été démontré que PPAR α et LXR s'influencent mutuellement (Ducheix et al., 2013b). Un effet supplémentaire de LXR est l'augmentation de l'expression de la protéine ANGPTL3 sécrétée par le foie, à l'origine de l'augmentation des TG plasmatiques (en inhibant l'activité de la lipoprotéine lipase, LPL) et de celle des AG libres (en activant la lipolyse dans les adipocytes), d'où l'effet hypertriglycéridémique médié par LXR (Inaba et al., 2003; Zhang et al., 2001). Cependant, si LXR augmente la stéatose, ce récepteur semble au contraire avoir un rôle protecteur dans la NASH, en diminuant l'inflammation et l'hypercholestérolémie (médiée par le régulateur clé de la biosynthèse de cholestérol : SREBP-2) (Cariello, Piccinin, et Moschetta 2021; Zhang et al. 2012; Ito et al. 2015). LXR est en effet capable d'inhiber la transcription des gènes des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α , l'IL-6 et l'IL-1 β , médiée par NF- κ B, et de diminuer l'activation des TLR, médiée par le transporteur d'efflux du cholestérol, ABCA1 (Venteclef et al. 2010; Zhu et al. 2010). De plus, l'activation de LXR atténue également les lésions hépatiques induites par le LPS dans la NAFLD sur un modèle murin en inhibant l'activité pro-inflammatoire des macrophages (Liu et al., 2012). Enfin, un rôle anti-fibrotique de LXR a également été décrit (Becares et al., 2019).

Le **récepteur farnésoïde X (FXR)** existe sous deux isoformes chez l'homme FXR α et FXR β ; il est principalement exprimé dans les organes impliqués dans le métabolisme et le transport des acides biliaires, tels que le foie, l'intestin et les reins, mais également présent dans le tissu adipeux et la glande surrénale. Il est le régulateur principal de la synthèse des acides biliaires, puisque activé par ces stéroïdes, il inhibe leur synthèse à partir du cholestérol *via* la sécrétion de FGF19, entérokinase capable d'inhiber le CYP7A1. Du fait, que l'expression hépatique de FXR soit décrite comme diminuée dans les NAFLD, des données issues de modèles rongeurs et de patients atteints de NASH, relèvent une expression élevée du CYP7A1, à l'origine des niveaux élevés d'acides biliaires retrouvés à ce stade de la maladie (Jiao et al., 2018; Kolodziejczyk et al., 2019). FXR régule également le métabolisme des lipides, du glucose et des lipoprotéines (Cave et al., 2016; Pineda Torra et al., 2003; Shen et al., 2011). Son activation réduit la lipogenèse hépatique, en inhibant SREBP-1 et favorise la β -oxydation des AG en stimulant l'expression de PPAR α et de CPT1 (Xi and Li, 2020). FXR est également impliqué dans la clairance des TG en favorisant l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL), responsable de l'hydrolyse des TG dans les lipoprotéines, abaissant ainsi les taux sériques de TG (Watanabe et al., 2004). Pour cela, FXR favorise la transcription du régulateur ApoC-II, co-activateur de la LPL et diminue l'expression des protéines ApoC-III et Angptl3, agissant comme inhibiteurs de la LPL (López-Velázquez et al., 2012). FXR semblerait également inhiber la sécrétion de VLDL indirectement en diminuant l'expression de MTTP et ApoB (Hirokane et al., 2004).

Le rôle de FXR est globalement protecteur contre les NAFLD (Xiong et al., 2014). Cependant, chez les patients atteints de NAFLD, la diminution de l'expression hépatique de FXR est observée et associée à une augmentation de l'expression de LXR et de la synthèse hépatique de TG (Aguilar-Olivos et al., 2015; Yang et al., 2010). Par ailleurs, plusieurs études ont rapporté que l'activation hépatique de FXR par des ligands naturels et synthétiques atténue la stéatose hépatique (Li et al., 2013), l'inflammation et la fibrogénèse dans la NAFLD (Friedman et al., 2018; Neuschwander-Tetri et al., 2015; Nouredin and Sanyal, 2018). En plus de ces différents rôles métaboliques, FXR induit la synthèse de FGF21 anti-inflammatoire (Cyphert et al., 2012) et régule le microbiome intestinal. Une inhibition du FXR chez des souris entraîne une prolifération bactérienne et une perméabilité intestinale augmentée ainsi que des niveaux plus élevés de facteurs pro-inflammatoires et pro-fibrosants (Cave et al., 2016; Tanaka et al., 2017).

V. Principale voie non génomique impliquée dans les NAFLD : la lipotoxicité

L'augmentation d'AG libres au niveau hépatique se traduit par l'estérification et l'accumulation des TG, simultanément à l'accumulation d'autres espèces lipidiques tels que les diacylglycérols, les AG polyinsaturés ou les céramides. Ces intermédiaires dits lipotoxiques sont responsables d'effets nocifs tels que le dysfonctionnement mitochondrial, le stress oxydant, le stress du RE et l'inflammation chronique du foie impliqués dans la progression des NAFLD. Dans cette partie, un focus sera fait sur les différentes espèces lipidiques retrouvées comme accumulées dans les NAFLD et leurs mécanismes de lipotoxicité dans la pathogénèse des NAFLD. Un point sera également fait sur la perturbation de l'homéostasie des membranes, dont les composants majeurs sont des lipides qui peuvent être à l'origine d'un remodelage membranaire et de la progression des NAFLD.

i. Altération de l'homéostasie des lipides et lipotoxicité

Lors des NAFLD, le métabolisme lipidique est altéré contribuant à l'accumulation de TG stockés sous forme de GL, la forme majeure des lipides hépatiques chez les personnes atteintes de NAFLD. Bien que le taux de TG accumulés soit un indice du stade de NAFLD, cette forme de stockage des lipides semble protéger contre l'accumulation excessive d'autres espèces lipidiques toxiques (Alkhoury et al., 2009). Ce rôle protecteur des TG a été confirmé par certaines études en montrant que l'inhibition de la DGAT2, catalyseur final de la synthèse des TG, diminuait la stéatose mais favorisait la production d'autres espèces lipidiques, impliquées dans la progression vers des stades NASH (Yamaguchi et al., 2007).

Au contraire, d'autres types de lipides sont capables de s'accumuler et de provoquer des dommages hépatiques. Cette lipotoxicité hépatique est associée à une inflammation chronique et est caractéristique de la progression de la stéatose hépatique vers la NASH (Neuschwander-Tetri, 2010). Des études de lipidomique ont permis de mettre en évidence l'augmentation de plusieurs types de lipides impliqués dans la NASH : les acides gras libres (AGL), les diacylglycérols (DAG), le

cholestérol libre (CL), la lysophosphatidylcholine (LPC) et les sphingolipides dont les céramides et la sphingosine-1-phosphate (Friedman et al., 2018; Marra and Svegliati-Baroni, 2018; Musso et al., 2018) (Figure 13).

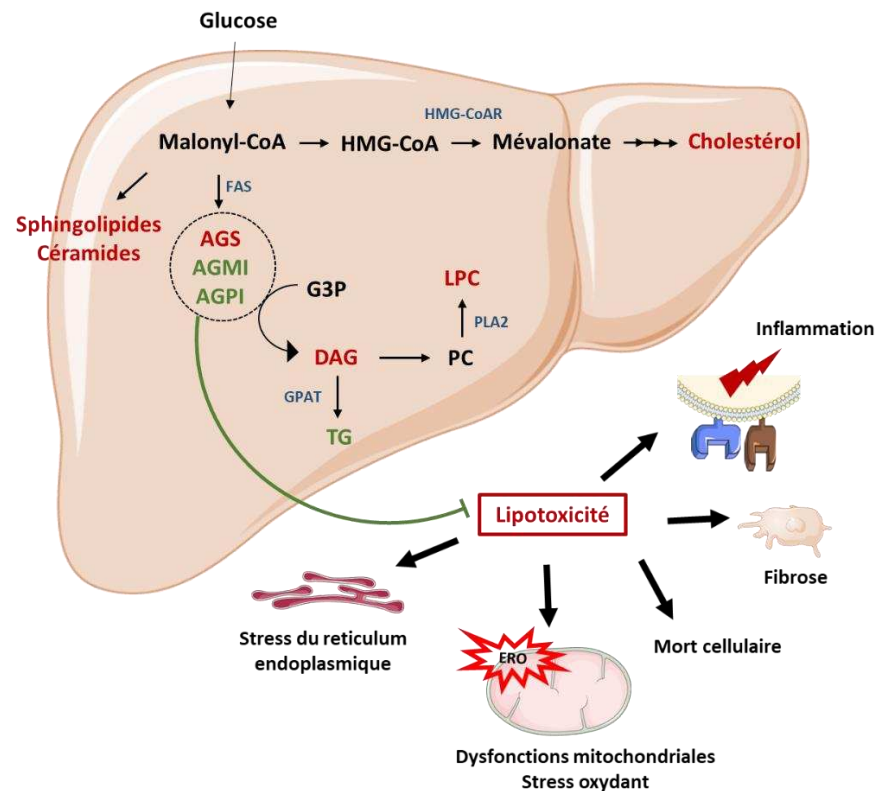


Figure 13 : Accumulation d'espèces lipidiques lipotoxiques et effets sur le foie. L'augmentation d'AG hépatiques se traduit par l'accumulation d'espèces lipidiques lipotoxiques tels que les sphingolipides et céramides, les AG saturés (AGS), les diacylglycérols (DAG), la lysophosphatidylcholine (LPC) ou le cholestérol. Ces intermédiaires lipotoxiques sont responsables d'effets nocifs impliqués dans la progression de la maladie tels que le stress du RE, le dysfonctionnement mitochondrial, le stress oxydant, la mort cellulaire, l'inflammation chronique du foie et le développement de la fibrose. Au contraire, les AG mono/poly-insaturés (AGMI/AGPI) seraient protecteurs contre la lipotoxicité des autres espèces lipidiques.

a. Les acides gras libres

Les acides gras libres (AGL), présents en excès dans les NAFLD, sont les plus fréquemment associés à la lipotoxicité hépatique. Ils sont classés selon la longueur de leur chaîne carbonée et leur degré de désaturation (AG saturés, AGS; AG mono-insaturés, AGMI; AG poly-insaturés, AGPI). Si l'inhibition de la synthèse de TG a permis de réduire la stéatose, elle a aussi entraîné l'augmentation du taux d'AGL hépatique qui ont contribué au développement du stress oxydant, de l'inflammation et de la fibrose (Yamaguchi et al., 2007).

Certaines études ont mis en évidence le rôle des **AG saturés (AGS)** par rapport aux AG insaturés (AGI) dans la lipotoxicité. Les AGS, notamment le palmitate (C16:0), sont fortement augmentés dans la NAFLD et associés à la progression de la NASH (Musso et al., 2018). Le profil lipidomique de biopsies hépatiques de patients NASH, a permis d'identifier une diminution de la désaturase FADS1 associée à une activité importante de l'élongase ELOVL6, entraînant l'augmentation d'AGS

à chaîne longue (Chiappini et al., 2017). Le pouvoir cytotoxique des AGS a été mis en évidence dans de nombreuses études *in vitro* et *in vivo*, notamment en stimulant le stress du RE et le stress oxydant, et en déclenchant des signaux apoptotiques et des phénomènes inflammatoires (Deng et al., 2022; Hirsova et al., 2016a; Pierantonelli and Svegliati-Baroni, 2019).

Alors que les AGS sont lipotoxiques, les **AGMI** comme le palmitoléate (C16:1) et l'oléate (C18:1) sembleraient protéger de la toxicité des AGS. En effet, l'oléate réduirait la toxicité du palmitate dans des hépatocytes en culture, en favorisant son utilisation pour la synthèse de TG (Chen et al., 2018; Musso et al., 2018; Zeng et al., 2020). De plus, alors que la surexpression de la désaturase SCD1, qui convertit les AGS en AGMI, augmente la synthèse de TG, son inhibition génétique ou pharmacologique sensibilise les hépatocytes à l'apoptose induite par les AGS (Li et al., 2009; Rada et al., 2020). De même, certains **AGPI** sont également considérés comme protecteurs dans la pathogénèse des NAFLD. C'est le cas en particulier des AGPI ω -3 tels que l'acide eicosapentaénoïque (EPA), l'acide docosahexaénoïque (DHA) et l'acide docosapentaénoïque (DPA). Ces médiateurs réduiraient le stress du RE, le stress oxydant, l'inflammation et l'apoptose causés par les AGS (Musso et al., 2018). Il a été rapporté qu'une diminution du taux d'AGPI ω -3 et un rapport élevé d'AGPI ω -6²/ ω -3 étaient associés à la sévérité des NAFLD (Araya et al., 2004; Puri et al., 2007).

b. Le diacylglycérol (DAG)

Le DAG est le dernier intermédiaire avant la synthèse des TG (Figure 13). Les DAG seraient les médiateurs potentiels du développement de la résistance à l'insuline dès les premiers stades de NAFLD. En effet, l'accumulation excessive de DAG induit l'activation de la protéine kinase C ϵ (PKC ϵ) qui phosphoryle et inhibe l'activité de la kinase intracellulaire du récepteur à l'insuline (IRKS2) dans des hépatocytes de rat (Petersen et Shulman 2017; Perry et al. 2014). Lors de cette activation, la synthèse de glycogène et la LDN sont augmentées et la néoglucogénèse diminuée. Le DAG induit également l'activation de l'inflammasome et la pyroptose des hépatocytes, médiée par la PKC δ (Koh et al., 2021).

c. Le cholestérol

L'altération du métabolisme du cholestérol joue un rôle dans la pathogénèse de la NASH, notamment *via* une accumulation de cholestérol libre (CL) ; notamment retrouvé dans le foie d'individus atteints de NASH, mais pas dans ceux atteints de stéatose (Svegliati-Baroni et al., 2019).

² l'augmentation des AGPI ω -6, comme l'acide linoléique et son métabolite l'acide arachidonique, déclenche une cascade inflammatoire et une peroxydation lipidique pouvant mener à différentes formes de mort cellulaire (Deng et al., 2022).

Dans la NASH, la forte expression du facteur de régulation SREBP2, en réponse au stress du RE, à l'inflammation ou à l'insulino-résistance, entraîne une activation de l'HMG-Coa réductase (Musso et al., 2018). Cette enzyme agit dans l'étape limitante de la synthèse de cholestérol qui entraîne l'accumulation de CL, en particulier dans les mitochondries et le RE (Bellanti et al., 2014) (Figure 13). De plus, la diminution de l'expression du CYP7A1, enzyme impliquée dans la synthèse d'acides biliaires à partir du cholestérol, est également observée ainsi que la diminution du transporteur d'efflux du cholestérol ABCG1, ce qui participe à l'accumulation de CL (Min et al., 2012).

Dans ce contexte de NASH, le CL est impliqué dans les lésions hépatiques, l'inflammation et la fibrose (Ioannou, 2016). Par exemple, l'ajout de cholestérol alimentaire à un régime HFD entraîne la progression de la simple stéatose vers la stéatohépatite fibrosante chez un modèle souris (Savard et al., 2013; Subramanian et al., 2011). Cette augmentation de CL contribue également à la pathogénèse de la NASH en induisant la mort cellulaire par apoptose (Arguello et al., 2015). Ce mécanisme implique un stress du RE et un dysfonctionnement mitochondrial (Musso et al., 2018). Il a également été montré que l'accumulation de CL sensibilisait les hépatocytes au TNF et au FAS, médiateurs de la mort cellulaire (Marí et al., 2006). Le CL stimule différents types cellulaires comme les cellules de Kupffer et les cellules étoilées, contribuant à la fois à l'inflammation chronique par le relargage de cytokines pro-inflammatoires et le recrutement de cellules immunitaires (Mridha et al., 2017) ; ainsi qu'au développement de la fibrose *via* la signalisation du TGF (Teratani et al., 2012).

En parallèle, l'oxydation du CL peut conduire à la formation d'oxystérols favorisant les lésions hépatiques en altérant l'activité mitochondriale des hépatocytes (Bellanti et al., 2017). Enfin, l'effet pro-inflammatoire et pro-apoptotique du cholestérol est également médié par la formation et l'accumulation de cristaux de cholestérol dans les gouttelettes lipidiques. En effet, la formation de ces cristaux est fortement associée à la progression de la NASH, puisqu'ils sont capables d'activer l'inflammasome NLRP3 et la pyroptose (Horn et al., 2021; Ioannou et al., 2019).

d. Céramides et autres sphingolipides

Les sphingolipides jouent un rôle prépondérant dans la pathogénèse et la progression des NAFLD en participant notamment au développement de l'insulino-résistance, de l'inflammation, du stress oxydant et à la mort cellulaire (Régnier et al., 2019; Yu and Wang, 2022).

1. Métabolisme des sphingolipides

Les sphingolipides sont des constituants des membranes biologiques qui sont particulièrement regroupés au niveau de microdomaines membranaires appelés radeaux lipidiques. En plus de leur rôle structural, ils interviennent dans la signalisation en régulant les fonctions cellulaires clés, telles que la croissance et la survie cellulaires, la prolifération, la différenciation, la migration et les réponses immunitaires.

Parmi eux, les céramides sont considérées comme étant au centre du métabolisme des sphingolipides car ce sont les précurseurs de la plupart des sphingolipides complexes. Ils peuvent être produits dans le RE par la voie de synthèse *de novo* qui est initiée par la condensation de palmitoyl-CoA et de sérine, catalysée par la serine palmitoyl-CoA transférase (SPT). Cette voie mène à la production de céramides par une série d'étapes enzymatiques comprenant les enzymes : 3-kéto-dihydrosphingosine reductase (KDSR), ceramide synthase (CerS) et dihydrocéramide désaturase (DES). En plus de la synthèse *de novo*, les céramides peuvent être générés à partir de sphingomyéline par la neutral sphingomyelinase (SMase) au niveau de la membrane plasmique, ou par la voie de recyclage de la sphingosine dans les lysosomes (Figure 14). Après leur synthèse, les céramides sont transportées hors du RE pour la synthèse d'autres sphingolipides, tels que le céramide-1-phosphate (C1P), le glycosylcéramide, la sphingosine, la sphingosine-1-phosphate (S1P), ou ils peuvent être reconvertis en sphingomyéline, phospholipide majeur des membranes plasmiques. Parmi ces sphingolipides, le C1P et la sphingosine sont associés à de nombreuses voies pro-inflammatoires et pro-apoptotiques, alors que le S1P aurait des effets anti-apoptotiques (Musso et al., 2012; Simon et al., 2019). La génération de céramide par la voie de la SMase a tout particulièrement été impliquée dans l'apoptose induite par des ligands de mort tels que le TNF et Fas (Summers, 2006)

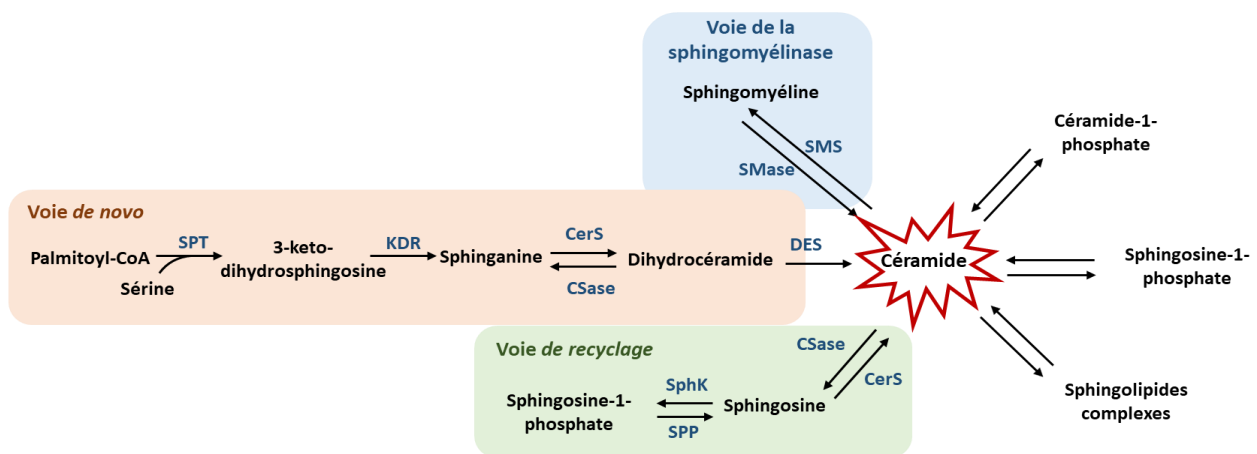


Figure 14 : Voies de biosynthèse des sphingolipides menant à la production de céramides.

2. Les céramides dans les NAFLD

Dans un contexte de NAFLD, l'apport excessif d'AGS, notamment de palmitate (l'un des substrats pour la synthèse *de novo*), stimule la synthèse des céramides. Cela peut ainsi expliquer les niveaux élevés de céramides décrits dans les modèles murins et chez les patients atteints de NAFLD (Anjani et al., 2015; Raichur et al., 2014). En corrélation avec l'accumulation de céramides, l'activité de plusieurs enzymes impliquées dans la synthèse des sphingolipides (SPT, CerS, DES), et en particulier de la SMase, est augmentée en fonction de la sévérité des NAFLD (Apostolopoulou et al., 2020; Chaurasia and Summers, 2015; Montandon et al., 2019; Simon et al., 2019).

Les céramides sont impliquées dans le métabolisme des lipides, en favorisant l'absorption hépatique des AG et leur stockage (Chaurasia et al., 2019). Ils favorisent notamment la

translocation de CD36 à la membrane plasmique permettant le transfert des AGL dans les hépatocytes (Xia et al., 2015). De plus, ils peuvent induire et activer le facteur de transcription SREBP1-c, stimulant ainsi la lipogenèse hépatique et la synthèse de TG (Hajduch et al., 2021). Dans ce processus, il est suggéré que la surexpression de la céramide synthase CerS6 (augmentée dans les NAFLD) et l'inactivation de CerS2 (diminuée dans les NAFLD) favorisent le clivage de SREBP1 conduisant à son activation (Kim et al., 2019). Parmi les céramides qui s'accumulent chez les patients NAFLD, le rôle du céramide C16:0, formé par la CerS6, a été particulièrement souligné (Fucho et al., 2017; Gorden et al., 2015; Raichur et al., 2014). En effet, celui-ci a notamment été impliqué dans la diminution des capacités de β -oxydation des AG, dans l'altération des fonctions mitochondriales, ainsi que dans l'insulino-résistance (Hammerschmidt et al., 2019; Raichur et al., 2014; Turpin et al., 2014).

En plus de leur implication dans la stéatose, les sphingolipides et les céramides, tout particulièrement, agiraient comme principaux promoteurs de la transition de la stéatose vers la NASH (Régnier et al., 2019; Yu and Wang, 2022). En effet, les taux de céramides hépatiques semblent refléter la sévérité de la NAFLD, puisque ceux-ci sont plus élevés (+33%) chez les patients atteints de NASH que chez ceux atteints de stéatose (Alonso et al., 2017; Gorden et al., 2015). De plus, l'augmentation de l'activité de la SMase a été associée à la production d'ERO, à la diminution du GSH antioxydant, au stress du RE et à l'induction de l'apoptose des hépatocytes (Fucho et al., 2014; García-Ruiz et al., 1997).

Récemment, il a été identifié que les céramides pouvaient être stockés sous forme d'acylcéramide dans les GL et que cette forme de stockage serait potentiellement protectrice contre la progression des NAFLD, en atténuant l'apoptose induite par les céramides (Senkal et al., 2017). Cependant, en présence d'une forte accumulation de céramides, celui-ci peut également être retrouvé sous sa forme libre et déclencher des lésions hépatiques (Tsugane et al., 1999). Le rôle des céramides a largement été décrit dans l'induction de la mort des hépatocytes ainsi que dans l'inflammation, mais également dans la fibrose. Les cellules étoilées peuvent, à la fois, être activées par les céramides et déclencher la fibrose (Moles et al., 2010), et peuvent également, elles-mêmes produire des céramides en régulant les enzymes clés de la voie de synthèse *de novo* (CerS2, CerS5) (Shmarakov et al., 2019).

ii. Rôle de la lipotoxicité dans les lésions hépatiques associées aux NAFLD

Dans les NAFLD, La lipotoxicité médiée par ces différentes espèces lipidiques en excès entraîne des dommages hépatiques qui favorisent le développement de la NASH (Figure 15). Les principales cibles de cette lipotoxicité sont les organites intracellulaires, tels que le réticulum endoplasmique (RE) et les mitochondries, favorisant ainsi le stress du RE et le stress oxydant. La lipotoxicité est également étroitement liée au développement de l'inflammation chronique (principalement médiée par les cellules de Kupffer) et à la mort cellulaire des hépatocytes (Arroyave-Ospina et al., 2021; Marra and Svegliati-Baroni, 2018; Rada et al., 2020).

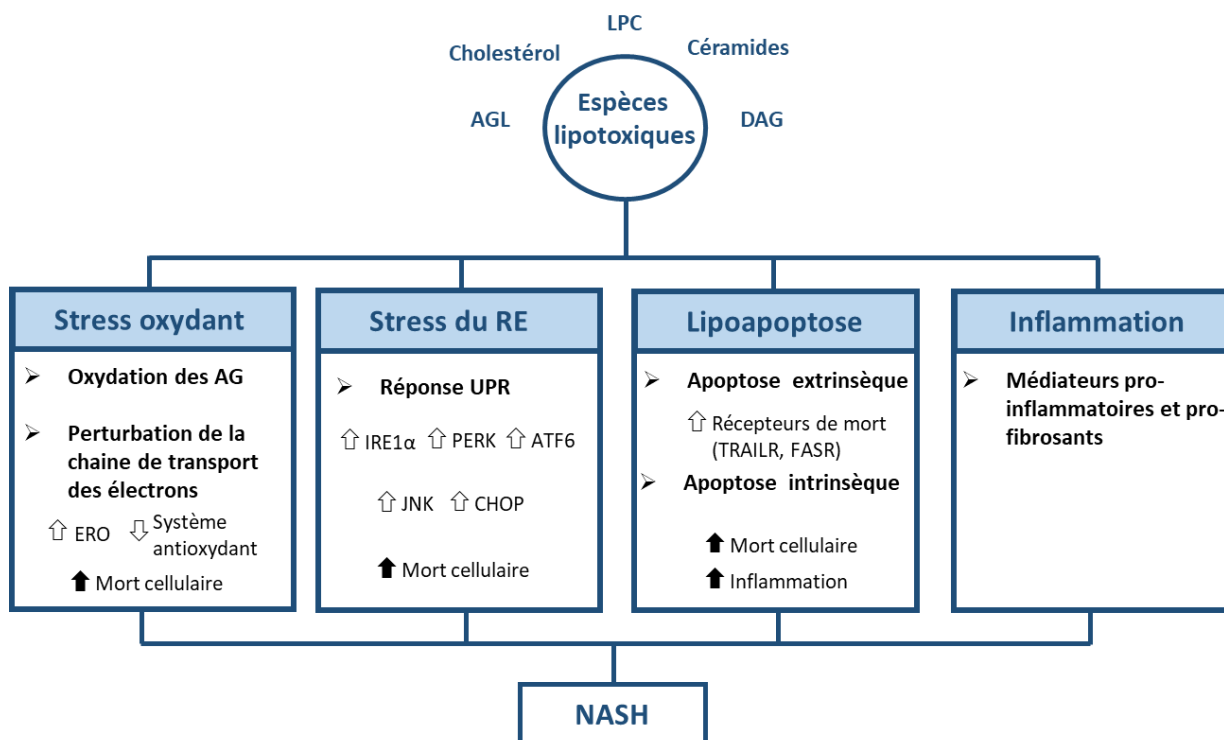


Figure 15 : Effets lipotoxiques médiés par les espèces lipidiques toxiques intervenant dans la progression des NAFLD. Les différentes espèces lipidiques accumulées dans les NAFLD (AGL, Cholestérol, Céramides, DAG) induisent une lipotoxicité hépatique à l'origine de la progression des NAFLD vers des stades NASH. Ces lipides favorisent le stress oxydant et le stress du RE, ainsi que les différentes voies apoptotiques menant à la mort cellulaire. Ils favorisent également le développement de l'inflammation

a. Impact de la lipotoxicité sur le stress oxydant

Le stress oxydant est l'un des mécanismes clés impliqués dans les dommages hépatiques menant à la progression de la stéatose vers la NASH (Arroyave-Ospina et al., 2021; Chen et al., 2020). Il a été montré dans de nombreux modèles *in vivo* de NAFLD ainsi que lors d'essais cliniques, que l'utilisation d'antioxydants, tels que la vitamine E, permettait de réduire certains paramètres de la NASH comme la mort cellulaire (Spahis et al., 2017). Le développement du stress oxydant est étroitement lié à l'accumulation d'AG et implique la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) en grande quantité, à l'origine de la peroxydation lipidique et des dysfonctions mitochondriales (Chen et al., 2020; Sumida et al., 2013).

1. Mécanisme de production des ERO

Le stress oxydant résulte d'un déséquilibre entre la production excessive d'ERO (radicaux libres dérivés de l'oxygène) et le dépassement des capacités des systèmes antioxydants.

Le dysfonctionnement mitochondrial est à l'origine de la production d'ERO, notamment lorsque la β -oxydation est suractivée, entraînant une accélération de l'activité du cycle de Krebs, qui lui-même stimule l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale pour produire l'ATP (Figure 16). Cette suractivité s'accompagne d'une fuite des électrons depuis la chaîne respiratoire, qui peuvent

réagir avec l'oxygène pour former les ERO (anion superoxyde, peroxyde d'hydrogène et radical hydroxyle). En plus de la fuite d'électrons médiée par l'augmentation de la β -oxydation, des altérations des complexes de la chaîne respiratoire accentuent également cette fuite d'électrons pour former des ERO (Sunny et al., 2017). En parallèle, la diminution des capacités antioxydantes contribue à l'accumulation des ERO et au développement du stress oxydant (Chen et al., 2020; Ore and Akinloye, 2019; Smolková et al., 2020; Videla et al., 2004). Cette diminution de la réponse antioxydante est médiée par le facteur de transcription Nrf2, régulateur majeur de la balance redox, et par la diminution des niveaux d'enzymes antioxydantes (catalase [CAT], superoxyde dismutase [SOD], glutathion peroxydase [GPX]), ainsi que des piègeurs d'ERO, comme le glutathion (Chen et al., 2020; Ore and Akinloye, 2019; Smolková et al., 2020; Spahis et al., 2017; Videla et al., 2004).

Bien que la mitochondrie reste le site principal de production d'ERO, le stress du RE contribue également fortement au stress oxydant (~25% de la production totale d'ERO cellulaire), et ce, notamment par l'activation de la protéine CHOP et de la kinase JNK (Fujii et al., 2018). De plus, le stress du RE provoque un efflux de calcium qui peut exercer des effets sur les mitochondries (via la perméabilisation des membranes mitochondriales) et ainsi accentuer le stress oxydant (Deniaud et al., 2008; Egnatchik et al., 2014). Certaines études suggèrent également que le stress du RE pourrait réguler négativement le facteur Nrf2, favorisant ainsi le stress oxydant (Cullinan and Diehl, 2006).

2. Causes du stress oxydant dans les NAFLD

Dans le contexte des NAFLD, la surcharge en lipides hépatiques est responsable d'un dysfonctionnement mitochondrial, *via* une suractivation de la β -oxydation, à l'origine de la production d'ERO (Arroyave-Ospina et al., 2021). L'altération des complexes de la chaîne respiratoire a également été mise en évidence dans les tissus hépatiques de personnes atteintes de NAFLD, accentuant la fuite d'électrons pour former des ERO (Chen et al., 2020; Sunny et al., 2017) (Figure 16). Les AG libres, le cholestérol ou encore les céramides ont également été décrits comme pouvant induire des altérations des complexes de la chaîne mitochondriale, mécanisme mis en évidence dans les tissus hépatiques de personnes atteintes de NAFLD, et accentuant la fuite des électrons pour former des ERO (Alkhoury et al., 2009; Summers, 2006). Ainsi, la formation d'ERO accentuée par les AG contribue au stress oxydant, en particulier, dans un contexte d'altération des fonctions antioxydantes, comme cela est décrite dans la NASH (Liu et al., 2015; Masarone et al., 2018; Yesilova et al., 2005). En dépit du fait qu'il a été démontré, au cours des NAFLD, que, dans un premier temps une réponse antioxydante adaptative se mettait en place pour contrer la hausse des ERO ; l'accumulation massive des AG hépatiques semble donc être la principale cause du déséquilibre de cet état redox entraînant une saturation des capacités antioxydantes (Anstee et al., 2019).

En conséquence des dysfonctions mitochondriales, des voies alternatives peuvent être utilisées pour compenser l'oxydation des AG. C'est le cas des enzymes CYP2E1 et CYP4A11, présentes dans le RE, et dont l'activité hépatique était augmentée chez les patients atteints de NASH. L'augmentation de l'oxydation des AG *via* les CYP induirait une quantité excessive d'ERO

exacerbant le stress oxydant hépatique et par conséquent aggravant les lésions hépatiques (Aubert et al., 2011; Begriche et al., 2013).

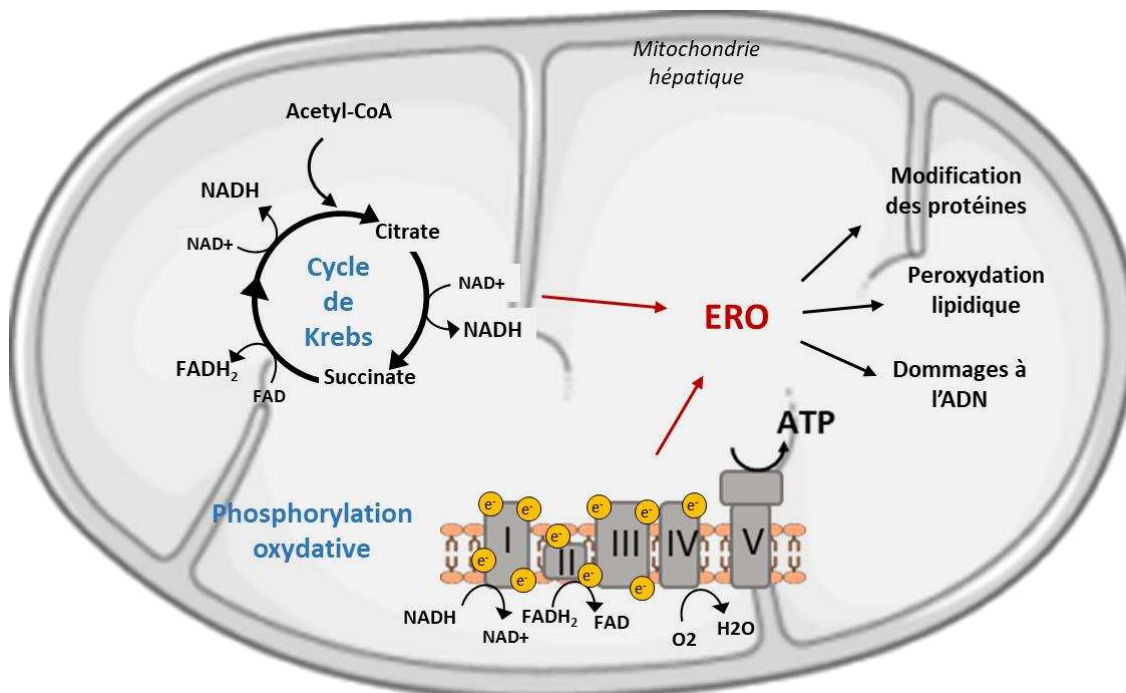


Figure 16 : Mécanismes de production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) au cours du stress oxydant et principaux effets (Figure adaptée de Hughey et al., 2022).

3. Effet du stress oxydant dans les NAFLD

La surproduction d'ERO provoque l'apparition d'oxydations irréversibles et délétères des macromolécules cellulaires : ADN, protéines et lipides (Figure 16). Ainsi, l'oxydation de l'ADN, évaluée par l'apparition des produits 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) ou 8-hydroxyguanine (8-OH-G) peut conduire à des cassures de brins d'ADN ou des modifications de bases. Si elles ne sont pas réparées par les systèmes de réparation de la cellule, elles peuvent induire des mutations ou l'activation de voie de signalisation induisant la mort cellulaire. Dans le contexte des NAFLD, des mutations ponctuelles et des niveaux accrus de 8-OH-dG ont été plus fréquemment trouvés dans la NASH que dans la stéatose simple (Chen et al., 2020). Dans le cas des protéines, leur oxydation peut entraîner une diminution ou une augmentation de leur activité enzymatique ou une susceptibilité à leur dégradation protéolytique accrue, ce qui peut également participer à des dysfonctions cellulaires et au NAFLD.

Enfin, concernant l'oxydation des lipides, la peroxydation lipidique, qui correspond à l'oxydation des AGPI par les ERO, entraîne la formation de produits hautement réactifs comme le 4-hydroxy-2-nonéal (4-HNE) et le malondialdéhyde (MDA). Ces produits qualifiés comme biomarqueurs du stress oxydant sont retrouvés augmentés chez les patients atteints de NASH en comparaison aux patients atteints de stéatose (Chen et al., 2020; Ore and Akinloye, 2019). De plus, les produits issus de la peroxydation lipidique sont capables de diffuser dans l'espace extracellulaire et d'activer les cellules de Kupffer, contribuant ainsi à l'inflammation (Liu et al., 2016). En outre, la présence de

phospholipides oxydés, a été montrée comme corrélée et augmentée dans la NASH humaine et murine. En effet, les phospholipides de la membrane mitochondriale, comme la cardiolipine, sont également sensibles aux attaques d'ERO. Leurs oxydations peuvent endommager la structure de la bicouche mitochondriale, la fluidité et la perméabilité de la membrane et ainsi potentialiser la fuite de protons et la libération du cytochrome c, détériorant davantage la fonction mitochondriale et induisant l'apoptose (Arroyave-Ospina et al., 2021; Z. Chen et al., 2020; Sun et al., 2020). De plus, les ERO et lipides oxydés contribuent à l'inflammation dans la NASH. Par exemple, les LDL oxydés sont reconnus par les cellules de Kupffer pro-inflammatoires et agissent comme médiateurs de l'inflammation dans la NASH en entraînant une libération accrue de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α (Arroyave-Ospina et al., 2021; Bieghs et al., 2012).

Enfin, cette surproduction d'ERO dans un environnement déjà enrichi en lipides, favorise donc la peroxydation lipidique et les dommages oxydatifs de l'ADN mitochondrial, diminuant davantage la fonction mitochondriale et réduisant ses capacités d'oxydation des AGL. Ce cercle vicieux exacerbe le dysfonctionnement mitochondrial et le stress oxydant. En parallèle, les ERO peuvent également amplifier les lésions hépatiques en activant les cellules étoilées, favorisant le développement de la fibrose, ou en endommageant les cellules épithéliales sinusoidales (Arroyave-Ospina et al., 2021; Svegliati-Baroni et al., 2001).

b. Impact de la lipotoxicité sur stress du réticulum endoplasmique

Le RE contribue aux fonctions cellulaires vitales par la synthèse, la maturation et le repliement des protéines, ainsi que par la synthèse des lipides et la régulation de l'homéostasie du calcium. La perturbation de l'un de ces processus déclenche un stress du RE. En réponse à cette perturbation physiologique du RE, une réponse intracellulaire adaptative se met en place, appelée réponse UPR (« Unfolded Protein Response »). L'UPR vise ainsi à rétablir l'homéostasie du RE et à favoriser la survie (Marra and Svegliati-Baroni, 2018). Cependant une activation prolongée de l'UPR favorise un stress du RE chronique à l'origine de la production d'ERO et de l'activation de voies apoptotiques menant au stress oxydant et à la mort cellulaire.

L'activation de la voie UPR et par conséquent le stress du RE joue un rôle majeur dans la pathogénèse des NAFLD (Puri et al., 2008). Des échantillons de biopsies hépatiques de patients atteints de NAFLD ont permis de démontrer l'activation de l'UPR, avec des degrés d'activation variable en fonction du stade de la maladie (Lebeaupin et al., 2018). Il a été largement décrit que la lipotoxicité, induite par la saturation en lipides dans la membrane du RE (leur lieu de synthèse) était un facteur d'activation de la réponse UPR. Par exemple, les AGS produit par la LDN dans le RE, peuvent s'incorporer dans les phospholipides de la membrane du RE, entraînant des modifications de la composition lipidique de la membrane et une libération calcique, à l'origine du stress du RE (Fu et al., 2012). Les céramides générées par la SMase seraient également capables d'induire un stress du RE par un mécanisme supposant une perturbation de l'homéostasie calcique (Hajduch et al., 2021). Ainsi l'augmentation des niveaux d'AGS, de céramides, de DAG et de

cholestérol libre au sein des hépatocytes a été décrite pour activer le stress du RE (Pardo et al., 2015).

D'un point de vue mécanistique, ces lipides sont capables d'activer les 3 principaux capteurs de stress situés dans le RE : **IRE1**, **PERK** et **ATF6**. Bien que ces voies déclenchent la réponse UPR, elles régulent également l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides (SREBP-1c, C/EBP et PPAR γ), dans l'inflammation (Nf- κ b, JNK) et dans l'apoptose cellulaire (CHOP, PUMA, Bax) (Figure 15). Ainsi, l'activation de ces voies contribuent favorisent non seulement le développement de la stéatose, mais aussi la progression pathologique vers la NASH. (Cazanave et al., 2010; Rutkowski et al., 2008; Urano et al., 2000; Ye et al., 2000; Zheng et al., 2010).

c. Impact de la lipotoxicité sur la mort des hépatocytes : la lipoapoptose

Même si plusieurs types de mort cellulaires ont été décrits, l'apoptose serait la principale voie impliquée dans la NASH. Cette mort cellulaire peut être induite par la voie extrinsèque de l'apoptose, qui est déclenchée par l'activation des récepteurs de morts tels que FasR, TNFR et TRAILR, et qui, une fois stimulé, activent la caspase 8 initiatrice et les caspases effectrices (3 et 7) (Hirsova et al., 2016a; Rada et al., 2020) (Figure 17). L'apoptose peut également être induite par la voie intrinsèque, qui est étroitement liée aux dysfonctions subcellulaires telles que le stress du RE et les dysfonctions mitochondriales. Ces deux cascades de signalisation pro-apoptotique convergent toutes deux vers la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale, qui permet la libération du cytochrome c et l'activation des caspases effectrices 3 et 7, déclenchant alors la fragmentation et la condensation de l'ADN et *in fine* la mort cellulaire.

Dans ce contexte de NAFLD, de nombreuses études ont démontré que le résultat final de la lipotoxicité induite par les lipides en excès était la mort cellulaire par apoptose. Ce phénomène est appelé lipoapoptose (apoptose induite par les lipides). C'est le cas par exemple des AGS, et en particulier du palmitate accumulé dans la NASH, qui a été décrit comme pouvant induire la mort cellulaire en activant à la fois les voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose dans les hépatocytes (Mota et al., 2016; Rada et al., 2020). En effet, un traitement au palmitate augmente à la fois l'expression à la membrane et l'activation de TRAIL-R2 conduisant à la mort cellulaire dépendante de la caspase 8 (Cazanave et al., 2011a) ; mais également l'expression des protéines pro-apoptotiques (comme Bim et PUMA) (Barreyro et al., 2007; Cazanave et al., 2009). Le palmitate peut, en outre, induire l'apoptose de manière indirecte *via* des intermédiaires lipidiques comme les céramides, impliquant un stress du RE ou l'activation de la voie de signalisation JNK (Listenberger et al., 2001; Mota et al., 2016). L'accumulation de céramides peut également être impliquée dans la mort des hépatocytes par apoptose. Ces espèces lipidiques forment de larges canaux dans la membrane externe mitochondriale, augmentant la perméabilité des membranes mitochondriales, ce qui conduit à la libération du cytochrome c et à l'activation des caspases (Colombini, 2010; Hajduch et al., 2021). De plus, les céramides peuvent induire l'apoptose par l'activation des récepteurs de mort (Reinehr et al., 2008), ou en agissant sur l'activité de la protéine pro-apoptotique Bax (Yu and Wang, 2022). L'accumulation de ces lipides toxiques déclenche également une activation soutenue de la kinase JNK, ce qui a pour conséquence une

régulation à la hausse de l'activation des protéines pro-apoptotiques (PUMA, Bim et Bax), conduisant à l'activation des caspases et à un dysfonctionnement mitochondrial, aboutissant finalement à la mort cellulaire (Cazanave et al., 2009; Malhi et al., 2006).

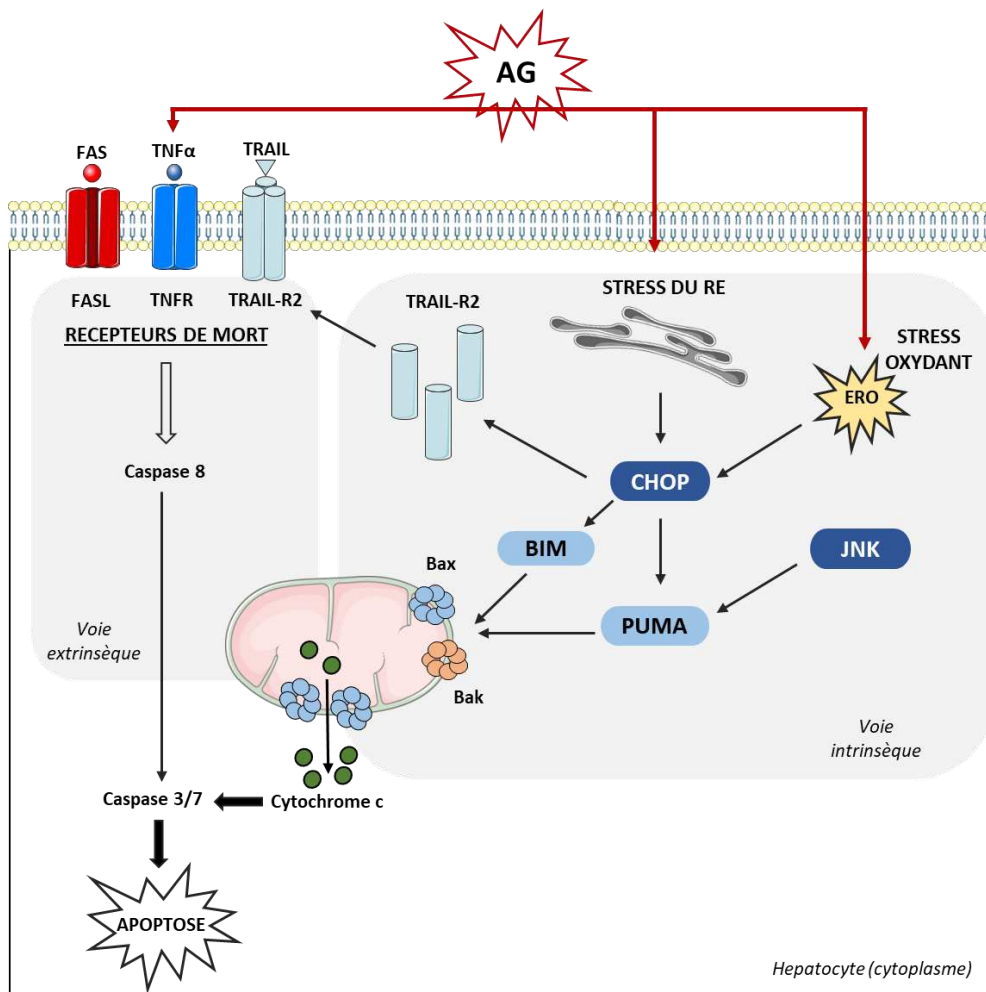


Figure 17 : Effets médiés par les lipides sur la mort cellulaire : la lipoapoptose. Les AG lipotoxiques sont capables d'activer la voie extrinsèque (dépendante des récepteurs de morts : FASL, TNFR, TRAILR) ou intrinsèque (dépendante des dysfonctions subcellulaires telles que le stress du RE ou le stress oxydant). Ces deux voies mènent à la perméabilisation de la membrane mitochondriale, au relargage du cytochrome c et à l'activation des caspases, déclenchant la mort cellulaire.

S'il a largement été décrit que les AGS, comme le palmitate, induisent l'apoptose, il est également reconnu que les AGI antagonisent les effets pro-apoptotiques des AGS. Ainsi SCD1 joue un rôle central en convertissant les AGS en AGMI et en protégeant de la lipoapoptose (Cazanave and Gores, 2010). De plus, les AGPI tels que l'oléate et la palmitoléate inhibent l'apoptose induite par le palmitate en réduisant les niveaux des protéines pro-apoptotiques Bim et PUMA, probablement en diminuant le stress du RE (Akazawa et al., 2010).

d. Impact de la lipotoxicité sur l'inflammation

Les hépatocytes endommagés pendant la lipotoxicité libèrent des cytokines, des chimiokines, des vésicules extracellulaires et d'autres molécules intracellulaires. Celles-ci agissent comme médiateurs pro-inflammatoires, pouvant activer les cellules de Kupffer, acteur majeur de l'inflammation, ainsi que le recrutement des cellules immunitaires favorisant l'inflammation chronique (Hernández et al., 2020; Rada et al., 2020). De plus, les lipides hépatiques peuvent eux-mêmes exercer des propriétés pro-inflammatoires en interagissant avec les récepteurs de type TLR et activer les différentes voies de signalisation en aval. Dans ce sens, la lipotoxicité est responsable de l'inflammation au cours des NAFLD et accélère la progression de la maladie.

Au cours de la NASH, l'effet pro-inflammatoire des différents AG lipotoxiques (céramides, CL, DAG, AGS) a été décrit. Par exemple, les AGS sont capables d'interagir directement avec les récepteurs situés sur les hépatocytes et les cellules de Kupffer contribuant à l'inflammation (Deng et al., 2022). Ainsi, le palmitate peut interagir avec les récepteurs TLR2 et TLR4 des cellules de Kupffer activant la voie de signalisation Nf- κ B pro-inflammatoire, la polarisation des macrophages pro-inflammatoires de type M1 et l'élévation des niveaux d'IL-1 β , d'IL6, de TNF α , de CCL2 et de MCP-1 (Boden et al., 2005; Kazankov et al., 2019; Kim et al., 2017; Tang et al., 2013; Wu et al., 2020). Les cytokines et chimiokines sécrétées déclenchent à leur tour le recrutement d'autres cellules immunitaires, comme les monocytes, macrophages ou neutrophiles, exacerbant l'environnement inflammatoire hépatique (Kazankov et al., 2019; Rensen et al., 2009).

Certains AG dont les AGS, les céramides, les DAG, ou encore la cristaux de cholestérol dans les GL des hépatocytes, sont capables d'activer la voie de l'inflammasome NLRP3 au sein des hépatocytes induisant l'activation de la caspase 1 et la stimulation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Deng et al., 2022; Vandanmagsar et al., 2011). Ce phénomène a pu être observé dans des modèles d'hépatocytes traités aux AGS, entraînant la pyroptose et la libération de particules de l'inflammasome associé à une activation subséquente des cellules étoilées et le développement de la fibrose hépatique (Gaul et al., 2021). Les AGS et les céramides ont également été décrits pour activer les cellules de Kupffer par le biais de l'inflammasome (Hughey et al., 2022; Vandanmagsar et al., 2011).

L'inflammation peut aussi conduire à l'accumulation de céramides par un mécanisme dépendant du TLR. En effet, le TNF α et l'IL-1, sécrétés en réponse à l'activation du TLR4 par les AGS, sont impliqués dans l'accumulation des céramides en augmentant l'expression de plusieurs enzymes impliquées dans la synthèse des céramides, dont la SMAse, la SPT et les CerS (Chang et al., 2011; Holland and Summers, 2008; Pagadala et al., 2012). D'autre part, les céramides peuvent aussi aggraver l'inflammation du foie, puisque l'inhibition de leur synthèse entraîne l'inactivation de JNK, impliquée dans les réponses inflammatoires et la régulation de l'apoptose (Jiang et al., 2019). La voie inflammatoire Nf- κ B est à la fois impliquée dans la synthèse des céramides et activée par les céramides, soutenant le fait que les céramides peuvent à la fois être la cause et la conséquence de l'inflammation (Régnier et al., 2019). Enfin, la libération de vésicules extracellulaires enrichies en céramides à partir des hépatocytes, active davantage les macrophages et accélère la progression de la NASH (Kakazu et al., 2016).

e. Impact de la lipotoxicité sur le remodelage membranaire

1. La fluidité membranaire

Les membranes plasmiques sont des bicouches lipidiques fluides composées de glycérosphospholipides majoritairement, de sphingolipides, de cholestérol. La fluidité membranaire représente la facilité de mouvement au sein de la membrane ; elle est due essentiellement aux mouvements des phospholipides et est régie par les chaînes radicalaires d'AG des phospholipides. En effet, la fluidité membranaire augmente généralement avec la proportion d'AGI et le degré d'insaturation. A l'inverse, les AGS et le cholestérol favorisent la formation de structures plus ordonnées, plus compactes et plus rigides. Les propriétés de fluidité de la membrane régulent diverses fonctions cellulaires associées à la membrane, la transduction des signaux, le transport bidirectionnel et dynamique de diverses molécules et la communication intra et extracellulaire (Wang and Tontonoz, 2019).

Au sein de ces membranes, les "radeaux lipidiques" sont des microdomaines membranaires spécifiques enrichis en cholestérol, en sphingolipides et en phospholipides à AGS (Sezgin et al., 2017). Ces microdomaines, à la structure plus rigide, mais dynamique, servent de plateformes de signalisation cellulaire par l'exclusion ou le recrutement de protéines par exemple (Anderson and Jacobson, 2002).

2. Le remodelage membranaire

Le remodelage membranaire est défini comme une altération de la fluidité membranaire et/ou des caractéristiques physico-chimiques de la membrane ou des radeaux lipidiques. Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine d'un remodelage membranaire, comme par exemple l'exposition aux xénobiotiques, démontré au sein de notre équipe. Celui-ci peut être induit par effet direct, c'est par exemple le cas de l'Ethanol qui a été décrit pour induire une fluidification des membranes (Nourissat et al., 2008), ou par effet indirect en modifiant la composition lipidique des membranes ; c'est le cas par exemple du B[a]P qui inhibe l'HMGCoA-réductase, appauvrissant les membranes en cholestérol (Tekpli et al., 2010). Des modifications de la composition des phospholipides membranaires, en particulier le remodelage de la PC (phospholipide le plus abondant des membranes) par les enzymes lysophosphatidylcholine acyltransférases (LPCAT), jouent également un rôle dans le métabolisme des lipides, l'homéostasie cellulaire et le remodelage des membranes cellulaires (Wang and Tontonoz, 2019).

3. Effets des lipides sur la fluidité membranaire dans les NAFLD

Au cours des NAFLD, le remodelage membranaire a été proposé comme pouvant contribuer à la pathogénèse de la maladie (Hall et al., 2017; Imran et al., 2018).

Par exemple, l'activation et le recrutement du TLR4, au sein des radeaux lipidiques, est favorisé par un enrichissement de la membrane en AGS et en cholestérol, phénomène contribuant au déclenchement des voies inflammatoires (Das et al., 2015; Gianfrancesco et al., 2018). De précédentes études menées au laboratoire sur différents xénobiotiques, ont permis de mettre en

évidence que le remodelage membranaire, impliquant une agrégation des radeaux lipidiques, était à l'origine de l'induction de la mort cellulaire, *via* le recrutement de récepteurs de mort (Rebillard et al., 2007) ou en modulant le stress oxydant (Collin et al., 2014; Nourissat et al., 2008). Les céramides, dont la synthèse est augmentée dans les NAFLD, jouent également un rôle dans le remodelage membranaire. En effet, notre équipe a montré que l'augmentation de la teneur en céramides, induite par une translocation de la SMase au sein de ces radeaux, conduisaient à un regroupement des radeaux lipidiques, impliqué dans la mort cellulaire (Rebillard et al., 2007). Les ERO et la peroxydation lipidique peuvent également participer à l'agrégation des radeaux lipidiques (Nourissat et al., 2008) .

La déstructuration de ces radeaux lipidiques, provoquée par une diminution de la teneur en cholestérol, serait également impliquée dans le déclenchement de l'apoptose induite chimiquement. Cela a été démontré par la translocation et l'activation de protéines spécifiques en dehors de ces radeaux, aboutissant à un stress oxydant, à des altérations mitochondriales et finalement à la mort cellulaire (Tekpli et al., 2010).

Au cours de la progression de la NAFLD, l'expression hépatique de gènes associés au remodelage membranaire, tels que la LPCAT2, la LPCAT3 (lysophosphatidylcholine acyltransférase 2 et 3) et la PLA2 (phospholipase A2), a été décrite comme étant augmentée. La LPCAT2 est responsable de la synthèse de la phosphatidylcholine (PC), un composant important de la membrane cellulaire, tandis que la PLA2 clive la PC en acide arachidonique (AA). Ce remodelage des phospholipides membranaires génère un excès d'AA et de ses métabolites eicosanoïdes, favorisant l'inflammation et un stress oxydant (Hall et al., 2017). La LPCAT3, régulé par LXR (Rong et al., 2013) et les PPARs (Singh and Liu, 2017), est impliquée dans l'incorporation des AGPI dans les glycophospholipides membranaires et également dans la sécrétion des VLDL, dans l'induction du facteur SREBP-1c et dans l'adipogénèse (Wang and Tontonoz, 2019).

L'obésité et les désordres métaboliques ont été associés à une diminution de la fluidité membranaire avec un enrichissement en AGS (Gianfrancesco et al., 2018). L'augmentation du cholestérol dans la NASH peut également expliquer cette diminution de la fluidité membranaire, puisque celui-ci est connu pour augmenter la rigidité de la membrane. En conséquence, cette rigidité peut perturber la signalisation des protéines membranaires. Par exemple, la fonction du 2-oxoglutarate, transporteur de glutathion, a été montrée comme altérée suite à l'accumulation de cholestérol dans les membranes mitochondriales. Cette altération entraîne une diminution du glutathion mitochondrial favorisant ainsi la production d'ERO dans cet organite, la peroxydation lipidique et la nécrose des hépatocytes (Baulies et al., 2017).

VI. Autres mécanismes impliqués dans la pathogénèse des NAFLD

Les NAFLD sont des pathologies multifactorielles où d'autres facteurs, que ceux décrits précédemment, peuvent être impliqués dans la pathogénèse ; c'est le cas notamment du microbiote intestinal et des facteurs épigénétiques.

i. Rôle du microbiote intestinal dans la progression des NAFLD

Le foie et l'intestin sont étroitement connectés, puisque le foie reçoit 70% du débit sanguin intestinal *via* la veine porte. Le sang, ainsi apporté au foie, est composé de nutriments et d'acides biliaires mais également de bactéries et de métabolites bactériens provenant du microbiote intestinal (Kolodziejczyk et al., 2019). Ce microbiote intestinal correspond à l'écosystème bactérien, composé de grands phyla (dont les principaux sont les Bacteroidètes et Firmicutes), présents dans la lumière intestinale. La composition et les fonctions de ce microbiote sont déterminées par une variété de facteurs notamment le régime alimentaire. Le microbiote intestinal est, entre autres, capable d'affecter les métabolismes hépatiques des glucides et des lipides et d'influencer l'équilibre dans le foie entre les effecteurs pro-inflammatoires et anti-inflammatoires, ce qui affecte directement la NAFLD et sa progression vers la NASH. Il est maintenant reconnu que la perturbation du microbiote intestinal impliquant la dysbiose intestinale et une modification de la perméabilité intestinale, participent à la pathogenèse des NAFLD (Kolodziejczyk et al., 2019) (Figure 18).

a. La dysbiose intestinale dans les NAFLD

Ces dernières années, l'intérêt grandissant pour le microbiote intestinal et ses différentes fonctions vitales dans l'organisme, a également souligné que son altération, appelée dysbiose, serait impliquée dans les NAFLD (Khan et al., 2021; Kolodziejczyk et al., 2019; Porras et al., 2018). Plusieurs expériences basées sur la manipulation du microbiote fournissent en effet des preuves sur le rôle du microbiote intestinal dans l'obésité et la NAFLD. Ainsi, des souris exemptes de microbiote et nourries avec un régime riche en graisses, présentaient des niveaux inférieurs de lipides hépatiques par rapport à des souris avec microbiote (Rabot et al., 2010). Ces études démontrent que le microbiote intestinal participe donc à l'accumulation hépatique de lipides provenant de l'alimentation en synthétisant des facteurs trophiques qui aident à l'absorption des nutriments. Ainsi plusieurs études chez la souris et l'homme ont démontré que non seulement le microbiote avait un rôle dans l'induction et la progression de la NAFLD (Bäckhed et al., 2004; Chiu et al., 2017; Le Roy et al., 2013), mais que la NAFLD était également associée à des modifications de la composition bactérienne du microbiote intestinal (Saltzman et al., 2018). En effet, des différences de compositions bactériennes intestinales ont été identifiées entre les personnes atteintes de stéatose hépatique et les personnes atteintes de NASH (par exemple une diminution des bactéries Firmicutes et une augmentation des Bactéroïdes), témoignant du rôle de la dysbiose dans l'évolution pathologique de la stéatose hépatique vers la NASH (Boursier et al., 2016; Khan et al., 2021; Zhu et al., 2013).

b. Rôle de la dysbiose dans l'évolution pathologique des NAFLD

Un certain nombre de mécanismes potentiels peuvent découler de la perturbation du microbiote intestinal dans les NAFLD, notamment une altération de la perméabilité intestinale, le développement d'une inflammation et la production de métabolites bactériens toxiques, conduisant à une aggravation de la maladie.

Chez les patients atteints de NAFLD, plusieurs études relèvent une augmentation de la perméabilité intestinale (Luther et al., 2015). Elle serait due à une perturbation des jonctions serrées entre les cellules endothéliales intestinales, entraînant une augmentation d'absorption des nutriments ainsi que la translocation des bactéries et de leurs produits dérivés vers le foie. Ainsi, des souris présentant un dysfonctionnement de la barrière intestinale, nourries avec un régime riche en graisse, développent une NASH plus sévère que des souris témoins (Rahman et al., 2016). La perturbation des jonctions serrées de l'intestin pourrait en partie être due à l'augmentation de la production d'éthanol endogène et d'acétaldéhyde, produites par le microbiote intestinale (Mir et al., 2016).

Par ailleurs, la pathogénèse des NAFLD peut être médiée par l'augmentation de métabolites bactériens toxiques. Par exemple, les AG à chaîne courte (AGCC) (acétate, butyrate, propionate...) sont les principaux produits libérés après digestion des glucides complexes par les bactéries intestinales (Zhu et al., 2015). Chez l'homme, une surproduction d'AGCC, produits par le microbiote intestinal, a été observée chez des personnes obèses, et a suggéré que la dysbiose intestinale pourrait contribuer au développement de la stéatose en augmentant l'apport d'AGCC au niveau foie (Moschen et al., 2013). Les AGCC activent les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR), en particulier les GPCR41 et GPCR43, qui régulent la β -oxydation des AG et la sensibilité à l'insuline, favorisant ainsi l'apparition et la progression de la NAFLD (Armstrong et al., 2016; Marchesi et al., 2016; Zhou et al., 2018). L'augmentation de l'éthanol endogène, dont la source principale est la flore bactérienne du microbiote, est observée dans les populations atteintes de NAFLD et est également impliquée dans la pathogénèse (Michail et al., 2015; Volynets et al., 2012; Zhu et al., 2013). En effet, l'éthanol, outre sa participation à l'augmentation de la perméabilité intestinale, contribuerait également au développement des atteintes hépatiques, et ce, en exacerbant le stress oxydant et l'inflammation hépatique (Kolodziejczyk et al., 2019).

Une dysbiose intestinale peut également entraîner un métabolisme accru de la choline exogène et endogène, d'où une carence en choline, phospholipide essentiel à l'assemblage des lipoprotéines VLDL. Cette carence en choline induite par des modifications du microbiote intestinal peut ainsi altérer l'export des lipides, favorisant la stéatose hépatique et la NASH (Moschen et al., 2013). De plus, les régimes déficients en choline sont couramment utilisés pour générer des modèles NASH dans les études *in vivo*, témoignant de son importance en tant que nutriment dans l'alimentation et de son rôle dans la NAFLD.

Enfin, le microbiote intestinal est une source de produits bactériens, aussi appelés endotoxines, qui, en raison de la perturbation de la barrière intestinale sont délivrés au foie par la veine porte. Parmi ces produits, on retrouve notamment des lipopolysaccharides (LPS), de l'ADN bactérien et des peptidoglycanes. L'augmentation des taux sériques de LPS, composant de la paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif, et de la perméabilité intestinale ont été associée au développement de la NAFLD (Farhadi et al., 2008). Le LPS participe à l'évolution des NAFLD en induisant une inflammation *via* son interaction avec le récepteur TLR4 exprimé par les cellules hépatiques (hépatocytes, cellules de Kupffer, cellules étoilées). Enfin, il a été démontré que le palmitate induisait une inflammation et une infiltration de macrophages dans le foie, et que ces lésions

hépatiques étaient exacerbées par une endotoxine dérivée de l'intestin (Khan et al., 2021; Ogawa et al., 2018).

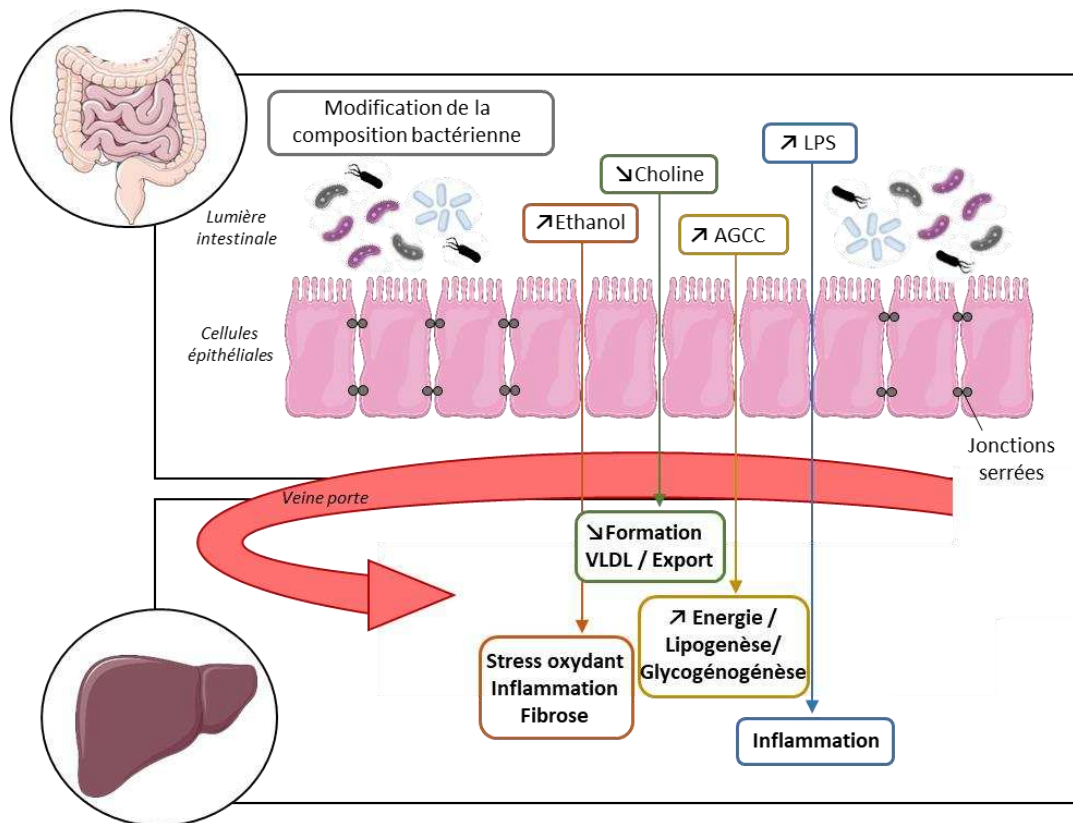


Figure 18 : Rôle de la dysbiose intestinale dans la pathogénèse des NAFLD. La modification de la composition bactérienne entraîne une dysbiose responsable de la production accrue d'éthanol intestinal, qui est toxique pour le foie et peut endommager la perméabilité intestinale en détruisant les jonctions serrées. Le LPS dérivé du microbiote intestinal peut se lier aux récepteurs TLR hépatiques et activer les voies pro-inflammatoires. Le LPS, tout comme l'éthanol, favorise le développement de l'inflammation et de la fibrose hépatique. Le microbiote est responsable d'une augmentation du métabolisme de la choline entraînant une carence en choline qui empêche la formation et l'excrétion des VLDL, d'où l'accumulation de TG dans le foie. Enfin, un excès d'AG à chaîne courte, substrat de la glycogénogénèse et de la synthèse de lipides, favorise l'accumulation d'AGL hépatiques.

ii. Facteurs épigénétiques : méthylation de l'ADN, miR

Les modifications épigénétiques sont des phénomènes réversibles et héréditaires, qui affectent les gènes sans altérer les séquences d'ADN. Il existe maintenant un nombre croissant de preuves décrivant les modifications épigénétiques comme acteur crucial dans la pathogénèse et la progression des NAFLD (Jonas and Schürmann, 2020; Juanola et al., 2021). Il a, par exemple, été décrit que la nutrition prénatale, l'obésité maternelle, ou l'exposition aux toxiques environnementaux durant le développement fœtal, pouvaient entraîner des modifications épigénétiques transmises à l'enfant. Ces modulations contribuent à la susceptibilité post-natale d'un individu au développement de NAFLD et prédisposent même à des formes plus sévères de la maladie (Bruce et al., 2009; Jonas and Schürmann, 2020).

Ces modifications épigénétiques peuvent être liées à des altérations de la méthylation de l'ADN, des modifications des protéines histones, induisant un remodelage de la chromatine, ainsi que des variations de l'expression des micro-ARN. Les modifications épigénétiques sont connues pour être impliquées dans le métabolisme des lipides hépatiques, la résistance à l'insuline, le dysfonctionnement mitochondrial, le stress du RE, le stress oxydant et dans la libération de cytokines pro-inflammatoires, qui sont tous impliqués dans le développement et la progression de la NAFLD (Noureddin and Sanyal, 2018; Pirola et al., 2013; Podrini et al., 2013).

Par exemple, plusieurs études récentes ont démontré que la dérégulation du métabolisme des lipides lors des NAFLD, serait associée à la dérégulation de nombreux **micro-ARN (miR)** hépatiques (Gjorgjieva et al., 2019). Les miR sont de petites molécules d'ARN (~ 22 nucléotides) non codantes qui régulent la dégradation ou la traduction de l'ARN messenger, modulant ainsi l'expression de réseaux de gènes. Ces miR peuvent réguler différentes voies biologiques impliquées dans la pathogénèse des NAFLD telles que l'absorption des lipides, la LDN, l'oxydation et l'export des lipides, l'apoptose ou encore la fibrose (Vienberg et al., 2017). Ainsi parmi les miR, l'augmentation des niveaux circulants de miR-122, miR hépatique le plus abondamment exprimé et le plus étudié, est associée à la pathogénèse des NAFLD et corrélée à la sévérité de la maladie (Becker et al., 2015; Pirola et al., 2015). Son expression est associée à une augmentation de la lipogenèse, en ciblant les gènes ACC2 et SREBP, à une altération de la sécrétion des lipides et à l'induction des voies fibrotiques (Cheung et al., 2008; Csak et al., 2015; Hsu et al., 2012). Même si les mécanismes ne sont pas encore totalement élucidés, d'autres miR seraient impliqués dans la pathogénèse des NAFLD, comme le miR-21, le miR-34a, les miR-33a/2, et ce, en régulant la lipogenèse hépatique (Hochreuter et al., 2022; Torres et al., 2018; Wu et al., 2016; Xu et al., 2015). Le miR-21 serait aussi impliqué dans l'inflammation et la fibrose et participerait au développement de la NASH en inhibant l'expression du récepteur PPAR α (Lee et al., 2017; Loyer et al., 2016). De plus, les miR circulants sont également proposés comme biomarqueurs potentiels dans le diagnostic non invasif des NAFLD (Liu et al., 2018).

Chapitre II : Les perturbateurs endocriniens et les TAFLD

Dans nos sociétés modernes, l'augmentation des apports énergétiques liés à l'alimentation et à la sédentarité ne suffisent pas à elles-seules à expliquer l'élévation de la prévalence des NAFLD. Ces dernières décennies, de plus en plus d'études mettent en évidence l'impact d'une exposition aux toxiques environnementaux dans la survenue et le développement des maladies métaboliques comme l'obésité et les NAFLD (Deierlein et al., 2017; Foulds et al., 2017; Heindel et al., 2022, 2017; Le Magueresse-Battistoni et al., 2017). En particulier, la classe des perturbateurs endocriniens attire l'attention par ses capacités à perturber à la fois le système endocrinien et les fonctions métaboliques.

De nombreux polluants de l'environnement ont ainsi été décrits comme « obésogènes » (participant au développement de l'obésité) ou à titre plus large, comme perturbateurs métaboliques (altérant les fonctions métaboliques dont le métabolisme lipidique), et peuvent donc par conséquent jouer un rôle dans les NAFLD.

I. Les NAFLD et contaminants environnementaux : TAFLD

Ces dernières décennies, en raison de la forte croissance industrielle, de très grandes quantités de substances chimiques ont été produites et utilisées. Malgré leur utilité, il est apparu qu'ils contribuaient également à la pollution environnementale et au développement de multiples pathologies.

Face à ces polluants, le foie constitue la première ligne de défense du corps du fait de son rôle central dans la détoxification des xénobiotiques (Wahlang et al., 2013). Il représente donc un organe cible pour les différents toxiques présents dans l'environnement auxquels nous sommes exposés. Par conséquent, son exposition continue à de nombreuses substances toxiques, même à de faibles concentrations, peut altérer son fonctionnement. Dans ce sens, 33% des 677 produits chimiques industriels les plus couramment utilisés en milieu professionnel auraient un effet nocif pour le foie entraînant une hépatotoxicité (Cave et al., 2011). Cependant, en ciblant le foie dont le rôle majeur est également de contrôler l'homéostasie des lipides, ces molécules peuvent induire des perturbations métaboliques.

De plus en plus d'études mettent ainsi en évidence un lien entre l'exposition à certains polluants environnementaux et l'apparition de NAFLD. Par exemple, en 2015, une étude menée aux Etats-Unis sur le modèle rongeur a identifié plus de 120 toxiques environnementaux pouvant être potentiellement impliqués dans la survenue des NAFLD et la NASH. Parmi ces toxiques, la majorité était des pesticides, mais on trouvait également des solvants, des plastifiants, des additifs alimentaires, des métaux lourds, des PCBs, des dioxines comme pouvant induire une NAFLD (Al-Eryani et al., 2015). Des corrélations entre l'exposition à des polluants et l'apparition de NAFLD chez l'Homme ont également été démontrées (Foulds et al., 2017). L'une des premières, portait

sur des travailleurs exposés au polychlorure de vinyle qui présentaient des biopsies hépatiques ressemblant à celles de sujets atteints de NASH, en absence d'obésité et de consommation d'alcool (Cave et al., 2010b). Dans ce contexte, le terme de TAFLD et de TASH (Toxicant Associated Fatty Liver Disease [TAFLD], Toxicant Associated Steatohepatitis [TASH]) a été proposé par Matthew C.Cave et son équipe, pour décrire les NAFLD et NASH induites par des toxiques (Wahlang et al., 2013).

Depuis, de nombreuses études menées sur des modèles *in vivo* ou chez l'Homme ont identifiés un impact de différentes classes de toxiques environnementaux sur le développement ou l'aggravation de la stéatose et/ou de la NASH. En plus d'induire une stéatose, certaines molécules sont également susceptibles de jouer un rôle dans la transition de la stéatose vers la stéatohépatite. Dans ce contexte, il est aussi considéré que la présence d'une stéatose préalablement établie sensibilise le foie aux agressions causées par les toxiques environnementaux (Heindel et al., 2017, 2015; Wahlang et al., 2013).

Parmi ces polluants environnementaux, on trouve une sous-classe de molécules, les perturbateurs endocriniens (PE), à laquelle l'homme est exposé de manière ubiquitaire dans sa vie quotidienne, qui est tout aussi préoccupante du fait de leur implication, au même titre que les autres toxiques, dans les NAFLD.

II. Origine des PE et exposition humaine

La problématique des PE a émergé dans les années 1960, après la découverte par des écologistes que des phénomènes affectant la survie à long terme de diverses espèces animales (tels que, la diminution de la reproduction chez des oiseaux, l'apparition de troubles génitaux chez des alligators, ou encore des modifications de sexe chez les poissons) pouvaient être attribués à des polluants de l'environnement. Ainsi, l'effet de ces molécules sur les écosystèmes environnementaux a alerté bon nombre de chercheurs et la préoccupation concernant ces molécules toxiques de l'environnement n'a fait qu'augmenter, car en plus d'affecter la faune, celles-ci perturberaient le système endocrinien des êtres humains. Par la suite, une prise de conscience a lieu dans les années 1990, où le terme de "perturbateurs endocriniens" est proposé à la conférence de Wingspread. L'organisation mondiale de la santé (OMS) a, depuis, défini un perturbateur endocrinien comme « **une substance ou un mélange de substances exogène(s), qui altère les fonctions du système endocrinien et, de ce fait, induit des effets néfastes dans un organisme intact, chez sa progéniture ou au sein de (sous)-populations** ». Un PE peut agir de différentes manières : il peut avoir un effet agoniste ou antagoniste en se fixant de la même manière qu'une hormone naturelle sur son récepteur et soit amplifier sa réponse de base, soit bloquer son action ; il peut aussi modifier la dégradation ou la production d'une hormone ou de son récepteur, ainsi qu'altérer son transport (La Merrill et al., 2020; Yang et al., 2015). Ainsi, en interférant avec la signalisation hormonale physiologique du système endocrinien, ils perturbent l'homéostasie et entraînent divers effets délétères sur la santé (Preda et al., 2012).

Les PE représentent un groupe hétérogène de substances qui peuvent être d'origine naturelle (phytoœstrogènes) ou synthétiques (contraceptifs, hormones de synthèse, médicaments, produits phytosanitaires...). Parmi ces derniers, la plupart proviennent des industries agrochimiques (pesticides, plastiques, dioxine) et de leurs rejets. Différentes classes de PE peuvent être citées, comme les polluants atmosphériques issus de la combustion tels que les dioxines (TCDD et PCDD/F) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Benzo[a]pyrène); les plastifiants tels que les phtalates (DBP, DEHP) et les bisphénols; les produits chimiques industriels, notamment les retardateurs de flammes; les composés perfluorés (PFOA, PFOS); les polychlorobiphényles (PCB 126, PCB 153, Arochlor); les métaux lourds (Arsenic, Cadmium); les pesticides (Atrazine, DDT); les conservateurs comme les parabènes (Tableau 3) (Cave et al., 2016; Kabir et al., 2015). Parmi ces substances, certaines sont classées cancérigènes, mutagènes ou reprotoxiques. Au cours des dernières décennies, la liste des substances classées comme perturbateurs endocriniens s'est considérablement allongée, puisqu'il est estimé que sur les milliers de produits manufacturés, environ 1 millier possède des propriétés de perturbation endocrinienne.

Tableau 3 : Les différentes familles de PE selon leurs principaux usages/sources de contamination

Famille chimique	Usage/sources de contamination	Exemple
Composés phénoliques	Plastiques (emballages alimentaires, jouets), Désinfectants, cosmétiques, agents anti-microbiens conservateurs	Bisphénols A et substituts, Parabènes
Phtalates	Emballages alimentaires, jouets, revêtements, tubulures médicales, cosmétiques, parfums	Dibutyl phtalate (DBP), Di(2-ethylhexyl) phtalate (DEHP)
Composés perfluorés	Revêtement anti-tâche, hydrofuge, anti-graisse des canapés, textiles, ustensiles de cuisine	Acide perfluorooctanoïque (PFOA), Acide perfluorooctanesulfonique (PFOS)
Pesticides/Insecticides	Agriculture, nettoyage urbain, pollution rémanente	<u>Anciens pesticides</u> : DDT, Dieldrine, chlordane, chlordécone <u>Autres</u> : Atrazine, Lindane, glyphosate
Métaux	Exploitation minière, combustion, incinération des déchets, présents dans les sols et l'air	Arsenic, Cadmium, Mercure
Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)	Constituants naturels du charbon et du pétrole, ou qui proviennent de la combustion incomplète de matières organiques telles que les carburants, le bois, le tabac, les aliments (source anthropique et naturelle)	Benzo[a]-pyrène, Dibenzo[a,h]anthracène, Benzo[e]pyrène, etc
Retardateurs de flammes	Mousses pour mobilier, tapis, vêtements ; équipements électroniques	polybromodiphényléthers (PBDE), Tétrabromobisphénol A (TBBPA), Polybromobiphényles (PBB), Hexabromocyclododécane (HBCD)
Polychlorobiphényles (PCB)	Plastifiants dans les résines, fluides dans les transformateurs électriques, lubrifiants, adhésifs, peintures, particules dans l'air et l'alimentation	PCB 126, PCB 153, Arochlor (mélange de PCB)
Organoétains	Biocide dans les peintures marines, fongicide, stabilisant PVC	Tributyltin (TBT)
Dioxine	Sous-produits du traitement des métaux, d'incinération, de la production des pesticides	TCDD, PCDD, PCDF

Dans l'environnement, ces substances sont présentes dans l'air (*via* la pollution atmosphérique), les sols (*via* l'agriculture), et l'eau (*via* le traitement des eaux usées, le ruissellement agricole et industriel), et peuvent persister plusieurs années après leur production, du fait d'une demi-vie très longue. De plus, certains PE sont classés en tant que « polluants organiques persistants » (POP) en raison de leur caractère hautement lipophile et donc de leur forte capacité à résister à la dégradation environnementale. Par conséquent, ils sont capables de s'accumuler dans les tissus et organes riches en graisses, notamment dans le tissu adipeux, chez l'Homme et l'animal, et peuvent ainsi contaminer une grande partie de la chaîne alimentaire (viande, poisson, produits laitiers) (Polyzos et al., 2012). Leur profil toxique est particulièrement alarmant, en particulier chez les sujets obèses, qui présentent une plus grande quantité de graisse viscérale et donc un site de dépôt plus important où les PE peuvent se bioaccumuler (La Merrill et al., 2013). De plus, il a été montré que ces PE séquestrés dans le tissu adipeux, peuvent être progressivement relargués dans la circulation sanguine entraînant une exposition interne chronique (Lee et al., 2017). En outre, les POP sont semi-volatiles et peuvent donc se propager sur de longues distances et se disperser dans l'atmosphère (Hung et al., 2016). Bien que depuis 2001, la Convention de Stockholm réglemente la production et l'utilisation des POP en raison de leurs effets néfastes graves sur l'Homme et les écosystèmes (Kassotis et al., 2020), leur capacité à se bioaccumuler entraîne une contamination encore actuelle dans l'environnement, chez l'animal et chez l'Homme.

Concernant les produits chimiques non persistants, même s'ils sont moins lipophiles et donc se ne bioaccumulent pas (ou peu) dans le corps, leur exposition n'en reste pas moins préoccupante. En effet, en raison de leur production massive notamment dans l'industrie des plastiques et de leur utilisation pour de nombreux objets de la vie quotidienne, ils sont omniprésents dans l'environnement entraînant également une exposition chronique.

i. Classes de PE en fonction de leurs utilisations

De nombreux PE ont été produits en masse au cours des dernières décennies, en raison de leur utilisation généralisée en tant que plastiques, plastifiants, conservateurs, revêtements, pesticides, biocides, appareils électriques.

a. **Les bisphénols**

Les bisphénols sont des composés synthétiques organiques largement utilisés pour la synthèse de plastiques polycarbonates et de résines époxy principalement. En raison de leur grande résistance à la chaleur et aux chocs, de leur dureté et de leur transparence, ils sont utilisés dans la fabrication d'une large gamme de produits de consommation, tels que les appareils électroménagers, les verres de lunettes, le matériel médical mais également dans les revêtements de contenants alimentaires (boîtes de conserves, canettes, bonbonnes d'eau, tupperware). Une petite part des bisphénols est utilisée comme agent révélateur d'impression des papiers thermiques (tickets de caisse, billet d'avion). Si l'exposition aux bisphénols peut se faire *via* les 3 voies : inhalation, ingestion, contact cutané, la voie alimentaire reste majoritaire. En effet, les bisphénols sont

capables de migrer des emballages vers les aliments en raison de leurs propriétés lipophiles ou lors de procédé de chauffage (Dallio et al., 2019).

Synthétisé pour la première fois en 1891, le BPA a été très étudié lors de la recherche d'œstrogènes synthétique. C'est dans les années 1960, que son utilisation massive par l'industrie du plastique commence. Cependant, du fait de ses propriétés de xénoœstrogène (mimant l'activité oestrogénique et capable de se lier aux récepteurs α et β des œstrogènes), le BPA a été classé en tant que reprotoxique de classe 1B et son utilisation est interdite dans l'Union Européenne (UE) depuis 2015 dans tous les contenants alimentaires. En raison de sa réglementation, de nombreux substituts analogues au BPA ont vu le jour. S'il en existe 24 au total, le BPF et le BPS sont les plus utilisés en remplacement du BPA. Cependant, du fait de leurs similitudes structurelles et fonctionnelles, comparés au BPA, et des données expérimentales soulignant leur toxicité et leurs propriétés oestrogéniques (Moreman et al., 2017), ils semblent avoir des effets similaires sur la santé (Beausoleil et al., 2022; Cano-Nicolau et al., 2016; Gu et al., 2019; Ji et al., 2021; Qiu et al., 2019).

L'exposition humaine aux bisphénols continue d'être ubiquitaire, en raison de sa large utilisation, et a pu être mise en évidence dans des études de biosurveillance humaine. Dernièrement, l'enquête ESTEBAN réalisée sur la population française de 2014 à 2016 a pu détecter et identifier la présence des différents bisphénols BPA, BPS et BPF, dans 100% des échantillons d'urines à la fois chez l'adulte et chez l'enfant à des concentrations allant de 0,23 $\mu\text{g/L}$ à 2,26 $\mu\text{g/L}$ (Fillol et al., 2021).

b. Les phtalates

Les phtalates sont largement utilisés dans la fabrication de divers objets du quotidien. Les phtalates à chaîne longue (tels que le DEHP et le DiNP, DiDP, BBP³) sont utilisés en tant que plastifiants pour ajouter de la flexibilité aux plastiques retrouvés dans les revêtements en vinyle, les dispositifs médicaux, les emballages alimentaires, les jouets. Les phtalates à chaîne courte (tels que le DBP, le DiBP et le DEP) sont utilisés comme additifs et stabilisateurs de parfum dans les vernis, les solvants et les cosmétiques (Chen et al., 2016). Une de leurs caractéristiques est qu'ils ne sont pas chimiquement liés aux plastiques auxquels ils sont ajoutés et peuvent donc facilement migrer du contenant vers le contenu ou diffuser dans l'environnement. L'exposition aux phtalates est ubiquitaire et peut donc se faire par ingestion (*via* la contamination de l'alimentation et de l'eau), par absorption cutanée (*via* les cosmétiques), par inhalation (*via* la contamination d'air extérieur et intérieur) ou enfin par voie parentérale (*via* les dispositifs médicaux).

Si le DEHP est l'ester de phtalate le plus abondamment produit et le plus largement utilisé, dans l'UE, il a été classé en tant que reprotoxique de classe 1B, tout comme le DBP, le BBP et le DiBP. De ce fait, leur usage est fortement réglementé et interdit dans certaines utilisations

³ Les phtalates sont classés en fonction de la longueur de leur chaîne. Les phtalates à chaîne longue comprennent le DEHP (Di(2-ethylhexyl) phtalate), le DiNP (Di-isononyl-phtalate), le DiDP (Di-iso-décyl-phtalate) et le BBP (Butyl-benzyl-phtalate). Les phtalates à chaîne courte font référence au DBP (di-n-butyl phtalate), au DiBP (Di-isobutyl phtalate) ou encore au DEP (Diethyl phtalate)

(cosmétiques, revêtement alimentaire). Par leurs propriétés de xénoœstrogènes, ils sont à l'origine de malformations génitales, de problèmes de fertilité, d'effets cognitifs, mentaux et comportementaux et de diverses allergies (Nicolopoulou-Stamati et al., 2015).

L'exposition humaine a pu être déterminée grâce à l'enquête de biosurveillance ESTEBAN, citée ci-dessus, et qui a pu détecter et identifier la présence notamment du DEHP dans les urines chez l'adulte et l'enfant allant de 17,6µg/L à 27,2µg/L (Fillol et al., 2021).

c. Les parabènes

Les parabènes sont des conservateurs utilisés pour leurs propriétés antimicrobiennes et antifongiques dans les produits cosmétiques, les produits pharmaceutiques et l'alimentation. Ainsi l'ingestion et l'absorption cutanée sont les principales voies d'exposition chez l'Homme. Les parabènes ont été détectés dans le sang, le lait maternel et dans les urines à des taux allant de 0,5µg/L (butyl-parabène) à 43,9µg/L (methyl-parabène) (Darbre and Harvey, 2008). Du fait de leur grande utilisation dans les produits de soin, le seul effet toxique avéré et reconnu sur la santé humaine lié à leur exposition est le risque d'allergies cutanées. Cependant de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* décrivent leurs propriétés de PE et notamment leur capacité à activer le récepteur aux œstrogènes, ayant des effets sur le système reproducteur et sur la promotion du cancer du sein (Nicolopoulou-Stamati et al., 2015). Depuis 2014, certains parabènes ont été interdits dans les cosmétiques et les concentrations de butyl- et propyl- parabènes (les plus fréquemment utilisés) sont règlementés et ne doivent pas dépasser 0,14% du produit.

d. Les composés perfluorés (PFAS)

Les composés perfluorés (PFAS) sont des composés antitaches, imperméables aux graisses et hydrofuges utilisés dans un grand nombre de produits industriels (en tant que tensioactifs et émulsifiants) et de biens de consommation (tels que les tissus antitaches, les mousses anti-incendie, ustensiles de cuisine antiadhésifs, matelas imperméables, emballages alimentaires). Ce sont des polluants omniprésents dans l'environnement domestique. Ils peuvent contaminer l'Homme *via* l'alimentation (eaux et viande/poissons contaminés, les matériaux de cuissons) et *via* l'inhalation d'air pollué ou de poussières domestiques.

Parmi ces substances, les PFOA et PFOS sont les composés perfluorés les plus utilisés, mais sont fortement hépatotoxiques et ont été classés en tant que cancérogènes potentiels pour l'Homme (classe 2B). Pour ces raisons, leur utilisation a été règlementée et restreinte en 2015 au sein de l'UE (utilisation du PFOA interdite, utilisation du PFOS limitée-Convention de Stockholm sur les POP), mais ils sont toujours largement fabriqués et utilisés dans d'autres pays. Bien que la majeure partie de la production ait cessé dans l'UE, les PFCs restent très fortement répandus dans l'environnement du fait de leur capacité à se bioaccumuler (classés en tant que POP). Des études de biosurveillance ont permis de détecter la présence de PFCs dans le sang, le sérum, le lait maternel, le placenta, ainsi que la bioaccumulation dans les tissus corporels, dont le foie (Centers for Disease Control and Prevention, 2021; Kärman et al., 2010). L'enquête de biosurveillance

ESTEBAN a mis en évidence une contamination totale de population avec des taux dans les urines chez les adultes et les enfants estimés entre 1,56µg/L à 4,03µg/L (ESTEBAN).

e. Les insecticides organochlorés

Les insecticides organochlorés font partie des pesticides les plus couramment utilisés. Parmi eux, le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), a été très largement utilisé comme insecticide agricole, dans les maisons ou encore dans la lutte contre divers arthropodes vecteurs de maladie à partir des années 1930⁴. Cependant, suite à la découverte que le DDT était capable d'interférer avec la signalisation oestrogénique et responsable de la disparition de certaines espèces d'oiseaux⁵, il fut interdit dans les années 1970, en raison de son impact environnemental et sanitaire élevé. Cependant, le DDT reste actuellement encore utilisé comme répulsif anti-moustique dans certaines régions où le paludisme est encore très présent. Du fait de sa persistance élevée, il est classé en tant que POP. Ainsi, le DDT et son principal produit de dégradation, le DDE continuent de contaminer les sols, les eaux, les organismes vivants et l'alimentation humaine, rendant son exposition ubiquitaire encore aujourd'hui, même dans des régions où le paludisme n'existe pas. De ce fait, en France, il est détectable dans le sérum à des niveaux allant de 104,6ng/L à 908,4ng/L chez l'adulte et l'enfant (ESTEBAN). Il convient de noter que le métabolite DDE, est retrouvé à des concentrations supérieures, que sa molécule mère, le DDT, dans les systèmes aquatiques (eaux, sédiments, organismes aquatiques) (Kuranchie-Mensah et al., 2012). Le DDE a été classé comme potentiellement cancérigène pour l'Homme (classe 2B) par le CIRC.

f. Les biocides : la tributylène

La tributylène ou tributylétain (TBT) a été largement utilisée dans les années 1970 comme biocide dans les peintures de coques de navire, pour empêcher la fixation des organismes aquatiques, ainsi que comme fongicide pour les papèteries et les systèmes d'eau industriels. Son utilisation a été interdite en 2008, du fait de la capacité de cette molécule à altérer les rapports de sexe mâles/femelles des organismes marins, entraînant des déficiences reproductives (Antizar-Ladislao, 2008). Cependant, du fait de sa diffusion dans les eaux marines et de sa stabilité, la TBT est encore retrouvée dans les eaux et sédiments ainsi que dans les organismes marins (Ashraf et al., 2017). Outre ces effets sur la reproduction marine, la TBT a été démontrée comme obésogène et capable d'augmenter l'adiposité (Grün et al., 2006; Ouadah-Boussouf and Babin, 2016).

⁴ A ce titre, Paul Hermann Müller, chimiste suisse, reçu en 1948 le prix Nobel de physiologie ou médecine pour sa découverte de la grande efficacité du DDT comme poison de contact contre plusieurs arthropodes, permettant de lutter contre diverses maladies transmises par les insectes.

⁵ Ces effets néfastes furent notamment décrits, par la biologiste Rachel Carson, grâce à son roman *Printemps silencieux*, publié en 1962. Celui-ci déclarait que le DDT était notamment responsable de l'amincissement de la coquille d'œufs chez les oiseaux entraînant une hausse de la mortalité et des problèmes de reproduction ; accusant également l'industrie chimique de vendre des poisons et de pratiquer de la désinformation sur les réels effets des molécules.

g. Les métaux lourds

Les métaux lourds (l'arsenic, le mercure, le plomb et le cadmium) sont des éléments naturellement présents dans l'environnement et contaminants de l'eau, de l'air et de l'alimentation. Parmi ces métaux, le cadmium est un hépatotoxique, décrits pour s'accumuler dans le foie. Il est classé par le CIRC en tant que cancérigène du groupe I en étant notamment impliqué dans le cancer du poumon, en lien avec la présence de cadmium dans la fumée de cigarette. Pour les non-fumeurs, la consommation d'aliments et d'eau contaminés est la source principale d'exposition au Cd. Il est également présent dans les plastiques, les piles et batteries et composants de circuits électroniques ainsi que dans les pesticides. On en trouve aussi dans l'eau potable et certains aliments comme les produits de la mer et certaines céréales. Les taux de cadmium retrouvés dans les urines varient de 0,28 à 0,43µg/L chez les adultes et enfants et étaient supérieurs chez les adultes fumeurs (ESTEBAN 2019). Du fait de sa structure similaire à celle du zinc et du calcium, le cadmium peut entrer en compétition avec d'autres cations essentiels du corps et entraîner ainsi une perturbation du métabolisme biologique des cellules (Fu and Xi, 2020).

h. Autres PE

De nombreux autres PE existent comme **les retardateurs de flammes, PBDE et OPFR**, utilisés pour réduire la combustibilité de divers objets (meubles, vêtements, jouets, appareils électroniques), en matière de prévention anti-incendie. Les **dioxines** et les **hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)** résultent de processus de combustion naturelle ou anthropique. Les dioxines sont des sous-produits provenant de l'incinération, du traitement des métaux et de la production de pesticides, alors que les HAP sont notamment présents dans les céréales et les aliments grillés, sous forme de particules présentes dans l'air ou dans la fumée de cigarette. Enfin, les **PCBs** ont été utilisés comme lubrifiants et dans la fabrication de transformateurs électriques et de condensateurs. Bien que leur production soit interdite, ils sont classés en tant que POP et continuent de contaminer tous les écosystèmes et principalement la chaîne alimentaire, en s'accumulant dans les aliments riches en graisse. Toutes ces molécules ont été décrites pour leurs effets toxiques sur la santé humaine d'un point de vue hépatique, neurologique et immunologique.

ii. Caractéristiques

En interférant avec le système hormonal physiologique des êtres vivants, les PE ont été décrits pour exercer divers effets avérés ou suspectés sur la santé humaine : troubles du système reproducteur et de la reproduction, effets sur le développement neurologique et le comportement, apparition de cancers hormono-dépendants (sein, utérus, prostate, testicules) (Gore et al., 2015). A titre d'exemple, le distilbène prescrit à des femmes enceintes pour éviter les avortements spontanés, a été interdit dans les années 70 suite à la découverte que son administration était corrélée à la survenue de cancers du vagin, du sein et de l'utérus chez les filles des mères traitées (Herbst et al., 1971). Un autre exemple est celui du chlordécone, utilisé

massivement comme insecticide organochloré, dans les bananeraies jusqu'en 1993, qui a été classé cancérigène possible (Groupe 2B) pour l'Homme par le CIRC et mis en relation avec la survenue du cancer de la prostate (Guzelian et al., 1980).

Cependant, à de rares exceptions près, le lien de causalité chez l'Homme est insuffisamment démontré et leurs effets restent controversés dans la survenue des cancers ou dans leur rôle sur la santé humaine. Cela s'explique par le fait que plusieurs niveaux de complexité apparaissent dans l'évaluation des mécanismes d'actions des PE:

- **Effets non monotones** : la toxicocinétique des PE est décrite pour suivre une courbe de dose/réponse non monotone, c'est à dire avec des effets non dépendants de la dose. Cette notion diffère de l'action des molécules classiquement décrites en toxicologie qui, elles, exercent des effets toxiques suivant une dose/réponse linéaire et proportionnelle (la toxicité pouvant être prédite en fonction de la dose) (Figure 19). Ainsi pour certains PE, des effets toxiques sont décrits à faible doses et absents à fortes doses. Cela a pour conséquence, lors des tests de toxicité, une possible mauvaise estimation de la dose de sécurité, qui est la plupart du temps déterminée sur la base de fortes concentrations, ce qui ne garantit pas finalement une absence de danger après exposition à de plus faibles doses (Vandenberg et al., 2012).

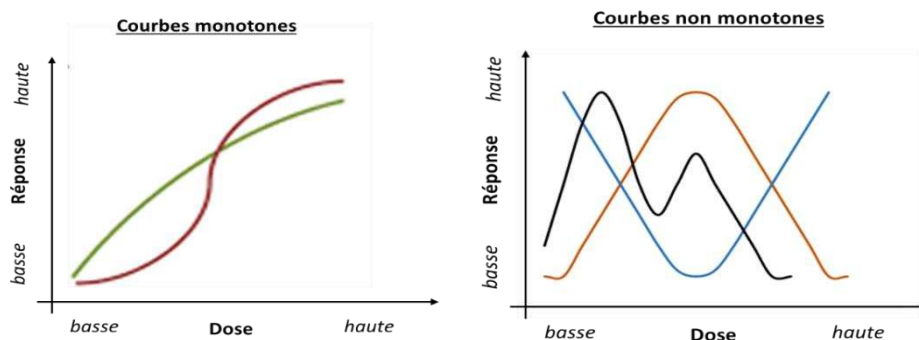


Figure 19: Courbes monotones décrivant une dose/réponse linéaire et proportionnelle versus courbes non monotones caractéristiques des PE : courbe en U, courbe en U inversée, courbe bi-phasique

- **Effet à faibles doses** : Les études expérimentales sont souvent réalisées en évaluant la toxicité d'une substance unique à forte dose. Or, l'exposition aux PE se fait souvent à faibles doses dans la population générale, doses appelées « environnementales » et souvent inférieures aux doses journalières tolérables (DJT, définie par expérimentation animale en extrapolant la dose la plus forte sans effet). Certains PE, démontrent un impact plus fort à faibles doses qu'à fortes doses. Par exemple, des effets transcriptomiques hépatiques plus robustes ont été observés chez des souris traitées avec de faibles doses de BPA qu'avec des fortes doses (Marmugi et al., 2012).
- **Age d'exposition** : comme il sera plus amplement décrit par la suite, les PE peuvent avoir des effets différents selon l'âge d'exposition et particulièrement lors d'exposition *in utero* ou post-natale sur l'organisme en développement, ou encore au moment de la puberté. Ces fenêtres d'exposition représente des périodes de vulnérabilité très forte aux PE, qui peuvent prédisposer les individus à développer une maladie plus tard à l'âge adulte.

- **La latence d'exposition** : les dysfonctionnements résultants de l'exposition aux PE peuvent ne pas se manifester pendant la période d'exposition mais peuvent être différés par rapport à l'exposition, ce qui représente un défi pour associer l'exposition aux PE dans une maladie particulière.
- **Exposition chronique** : Les PE sont omniprésents dans notre environnement et parfois persistant démontrant la nature chronique de l'exposition par inhalation, ingestion, ou contact cutanée. Cela nécessite donc d'évaluer les effets à long terme qui expérimentalement ne sont pas toujours faciles à mettre en évidence. De plus, en raison du phénomène de bioaccumulation de certains PE, ils peuvent se retrouver séquestrés notamment dans les graisses, et exposer l'organisme de manière chronique. Il a notamment été décrit que la chirurgie bariatrique chez les personnes obèses, entraînait le relargage de POP dans la circulation de par la diminution de tissu adipeux, favorisant dans ce cas l'exposition chronique, ce qui pourrait contribuer à la survenue de perturbations endocriniennes et de TAFLD (Jansen et al., 2022)
- **Effet cocktail** : une autre complication potentielle des études mécanistiques est le fait que l'Homme est exposé à une multitude de PE ; *via* l'eau, l'air ou l'alimentation contaminée ; ceux-ci peuvent avoir des effets biologiques additifs ou synergiques. Ainsi la difficulté est d'évaluer les effets cumulatifs de mélanges complexes de polluants sur la santé humaine. Cette notion d'expositions multiples, doit être considérée dans l'évaluation des risques, plutôt que celle d'expositions isolées, notamment lorsque l'exposition à faibles doses à un mélange de PE provoque des effets néfastes alors que les PE pris individuellement ne génère aucun effet.

Etant donné le fardeau socio-économique des maladies causées par les PE dans les pays industrialisés qui est estimé entre 50 et 300 milliards d'euros/an, les études visant à accroître les connaissances sur le lien de causalité entre les effets sur la santé et les PE, représentent un grand défi de santé publique (Rijk et al., 2016). L'interprétation des données relatives à l'évaluation des risques sanitaires ou environnementaux concernant les PE est complexe et il est indispensable de prendre en compte les effets à long terme de mélanges de polluants détectés à des concentrations faibles cohérentes avec les expositions environnementales (Le Magueresse-Battistoni et al., 2018). Bien qu'une grande partie de la recherche se soit concentrée sur la perturbation de la reproduction du fait de l'interférence avec l'action des hormones sexuelles (œstrogènes, androgènes) (Darbre, 2015), il apparaît qu'une grande partie de ces PE semble induire des altérations du métabolisme des lipides et des glucides. En effet, puisque la régulation du métabolisme énergétique repose sur l'action de diverses hormones (insuline, glucagon, hormones thyroïdiennes, glucocorticoïdes, hormones sexuelles) ; les PE, en agissant comme agoniste ou antagoniste de ces hormones, ou en perturbant leur signalisation, contribuent à perturber l'homéostasie énergétique. Pour ces raisons, certains PE ont également été catégorisés comme perturbateurs métaboliques pouvant favoriser le développement de maladies métaboliques dont les NAFLD (Heindel et al., 2017).

III. Les PE perturbateurs métaboliques impliqués dans les TAFLD

L'apparition et la progression des NAFLD peuvent être dues à une exposition aux PE, à différents âges et tout au long de la vie. Cependant, il a également été démontré que des périodes de vulnérabilité existaient, notamment pendant la période fœtale, augmentant la susceptibilité de développer la maladie plus tard à l'âge adulte.

i. Exposition directe

Chez l'Homme, l'exposition aux PE peut se faire *via* différentes voies témoignant de l'exposition chronique à de multiples sources (Figure 20). L'exposition principale à ces perturbateurs se fait par la **consommation orale** d'aliments et d'eaux contaminés, en raison de la migration des substances depuis les emballages dans l'alimentation, de la contamination des sols de cultures et des résidus d'hormones présents dans la viande (Gore et al., 2015). La contamination peut également se faire par l'**inhalation** de polluants atmosphériques présents dans l'air extérieur ou dans les poussières domestiques. Ces dernières peuvent notamment regrouper de nombreuses classes de PE (retardateurs de flammes, phtalates, pesticides, composés perfluorés) auxquels l'Homme est exposé de manière chronique *via* son habitation. Il est estimé que les enfants ingèrent entre 60 et 100 mg de poussière par jour provenant des environnements intérieurs (US EPA, 2017). Enfin l'**absorption cutanée** *via* les cosmétiques et produits de soin, représente une autre voie d'exposition non négligeable. La **voie intraveineuse** par l'utilisation de phtalates dans les tubulures médicales ou encore le **transfert biologique** du placenta et du lait maternel de la mère à l'enfant sont également des voies par lesquelles les PE peuvent pénétrer dans le corps.



Figure 20 : Sources de contaminations de la vie quotidienne des populations.

Les expositions professionnelles sont particulièrement à risque, du fait d'une exposition souvent multiple et à de plus fortes doses de substances. Plusieurs secteurs se trouvent concernés comme l'agriculture (manipulation de pesticides), les industries pharmaceutiques (production d'hormones) et chimique (fabrication des pesticides, matières plastiques). Concernant la population générale, l'exposition à certains POP, tels que les PCBS, les PFCs, certains métaux lourds et les pesticides, a été associée à une augmentation de la concentration sanguine des enzymes hépatiques, suggérant que ces polluants sont capables d'induire un effet délétère sur la fonction hépatique (Cave et al., 2010a; Gleason et al., 2015; Kumar et al., 2014; Lin et al., 2010; Wahlang et al., 2020). S'ajoutent à cela, de plus en plus de données épidémiologiques qui démontrent que l'exposition aux PE contribuent de manière significative au développement des NAFLD (VoPham, 2019). En effet, des associations directes ont été faites entre la survenue de NAFLD et l'exposition aux pesticides organochlorés (Sang et al., 2022) et au cadmium (S. Han et al., 2022; Hyder et al., 2013; Park et al., 2021; Xu et al., 2021). Concernant les composés perfluorés, PFOA et PFOS, en plus d'augmenter le risque de développer une obésité chez les adolescents et les adultes (Averina et al., 2021; Qi et al., 2020), il semblerait qu'ils jouent également un rôle dans la progression pathologique des NAFLD (Sen et al., 2022). Des études sur les PE non persistants, tels que le BPA et les phtalates, ont également permis d'associer des taux urinaires élevés de BPA et de MEHP (Mono(2-éthylhexyl)phtalate), métabolite du DEHP, avec la présence de dysfonctions hépatiques, d'insulino-résistance et de stéatose hépatique chez l'enfant et chez l'adulte (Hatch et al., 2008; Kim et al., 2019; Lang et al., 2008; Stahlhut et al., 2007; Stojanoska et al., 2017; Verstraete et al., 2018).

ii. Exposition indirecte : développementale et transgénérationnelle

Les effets délétères de l'exposition à différents toxiques peuvent se produire tout au long de la vie, cependant, les périodes précoces de la vie (foetale ou postnatales précoces), appelées expositions développementales, représentent une fenêtre de vulnérabilité supérieure et particulièrement préjudiciable (Treviño and Katz, 2018). Par exemple, l'exposition à la famine ou au contraire à un régime riche en graisses pendant la grossesse, a été associée à une augmentation de la prévalence de la NAFLD de la descendance à l'âge adulte (Wang et al., 2016; Wesolowski et al., 2017). Plus globalement des changements dans l'environnement maternel peuvent altérer la fonction placentaire et entraîner des altérations des réponses hépatiques fœtales qui favorisent un phénotype pathologique chez les enfants.

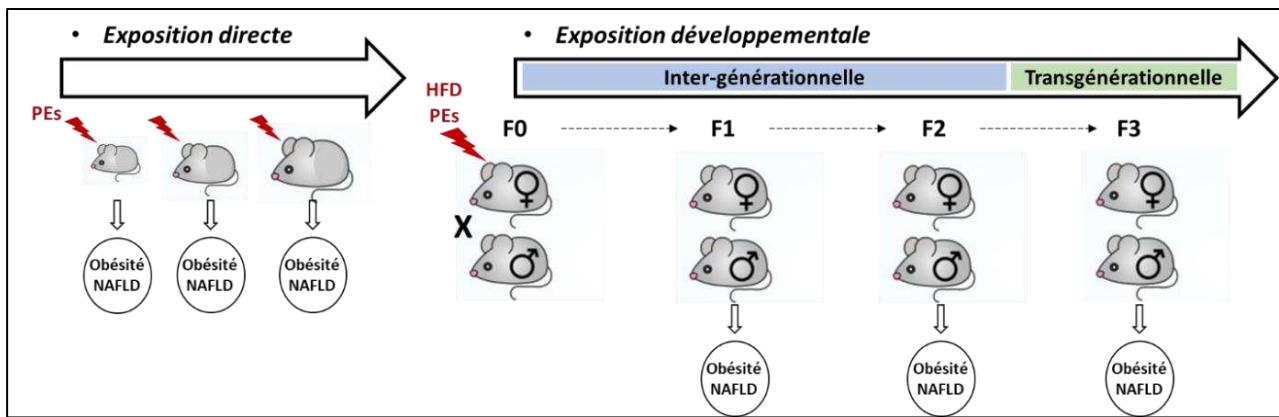


Figure 21: Périodes d'expositions aux PE au cours de la vie (directe et indirecte). Les organismes peuvent être exposés aux PE tout au long de leur vie et déclencher un phénotype NAFLD dès l'enfance ou au stade adulte. Cependant, l'exposition développementale *in utero* prédispose également les organismes au développement de NAFLD plus tard. Ainsi l'exposition maternelle à un régime alimentaire obésogène (tel qu'un régime riche en graisse, HFD) ou aux PE, contribue à la NAFLD de la progéniture F1. Les aspects de ce phénotype peuvent être transmis aux générations suivantes (F2, F3). Ces modèles pré-cliniques sont essentiels pour définir les mécanismes à l'origine des phénotypes intergénérationnels et transgénérationnels.

De manière similaire, il a également été montré que l'exposition au PE durant ces périodes augmentait la susceptibilité de développer des pathologies comme l'obésité et les NAFLD une fois au stade adulte (Barouki et al., 2012b; Heindel et al., 2017). Des études *in vivo* ont montré que l'exposition au BPA ou au DEHP pendant la gestation entraînait une augmentation de la prise de poids de la progéniture une fois à l'âge adulte, associée au développement d'une stéatose et à la surexpression de gènes lipogéniques hépatiques (SREBP-1c, FAS, ACC ou encore DGAT1) (An et al., 2021; Lin et al., 2019). De même, une exposition chronique au PFOS entraîne un impact sur le métabolisme des lipides à la fois sur la génération F0, directement exposée, et la génération F1 (Cui et al., 2017). De manière similaire, l'exposition prénatale à la TBT entraîne une accumulation précoce de lipides dans les tissus adipeux et une stéatose hépatique chez les souris (Grün et al., 2006).

Certains effets passent les générations et affectent des individus non exposés. Les mécanismes d'action passent par des modifications épigénétiques

Ces périodes d'expositions sont particulièrement critiques car elles sont caractérisées par des modifications hormonales importantes pour l'organisme en développement. Ainsi, durant ces périodes, l'organisme est particulièrement sensible à l'exposition aux PE, qui viennent perturber le métabolisme. De plus, à ce stade, l'organisme ne dispose pas encore de tous les mécanismes de protection tels que le métabolisme des xénobiotiques ou le système de réparation de l'ADN (Foulds et al., 2017 ; Heindel et al., 2015). Les mécanismes d'actions d'exposition prénatale aux PE passent par des **modifications épigénétiques**. Des modifications de la méthylation de l'ADN au niveau de régions promotrices de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique ont notamment été décrites pour l'exposition au BPA, au DEHP ou encore à la TBT, favorisant l'accumulation de lipides hépatiques (Bastos Sales et al., 2013; Gu et al., 2016; Ke et al., 2016; Longo et al., 2020; Manikkam et al., 2013; Qin et al., 2021; Strakovsky et al., 2015). Des études ont également démontré que les expositions prénatales aux PE **perturbent la fonction mitochondriale** dans le

foie. Chez des rats, une exposition *in utero* au BPA a induit une diminution de l'activité du complexe respiratoire mitochondrial chez la progéniture dès 3 semaines, conduisant à un stress oxydant et à une stéatose (Jiang et al., 2014). Une perturbation de la β -oxydation, ainsi que des altérations structurelles des mitochondries, peuvent également être observées en réponse aux expositions développementales aux PE (Quist et al., 2015; Strakovsky et al., 2015).

Par ailleurs, l'effet des PE peut également dépendre du contexte nutritionnel. En effet, leur exposition combinée à un régime enrichi en graisse, montrent le plus souvent une aggravation du phénotype car en plus d'augmenter l'accumulation de lipides hépatiques, l'exposition à certains PE, comme le BPA ou au PFOA, déclenche également une infiltration de macrophages pouvant contribuer au développement de la NASH (Strakovsky et al., 2015; Tan et al., 2013; Wei et al., 2014).

Bien que de nombreuses études *in vivo* démontrent que les expositions développementales aux PE favorisent la NAFLD à l'âge adulte, les données épidémiologiques chez l'Homme manquent encore pour étayer ce lien. Cependant, l'un des premiers arguments est la présence de PE dans le sérum maternel ou fœtal, ainsi que dans le lait maternel, le placenta et le sang de cordon ombilical, qui témoigne du fait que les expositions peuvent effectivement se produire avant et après la naissance. S'ajoute à cela le fait que certains PE tels que le BPA et les PFCs ont également été mesurés dans les organes fœtaux, y compris le foie (Cao et al., 2012; Mamsen et al., 2017). De plus, quelques études révèlent des associations entre l'exposition prénatale au BPA ou au DDE et l'augmentation de l'IMC (Karmaus et al., 2009; Valvi et al., 2013). Par exemple, une étude a révélé que l'augmentation des concentrations de phtalates dans l'urine maternelle pendant la grossesse doublait la probabilité que la descendance soit en surpoids ou obèse (Buckley et al., 2016). Enfin, une étude portant sur les POP a révélé que l'exposition *in utero* aux PCB et PBDE augmentait la quantité de lipides présents chez l'enfant (Boutot et al., 2021). Ces études démontrent bien le risque pour la descendance de développer des maladies métaboliques en réponse à l'exposition périnatale à ces PE.

Si certains effets toxiques sont rapportés chez la progéniture F1 exposée *in utero*, des effets peuvent également apparaître chez leur descendance (Figure 21). Une exposition prénatale à la TBT de souris gestantes FO a entraîné une augmentation d'adiposité et un phénotype NAFLD chez les générations F1, F2 et F3. Cette étude indique que l'exposition prénatale à la TBT a provoqué des changements dans les cellules germinales des fœtus de la génération F1 qui ont été transmises aux générations suivantes, témoignant que les effets sont transgénérationnels (Chamorro-García et al., 2013). Ainsi l'exposition *in vivo* à la TBT, mais également à d'autres PE comme le BPA, le DEHP, le DBP ou encore le DDT et le cadmium, est capable d'induire des modifications héréditaires et transgénérationnelles du génome, comme des mutations épigénétiques, prédisposant à l'accumulation de lipides plusieurs générations après (Camsari et al., 2019; King et al., 2019; Manikkam et al., 2013; Skinner, 2008; Skinner et al., 2013). Pour le BPA notamment, des effets sur le développement de l'obésité ont pu être observés jusqu'à la génération F6 (Jung et al., 2022). En effet, du fait de la nature héréditaire des reprogrammations épigénétiques, ces modifications peuvent ainsi persister sur de nombreuses générations et affectés des individus non exposés (Stel and Legler, 2015). Bien que des modifications épigénétiques aient été décrites (Bernal and Jirtle, 2010; Chamorro-Garcia and Blumberg, 2014; Dominguez-Salas et al., 2014), les études évaluant

les effets transgénérationnels sont encore très émergentes. Dans ce contexte, un intérêt particulier est donné pour que les études expérimentales et analyses développementales de l'exposition aux PE soient poussées au-delà des générations F1 pour mieux comprendre leur impact sur les générations suivantes.

iii. PE et mécanismes impliqués dans le développement des TAFLD

Les PE sont initialement connus pour induire des perturbations endocriniennes en interférant avec n'importe quel aspect de l'action hormonale. De nouvelles preuves sont apparues témoignant que l'exposition aux PE peut induire des perturbations métaboliques, augmentant la susceptibilité de développer des maladies métaboliques. Ainsi, récemment les termes de « obésogènes » ou « perturbateurs métaboliques » ont émergé, pour décrire de manière plus appropriée les PE capables d'induire l'obésité ou plus largement les troubles métaboliques comme le T2D, le MetS ou encore les NAFLD (Cano et al., 2021; Heindel et al., 2017). Ces PE sont capables d'interagir avec les récepteurs nucléaires pour perturber la signalisation intracellulaire hépatique. Ils peuvent ainsi altérer le métabolisme lipidique favorisant l'accumulation de lipides hépatiques et la stéatose (Angrish et al., 2016), ou induire le stress oxydant, l'inflammation ou la mort cellulaire, caractéristiques de la progression vers la NASH (Armstrong and Guo, 2019).

a. Effets obésogènes

En 2002, il a été, pour la première fois suggéré que l'épidémie mondiale d'obésité actuelle était associée à l'augmentation de la production de produits chimiques. Dans ce sens, différentes variétés de produits chimiques environnementaux ont été associées à l'augmentation de la prise de poids (Baillie-Hamilton, 2004). Par la suite, Grün et Blumberg, ont confirmé cette hypothèse et proposé le terme, maintenant reconnu, d'« obésogène » pour décrire les toxiques de l'environnement capables de déréguler le métabolisme énergétique, en favorisant le stockage de graisse et conduisant au développement de l'obésité (Blumberg, 2011; Grün and Blumberg, 2007). Un certain nombre de produits chimiques obésogènes ont depuis été identifiés, parmi lesquels la plupart sont des PE : comme le BPA et son substitut le BPS, la TBT ou encore le DEHP, les composés perfluorés PFOA et PFOS et les parabènes (Bernal et al., 2022; Chamorro-Garcia and Blumberg, 2014; Darbre, 2017; Foulds et al., 2017; Griffin et al., 2020; Heindel et al., 2015; Hu et al., 2016). Récemment, le DDT et son métabolite DDE ont également été suggérés comme obésogènes dans des études épidémiologiques et *in vivo* sur le rongeur (Al-Obaidi et al., 2022; Cano-Sancho et al., 2017).

Une exposition précoce à ces molécules favorise l'obésité plus tard à l'âge adulte en stimulant l'adipogénèse (augmentation de la différenciation, du nombre et de la taille des adipocytes) et l'accumulation de lipides dans les adipocytes. Ces obésogènes peuvent également altérer le fonctionnement de l'hypothalamus, contrôlant par conséquent l'appétit et la satiété (Bernal et al., 2022; Heindel et al., 2017, 2015), ou perturber les taux d'hormones, leptine et adiponectine, qui régulent la satiété, le métabolisme du glucose et la sensibilité à l'insuline (Bernal et al., 2022;

Griffin et al., 2020). Ces effets sont majoritairement médiés par le récepteur PPAR γ , régulateur clé de l'adipogénèse. En favorisant l'obésité et donc l'augmentation de la masse de graisse, ces molécules lipophiles augmentent également leur capacité de rétention au sein de ce tissu adipeux, et créent ainsi un cercle vicieux (Griffin et al., 2020). Les mécanismes d'actions par lesquels ces PE sont capables d'induire l'obésité ont notamment été décrits en détails sous forme de deux revues auxquelles j'ai participé : Heindel et al., 2022; Lustig et al., 2022.

b. Effets des perturbateurs métaboliques

Le terme de perturbateur métabolique a été proposé pour prendre en compte de manière plus générale les PE capables d'augmenter la susceptibilité des maladies métaboliques. Ces molécules, en dérégulant le métabolisme des lipides contribuent à l'initiation et au développement des NAFLD (Heindel et al., 2017). Ces PE peuvent à la fois agir comme éléments déclencheurs de la stéatose et/ou favoriser la progression de la stéatose vers la stéatohépatite. Les mécanismes induits par ces PE sont principalement médiés par leurs interactions avec les récepteurs nucléaires « métaboliques » qui, en plus d'agir sur le métabolisme des lipides, sont également impliqués dans le stress oxydant, l'inflammation, la mort cellulaire et la fibrose (Armstrong and Guo, 2019; Foulds et al., 2017).

1. Effets des PE médiés par les récepteurs nucléaires

Les PE possèdent des caractéristiques similaires à celles des hormones naturelles (œstrogènes, androgènes, thyroïdiennes), avec par exemple le BPA, oestrogéno-mimétique, ou le DEHP, anti-androgène. Ainsi il peuvent exercer leurs effets en agissant comme agonistes ou antagonistes des récepteurs hormonaux, tels que les récepteurs aux œstrogènes (ER α et β), les récepteurs aux androgènes (AR) et les récepteurs des hormones thyroïdiennes (TR) (Kabir et al., 2015). Cependant, il est maintenant reconnu que ces PE peuvent altérer spécifiquement les voies de régulations d'autres récepteurs « métaboliques » (PPARs, CAR, PXR, FXR, LXRs, AhR) (par modification de leur expression ou par liaison à ces récepteurs). Ainsi, du fait qu'ils régulent l'homéostasie énergétique au cours des périodes d'alimentation/de jeûne ; en interagissant de manière inappropriée avec ces récepteurs, les PE viennent perturber cette homéostasie. En dérégulant, ces voies de signalisation, ils peuvent ainsi impacter la transcription de gènes pouvant être impliqués dans le développement des maladies métaboliques et en particulier des NAFLD (Cave et al., 2016; Delfosse et al., 2015; Lustig et al., 2022; Maradonna and Carnevali, 2018). La stimulation ou la répression de l'activité de ces récepteurs par les PE, semblent être un événement déclencheur dans le développement de la stéatose et participent à la pathogénèse des NAFLD (Cave et al., 2016; Foulds et al., 2017; Mellor et al., 2016; Wahlang et al., 2016).

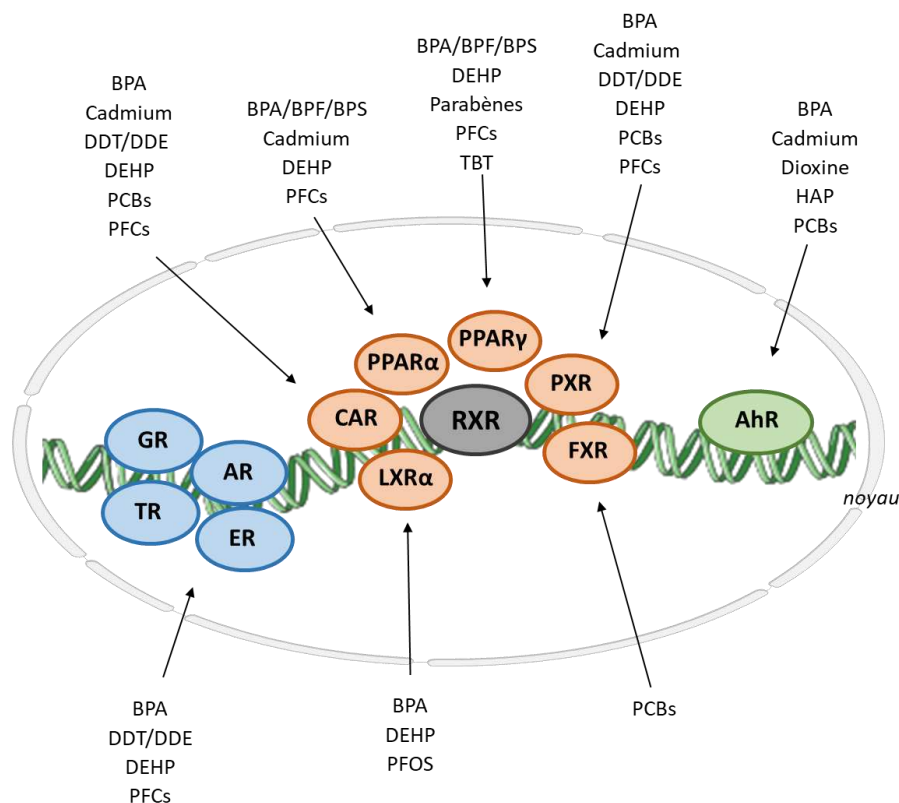


Figure 22 : Interaction entre les PE et les récepteurs nucléaires intervenant dans la pathogénèse des NAFLD. La sous famille NR1 des récepteurs nucléaires (PPARs, PXR, CAR, LXR, FXR) s'hétérodimérise avec les récepteurs RXR pour favoriser ou inhiber le développement de la stéatose lors de la liaison avec leur ligand. Certains PE sont connus pour se lier à ses récepteurs nucléaires avec des affinités variables, et affecter leur activité. Le récepteur AhR est également impliqué dans les effets induits par les PE entraînant le développement de la stéatose. Enfin, PE peuvent également interagir avec les récepteurs hormonaux : ER (récepteurs aux oestrogènes), AR (récepteurs aux androgènes), TR (récepteurs aux hormones thyroïdiennes, et GR (récepteurs aux glucocorticoïdes) et interférer avec l'homéostasie énergétique favorisant le développement de maladies métaboliques (Bernal et al., 2022; Casals-Casas et Desvergne, 2011; Cave et al., 2016; Corton et al., 2014; Ducheix et al., 2013c; Ge et al., 2022; Le Magueresse-Battistoni et al., 2017; Negi et al., 2021; Takeuchi et al., 2006).

La Figure 22 résume les interactions décrites entre certains PE et les récepteurs impliqués dans le développement des NAFLD. Ainsi, les récepteurs PPARs, notamment impliqués dans le contrôle de l'expression des gènes de l'adipogénèse, le métabolisme du glucose, des lipides et du cholestérol (Varga et al., 2011), sont également activés, en plus de leurs ligands naturels, par les phtalates, les bisphénols A, S et F, les composés PFOA et PFOS ou encore les parabènes (Bernal et al., 2022). Les substituts du BPA, les BPS et BPF, ont été décrits pour diminuer l'expression de PPAR α , contribuant à la stéatose (Marqueño et al., 2021; Wang et al., 2019). Certains HAP, les dioxines ou certains PCB induisent une stéatose en se liant au récepteur AhR (Foulds et al., 2017; Sato et al., 2008). L'activation de ce récepteur induit une stéatose hépatique suite à une augmentation de CD36 (He et al., 2011; Zhu et al., 2020), mais peut, à l'opposé, être inhibée par les ligands des récepteurs PXR et de CAR (Oshida et al., 2015). Le BPA, les phtalates ou les perfluorés peuvent interagir avec LXR α (Mozzicafreddo et al., 2015; Zhang et al., 2012). Il a également été montré que l'activation de récepteurs nucléaires tels que PPAR, PXR, CAR par les

xénobiotiques contribuaient à la progression des TAFLD avec l'induction d'une inflammation et/ou d'une fibrose (Klaunig et al., 2018; Yamazaki et al., 2007).

Il convient de noter que certains PE peuvent interagir avec plusieurs récepteurs à la fois, entraînant des effets similaires ou opposés, qui se cumulent ou s'antagonisent. Par exemple, les PFCs, dont l'exposition est liée à l'augmentation de la stéatose, peuvent interagir à la fois avec leur récepteur cible PPAR α , mais également avec CAR et PPAR γ , dont les effets sur les NAFLD ne sont pas identiques (Foulds et al., 2017; Yan et al., 2015). Quant à la TBT, elle interagit à la fois avec PPAR γ et RXR α pour augmenter la prolifération et la différenciation des adipocytes favorisant le stockage des lipides (Shoucri et al., 2018). Autre exemple, les phtalates comme le DEHP et son métabolite le MEHP, perturbent l'homéostasie énergétique par des mécanismes médiés à la fois par PPAR α et PPAR γ (Hurst and Waxman, 2003). Le PCB 156 est connu pour induire la stéatose en activant AhR, PXR et CAR et en diminuant l'expression de PPAR β/δ (Chen et al., 2020; Shan et al., 2020). Le BPA est capable d'induire la stéatose hépatique en activant PPAR γ , PXR, LXR et en diminuant l'expression de CAR (Marmugi et al., 2012).

De plus, les PE sont également pris en charge par le métabolisme des xénobiotiques *via* les CYP450 qui sont activés par les récepteurs AhR, CAR et PXR (Foulds et al., 2017; Wahlang et al., 2016). Il est à noter qu'en plus d'activer ces récepteurs, l'exposition aux PE est également associée à une modulation du métabolisme des xénobiotiques. Des études démontrent que les pesticides, les parabènes, les phtalates et le BPA peuvent réduire l'efficacité catalytique des CYP450 (Cano et al., 2021). À ce propos, c'est également le cas pour la stéatose dont la présence pourrait également affecter le métabolisme des xénobiotiques par des altérations de l'expression de diverses enzymes liées aux phases I, II et III (Cobbina and Akhlaghi, 2017; Fisher et al., 2009; Merrell and Cherrington, 2011), avec des conséquences attendues en termes de toxicocinétique chimique (Cichocki et al., 2017). De ce fait, en raison d'un métabolisme altéré, associé à une exposition prolongée, cela peut favoriser la bioaccumulation de ces substances au sein de l'organisme et finalement augmenter/prolonger leurs effets. En revanche, il a également été démontré que la prise en charge de certains composés par les CYP450, malgré une potentielle réduction de leur activité, peut favoriser leur transformation en métabolites plus réactifs. C'est le cas notamment des phtalates DEHP et DBP qui, à travers la métabolisation de phase I, conduisent à l'apparition de MEHP et MBP ayant des capacités de perturbations métaboliques plus importantes (Benjamin et al., 2017).

2. Mécanismes impliqués dans le développement de la stéatose par les PE

Les PE sont capables d'induire la stéatose hépatique en perturbant les événements métaboliques clés menant à l'accumulation de lipides hépatiques : augmentation des capacités d'absorption et de synthèse d'AG *via* la LDN, diminution de l'oxydation des AG et de leur export sous forme de VLDL (Figure 23)(Angrish et al., 2016) .

Le BPA, tout comme son substitut le BPS, ou encore le cadmium sont connus pour augmenter la synthèse des AG, *via* la stimulation de la LDN, favorisant la stéatose (Lin et al., 2017; Marmugi et

al., 2012; Pan et al., 2018; Wang et al., 2018). Le phtalate DEHP a été décrit comme impliqué tout particulièrement dans l'augmentation de la synthèse des TG hépatiques en augmentant l'expression de DGAT1 (l'étape finale de synthèse des TG) (An et al., 2021). D'autres PE, comme le BPA, le PFOS et les phtalates (DEHP et DBP), ont été décrits pour activer les voies de signalisation dépendantes de PPAR α ou SREBP-1c. Ils peuvent ainsi induire l'accumulation de lipides, soit en augmentant les capacités d'absorption des AG (augmentation de l'expression de CD36), soit en diminuant leur export (diminution de l'expression d'APOB ou de production des VLDL) (Chen et al., 2016; Cheng et al., 2016; Lin et al., 2017; Marmugi et al., 2012; Wan et al., 2012; Zhang et al., 2021). Si une diminution de la β -oxydation a été décrite pour certains PE (Grasselli et al., 2013; He et al., 2019; Strakovsky et al., 2015; Wan et al., 2012), l'exposition au PFOS et au BPA entraîne à la fois une diminution des capacités de β -oxydation dans un premier temps, suivi de sa stimulation compensatoire (Azevedo et al., 2019; Cheng et al., 2016). Dernièrement, l'exposition au PFOA a également été associée à une augmentation des TG et du cholestérol médiée par PPAR γ et le facteur de transcription SREBP2 (Yan et al., 2015; Zhang et al., 2019). Enfin, il a été montré que l'exposition au PCB 156 altère les différentes voies métaboliques menant au développement de la stéatose. Cela favorise l'absorption des AG par l'augmentation de l'expression de FAT/CD36 et des FABPs ; stimule la LDN en régulant SREBP-1c ; inhibe la β -oxydation en diminuant l'expression de CPT1 et limite l'export des lipides en réduisant les taux de MTTP (Shan et al., 2020).

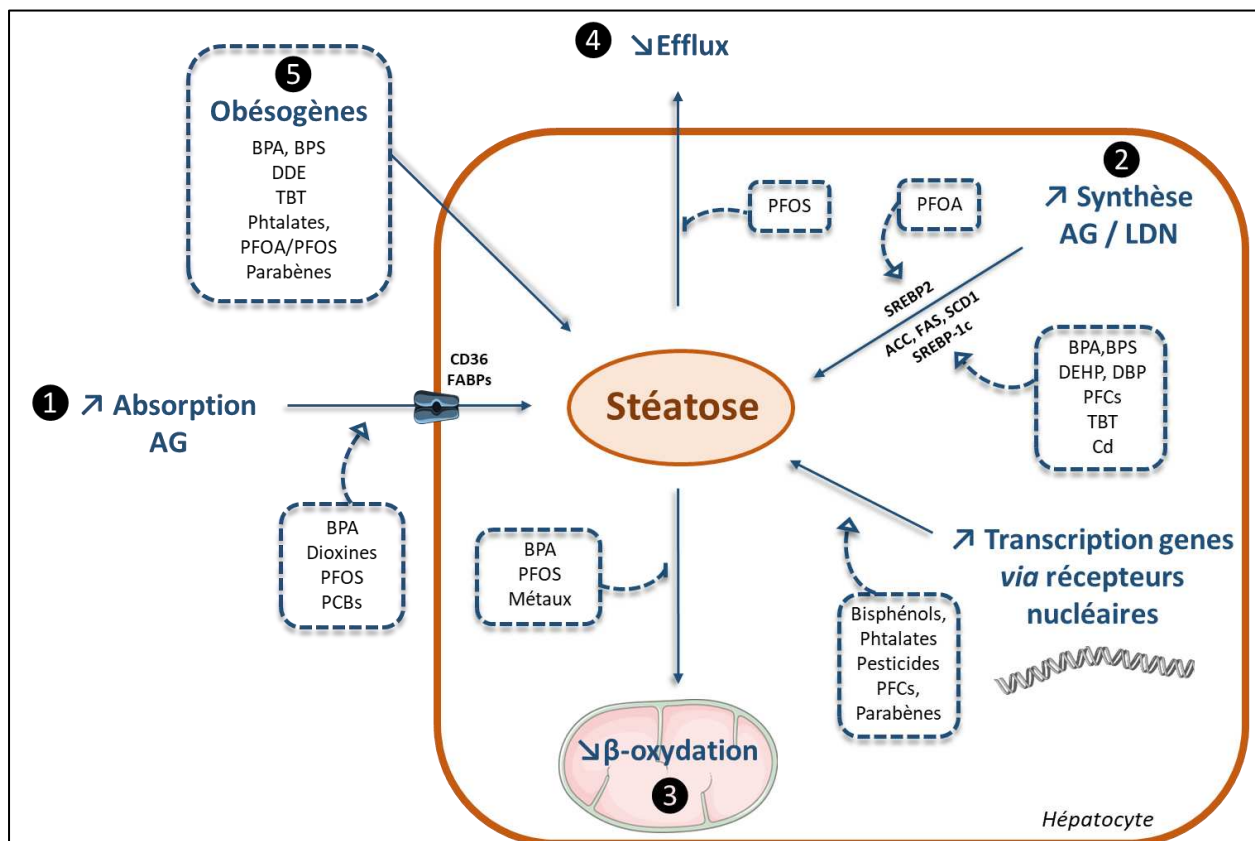


Figure 23 : Mécanismes moléculaires induits par l'exposition aux PE, menant au développement de la stéatose. La perturbation de la signalisation résultant de l'interaction entre les PE et les récepteurs nucléaires déclenche une altération des voies métaboliques qui favorisent l'accumulation des lipides dans les hépatocytes : (1) une augmentation significative de l'absorption des lipides, (2) une augmentation de la LDN (3) une diminution de l'oxydation des AG, (4) une inhibition de la sécrétion lipidique sous forme de VLDL. Certains PE ont également été décrits pour leurs propriétés obésogènes (5).

Des modifications épigénétiques peuvent expliquer ces effets médiés par les PE. Ainsi l'exposition au BPA induit une dérégulation du miR-192 corrélée à l'augmentation de l'activité de SREBP-1c et de la LDN, concomitante de l'augmentation de synthèse de TG hépatique (Lin et al., 2017). Le PFOA a également été décrit pour favoriser la synthèse de lipides hépatiques *via* SREBP-1c, dont la maturation serait médiée par des miR augmentés au niveau hépatique (Yan et al., 2015).

De nombreux PE sont également impliqués dans la résistance à l'insuline, caractéristique et facteur de risque pour le développement de la stéatose (Mimoto et al., 2017). Les BPA, BPF, cadmium et phtalates perturbent la signalisation et l'action de l'insuline (James-Todd et al., 2016; Wang et al., 2012; Zhang et al., 2017; Zhao et al., 2018) par des défauts de phosphorylation du récepteur IRS-1 (Batista et al., 2012), une dérégulation des protéines GLUT (principal transporteur du glucose) (Batista et al., 2012; Han et al., 2003; Rajesh and Balasubramanian, 2014) ou des altérations de la néoglucogenèse (Martinelli et al., 2006). Le BPA est impliqué dans l'initiation de la résistance à l'insuline à la fois au niveau hépatique et périphérique, augmentant ainsi la glycolyse pour la production de TG hépatiques, ainsi que la lipolyse du tissu adipeux augmentant ainsi les taux circulants d'AGL acheminés jusqu'au foie (Dallio et al., 2019; Polyzos et al., 2012).

3. Mécanismes impliqués dans la transition de la stéatose vers la stéatohépatite par les PE

Certains toxiques ont également été décrits pour induire la mort cellulaire, l'inflammation ou encore la fibrose hépatique, événements impliqués dans la progression pathologique des NAFLD. En effet, certains de ces toxiques seraient impliqués dans la production d'espèces lipidiques lipotoxiques ainsi que dans l'induction d'un dysfonctionnement mitochondrial, d'un stress oxydant, d'un stress du RE, et d'une dysbiose intestinale (Joshi-Barve et al., 2015; Wahlang et al., 2019) (Figure 24).

La plupart des PE sont capables d'induire des dysfonctions mitochondriales impliquées dans la production excessive d'ERO, le stress oxydant, l'accumulation de lipides, la mort cellulaire et l'inflammation (Simões et al., 2018). C'est le cas du BPA, par exemple, qui induit une diminution d'expression de gènes de la biogénèse mitochondriale (TFAM, SIRT1), ainsi que l'inhibition des complexes de la chaîne respiratoire menant à une altération de la phosphorylation oxydative (OXPHOS) et de la production d'ATP (Huc et al., 2012; Khan et al., 2016). De plus, le BPA serait capable d'activer les voies intrinsèques de l'apoptose *via* la caspase-3, Bax et Bcl-2, pouvant, de cette façon, contribuer à la pathogénèse des NAFLD (Jiang et al., 2014). Les autres PE, tels que le BPS, les phtalates DEHP et DBP, le DDE ou encore les PFOA/PFOS entraînent également des altérations fonctionnelles (diminution de l'activité de la chaîne respiratoire et de la production d'ATP) et structurelles des mitochondries. Ces perturbations sont associées à une production élevée d'ERO mitochondriales et à une peroxydation lipidique favorisant le stress oxydant, caractéristique importante de la progression pathologique (Azevedo et al., 2019; Chen et al., 2016; Cheng et al., 2016; Elmore and La Merrill, 2019; Hagenars et al., 2013; Liu et al., 2017; Morales-Prieto et al., 2018; Xu et al., 2013). Le DDT entraîne une production accrue d'ERO dépendante de l'activation des CYP450 impliqués dans sa voie de détoxification (Migliaccio et al., 2019). Il a été

rapporté que les dysfonctions mitochondriales et le stress oxydant sont les principaux mécanismes de toxicité induits par le cadmium (He et al., 2019; Pan et al., 2018), qui favorise le développement de la NASH par la suppression de la signalisation de PPAR α -SIRT1 (régulateurs de la β -oxydation des AG) (Alshehri et al., 2021; He et al., 2019). En parallèle de l'augmentation du stress oxydant, une diminution de l'activité de la machinerie antioxydante (SOD, glutathion, CAT, peroxydase) est également observée après exposition aux PE (BPA, PFOA/PFOS, cadmium) (Hagenaars et al., 2013; He et al., 2019; Huc et al., 2012; Polyzos et al., 2012), dérégulant l'équilibre oxydatif des cellules hépatiques. Dans ce sens, l'exposition au DEHP et/ou à son métabolite, le MEHP, a été décrite, dans des études *in vivo* et *in vitro* pour aggraver les NAFLD et favoriser le développement de la stéatose vers la NASH (Hsu et al., 2021; Tête et al., 2020; Zhang et al., 2019), principalement en perturbant l'équilibre oxydatif des cellules hépatiques (Chen et al., 2016).

Un stress du RE a été retrouvé dans de nombreuses études *in vivo*, suite à l'exposition aux Bisphénols (BPA et BPS), au PFOS, ou encore au cadmium (Asahi et al., 2010; Fai Tse et al., 2016; Hu et al., 2022; Jin et al., 2016; Qin et al., 2020).

Le cadmium a également été décrit comme inducteur de mort cellulaire en inhibant les désaturases et donc favorisant l'augmentation d'AGS lipotoxiques (Zhu et al., 2022). Le DDE a lui aussi été associé à des modifications des profils métabolomiques avec une augmentation des taux d'AGS et AGMI, ainsi que l'élévation des taux de sphingolipides et de céramides en particulier, à l'origine de la lipotoxicité (Liu et al., 2017; Olsvik and Sjøfteland, 2018).

L'inflammation peut également être induite en réponse aux expositions aux PE *via* l'infiltration de cellules inflammatoires, l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires, l'activation de l'inflammasome (Cano et al., 2021; Chen et al., 2016; Li et al., 2021; Weng et al., 2020; Xu et al., 2013). Le BPA et les PFOA/PFOS ont ainsi été associés à une augmentation de la libération de cytokines pro-inflammatoires (IL-8, IL-6, TNF- α , IL-1 β) (Acaroz et al., 2019; Feng et al., 2020; Huc et al., 2012; Yang et al., 2014), mais également à une activation de cellules de Kupffer et à leur polarisation en phénotype M1 pro-inflammatoire (Han et al., 2018; Lv et al., 2017). L'exposition au cadmium peut entraîner une inflammation hépatique en s'internalisant dans les cellules de Kupffer par leur liaison aux métallothionéines déclenchant l'activation de l'inflammasome (Li et al., 2021).

L'exposition au DEHP a également été associée à l'augmentation de facteurs pro-fibrogéniques, activant les cellules étoilées favorisant, dans ce contexte de micro-environnement pro-inflammatoire, le développement de fibrose (Chen et al., 2016; Zhao et al., 2019). De même, l'exposition à la TCDD exacerbe la NAFLD induite par un régime HFD et potentialise l'induction d'une fibrose hépatique (Duval et al., 2017; Han et al., 2017).

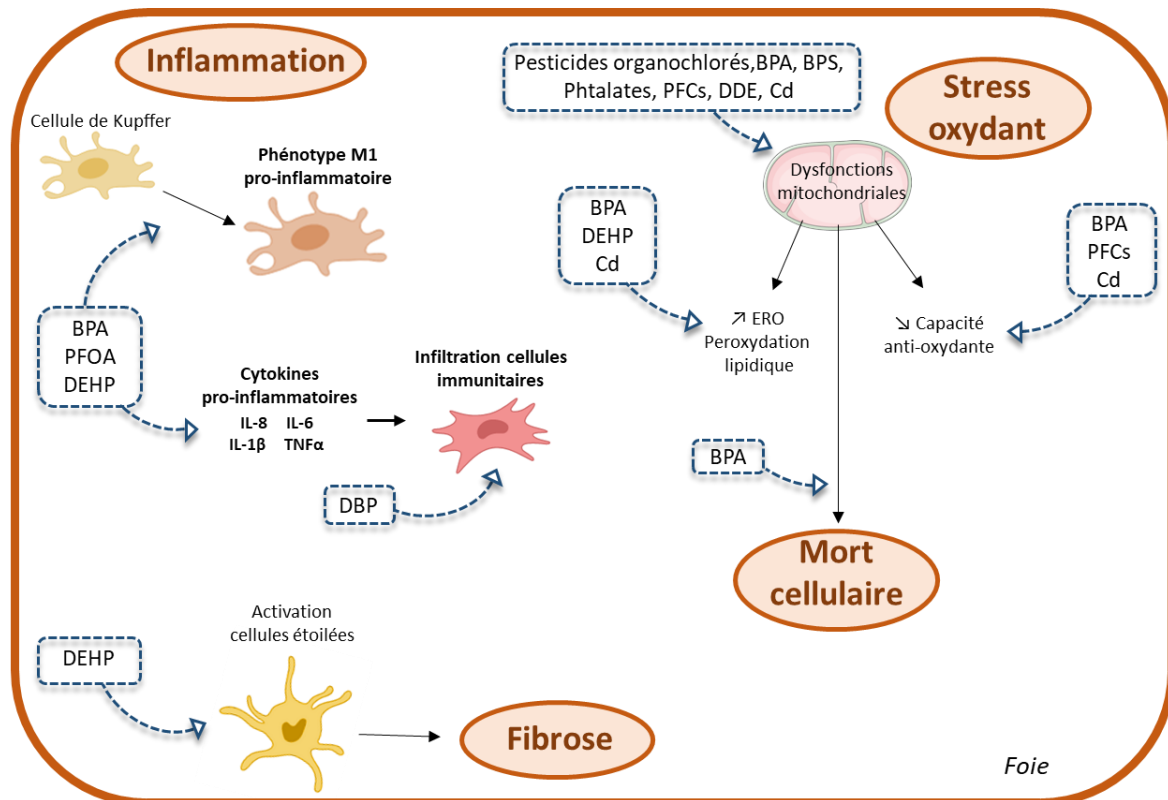


Figure 24: Effets des PE dans la progression pathologique des NAFLD. Plusieurs PE favorisent l'inflammation hépatique par divers mécanismes tels que l'induction de la production de cytokines et la polarisation des cellules de Kupffer vers un phénotype pro-inflammatoire et l'augmentation de l'infiltration des cellules immunitaires. La plupart des PE entraînent des dysfonctions mitochondriales favorisant la production d'ERO et le stress oxydant, participant *in fine* à la pathogénèse de la NASH. Enfin, certains PE activent les cellules étoilées hépatiques favorisant le développement de fibrose.

D'autres mécanismes reconnus dans le processus physiopathologique des NAFLD peuvent être dérégulés par les PE. Un lien est notamment fait entre l'exposition à certains PE, comme le BPA, le BPS, le DDE ou l'exposition aux POP, et l'altération du microbiote intestinal *via* une perturbation de la composition microbienne intestinale ainsi que l'augmentation de la perméabilité intestinale (Bernal et al., 2022; Dallio et al., 2019; Feng et al., 2020; Gomez et al., 2020; Liang et al., 2020). La libération d'endotoxines dans la circulation serait impliquée et favoriserait le développement d'une inflammation hépatique, responsable de la progression vers des stades NASH (Feng et al., 2020). Le rôle du récepteur AhR est suspecté dans cette altération de l'axe foie-intestin. En effet, l'altération du microbiote dans les maladies métaboliques diminue la production de ligands d'AhR, avec pour conséquence une augmentation de la perméabilité intestinale et une diminution de la sécrétion de l'hormone intestinale GLP-1 (Glucagon-like peptide-1). Or GLP-1 est une incrépine impliquée dans le maintien de l'homéostasie du glucose et de la fonction hépatique. Ainsi, l'exposition au PCB 126 a été associée à une dysbiose intestinale *via* la diminution de GLP-1 liée à des modifications des espèces bactériennes présentes dans le microbiome (Petriello et al., 2018). De plus, l'activation d'AhR médie la libération d'IL22, cytokine capable de réduire les troubles métaboliques (Natividad et al., 2018). Du fait de son rôle physiologique dans le maintien de la fonction de la barrière intestinale et dans l'inflammation, l'implication du récepteur PXR, activé

par les contaminants de l'alimentation, a également été rapporté dans l'initiation de la dysbiose intestinale (Barretto et al., 2021; Cave et al., 2016).

4. Autres mécanismes induits par les PE impliqués dans la pathogenèse des NAFLD : cas du rythme circadien et du système endocannabinoïde

Récemment, une perturbation du rythme circadien a été décrite comme mécanisme potentiel par lequel les PE peuvent induire une perturbation du métabolisme des lipides. Le rythme circadien régule tous les processus biologiques comme le sommeil et l'alimentation, sur des durées cycliques de 24h. Des troubles du sommeil et des perturbations des schémas circadiens normaux de l'apport alimentaire altèrent les rythmes métaboliques, qui sont étroitement liés au métabolisme des lipides et du glucose (Longo and Panda, 2016; Sato et al., 2018). Des études réalisées chez l'Homme ont montré que des niveaux plus élevés de BPA urinaire étaient associés à une durée de sommeil plus courte (Beydoun et al., 2016). L'exposition au BPA est capable d'altérer l'expression des gènes de l'horloge circadienne (Rhee et al., 2014). De plus, ces gènes peuvent notamment réguler directement le récepteur PPAR γ et l'adipogénèse (Chen and Yang, 2014).

Ces dernières années, un lien direct entre le système endocannabinoïde (SE) et son implication dans les dérégulations métaboliques a émergé. Le SE régule l'équilibre et l'homéostasie du corps (gestion du poids, température, glycémie, rythme cardiaque), de par l'action des récepteurs membranaires (CB1 et CB2) et de ses ligands, les endocannabinoïdes, des dérivés d'AG (dont les principaux sont l'anandamide et le 2-arachidonoylglycerol, des dérivés de l'acide arachidonique). Ces dérivés d'AG se lient et activent les PPARs pour moduler les comportements alimentaires et le métabolisme des lipides (Pagano et al., 2008). Certains PE seraient capables de déréguler l'équilibre métabolique contrôlé par le SE et ainsi participer aux NAFLD. Le DEHP, par exemple, stimulerait le SE et la stéatose hépatique par une surexpression de CB1 (Cheng et al., 2018), alors que le BPA stimulerait également le SE mais cette fois-ci en favorisant l'augmentation des taux d'endocannabinoïdes endogènes (Martella et al., 2016).

Ainsi, les PE sont impliqués dans le développement et la progression des NAFLD à travers différents mécanismes d'action en perturbant les voies métaboliques menant à l'accumulation de lipides hépatiques et à la stéatose ; ainsi qu'en contribuant au stress oxydant ou au développement de l'inflammation pour promouvoir la transition vers la stéatohépatite jusqu'au stade fibrotique. En favorisant le développement d'insulino-résistance ou de l'adipogénèse, ils créent un environnement propice aux dysfonctions métaboliques. Cependant, si la plupart des études mécanistiques ont été réalisées lors d'exposition unique, la population est en réalité exposée à tout un mélange de molécules pouvant agir en synergie entre elles et avec l'alimentation. De ce fait, il y a de plus en plus d'intérêt à étudier les effets de ces molécules en mélange (effet cocktail) pour mieux comprendre leurs modes d'action et mieux en appréhender les risques pour la santé.

5. Effet des co-expositions (HFD/PE) et des mélanges de PE

Les PE combinés à d'autres facteurs de risque, comme la présence d'obésité ou d'une stéatose préalablement installée, sont connus pour avoir un impact hépatotoxique plus élevé et peuvent donc déclencher l'aggravation des NAFLD.

En effet, la présence au préalable d'une stéatose hépatique, peut augmenter la sensibilité aux lésions hépatiques causées par les toxiques environnementaux. Par exemple, au sein de notre équipe, nous avons montré *in vitro* et *in vivo*, notamment sur un modèle de larve de poisson-zèbre, que la présence au préalable d'une stéatose induite par un régime HFD sensibilise le foie à l'exposition aux toxiques, favorisant ainsi l'évolution vers la NASH (Imran et al., 2018; Tête et al., 2020). Dans un modèle rongeur, une exposition au BPA ou à un mélange de PCBs entraîne une stéatohépatite uniquement chez les animaux nourris avec un régime HFD (Wahlang et al., 2014; Wei et al., 2014). De même, le DEHP augmente les désordres métaboliques de souris obèses en favorisant le développement de l'inflammation (Hsu et al., 2021).

Ces effets peuvent en partie s'expliquer par des dérégulations des enzymes responsables du métabolisme de détoxification des xénobiotiques, comme les CYP450, qui prennent en charge la plupart des produits chimiques industriels (Rendic and Guengerich, 2015). En cas de dérégulations des CYP450, la détoxification des contaminants peut être incomplète ou entraîner une toxicité hépatique, favorisant la transition vers la TASH (Merrell and Cherrington, 2011). Dans ce sens, il a précédemment été décrit par notre équipe, sur modèle *in vitro*, que la présence d'une stéatose augmentait la toxicité d'une co-exposition au B[a]P/Ethanol en modifiant le métabolisme du B[a]P (Bucher et al., 2018b; Tête et al., 2020). Notamment, la stéatose induite par un régime HFD, pourrait épuiser les capacités d'oxydations mitochondriales des cellules hépatiques, qui exposées par la suite aux toxiques, aggrave la stéatose. Ainsi, en diminuant les défenses antioxydantes du foie ou en altérant le métabolisme des xénobiotiques, la présence de stéatose sensibiliserait cet organe aux agressions ultérieures de toxiques de l'environnement (Wahlang et al., 2013a ; Heindel et al., 2015 ; Heindel et al., 2017). Enfin, des effets combinés peuvent également se produire entre alimentation et expositions aux toxiques, jouant un rôle dans la pathogénèse des NAFLD. Par exemple, l'hépatotoxicité du PFOA est augmentée, *via* la hausse de l'inflammation et de la mort cellulaire nécrotique chez les souris nourries avec un régime HFD (Tan et al., 2013). L'exposition au PCB 126, entraîne le développement de dommages hépatiques aggravés, d'inflammation et de fibrose quand elle est couplée à un régime HFD (Wahlang et al., 2017). L'effet du DDE est également potentialisé lorsqu'il est couplé au régime HFD en aggravant les dysfonctions métaboliques et l'inflammation (Pestana et al., 2017), mais également en augmentant les espèces lipidiques toxiques (Rodríguez-Alcalá et al., 2015). Enfin il a été montré sur le modèle rongeur, que l'effet combiné du BPA et du HFD entraînait un phénotype de NASH, comparé au BPA ou au régime seul (Wei et al., 2014).

L'Homme est quotidiennement exposé à des mélanges de contaminants plutôt qu'à un seul composé, *via* l'alimentation, l'air ambiant, le contact cutané, ou la fumée de cigarette pour les individus fumeurs. Cependant, peu d'études se concentrent sur cet effet « cocktail » du fait de la complexité à décrypter clairement les mécanismes impliqués.

D'un point de vue épidémiologique, quelques études ont évalué chez l'homme la relation entre des mélanges de contaminants environnementaux avec les taux élevés d'enzymes hépatiques, indicatifs des dommages hépatiques (Gleason et al., 2015; Rantakokko et al., 2015; Serdar et al., 2014; Yorita Christensen et al., 2013). Au niveau expérimental, il a été examiné, dans des modèles rongeurs, l'effet de mélanges de POP (PCBs, TCDD, pesticides organochlorés ou encore métaux lourds) sur la stéatose hépatique (Ambolet-Camoit et al., 2015; Mulligan et al., 2017; Shan et al., 2015). Il a ainsi été décrit que l'exposition de souris à un mélange de contaminants à faibles doses (BPA, PCB 153, DEHP et TCDD), entraîne l'apparition d'une stéatose hépatique et des effets synergiques avec l'alimentation (Labaronne et al., 2017; Naville et al., 2019, 2013). De même l'exposition à un mélange de polluants (phtalates, triclosan, PFCs) à des concentrations similaires à celles retrouvées chez l'Homme, stimule l'adipogénèse et le stockage des lipides sur un modèle *in vivo* de poisson-zèbre (Mentor et al., 2020). L'exposition par voie orale de souris obèses à un mélange de 22 contaminants environnementaux exacerbe également la stéatose présente initialement chez ces animaux (Mailloux et al., 2014). Par ailleurs, les mélanges de toxiques peuvent avoir des effets additifs, potentialisateurs ou encore antagonistes. Par exemple, la combinaison de TCDD et d'Arochlor (mélanges de PCBs) a un effet plus important sur le développement de NAFLD chez la souris, par rapport à l'exposition aux molécules seules (Shan et al., 2015). A l'inverse, tandis que la co-exposition de rats à la dioxine TCDD seule conduit à l'apparition de NAFLD, la co-exposition avec le DEHP entraîne une diminution de la NASH induite par la TCDD (Tomaszewski et al., 1988). Dans ce contexte, notre équipe s'intéresse depuis de nombreuses années, à évaluer l'impact des co-expositions aux contaminants environnementaux principalement au Benzo[a]pyrène (HAP) et à l'éthanol et a constaté que la co-exposition était plus préjudiciable que des exposition seules (Collin et al., 2014). De plus, il a été observé que cette co-exposition, même à faible dose, pouvait favoriser la progression de la stéatose vers un état de type stéatohépatite (Bucher et al., 2018b, 2018a; Imran et al., 2018; Tête et al., 2018).

Pour résumé, si de nombreux PE ont été décrits pour être impliqués dans l'initiation et la progression des NAFLD, dans la suite de manuscrit, un focus sera fait sur un ensemble de 10 PE, utilisés au cours des expérimentations réalisées lors de cette thèse: les bisphénols A, S, F; les phtalates DEHP et DBP; les composés perfluorés PFOA et PFOS; le métabolite de l'insecticide DDT, le DDE; le métal lourd cadmium; et le conservateur butyl-paraben.

IV. Ligne directrice pour l'évaluation des PE par l'OCDE

Face à la grande quantité de substances chimiques produites et retrouvées dans notre vie quotidienne et leurs potentiels effets toxiques sur la santé humaine (potentiels puisque, pour certaines molécules, ces effets ne sont pas encore démontrés), il apparaît un besoin plus important de réglementations et de méthode d'évaluation des risques. Pour garantir des conditions de vie saines, l'Union Européenne dispose de plusieurs agences en charge de la

régulation et de l'évaluation des risques des produits chimiques : l'ECHA (« European chemicals Agency ») ou encore l'EFSA (« European food safety agency »). Entrée en vigueur le 1er juin 2007, la réglementation REACH⁶ ("Registration, Evaluation, Autorisation and Restriction of Chemicals") en particulier vise à évaluer les risques liés aux produits chimiques sur la santé humaine et l'environnement. Ainsi, ces agences réglementaires évaluent les substances produites en quantité élevée depuis 2018 et concluent sur leur autorisation de mise sur le marché ou leur restriction. Ces organisations sont également en charge d'établir les valeurs seuils toxicologiques de références, bien que concernant les PE, plusieurs rapports indiquent de reconsidérer les doses tolérables soulignant que l'évaluation des risques ne serait pas suffisamment protectrice (Kassotis et al., 2020).

Pour ce faire, une organisation internationale, l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economique), a mis en place des normes et des lignes directrices concernant les tests de sécurité réglementaires à effectuer par les industries et laboratoires pour évaluer la toxicité des substances chimiques. Ainsi, différents tests standardisés (sur modèles *in vitro* et *in vivo* ; modèles mammifères ou non) sont disponibles permettant notamment d'évaluer l'effet de perturbation endocrinienne des substances chimiques (lignes directrices n°150). A titre d'exemple, 8 études toxicologiques réglementaires ont été menées sur le BPS conformément aux lignes directrices de l'OCDE pour l'évaluation de ses effets toxiques (Beausoleil et al., 2022) et ont conduit à sa classification comme toxique pour la reproduction de catégorie 1B (ECHA, 2020). Cependant, les différents tests proposés par l'OCDE (41 au total pour évaluer le caractère de perturbateur endocrinien d'une substance) se concentrent surtout sur les perturbations endocriniennes médiées par les hormones (œstrogènes, androgènes, thyroïdienne) et n'évaluent pas le potentiel de perturbation métabolique de ces composés. De plus, certains tests toxicologiques, basés sur les expérimentations animales sur mammifères, sont long à mettre en place et coûteux. Ainsi, devant le nombre important de substances à venir sur le marché, le développement de nouvelles stratégies de tests pour évaluer rapidement les effets de PE sur les maladies métaboliques est nécessaire.

Au regard des exigences et du très grand nombre de substances chimiques à évaluer, la réglementation REACH pousse à limiter les expérimentations sur les vertébrés et à promouvoir le développement de méthodes alternatives à l'expérimentation animale. D'un point de vue éthique également, l'OCDE pousse à l'utilisation de techniques *in vitro* et *in silico* pour étudier les mécanismes d'actions des molécules toxiques et leurs effets sur les maladies métaboliques. Cependant, les informations provenant d'organismes entiers restent nécessaires pour intégrer tous les processus physiologiques intervenant au cours d'une pathologie (cellulaire et moléculaire). Pour cela, la réglementation REACH applique, pour l'expérimentation animale, le principe des 3Rs pour « Réduire, Raffiner, Remplacer » (Tableau 4), qui prend en compte le respect des règles de bien-être des animaux et l'optimisation des conditions d'utilisation des animaux.

⁶ Dans un communiqué paru en octobre 2020, l'UE annonçait son plan de révision de REACH, visant à revoir la législation de nombreuses substances chimiques nocives pour fin 2022. Cette proposition de révision vient d'être récemment reportée reportée à fin 2023.

Les 3Rs veillent également à promouvoir l'utilisation de méthodes alternatives à l'expérimentation animale (*in vitro*, *in silico*) dans l'évaluation des dangers liés à ces substances, ou à défaut de limiter le nombre d'animaux et leurs souffrances.

Tableau 4 : Principe des 3Rs mis en place par la réglementation REACH dans le cadre de l'expérimentation animale dans l'évaluation des risques liés aux substances chimiques

	Principe	Comment faire ?
Réduire	Réduire au minimum de nombre d'animaux utilisés, ainsi que le nombre de répétitions	Optimiser les protocoles expérimentaux
Raffiner	Optimiser les conditions d'utilisation des animaux. Minimiser et soulager la souffrance et promouvoir le bien-être animal	Utiliser des techniques peu ou non invasives (imagerie, analyses <i>in vivo</i>) ; améliorations des procédures expérimentales (utilisation d'anesthésique/analgésique, réduire la durée d'exposition)
Remplacer	Remplacer ou éviter les tests sur le modèle animal lorsqu'il n'est pas indispensable	Utiliser des modèles <i>in vitro</i> , <i>in silico</i>

Cette règle des 3Rs, incite également, à l'utilisation de modèles *in vivo* non mammifères, qualifiés de modèles alternatifs (poisson ou amphibiens). Le poisson est un modèle d'étude déjà utilisé dans de nombreux domaines et notamment en toxicologie environnementale, car il est l'un des premiers organismes à subir la pollution chimique dans les eaux. L'OCDE propose déjà différents tests validés ou en cours de validation utilisant le modèle du poisson pour évaluer une substance en terme de toxicité ou de perturbation endocrinienne (certains d'entre-eux seront présentés plus tard dans le Tableau 5 ; Chapitre 3 / Application du poisson-zèbre dans le domaine de la toxicologie).

V. Modèles d'évaluation du risque lié aux PE dans les NAFLD/TAFLD.

Actuellement la capacité à traiter les NAFLD/TAFLD et en particulier le stade pathologique de la stéatohépatite est contrainte par notre connaissance limitée des mécanismes sous-jacents. L'utilisation de modèles *in vivo* est devenu un outil indispensable pour comprendre la physiologie complète de la maladie et des processus métaboliques intervenant dans les NAFLD. Bien que les études *in vitro* aident à la compréhension des mécanismes cellulaires intervenant dans la pathogénèse des NAFLD (Kassotis et al., 2022), celles-ci sont peu transposables à l'Homme et ne récapitulent pas complètement la complexité du foie humain, ni les interactions entre les organes qui agissent en synergie pour créer le contexte pathologique des NAFLD (tissu adipeux, pancréas, foie), ni les effets néfastes qui peuvent se développer plus tard dans la vie après des expositions *in utero*. Ainsi de nombreux modèles *in vivo* ont été décrits et utilisés pour l'étude du développement et de la progression des NAFLD.

Le **modèle rongeur** est celui qui a été le plus utilisé pour l'étude des NAFLD, notamment parce que la transposition à l'homme, aux niveaux anatomique, physiologique, cellulaire et moléculaire, est relativement aisée. Ces petits mammifères présentent en particulier au niveau du foie de grandes ressemblances phénotypiques et génotypiques avec l'Homme. Ils sont donc les modèles

traditionnellement utilisés pour l'étude des mécanismes sous-jacents des maladies du foie. Des modèles rongeurs de NAFLD ont été développés avec l'utilisation de régimes hypercaloriques, de régimes riches en graisse (HFD) et/ou en sucre, de régimes déficients en méthionine et en choline (MCD), ou par des manipulations génétiques comme les souris ob/ob et db/db (qui présentent des défauts de la voie de signalisation de la leptine et développent une obésité, une stéatose et une résistance à l'insuline) (Kanuri and Bergheim, 2013; Nagarajan et al., 2012; Panchal and Brown, 2011). D'autres modèles ont permis d'étudier les séquences d'évènements conduisant à la stéatose hépatique, à la stéatohépatite, à la fibrose hépatique et au CHC (Itoh et al., 2011). De plus, ce modèle a été utilisé en tant qu'organisme modèle pour tester l'efficacité de certains agents thérapeutiques candidats (Nagarajan et al., 2012).

Bien que chaque modèle rongeur développé pour l'étude des NAFLD présente des avantages spécifiques, aucun d'entre eux ne rassemble toutes les caractéristiques de la NAFLD humaine. Par exemple, les modèles déficients en méthionine et choline présentent une stéatose et une NASH mais pas d'obésité ; alors que les modèles ob/ob développent une obésité et une stéatose mais nécessitent un régime spécifique (MCD ou HFD) pour progresser vers la NASH, et sont résistants à la fibrose (Kanuri and Bergheim, 2013). De plus, dans ce modèle, la maladie met du temps à se développer, rendant difficiles les études transgénérationnelles. Enfin l'utilisation du modèle rongeur présente ses limites notamment du fait de leur taille relativement importante, leur petit nombre de descendants, leur vitesse de développement et leurs coûts financiers relativement élevés. Ces différents critères rendent l'utilisation de ce modèle relativement difficile voire impossible pour des criblages à haut débit.

Au-delà des modèles rongeurs classiquement utilisés pour l'étude des maladies métaboliques, et dans le respect de la règle des 3Rs, ces dernières années, de nouveaux modèles qualifiés « d'alternatifs » ont émergé. Parmi lesquels on trouve : les vers, *Caenorhabditis elegans*, les mouches, *Drosophila melanogaster* et le poisson-zèbre, *Danio rerio* (Schlegel and Stainier, 2007). Ces espèces présentent plusieurs avantages, dont leur petite taille, un développement relativement rapide, un génome entièrement séquencé, ainsi que la possibilité d'obtenir rapidement un grand nombre de descendants. Ces avantages permettent aussi d'utiliser ces modèles pour le criblage haut débit de produits chimiques (Benchoula et al., 2019; Kassotis et al., 2022; P. Shen et al., 2018; Volkoff, 2019; Warr et al., 2018).

C.elegans et ***D.melanogaster*** ont précédemment été utilisés comme organismes modèles pour l'étude de l'obésité et du syndrome métabolique, du fait qu'ils possèdent les mécanismes impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique, lipidique et insulinaire (Bayliak et al., 2019; Hashmi et al., 2013; P. Shen et al., 2018; Warr et al., 2018; Watts, 2009). Ils ont ainsi permis de comprendre les mécanismes d'accumulation des lipides et d'identifier les composés modulant le stockage des graisses et favorisant l'obésité (Bouyanfif et al., 2019; Lemieux et al., 2011; Martorell et al., 2012; McKay et al., 2003; Mohajer et al., 2021), comme le méthylmercure, le BPS ou le DEHP (Caito et al., 2020; Cao et al., 2016; Chen et al., 2019; Xiao et al., 2021). Cependant, ils stockent les lipides dans des cellules non spécialisées (le corps gras pour *D.melanogaster* et les cellules intestinales et épidermales pour *C.elegans*) et certains organes indispensables au

métabolisme sont absents (foie, pancréas, système immunitaire), suggérant une conservation plus faible des processus biologiques (Mullaney and Ashrafi, 2009; Warr et al., 2018; Watts, 2009).

Les poissons, comme **le poisson-zèbre** (*Danio rerio*) et **le médaka** (*Oryzias latipes*), sont de plus en plus utilisés comme alternative aux rongeurs pour des études sur le développement et en (éco)toxicologie. En particulier, ils sont largement utilisés pour l'étude des mécanismes impliqués dans la pathogénèse et la progression des NAFLD et pour l'étude du métabolisme des lipides suite à une exposition aux PE. Comme les mammifères, ils possèdent tous les organes contrôlant l'homéostasie énergétique et le métabolisme (pancréas, foie, muscle squelettique, tissu adipeux). De plus, ils peuvent être rapidement et facilement manipulés pour modéliser les maladies hépatiques à un coût relativement faible (Asaoka et al., 2013; Faillaci et al., 2018; Goldsmith and Jobin, 2012; Salmi et al., 2019; Schlegel and Stainier, 2007). Un grand nombre de poissons génétiquement modifiés et/ou traités chimiquement ont été développés pour l'étude des NAFLD (Asaoka et al., 2013). Notamment, l'utilisation de la larve de poisson-zèbre s'est répandue pour modéliser diverses maladies humaines et connaît un intérêt particulier pour l'étude des NAFLD (Goldsmith and Jobin, 2012; Kassotis et al., 2022; Schlegel and Stainier, 2007). L'utilisation de la larve de poisson-zèbre comme organisme modèle pour l'étude des NAFLD sera développée plus en détails dans le 3ème chapitre de cette thèse.

Chapitre III : Le poisson-zèbre (*Danio rerio*)

Parmi les modèles animaux utilisés pour la recherche scientifique, le poisson-zèbre est devenu, ces dernières décennies, un puissant outil dans différents domaines : biologie du développement, génétique, toxicologie, éthologie, découverte de médicaments et cancérologie. Du fait de ces nombreux avantages (taille, rentabilité, transparence, développement rapide, fécondation *ex-utero*) et de ses fortes similitudes avec les mammifères, la popularité de ce modèle ne cesse de grandir pour comprendre divers mécanismes physiopathologiques, dont ceux intervenant dans les maladies hépatiques (Bambino and Chu, 2017; Teame et al., 2019). En effet, concernant les maladies métaboliques, il est devenu l'un des modèles les plus utilisés pour l'étude des NAFLD (Goldsmith and Jobin, 2012; Katoch and Patial, 2021; Menke et al., 2011).

I. Caractéristiques générales sur le poisson-zèbre

Le poisson-zèbre ou zebrafish ou encore *Danio Rerio* est un poisson téléostéen, de la famille des Cyprinidés. C'est un poisson tropical d'eau douce originaire d'Asie du Sud, dont l'habitat naturel est les rizières, les eaux stagnantes et les petits cours d'eau à faible débit.

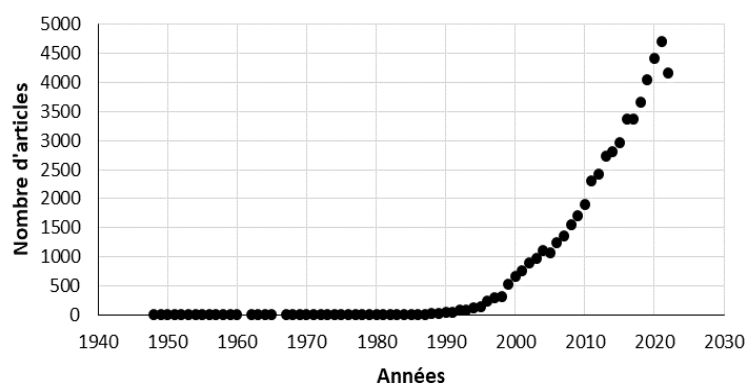


Figure 25 : Nombre d'articles scientifiques portant sur le poisson-zèbre parus sur Pubmed de 1940 à nos jours.

i. Historique

Découvert dans la rivière du Gange à la fin du 19^{ième} siècle, les chercheurs se sont tout d'abord intéressés à son développement, en raison de sa capacité à produire de grandes portées d'embryons transparents pouvant être élevés en laboratoire (Roosen-Runge, 1937). Par la suite, les premières études retrouvées dans la littérature scientifique, utilisant le poisson-zèbre comme modèle en Biologie datent de 1952 ; elles étudiaient la toxicité de l'éthyle carbamate (uréthane) sur son développement précoce (Battle and Hisaoka, 1952). Dans les années 1970, George Streisinger, considéré comme le pionnier de la recherche sur le poisson-zèbre, a grandement popularisé l'utilisation de ce modèle aquatique dans la recherche en Biologie. De nos jours, il est largement utilisé comme organisme modèle dans presque tous les domaines de la recherche en biologie : la reproduction, le développement, la neurobiologie, le comportement, la toxicologie

(Teame et al., 2019), comme nous montre l'augmentation croissante, au fil des années, de son utilisation dans la recherche scientifique (Figure 25).

ii. Développement

Le poisson-zèbre est ovipare ; les femelles peuvent pondre jusqu'à une centaine d'œufs. Le développement embryonnaire du poisson-zèbre a bien été décrit dans la littérature (Kimmel et al., 1995). Après fécondation, les premières divisions cellulaires ont lieu. Puis l'embryon débute son organogénèse à l'intérieur d'un chorion et va puiser les lipides et nutriments nécessaires à son développement directement dans sa réserve vitelline, qui constitue une réserve énergétique héritée de la mère. Après l'éclosion, entre 48 et 72 heures post fécondation (hpf), l'embryon continue son développement et passe à un stade appelé eleuthéroembryon, au cours duquel il continue de se nourrir de manière endogène et va progressivement épuiser ses réserves vitellines. A partir de 120 hpf, celles-ci sont épuisées et il va chercher activement à se nourrir dans son environnement. Ceci est rendu possible car les principaux organes nécessaires à son alimentation sont fonctionnels : il possède ainsi une bouche ouverte (dès 72hpf), un intestin développé et des appendices –foie, pancréas- fonctionnels (à 76hpf), une vessie natatoire gonflée nécessaire à la nage pour la capture des aliments, tout ceci rendant l'absorption et le traitement des aliments externes possibles dès 120hpf. La nécessité de l'apport de nourriture exogène et l'acquisition de la nage spontanée marque le début du stade larvaire qui s'étend jusqu'à l'étape de métamorphose autour de 35 jpf (jour post-fécondation). C'est à partir de cet âge que la différenciation des gonades sexuelle intervient, marquant le passage du stade larvaire au stade juvénile entre 5 et 7 semaines. Il convient de noter que avant ce stade, le poisson-zèbre est considéré comme étant de sexe indifférencié, puisque l'expression de gènes impliqués dans la détermination du sexe ou la différenciation des gonades avant 8 jpf n'a pas été rapportée (Kossack and al., 2019). Cependant, des études ont montré qu'au stade larvaire du poisson-zèbre (13-25 jpf), le développement ovarien était considéré comme la voie par défaut, avec des gonades de type femelle. Par la suite, l'apoptose des ovocytes a été considéré comme un mécanisme clé impliqué dans la différenciation testiculaire et ovarienne (autour de 20-25 jpf). En effet, son inhibition permettrait la survie des ovocytes dans le phénotype « femelle » et le développement des ovaires ; alors que l'apparition de l'apoptose contribuerait au développement des testicules et à la détermination du phénotype « mâle » (Uchida et al., 2002). S'il existe une part de génétique, cette différenciation sexuelle peut également être influencée par des facteurs environnementaux, comme la nourriture, la densité de population, la température, le taux d'oxygène ou encore l'exposition aux PE (Santos et al., 2017). Au bout de 3 mois, la maturation sexuelle est complète et la reproduction possible, marquant le passage au stade adulte (Figure 26). En captivité, le poisson-zèbre a une espérance de vie de 3,5 ans.

Dans la suite de ce manuscrit, il sera utilisé les termes « larves » ou « stade larvaire », plutôt que « eleutheroembryon » pour décrire le stade à partir duquel le poisson-zèbre sort de son chorion (≥ 3 jours), jusqu'au stade juvénile (proche de 35 jpf).

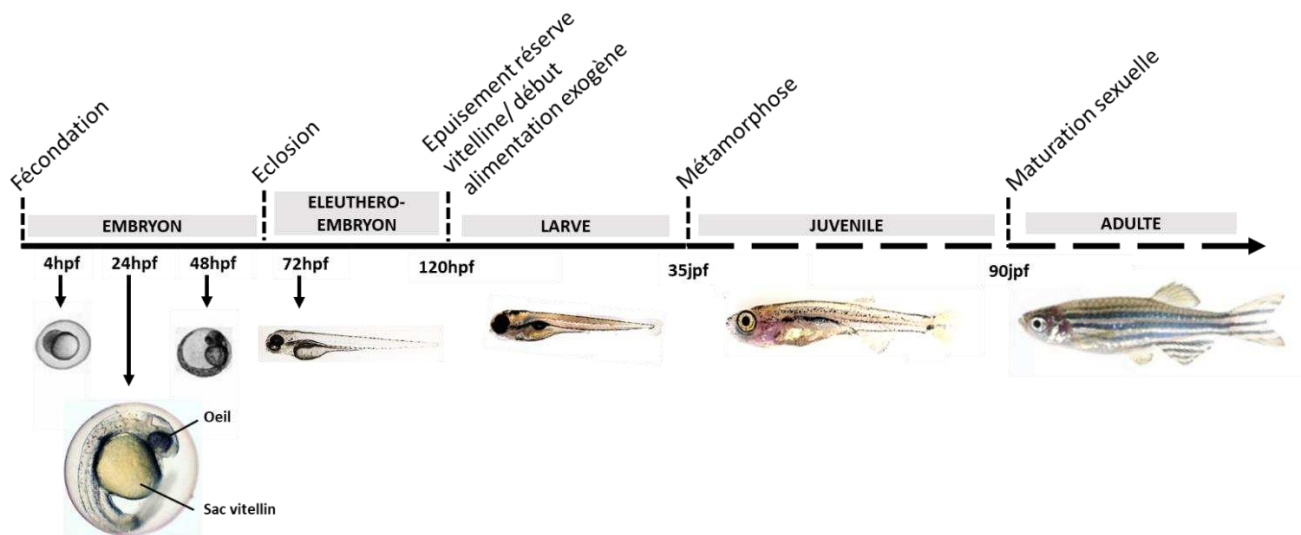


Figure 26 : Schéma récapitulatif des grandes étapes de développement du poisson-zèbre de la fécondation jusqu'au stade adulte

iii. Élevage

En laboratoire, l'environnement du poisson-zèbre est très important, principalement lorsque l'on cherche à évaluer l'effet de l'exposition à une substance. En effet, cela nécessite une grande rigueur concernant les conditions d'élevage et d'entretien (température, pH, nourriture, luminosité, bruit, etc.) pour permettre une robustesse et une reproductibilité des essais. Le contrôle du pH et de la T° est d'autant plus important, notamment lors des études en toxicologie où l'on sait que ces paramètres peuvent altérer la pharmacocinétique des composés chimiques (Cleal et al., 2020). Le poisson-zèbre adulte est poïkilotherme et s'adapte à de nombreuses températures dans son habitat naturel, mais en laboratoire il est conseillé une température de 28,5°C pour une reproduction optimale et un développement embryonnaire normal. L'eau d'élevage composée d'eau déminéralisée et de sels (sel marin, chlorure, bicarbonate de sodium) doit être à un pH recommandé entre 6,5 et 8. Le cycle biologique du poisson-zèbre est régi par des photopériodes de 14h de lumière / 10h d'obscurité, pour mimer les conditions naturelles d'éclairage et lui assurer un développement optimal. Ce poisson est omnivore et se nourrit, en élevage, principalement par une alternance d'aliments secs (poudre) et vivants (Artémia), qui, en plus d'apporter les qualités nutritives complètes, ont un effet d'enrichissement en stimulant le comportement de capture de proies (Aleström et al., 2020).

II. Avantages et limitations de l'utilisation du poisson-zèbre

Cet organisme aquatique présente de nombreux avantages qui expliquent son utilisation en tant qu'organisme modèle dans de nombreux domaines de la recherche en biologie, mais également quelques limites.

i. Avantages

Ces avantages regroupent ses facilités d'élevage, sa vitesse de développement rapide et de manière extra-utérine et son coût relativement faible comparé au modèle rongeurs (Bambino and Chu, 2017). De plus, ses similarités au niveau génétique et physiopathologique en font un modèle de choix pour l'étude des maladies humaines et dans la recherche en toxicologie.

a. Elevage

Contrairement aux limites du modèle des rongeurs, les poissons-zèbres sont de **petite taille** (<5 cm à l'âge adulte), faciles à manipuler, à entretenir et moins coûteux.

Ils ont une **grande capacité de reproduction**, un couple de poisson-zèbre pouvant générer des centaines d'œufs fécondés chaque semaine dont le **développement est extra utérin et rapide**. Alors que le développement et la maturation de tous les processus physiologiques peuvent prendre des semaines/années chez les mammifères, le poisson-zèbre **se développe rapidement** avec des organes métaboliquement fonctionnels seulement quelques jours après fécondation.

Un autre avantage biologique **est la semi-transparence** du poisson-zèbre pendant ces premiers stades de vies embryonnaires et larvaires. Couplé à son développement extra utérin, cela permet facilement l'observation et la surveillance de l'organogénèse et des processus biologiques et pathologiques, en utilisant des techniques d'imageries non invasives qui ne nécessitent pas d'intervention chirurgicale (Kimmel et al., 1995). Ce modèle permet notamment de dépister rapidement les changements morphologiques et histologiques des foies de larve transparente (Sadler et al., 2005).

Même si l'étude de certains processus biologiques nécessite des stades adultes, les avantages listés ci-dessus favorisent l'utilisation des stades embryonnaires et larvaires pour de nombreuses études.

b. Similarité avec l'Homme

De nombreuses connaissances ont déjà été acquises sur ce modèle concernant sa morphologie, sa physiologie, son développement et son génome témoignant de sa grande similarité avec les mammifères. D'un point de vue anatomique, le poisson-zèbre possède des systèmes d'organes avec les mêmes fonctions que leurs homologues humains et une physiologie bien conservée qui prédisposent le poisson-zèbre comme bon modèle pour l'étude des maladies métaboliques humaines (Menke et al., 2011) (Figure 27).

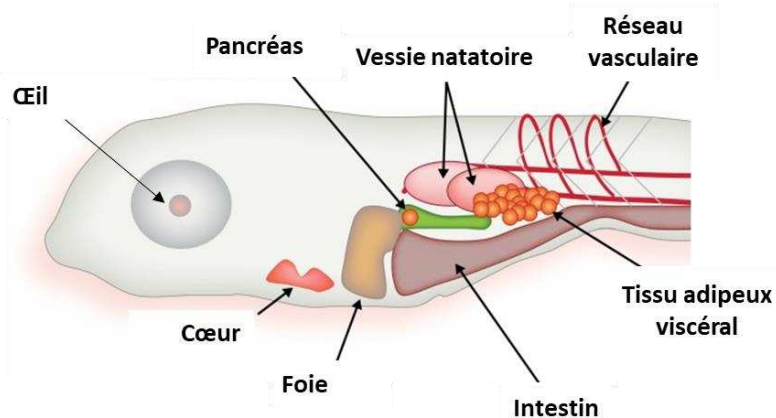


Figure 27 : Schéma représentant l'anatomie des larves de poisson-zèbre (issu de Schlegel and Gut, 2015). Au cours des premiers stades de vies, les larves de poisson-zèbre possèdent des systèmes vasculaire et digestif (intestin/foie/pancréas) fonctionnels. La vessie natatoire contrôle la flottabilité de la larve lui permettant la nage. Les 1ers adipocytes se développent au niveau viscéral au stade larvaire. À cet âge, l'animal reste suffisamment transparent pour permettre une imagerie complète des organes internes

Par exemple, le pancréas du poisson-zèbre contient des îlots comprenant des cellules α , β , δ et ϵ qui régulent l'homéostasie du glucose en sécrétant des hormones telles que le glucagon, l'insuline, la somatostatine et la ghréline, tout comme chez l'homme. Les médicaments régulant l'homéostasie du glucose chez l'homme ont les mêmes effets chez le poisson-zèbre (Gut et al., 2013). Bien qu'il ne possède pas d'estomac, son appareil digestif, dont le fonctionnement est globalement similaire à celui des mammifères, est composé d'une bouche, d'un œsophage, d'un intestin et d'un anus. Son intestin est colonisé par des espèces bactériennes témoignant de la présence d'un microbiote et d'une immunité intestinale chez le poisson-zèbre (López Nadal et al., 2020; Roeselers et al., 2011). Concernant le tissu adipeux, les premiers adipocytes apparaissent au stade larvaire, autour de 8 à 12 jpf. Ils se développent au niveau viscéral autour du pancréas, en premier lieu, puis dans le reste du corps, en corrélation avec la taille du poisson (plus qu'avec son âge) (Imrie and Sadler, 2010). Le poisson-zèbre ne possède pas de tissu adipeux brun, impliqué dans la thermogénèse des mammifères, mais la structure et la fonction du tissu adipeux blanc sont similaires à celles des mammifères, et assure la régulation du métabolisme et de stockage des lipides (Salmerón, 2018; Tingaud-Sequeira et al., 2011).

Le poisson-zèbre possède également, comme les mammifères, un système immunitaire inné et adaptatif bien conservé. Le système immunitaire inné se développe précocement (dès 48hpf) incluant neutrophiles et macrophages. Le système immunitaire adaptatif est pleinement fonctionnel 4 à 6 semaines après fécondation (Meeker and Trede, 2008; Traver et al., 2003). Les macrophages sont les premières cellules à apparaître dès 20hpf et jouent un rôle dans la défense immunitaire lors des premiers stades de vie en éliminant les cellules mortes et les microbes. Les différentes cellules du système immunitaire adaptatif ont également été identifiées comme les lymphocytes T, B, T régulateurs (dès 4 jpf), ainsi que les cellules présentatrices d'antigène comme les cellules dendritiques (autour de 8-12 jpf) (Martins et al., 2019; Torraca et al., 2014).

Enfin, le développement et la fonction hépatique qui seront discutés plus loin, sont également similaires d'un point de vue physiologique et physiopathologique.

c. Homologies génétiques

Depuis, 2013, le génome du poisson-zèbre est entièrement cartographié (Howe et al., 2013). A cause d'un évènement de duplication du génome (tetraploïdisation) qui s'est produite pendant l'évolution des téléostéens et bien qu'il y ait eu un retour partiel à l'état diploïde, de nombreux gènes sont encore présents sous deux formes, qui ont plus ou moins divergés au cours de l'évolution. Malgré cela, l'analyse du génome des poissons-zèbres révèle de fortes homologies génétiques avec le génome humain. Environ 70% des gènes humains et 82% des gènes potentiels liés aux maladies humaines ont un orthologue chez le poisson-zèbre (Howe et al., 2013). On peut par exemple citer parmi les similitudes, que le poisson-zèbre exprime la gamme complète des gènes des CYP450 nécessaires au métabolisme et à la biotransformation des xénobiotiques (Goldstone et al., 2010) ; il exprime également les gènes codant pour les différents récepteurs nucléaires, à l'exception de CAR, ainsi que ceux nécessaires au métabolisme des lipides et du glucose (Schaaf, 2017).

d. Manipulation génétique

Avec une cartographie génétique complète, l'un des avantages les plus puissants est la capacité d'effectuer des modifications génétiques. En effet, la suppression ou surexpression de gènes dans le poisson-zèbre est relativement facile que ce soit par approche transitoire (injection de morpholino anti-sens ou d'ARNm) ou pérenne (TILLING, transgénèse avec les systèmes CRISP/CAS9, TALLEN, ZFIN...). Ces approches génétiques créant des poissons mutants ou transgéniques, sont relativement faciles et peu coûteuses. Cette dernière décennie, un nombre important de lignées de poisson-zèbre génétiquement modifiées ont été générées pour mieux caractériser les voies moléculaires et génétiques impliquées dans les processus physiologiques et dans les pathologies humaines (Amsterdam and Hopkins, 2006; Trede et al., 2004).

Ces lignées peuvent exprimer un transgène couplé à des protéines fluorescentes dans des types de cellules spécifiques, qui peuvent ensuite être facilement détectées dans les embryons et larves transparentes ; ceci permet de surveiller en temps réel le développement et la progression de certains mécanismes physiologiques ou pathologiques. L'utilisation de poissons transgéniques exprimant des protéines fluorescentes hépatiques et pancréatiques, a notamment permis l'étude *in vivo* de l'organogénèse hépatique, ainsi que l'étude des processus physiologiques de développement de dommages hépatiques (Korz et al., 2008; Zhang et al., 2014). Plus de 5000 mutants et poissons-zèbres transgéniques sont actuellement disponibles et catalogués sur la base de données de la communauté de recherche du poisson-zèbre : ZFIN (The Zebrafish Information Network).

e. Application du poisson-zèbre dans le domaine de la toxicologie

L'utilisation du poisson-zèbre dans la recherche en toxicologie s'est nettement répandue. Notamment, le fait que la fécondation et le développement embryonnaire soient externes en dehors de la mère, permet une exposition facilitée à différentes molécules. Les embryons sont

suffisamment petits pour être contenus dans des plaques multi-puits et la perméabilité chimique au niveau du chorion permet une exposition optimale aux molécules qui sont simplement ajoutées dans l'eau d'élevage. Cela facilite le criblage génétique et chimique à une échelle qui n'est pas ou difficilement atteignable avec d'autres vertébrés, en combinant l'échelle et le haut débit des systèmes *in vitro* avec la physiologie complexe d'un animal entier vertébré. En outre, le fait que ce modèle réponde aux considérations éthiques de l'expérimentation animale, de nombreux tests ont été développés pour le criblage de molécules sur celui-ci.

1. Considérations éthiques

Les aspects éthiques de la recherche et le principe des 3Rs de la réglementation REACH sont primordiaux lors d'expérimentation sur le modèle animal en toxicologie. L'utilisation du poisson-zèbre, notamment au stade embryonnaire et larvaire, répond en partie à cette règle des 3Rs de l'expérimentation animale. En effet, l'utilisation d'un organisme inférieur moins développé, s'accorde avec la notion de « Remplacement » ; la possibilité d'observer des phénomènes biologiques à l'échelle individuelle permet de limiter le nombre d'animaux utilisés, ce qui correspond à la notion de « Réduction ».

Enfin, les embryons et larves de poisson-zèbre jusqu'à l'âge de 5 jpf ne sont pas soumises aux mêmes exigences réglementaires que les modèles après 5 jpf ou les modèles mammifères. En effet, d'après la directive 2010/63/UE, concernant la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques, les premiers stades de développement embryonnaire ne relèvent pas de la réglementation sur l'expérimentation animale (Strähle et al., 2012). Après 5 jpf, la résorption du sac vitellin et la nécessité d'apporter une nourriture exogène nécessaire à la survie de la larve constitue le stade à partir duquel les larves sont soumises à la réglementation (avant 5 jours l'embryon/l'eleutheroembryon se nourrissant grâce à ses réserves vitellines). Ainsi, dans ce cadre de la réglementation le modèle alternatif du poisson-zèbre (<5 jpf) est considéré comme modèle *in vitro*, répondant aux principes des 3Rs. C'est pourquoi l'utilisation de ce modèle et en particulier des premiers stades du poisson-zèbre avant 5 jpf, attire de plus en plus l'attention en tant que modèle alternatif en toxicologie humaine et environnementale. Il convient de noter cependant que, au-delà, de l'aspect réglementaire, nos études réalisées sur des organismes entiers expliquent l'usage du terme *in vivo* dans ce manuscrit et non pas de *in vitro*, pour les modèles avant 5 jpf.

2. Evaluation spécifique des effets de PE

Leurs différents avantages listés ci-dessus, les rendent idéaux pour les études haut-débit, notamment pour le criblage de molécules pour les études en toxicologie. Dans ce sens, l'OCDE a publié des tests standardisés recommandant l'utilisation du modèle alternatif du poisson-zèbre (avant 5 jpf), pour évaluer la toxicité potentielle de diverses substances (Tableau 5). Grâce à ces tests, il est alors possible de suivre en temps-réel les paramètres de toxicité et d'en extrapoler le risque pour la santé humaine (Brion et al., 2012; Brotzmann et al., 2022; Tingaud-Sequeira et al., 2011). Un avantage supplémentaire est qu'il est facile d'exposer les poissons aux substances toxiques directement par ajout dans le milieu d'élevage. A ce propos, entre 3 et 14 jpf (stade à

partir duquel les branchies deviennent fonctionnelles), l'absorption des molécules se fait principalement par voie dermique, facilitée par la perméabilité cutanée, et orale (Nishimura et al., 2015).

C'est un modèle reconnu dans le contexte de la perturbation endocrinienne. En effet, il est utilisé à la fois pour le criblage des substances à activité endocrine mais également pour l'identification de leurs effets et l'étude de leurs mécanismes d'action. Dans ce sens, l'OCDE recommande à nouveau le poisson-zèbre pour les tests règlementaires de perturbations endocriniennes (Test présenté dans le Tableau 5). Parmi ces tests, le test EASZY (test n°250) a, par exemple, été validé par l'OCDE pour détecter les substances chimiques ayant une activité oestrogénique en utilisant des embryons transgéniques de poisson-zèbre (OECD Test No. 250, 2021). Face aux perturbations métaboliques que les PE peuvent entraîner, le développement de nouveaux tests évaluant cette caractéristique est également nécessaire et manque encore à ce jour.

Tableau 5 : Tests proposés par l'OCDE sur le modèle du poisson-zèbre pour évaluer la toxicité et la perturbation endocrinienne de substances chimiques

N° du test OCDE	Nom du test	Principe du test de toxicité	Evaluation	Référence
Test de toxicité sur le modèle du poisson				
Test n°212	« Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages » Test de toxicité à court terme aux stades de l'embryon et de l'alevin <i>(Adapté du Test n° 210 « Fish, Early-life Stage Toxicity Test » en raccourcissant la fenêtre d'exposition, initialement prévue jusqu'au stade juvénile, à court terme sur les 1^{ers} stades de vies du poisson)</i>	Exposition de poisson à des stades embryonnaires à une substance chimique sur un court terme (modèle alternatif)	Evaluation des effets léthaux et sub-léthaux de molécules chimiques (contrôle des phénotypes anormaux, déformation, retard d'éclosion, survie, comportement)	(OECD Test No. 212, 1998) (OECD Test No. 210, 2013)
Test n°203	« Fish, Acute Toxicity Test » Test de toxicité aigüe sur le poisson	Exposition des poissons juvéniles à une substance chimique pendant une durée de 96h (modèle animal)	Evaluation de la toxicité aigüe par contrôle de la mortalité et mesure de la LC50	(OECD Test No. 203, 2019)
Test n°236	« Fish Embryo Acute Toxicity » (FET) Poisson, Test de toxicité aigüe au stade embryonnaire	Exposition de poissons à des stades embryonnaires à une substance chimique pendant 96h (modèle alternatif)	Evaluation de la toxicité aigüe par contrôle de la mortalité et mesure de la LC50	(OECD Test No. 236, 2013)

Test de perturbation endocrinienne				
Test n° 229	« Fish Short Term Reproduction Assay » Test de reproduction à court terme chez le poisson <i>(le Test n°230 « 21 days Fish Assay » est similaire au Test n°229 mais n'évalue pas les paramètres fécondité et histopathologie)</i>	Exposition de poissons mâles et femelles sexuellement matures à un produit chimique pendant une durée limitée (21 jours) (modèle animal)	Evaluation de l'activité oestrogénique et androgénique par mesure de la vitellogénine, de l'inhibition de l'aromatase et des caractères sexuels secondaires, évaluation de la fécondité, et observation de l'histopathologie des gonades	(OECD Test No. 229, 2012) (Test No. 230, 2009)
Test n°234	« Fish Sexual Development Test » Test de développement sexuel des poissons	Exposition de poissons à la période de différenciation sexuelle (modèle animal)	Evaluation de l'activité oestrogénique et androgénique par mesure de la vitellogénine et des sexes-ratios (déterminé par histopathologie gonadique)	(OECD Test No. 234, 2011)
Test n°250	« EASZY Test » Test de détection des substances à activité endocrinienne agissant via les récepteurs aux oestrogènes	Exposition au stade embryonnaire de poisson-zèbre transgénique <i>tg(cyp19a1b:GFP)</i> à un composé chimique pendant 96h (modèle alternatif)	Evaluation de l'activité oestrogénique par la mesure de l'induction du <i>cyp19a1b</i> (identifié par l'augmentation de fluorescence de la GFP au niveau du cerveau). Le <i>cyp19a1b</i> , code pour l'aromatase cérébrale, responsable de la synthèse d'oestrogènes	(OECD Test No. 250, 2021)

En pharmacologie, des expériences ont montré que les médicaments cardio-vasculaires, anti-angiogéniques et anti-cancéreux sur des embryons de poisson-zèbre avaient des réponses comparables à celles des mammifères (Langheinrich, 2003). Ainsi, dans l'industrie pharmaceutique, le poisson-zèbre peut être utilisé dans les études de toxicité au stade pré-clinique et pour cribler, identifier et évaluer la toxicité des nouveaux médicaments (Garcia et al., 2016; Zon and Peterson, 2005).

ii. Limitations

Malgré tous ces avantages, le modèle poisson-zèbre présente quelques limites.

Même si les homologies génétiques du poisson-zèbre avec l'Homme sont d'environ 70-85%, la transposition des résultats du poisson à l'Homme est à prendre avec plus de précautions que celle faite à partir des rongeurs (similarités génétiques de 92%).

De plus, s'il est un bon modèle pour représenter les pathologies humaines, certaines maladies dues à des différences physiologiques entre les mammifères et le poisson-zèbre, ne peuvent pas être étudiées, comme l'asthme ou les troubles placentaires.

La différenciation sexuelle ayant lieu 2/3 mois après la fécondation, l'étude de produits chimiques ayant une réponse spécifique au sexe, ne peuvent pas être testés sur les modèles larvaires qui présentent le plus d'avantages (Bambino and Chu, 2017). De ce fait, les études de perturbations endocriniennes, sont plutôt effectuées sur les modèles adultes de poisson-zèbre, du fait de la présence d'un dimorphisme sexuel des effets des PE. De plus, il est à noter que le sexe des poissons-zèbres au stade larvaire peut-être influencé par les niveaux d'hormones stéroïdes environnementales. Cependant, cela peut également être avantageux car l'impact des PE peut être évalué sur le foie et d'autres organes, indépendamment de l'influence des hormones sexuelles.

Certaines expositions peuvent ne pas représenter pleinement l'exposition humaine. Dans les études portant sur les tout premiers stades de développement (branchies non fonctionnelles / bouche non ouverte), l'ajout du toxique dans l'eau entraîne une exposition dermique. Chez l'Homme, de nombreux toxiques sont absorbés par voie orale, dans l'eau contaminée ou la chaîne alimentaire. Cela peut donc entraîner des différences significatives dans l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion des substances chimiques. De plus, les biomarqueurs urinaires d'exposition et de métabolisation sont également indisponibles chez le poisson (Bambino and Chu, 2017). En outre, habituellement, dans les expériences *in vivo* conventionnelles, une quantité connue et mesurable de substance chimique est administrée à l'animal. Chez le poisson-zèbre, l'absorption de la molécule présente dans l'eau globalement imprévisible, ce qui peut compliquer l'interprétation des résultats de dépistage et la comparaison entre les composés (Fleming and Alderton, 2013).

Une autre de ces limitations provient du fait qu'il possède des gènes qui se sont dupliqués au cours de l'évolution. En conséquence, il possède 26 206 gènes, ce qui est supérieur à tout autre vertébré séquencé auparavant. Cette duplication des gènes peut être une base importante de variabilité et de complexité car le poisson-zèbre peut avoir des voies de régulation et des réseaux moléculaires différents pour certaines fonctions spécifiques (Fontana et al., 2018; Postlethwait et al., 1998).

III. Le foie du poisson-zèbre

Comme chez les mammifères, le foie des poissons-zèbres, participe à la détoxification, à l'homéostasie et au métabolisme. Il existe de grandes similitudes entre le poisson-zèbre et l'Homme concernant la composition cellulaire hépatique, la physiologie, la régulation moléculaire et génique, la signalisation, la réponse aux dommages et les mécanismes cellulaires provoquant des dommages hépatiques. Cela fait du poisson-zèbre un modèle privilégié pour étudier les maladies du foie et en particulier les NAFLD (Chu and Sadler, 2009; Goessling and Sadler, 2015; Menke et al., 2011; Pham et al., 2017; Vernetti et al., 2017).

i. Développement hépatique

L'évolution des espèces entre les poissons et les mammifères a conservé de nombreux acteurs essentiels dans l'hépatogénèse (Sadler et al., 2007). L'organogénèse hépatique a pu être étudiée en détail et suivie, notamment grâce à l'utilisation de poisson-zèbre transgénique (comme le *tg(gutGFP)* ou *tg(lfabf:dsRed; elaA:EGFP)*) (Figure 28) (Field et al., 2003; Korzh et al., 2008; Tao and Peng, 2009).

Comme pour tous les vertébrés, le foie provient de l'endoderme de l'intestin antérieur. Le premier signe de spécification hépatique est observé à partir de 22hpf, lorsque les cellules progénitrices de l'endoderme antérieur commencent à exprimer des marqueurs hépatoblastiques tels que *prox1* et *hhex1*. Vers 28hpf, l'intestin subit une flexion vers la gauche, suivi d'un bourgeonnement formant l'ébauche du foie sur le côté gauche de l'embryon. Cette étape de bourgeonnement du foie, est accompagné de l'expression des marqueurs de différenciation (comme la transferrine et la protéine Fabp) qui indiquent aux hépatoblastes de se différencier en hépatocytes ou en cellules épithéliales biliaires. A partir de 48hpf, la phase de croissance hépatique continue, accompagnée de la différenciation des hépatocytes, de la formation du réseau biliaire et de l'initiation de la circulation sanguine dans les sinusoides, pour former un organe mature et fonctionnel à partir de 72hpf (Field et al., 2003; Korzh et al., 2008; Tao and Peng, 2009). Parallèlement, les cellules endothéliales et les progéniteurs des cellules étoilées pénètrent dans le foie (Sakaguchi et al., 2008; Yin et al., 2012). Entre 72hpf et 120hpf, le foie grossit de 8 à 10 fois sa taille par la mise en place du réseau vasculaire (Figure 28D). A ce stade, le foie fonctionne comme le foie adulte, remplit toutes les fonctions telles que la biotransformation des xénobiotiques, la lipogenèse, la sécrétion de protéines, l'équilibre du glycogène et la production de bile. Cependant, la structure du foie est davantage organisée à mesure qu'il grandit jusqu'à l'âge adulte (Chu and Sadler, 2009; Cox and Goessling, 2015).

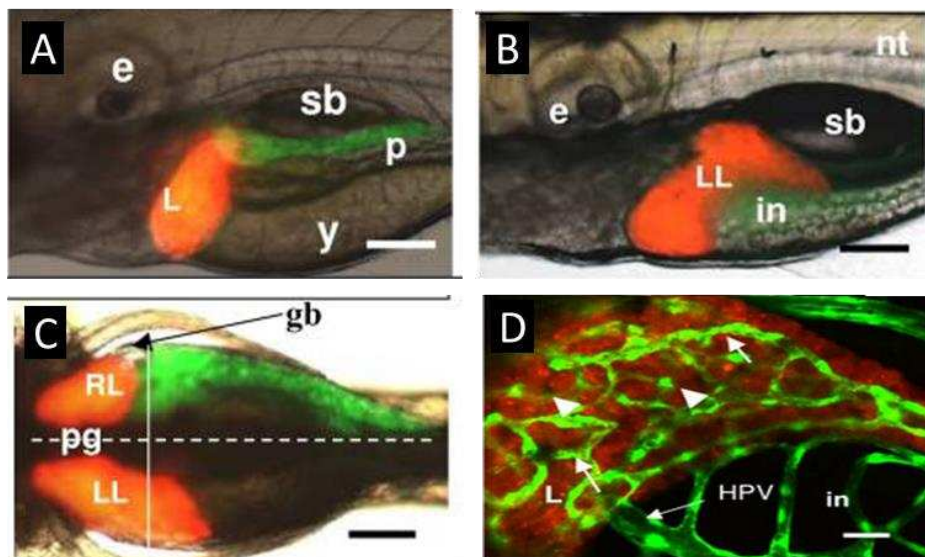


Figure 28: Développement du foie chez le poisson-zèbre transgénique Lipan *tg(lfabf:ds-Red;elaA:EGFP)* (protéine lfabp hépatique marquée en rouge par le fluorochrome dsRed, protéine ElaA pancréatique marquée en vert par le fluorochrome EGFP) (A) : expression de la RFP et GFP à 96 hpf ; (B,C) : expression de la RFP et GFP à 120hpf en vue latérale et dorsale. La ligne horizontale en pointillés en (C) représente la ligne médiane avec le côté droit en haut, (D) : Développement du réseau sinusoidal dans le foie en développement chez le poisson-

zèbre transgénique *Lipan/tg(fli1:EGFP)^{y1}* (protéine fli1 des cellules endothéliales marquées en vert par le fluorochrome GFP), flux sanguin détecté dans les sinusoides à 120hpf, mis en évidence par les flèches. (Images de microscopie à fluorescence issues de Korzh and al 2008).

e : eye (oeil), gb : gall bladder (vésicule biliaire), in : intestine (intestine), HPV : hepatic portal vein (veine porte hépatique), L : liver (foie), LL : left lobe (lobe droit), nt : notochord (notocorde), p : pancreas (pancréas), RL, right lobe (lobe gauche), sb : swim bladder (vessie nataoire) , y : yolk sac (sa vitellin)

ii. Comparaison anatomique et histologique avec le foie de mammifère

La principale différence entre le foie des poissons-zèbres et celui des mammifères est l'organisation structurale et cellulaire du tissu hépatique. Contrairement aux mammifères, le foie du poisson-zèbre possède 3 lobes (droit, gauche et ventral). De plus, si nous avons vu au début de ce manuscrit que le foie des mammifères était organisé en lobules hépatiques bien structurés par les canaux biliaires, les veines portes, et les artères hépatiques ; chez le poisson-zèbre, les vaisseaux sanguins sont répartis de manière aléatoire dans tout l'organe (Vliegenthart et al., 2014) (Figure 29). Les hépatocytes sont disposés en tubules et le canal biliaire est situé au centre. De plus, la veine centrale et la veine porte ne peuvent pas être différenciées morphologiquement. Enfin la zonation métabolique n'a pas été décrite dans le foie du poisson-zèbre (Pham et al., 2017).

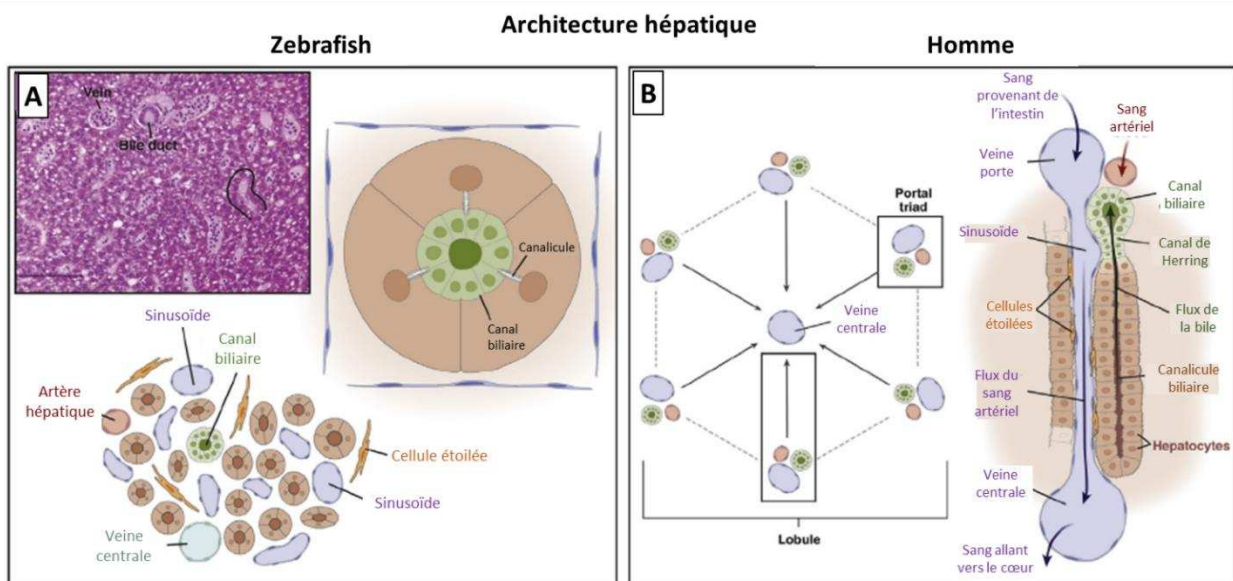


Figure 29 : Comparaison de l'anatomie cellulaire et architecturale du foie entre le poisson-zèbre (A) et l'Homme (B) (Schéma issu de Goessling and Sadler., 2015)

Malgré cette anatomie et cette architecture uniques, tous les types de cellules hépatiques présents chez les mammifères ont été identifiés chez le poisson-zèbre, à l'exception des cellules de Kupffer, et remplissent des fonctions similaires (Menke et al., 2011). Les hépatocytes participent à la sécrétion de la bile, à la sensibilité à l'insuline, à la biotransformation des xénobiotiques, au stockage des lipides et du glycogène, à la sécrétion des protéines sériques et des facteurs de coagulation. On y retrouve aussi les cellules endothéliales, qui tapissent les vaisseaux hépatiques et les sinusoides, les cellules épithéliales biliaires et les cholangiocytes pour le transport de la bile à partir des hépatocytes. Même si la présence des cellules de Kupffer a été

sujet de discordance, la présence de macrophages résidents au niveau du foie a été observée chez la larve et l'adulte, capables d'induire une réaction immunitaire innée en cas de dommages des hépatocytes (Martins et al., 2019; Shwartz et al., 2019). Enfin, les cellules étoilées ont également été identifiées et sont situées entre les cellules endothéliales et les hépatocytes. Elles sont capables de stocker les gouttelettes lipidiques, de s'activer et de sécréter de la matrice extracellulaire lors d'une lésion hépatique (Yan et al., 2018). L'utilisation de poissons-zèbres transgéniques fluorescents a rendu possible l'observation et l'étude du rôle et de la fonction des différentes cellules hépatiques (Bollig et al., 2009; Chi et al., 2008; Her et al., 2003; Lorent et al., 2010; Parsons et al., 2009; Sakaguchi et al., 2008; Wilkins et al., 2014; Yin et al., 2012).

IV. Intérêt du modèle de poisson-zèbre pour l'étude des NAFLD et TAFD

L'Homme et le poisson-zèbre partagent des similitudes structurelles et fonctionnelles au niveau hépatique, que ce soit dans la prise en charge des xénobiotiques, comme les polluants environnementaux, ou dans la régulation du métabolisme des lipides.

L'exposition aux polluants environnementaux et en particulier aux PE est de plus en plus décrite pour leurs implications dans les maladies métaboliques. En perturbant le métabolisme des lipides, par des mécanismes médiés généralement par les récepteurs nucléaires, ils sont capables d'induire l'initiation et la progression de NAFLD. Si le poisson-zèbre est un bon modèle d'étude pour évaluer l'hépatotoxicité des composés (de Souza Anselmo et al., 2018; Goldstone et al., 2010; Vliegenthart et al., 2014), il est également devenu un modèle important pour étudier le développement des NAFLD. De plus, chez le poisson-zèbre et chez l'Homme, l'homéostasie lipidique étant altérée de manière similaire par les PE, il est également un bon modèle pour l'étude des TAFD (Maradonna and Carnevali, 2018; Volkoff, 2019).

i. Métabolisme des xénobiotiques (enzymes de phase I, II, III)

La larve de poisson-zèbre est un modèle couramment utilisé pour évaluer la toxicité des xénobiotiques chez l'Homme (de Souza Anselmo et al., 2018; Goldstone et al., 2010). Chez le poisson, l'absorption d'un xénobiotique peut se faire par voie orale *via* la nourriture ou par voie dermique et branchiale si le composé est présent dans l'eau. Par la suite, ces composés exogènes sont pris en charge par les différents systèmes de distribution, métabolisation et excrétion, qui présentent de grandes similitudes avec l'homme.

Chez les mammifères et chez le poisson-zèbre, le métabolisme des xénobiotiques se déroule de la même manière, c'est-à-dire à travers une série de réactions enzymatiques de phase I et II et des transporteurs d'efflux de phase III. Le poisson-zèbre exprime la gamme complète des **enzymes CYP450** nécessaires au métabolisme et à la biotransformation des xénobiotiques. Non seulement l'activité de la plupart des CYP450 augmente considérablement après l'éclosion à environ 3 jpf (Saad et al., 2016), mais la plupart des CYP450 présents chez l'Homme possèdent un orthologue chez le poisson-zèbre (Goldstone et al., 2010). Parmi les 94 gènes *cyp450* identifiés chez le poisson-zèbre, 86 gènes appartiennent aux familles CYP1 à 3 et sont impliqués dans le

métabolisme des xénobiotiques (Saad et al., 2016; Verbueken et al., 2018). Parmi les principaux CYPs décrits dans la pathogénèse des NAFLD, on trouve le CYP3A4, la forme la plus abondante des CYP hépatiques et le CYP2E1, dont les orthologues chez le poisson-zèbre sont les *cyp3a65* et *cyp2y3*, respectivement (Goldstone et al., 2010; van Wijk et al., 2016). Concernant les enzymes de conjugaison, responsables du métabolisme de phase II, les gènes humains des SULTs et GSTs possèdent des orthologues chez le poisson-zèbre (de Souza Anselmo et al., 2018; van Wijk et al., 2016). Pour les UGTs, le poisson-zèbre possède des paralogues, qui malgré moins de chevauchement génétique que les orthologues, ont une fonction métabolique comparable (van Wijk et al., 2016). Enfin, les transporteurs d'efflux de phase III comme *abcb4* sont également identifiés chez le poisson-zèbre responsable de l'excrétion des xénobiotiques (Fischer et al., 2013). Comme chez l'Homme et les mammifères, la régulation du métabolisme des xénobiotiques dépend de nombreux facteurs dont le récepteur AhR, le récepteur PXR, ou encore le facteur de transcription Nrf2 (Goldstone et al., 2010; Kubota et al., 2013; Saad et al., 2016).

ii. Métabolisme des lipides

Le poisson zèbre est un modèle très pertinent pour étudier le métabolisme des lipides car il possède les mêmes processus d'absorption, de traitement et de transport des lipides que l'Homme. De plus, les facteurs de transcription, les régulateurs métaboliques et les multiples enzymes et transporteurs qui contrôlent l'homéostasie énergétique chez les mammifères sont présents chez le poisson-zèbre et peuvent être dérégulés de la manière similaire lors de dysfonctions métaboliques (Hölttä-Vuori et al., 2010; Ka et al., 2020; Oka et al., 2010; Quinlivan and Farber, 2017; Schlegel, 2012; Schlegel and Stainier, 2006). Il a été montré que le poisson-zèbre exprimait les récepteurs de l'adiponectine et les 3 isoformes du récepteur PPAR, essentiels à l'homéostasie des lipides (Nishio et al., 2008). Les fonctions clés telles que la régulation de l'appétit, la régulation de l'insuline et le stockage des lipides sont également bien conservées (Salmerón, 2018; Zang et al., 2018).

Les différentes classes de lipides (cholestérol, TG, MAG, DAG, céramides, phospholipides) ont été identifiées dès le stade embryonnaire chez le poisson-zèbre (Fraher et al., 2016). Dès les premiers stades de vie, les lipoprotéines responsables du transport des lipides, alimentent les différents organes en formation à partir de la réserve vitelline (Quinlivan and Farber, 2017). En plus du transport, la synthèse des lipides a également été démontrée dès les premiers stades de développement embryonnaire, *via* l'activation des voies de biosynthèse des AG et du mévalonate (Salmi et al., 2019).

Grâce à la transparence des larves, la visualisation et la quantification des lipides est possible, notamment au niveau du foie pour évaluer la NAFLD. Comme chez les mammifères, l'excès de nutriments chez le poisson-zèbre provoque une augmentation des taux plasmatiques de TG et une stéatose hépatique (Oka et al., 2010). Il est alors capable de stocker cet excès de TG dans les GL intracellulaires. L'accumulation de ces lipides peut être analysée par imagerie directe en utilisant différents colorants lipophiles, comme l'Oil Red O, des colorants lipophiles fluorescents (Nile Red, Bodipy, Lipid Green), ou encore des analogues de lipides fluorescents (BODIPY analogue AG ou

BODIPY analogue cholestérol, PED6). Ainsi, les lipides peuvent être analysés dans leur absorption, leur traitement et leur répartition dans les organes et tissus sur les larves de poisson-zèbre vivantes ou fixées (Asaoka et al., 2013; Carten et al., 2011). Ces avantages méthodologiques ont notamment été exploités pour évaluer les propriétés obésogènes des produits chimiques, grâce à une coloration au Nile Red de poissons juvéniles et la mise en évidence d'une augmentation d'adiposité (Green et al., 2018; Mentor et al., 2020; Wang et al., 2018).

iii. Régulation transcriptionnelle (récepteurs nucléaires)

Les récepteurs nucléaires sont très bien conservés entre les différentes espèces de vertébrés (Zhao et al., 2015). Ainsi le poisson-zèbre possède un ensemble de 73 gènes codant pour des récepteurs nucléaires, parmi lesquels les récepteurs nucléaires métaboliques précédemment décrits sont retrouvés (PPAR $\alpha\beta\gamma$, PXR, LXR α , FXR $\alpha\beta$, AhR), à l'exception du récepteur CAR et LXR β . Ces gènes sont exprimés dès 24hpf au cours de l'organogénèse (Bertrand et al., 2007) et assurent les mêmes fonctions que leurs homologues humains (Schaaf, 2017).

Les récepteurs PPARs largement étudiés chez le poisson-zèbre, assurent le même rôle de régulation du métabolisme énergétique et de différenciation adipocytaire (Den Broeder et al., 2015). Notamment, l'activation de PPAR γ stimule l'accumulation de GL et l'adipogénèse chez le poisson-zèbre (Tingaud-Sequeira et al., 2011). Il est à noter que lors de la duplication du génome chez les téléostéens, certains gènes codant pour les récepteurs nucléaires ont également été dupliqués chez le poisson-zèbre ; c'est le cas notamment pour PPAR α (PPAR αa /PPAR αb) et PPAR β (PPAR βa /PPAR βb).

L'absence du récepteur CAR est probablement arrivé au moment de la duplication du génome, mais PXR est suspecté, chez le poisson, d'avoir les fonctions qui, chez les mammifères, sont effectuées à la fois par PXR et CAR.

Il a été montré que l'activation du LXR α par des agonistes, entraînait des effets similaires chez le poisson-zèbre et chez les rongeurs en perturbant le métabolisme des lipides et en provoquant l'accumulation de lipides (Sukardi et al., 2012). Ces résultats ont notamment mis un frein au développement de médicaments exploitant les propriétés bénéfiques de l'activation de LXR dans la stéatose (Oosterveer et al., 2010).

Le récepteur AhR, connu pour avoir une grande affinité pour certains polluants environnementaux (HAP, TCDD), régule la transcription des gènes des CYP450. Il existe 3 orthologues de ce gène chez le poisson-zèbre : *ahr1a*, *ahr1b* et *ahr2*. L'activation et la régulation de chacun d'eux diffèrent et expliquent des rôles différents de ces gènes dans la toxicité médiée par les xénobiotiques (Karchner et al., 2005).

Enfin, il convient de noter que globalement, la réponse des récepteurs nucléaires aux PE est relativement proche entre l'Homme et le poisson-zèbre comme cela a été montré par l'équipe de P. Balaguer (Neale et al., 2020).

iv. Utilisation du modèle poisson-zèbre pour l'étude des maladies hépatiques humaines et l'hépatotoxicité

Un nombre important de produits chimiques tels que les médicaments et les polluants de l'environnement, exercent leur toxicité en ciblant le foie et peuvent donc induire des pathologies hépatiques comme la stéatose, la cholestase ou l'hépatite. Ainsi, le modèle de poisson-zèbre et plus particulièrement le modèle embryonnaire et larvaire a été décrit comme pertinent pour évaluer les risques d'hépatotoxicité humaine, en comparaison à des modèles *in vitro* (HepaRG) ou des modèles *in vivo* mammifères (souris) (Driessen et al., 2015, 2014, 2013; Imran et al., 2018; Podechard et al., 2017; Poon et al., 2017).

Lors d'une exposition à un hépatotoxique, des modifications de la morphologie du foie peuvent être évaluées visuellement (dégénérescence du foie, réduction de la taille du foie, retard de résorption du sac vitellin), sans nécessité de dissection grâce à la transparence de la larve (Hill et al., 2012) (Figure 30). Cette notion a été utilisée pour développer des tests phénotypiques à plus ou moins haut débit, évaluant l'hépatotoxicité de différents composés par imagerie et le calcul d'indice de malformation par informatique (Deal et al., 2016; He et al., 2012; Zhou et al., 2015).

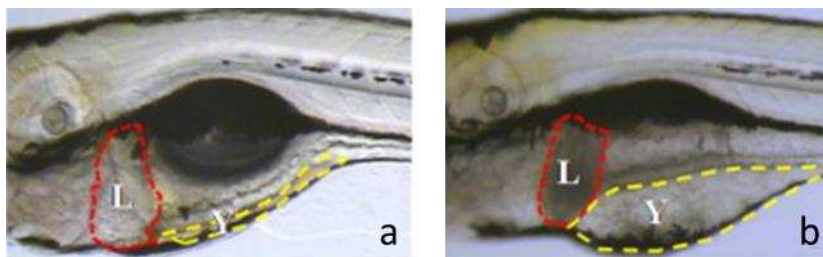


Figure 30 : Illustration des changements phénotypiques lors d'une exposition à des composés hépatotoxiques. a : larve de 120hpf présentant un foie sain et un sac vitellin résorbé; b : l'exposition à un toxique (tétracycline) entraîne une dégénérescence du foie (tissu plus foncé témoignant d'une nécrose et inflammation), une hypotrophie hépatique et un défaut de résorption du sac vitellin (Images de microscopie observée par lumière transmise issues de He *et al.*, 2012).

D'autres tests ont été développés utilisant des larves de poisson-zèbre transgéniques fluorescents au niveau du foie. Ces modèles permettent de prédire rapidement et de manière fiable l'hépatotoxicité d'un composé par microscopie à fluorescence, en prenant en compte la diminution d'intensité de fluorescence et de taille du foie, qui témoignent de dommages hépatiques (Chen et al., 2018; Zhang et al., 2014; Zhang et al., 2017). Enfin, dans le domaine du développement des médicaments et de la médecine clinique, la toxicité hépatique est l'une des principales raisons de refus d'approbation des médicaments. Dans cette optique, le développement de ces tests d'hépatotoxicité, rapides, à haut-débit, sur poisson-zèbre, permettrait de prévenir la toxicité hépatique des médicaments mis sur le marché, ainsi que dans la biosurveillance des substances toxiques environnementales.

v. Modèles poisson-zèbre développés pour l'étude des NAFLD/TAFLD

Le poisson-zèbre adulte ou embryonnaire/larvaire, est utilisé depuis plusieurs décennies pour modéliser des maladies humaines. La présence de tous les organes-clés nécessaires au métabolisme des lipides en font un outil idéal pour étudier l'obésité et les maladies métaboliques, telles que les NAFLD (Asaoka et al., 2013; Faillaci et al., 2018; Seth et al., 2013).

De manière semblable à l'homme, le poisson-zèbre développe une NAFLD en réponse au jeûne (Cinaroglu et al., 2011), à une alimentation riche en graisse, en cholestérol ou en fructose (Asaoka et al., 2013; Sapp et al., 2014; Schlegel, 2012), ou suite à l'exposition à des molécules chimiques hépatotoxiques (Amali et al., 2006; Braunbeck et al., 1990). L'exposition aux polluants environnementaux, en particulier aux PE, a également été largement étudiée sur ce modèle pour identifier les mécanismes par lesquels ils sont capables d'induire la NAFLD.

a. Pathogénèse des NAFLD chez le poisson-zèbre

Les mécanismes impliqués dans l'initiation de la stéatose comprennent l'absorption accrue d'AGL, une lipogenèse *de novo* excessive favorisée par l'hyperglycémie et la résistance à l'insuline, une diminution de la sécrétion hépatique des particules de VLDL et une altération de la β -oxydation mitochondriale des AG dans les hépatocytes (Schlegel, 2012; Schlegel and Gut, 2015). Il a également été mis en évidence des perturbations des facteurs de transcription C/EBP, SREBP-1c, tout comme l'altération du microbiote intestinal (Faillaci et al., 2018; Pham et al., 2008; Schlegel, 2012). La NASH possède les mêmes caractéristiques histologiques chez le poisson-zèbre que chez l'homme et est caractérisée par la présence d'une stéatose associée au ballonnement des hépatocytes et la mort cellulaire, l'infiltration cellulaire inflammatoire ainsi que les corps de Mallory-Denk et la fibrose (Amali et al., 2006; Schlegel, 2012; Schlegel and Gut, 2015). De plus, les principales caractéristiques de la progression de la stéatose vers des stades NASH, tels que, un dysfonctionnement de la réponse UPR entraînant un stress du RE, la production élevée d'ERO et la synthèse de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α ont également pu être mis en évidence sur ce modèle (Tableau S1, S2, S3 fournis en Annexe).

Plusieurs modèles de NAFLD ont été développés chez le poisson-zèbre et ont permis l'identification de gènes d'intérêt et de mécanismes impliqués dans la pathogénèse des NAFLD. Ces modèles peuvent être induits en manipulant les régimes alimentaires, ou par modification génétique (mutagénèse ou transgénèse). Enfin l'exposition à des polluants de l'environnement, et tout particulièrement aux PE a également été étudiée sur ce modèle pour leur induction de perturbations métaboliques (Asaoka et al., 2013; Katoch and Patial, 2021; Pham et al., 2017).

b. Modèles de NAFLD induits par l'alimentation

Les poissons-zèbres sont des animaux polyphages et peuvent s'alimenter avec différents régimes imitant les habitudes alimentaires humaines, ce qui les rend parfaitement adaptés à l'étude de l'influence des composants alimentaires dans la survenue des NAFLD. Il est connu que la composition alimentaire de certains régimes peut avoir un impact significatif sur le développement de NAFLD (Willebrords et al., 2015). Ainsi différents modèles de poisson-zèbre ayant les caractéristiques des NAFLD ont été développés en modulant les régimes alimentaires et ont permis de mieux caractériser les voies métaboliques impliquées dans la progression pathologique (Les différents modèles de poisson-zèbre induits par l'alimentation sont présentés en détail dans le Tableau S1 fourni en Annexe).

Par exemple, du fait que les besoins énergétiques du poisson soient de 30 calories/jour (Pannevis and Earle, 1994), le simple fait de suralimenter le poisson-zèbre avec une grande quantité d'alimentation standard (à base d'Artémia), entraîne une consommation de calories 5 fois supérieure, déclenchant une obésité. Ce modèle induit par la suralimentation présente, en plus, une hypertriglycéridémie ainsi qu'une stéatose hépatique, associées à la dérégulation de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique (tels que *ppara/γ* et *lxra*) (Oka et al., 2010). De même, l'alimentation des larves de poisson-zèbre avec des régimes riches en fructose, en cholestérol ou encore en graisses, sont suffisants pour induire le développement d'une NAFLD (Dai et al., 2015; Landgraf et al., 2017; Ma et al., 2019; Sapp et al., 2014). En plus d'induire l'accumulation de lipides hépatiques, le rôle du fructose et du cholestérol a également été confirmé dans la progression vers un stade NASH avec le déclenchement d'une inflammation, d'un stress oxydant (production d'ERO et peroxydation lipidique) et d'un stress du RE (Ferrari et al., 2018; Ma et al., 2019; Sapp et al., 2014). Dans les deux cas, i.e. suralimentation et régime HFD, certains gènes lipogéniques ont été montrés comme sous-exprimés (*srebf1*, *srebf2*, *acaca*, *fasn*, *hmgcra*), suggérant que ce type d'alimentation diminuait la formation de lipides endogènes (Katoch and Patial, 2021). Il est à noter que les différents types d'alimentation peuvent avoir des degrés d'action variable sur la stéatose, puisqu'il a notamment pu être montré que le degré et l'incidence de la stéatose étaient les plus élevés dans des cas de suralimentation/ de régimes hypercaloriques (Chen et al., 2018). De plus, le type d'AG utilisés dans les régimes HFD, sont des facteurs importants dans l'induction des dommages hépatiques, puisque les effets en fonction des AG saturés et des AG insaturés ne sont pas les mêmes dans l'induction de stéatose. Toutes ces études ont révélé que les modèles induits par l'alimentation présentaient des expressions géniques proches de la NAFLD humaine (Barrett et al., 2009).

Ainsi les modèles de poisson-zèbre développant une NAFLD induite par l'alimentation ont été utilisés dans différentes études pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents (Ahmad et al., 2019; de Oliveira et al., 2019). En plus de faire progresser la recherche fondamentale et de mieux comprendre l'impact de nos habitudes alimentaires sur le développement des NAFLD, les modèles induits par l'alimentation peuvent également être utilisés pour identifier des aliments pouvant servir de médicaments naturels pour la prévention ou le traitement de la stéatose hépatique humaine. Certains ont notamment été utilisés pour montrer que la consommation de légumes (en particulier de tomate) était bénéfique contre la stéatose et abaissait les niveaux de

cholestérol et de TG plasmatiques (Tainaka et al., 2011). Les propriétés hépato-protectrices de certains composés naturels (comme la caféine, la taurine, la berbérine) ont également été étudiées sur ces modèles et ont montré une diminution de la stéatose induite par l'alimentation (Chen et al., 2020; Hammes et al., 2012; Zheng et al., 2015). D'autres modèles induits par l'alimentation ont été utilisés pour tester de médicaments anti-stéatose ou hypolipidémiant ou encore des probiotiques pouvant améliorer les NAFLD (Dai et al., 2015; Geng et al., 2022; Ma et al., 2019).

c. Modèles mutants/transgéniques

De nombreux modèles génétiquement modifiés de poisson-zèbre ont été générés pour identifier les mécanismes contribuant au développement des NAFLD (Asaoka et al., 2013; Faillaci et al., 2018; Pham et al., 2017). Parmi eux, on y trouve des poissons-zèbres mutants (dont des mutations ont été induite, de manière chimique ou par recombinaison, au sein d'un gène) ; ou encore des poissons-zèbres transgéniques (pour lesquels un transgène a été apporté, pour la surexpression, l'extinction ou le marquage fluorescent d'un gène). Pour la recherche, de nombreux poissons-zèbres mutants ou transgéniques, présentant un phénotype NAFLD, existent et sont décrits en détail dans le Tableau S2 fourni en Annexe. Ces différents modèles se sont révélés utiles pour imiter la pathogenèse des NAFLD humaines et, ont permis en manipulant la fonction de gènes connus, de pouvoir caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans la pathogenèse.

Le **mutant** du poisson-zèbre foie gras (*foigr*) a été le premier mutant présentant une stéatose hépatique, identifié suite à un dépistage génétique d'hépatomégalie à 5 jpf (Sadler et al., 2005). Le gène *foigr*, orthologue du complexe TRAPPC11 chez l'Homme, est impliqué dans le trafic vésiculaire entre le RE et l'appareil de Golgi. La perte de la fonction de TRAPPC11 a permis de mettre en évidence que le stress du RE en raison d'une sur-activation de la réponse UPR contribuait au développement de la stéatose, mais également à l'apoptose des hépatocytes (Cinaroglu et al., 2011; DeRossi et al., 2016; Howarth et al., 2014; Sadler et al., 2005; Vacaru et al., 2014). De manière intéressante, la présence d'une mutation au niveau de *TRAPPC11* a également été retrouvée chez les patients atteints de stéatose (Liang et al., 2015). De plus, les cellules humaines mutées pour *TRAPPC11* présentent un défaut de glycosylation des protéines associé à une accumulation de lipides, au même titre que les hépatocytes du poisson-zèbre *foigr*. Ainsi, il est suggéré qu'un défaut de glycosylation des protéines peut être à l'origine de l'induction de la réponse UPR, conduisant à la stéatose hépatique chez les mutants *TRAPPC11* (DeRossi et al., 2016). Par la suite, d'autres mutants ont été identifiés, comme le mutant *redmoon*, qui porte une mutation pour le gène *slc16a6a*, et qui a permis de caractériser l'implication du transport hépatique de corps cétoniques dans la stéatose induite par le jeûne (Hugo et al., 2012). L'identification du mutant *hi559* a permis de relier la synthèse de phosphatidylinositol, phospholipide indispensable pour le foie, et le stress du RE dans le développement de la NAFLD (Thakur et al., 2011). L'utilisation de poissons-zèbres mutants a également permis de mettre en évidence que des régulations épigénétiques (Matthews et al., 2009) ou du système endocannabinoïde (Liu et al., 2016), étaient impliqués dans le développement de la stéatose.

Les **modèles transgéniques** ont également éclairé les mécanismes sous-jacents impliqués dans l'initiation de la NAFLD (Tableau S2). Le modèle surexprimant le récepteur des cannabinoïdes 1 (*cb1r*) développe une stéatose par la stimulation de l'expression de *srebf1* (Pai et al., 2013). La plupart des modèles transgéniques décrits dans ce tableau impliquent une augmentation de l'activité transcriptionnelle de l'expression des gènes lipogéniques. C'est par exemple le cas du modèle transgénique surexprimant la protéine YY1, qui induit l'expression des principaux gènes lipogéniques, *c/ebpα*, *ppary* et *srebf1* (Her et al., 2013). Le modèle transgénique surexprimant la gankyrine a été le premier à démontrer l'induction d'une stéatose hépatique *via* une dérégulation des microARN hépatiques. Le rôle des cellules épithéliales sinusoïdales ainsi que l'activation des cellules étoilées hépatiques et le dépôt de matrice extracellulaire subséquente, ont également été suivies dans la NAFLD, grâce à des modèles transgéniques (Howarth et al., 2013; Yin et al., 2012).

d. Etude des PE dans l'induction des NAFLD

De nombreux composés toxiques sont connus pour induire des dommages hépatotoxiques et ont été décrits pour induire des NAFLD sur le modèle de poisson-zèbre. C'est le cas de l'éthanol, de la thioacétamide, de la tunicamycine, des composés aromatiques polycycliques (HAP), ou encore de certains antibiotiques (Amali et al., 2006; Asaoka et al., 2013; Faillaci et al., 2018; Hammes et al., 2012; Pham et al., 2017). Dernièrement, l'exposition aux polluants environnementaux et en particulier aux PE a été étudiée dans le modèle de poisson-zèbre, en raison de leur implication dans l'initiation et la progression des maladies métaboliques, comme l'obésité et les NAFLD/TAFLD. Il a notamment été démontré que l'homéostasie lipidique était affectée de la même manière par les PE chez le poisson-zèbre et chez l'Homme (Maradonna and Carnevali, 2018; Volkoff, 2019). Plusieurs PE, dont certains ont déjà été décrits comme obésogènes, ont été rapportés pour leur rôle dans les TAFLD sur le modèle de poisson-zèbre. C'est le cas par exemple des Bisphénols BPA et BPS, du phtalate DEHP, du métal Cadmium, de la tributylène, ou encore des composés perfluorés PFOA et PFOS. Des mélanges de PE ont également été étudiés chez le poisson-zèbre et ont montré des perturbations du métabolisme des lipides (Mentor et al., 2020). Ce modèle a également été utilisé pour évaluer les effets transgénérationnels d'exposition aux PE et identifier les fenêtres spécifiques de sensibilité au cours de la vie (Mentor et al., 2020; Sant et al., 2021a).

De manière générale, les modes d'actions par lesquels ces molécules sont capables d'induire et d'entraîner la progression des TAFLD sur le modèle du poisson-zèbre sont cohérents avec ceux développés précédemment dans le Chapitre 2 (de la page 95-109). Ces molécules sont capables de perturber les processus métaboliques en interagissant avec les récepteurs nucléaires tels que PPAR, FXR, PXR, LXR (Maradonna and Carnevali, 2018). Ces PE sont également décrits dans la littérature pour avoir des effets sur l'adipogénèse, favorisant un contexte d'obésité ; la lipogénèse hépatique, l'oxydation des AG et le transport des lipides, initiant la stéatose hépatique ; ou encore le stress oxydant, le stress du RE, l'inflammation, la mort cellulaire ou encore la fibrose, favorisant la progression pathologique des NAFLD vers les stades avancés. Les différents mécanismes d'actions par lesquels ces molécules ont entraîné le développement des NAFLD sur le poisson-zèbre ont été répertoriés dans le Tableau S3 fourni en Annexe.

Ainsi, le modèle embryonnaire de poisson-zèbre est devenu un outil majeur pour l'étude du développement des maladies humaines, en particulier des NAFLD, ainsi qu'un modèle alternatif prometteur en toxicologie et spécifiquement comme outil d'évaluation de la toxicité des polluants environnementaux et des PE. A cet égard, un test utilisant le modèle de poisson-zèbre a été développé permettant de cribler et d'identifier les molécules dont les PE capables d'induire l'obésité. Ce test obésogène (Zebrafish Obesogenic Test – ZOT) a pu mettre en évidence que la tributylène (TBT), un polluant des océans, était capable d'augmenter l'adiposité générale du poisson-zèbre juvénile (Lyssimachou et al., 2015; Zhang et al., 2016). L'utilisation de ce test permettra d'identifier d'autres molécules obésogènes environnementales, arrivant sur le marché. Le développement d'autres tests devraient permettre de cribler et d'identifier les nouvelles molécules pouvant avoir un impact sur le développement des maladies métaboliques, autres que l'obésité, comme les NAFLD.

PARTIE 2 : CADRE ET OBJECTIFS

Ces dernières années, les NAFLD, dont la prévalence est en constante augmentation, sont devenues les pathologies hépatiques chroniques les plus fréquentes. Si le premier stade de la maladie, la stéatose hépatique, caractérisé par une accumulation excessive de lipides dans les hépatocytes (sous la forme de gouttelettes lipidiques), est bénin ; cet état sensibilise le foie en le rendant plus vulnérable aux agressions secondaires irréversibles. Ainsi, la stéatose peut progresser vers un stade pathologique et inflammatoire, appelé steatohépatite, qui prédispose à des stades avancés tels que la cirrhose ou le CHC. De nombreux facteurs sont connus pour participer à l'initiation et au développement des NAFLD ; parmi lesquels, l'exposition aux contaminants environnementaux a récemment été considérée comme nouveau facteur impliqué dans la pathogénèse. Parmi ces toxiques environnementaux, les perturbateurs endocriniens (PE) sont depuis de nombreuses décennies décrits pour leurs effets néfastes sur l'environnement et la santé humaine. Ils ont notamment été associés au développement de certains cancers, de troubles neurologiques et de troubles de la reproduction. Cependant, l'exposition aux PE est également décrite pour favoriser le développement des maladies métaboliques telles que l'obésité, le diabète ou encore les maladies hépatiques comme les NAFLD (Foulds et al., 2017; Heindel et al., 2017). Ils peuvent induire des effets délétères sur les fonctions hépatiques, même à faibles doses et en particulier lorsqu'ils se trouvent en mélange. Du fait de leur présence ubiquitaire dans notre environnement (alimentation, eau, revêtements, textiles, cosmétiques, pollution atmosphérique, etc.), ils sont particulièrement préoccupants.

Conformément au cadre réglementaire mis en place au sein de l'Union européenne pour réduire l'utilisation de certains PE et protéger les consommateurs, de nouvelles méthodes plus efficaces permettant de prédire correctement les effets de PE sont nécessaires, et en particulier pour évaluer leurs effets sur les maladies métaboliques. Dans ce contexte, le projet européen Oberon a été initié pour fournir une **batterie de tests standardisés permettant d'identifier et de caractériser les effets des PE sur les maladies métaboliques telles que l'obésité, le diabète et les NAFLD** (Audouze et al., 2020). Cette approche multidisciplinaire combine des tests expérimentaux sur modèles *in vitro* (cellules 2D, 3D) et *in vivo* (poisson-zèbre) ; des technologies omiques à haut débit ; de l'épidémiologie et des études de biosurveillance humaine ; et des modèles informatiques avancés (*in silico*) (Figure 31). Après un processus de développement et de validation de ces différents tests, l'objectif d'Oberon est par la suite, de proposer ces tests à l'OCDE, dans le but de mieux prédire et caractériser les effets métaboliques de l'exposition aux PE. Ainsi l'étude de ces effets métaboliques, qui ne sont pas couverts par les tests actuels proposés par l'OCDE (www.oecd.org), permettraient aux autorités réglementaires de procéder à l'évaluation des risques et de prendre les décisions pertinentes quant à la réglementation des PE.

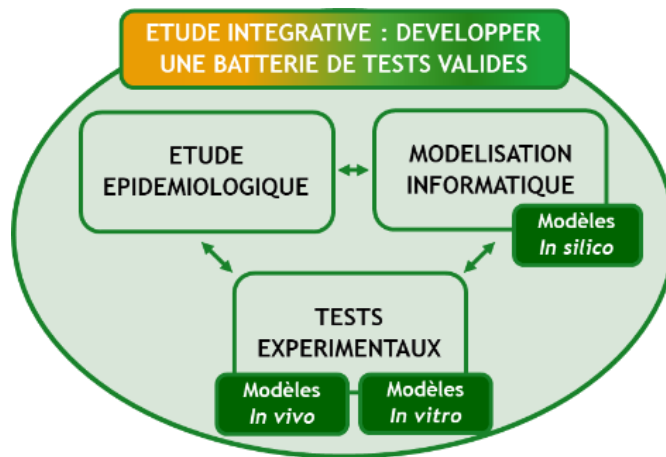


Figure 31: Projet Oberon. Etude intégrative visant à développer une batterie de tests pour l'étude des effets de PE dans les maladies métaboliques, regroupant des études épidémiologiques et de biosurveillance humaine ; des modèles informatiques avancés (*in silico*) et des tests expérimentaux sur modèles *in vitro* et *in vivo*.

La NAFLD est une pathologie complexe faisant intervenir non seulement le foie, mais également d'autres organes comme le tissu adipeux (adipogénèse), le pancréas (insulino-résistance), et l'intestin (dysbiose du microbiote intestinal), tous décrits pour avoir un impact sur le développement et la progression des NAFLD. De ce fait, l'utilisation d'un modèle *in vivo*, se révèle nécessaire pour prendre en compte tous les aspects de la pathogénèse des NAFLD et se rapprocher au plus près de la pathologie humaine. Dans ce contexte, la larve de poisson-zèbre qualifiée de modèle « alternatif », a été choisie pour les études *in vivo* au sein du projet OBEREON et en cohérence avec la réglementation REACH (3Rs). L'une des forces de ce modèle réside dans ses grandes similarités avec les mammifères au niveau génétique et de sa physiologie hépatique. Il possède également de nombreux avantages techniques, au niveau de sa taille, de sa vitesse de développement *ex vivo*, de la transparence de son corps, qui le rendent compatible avec des techniques d'imageries haut débit. Ce modèle larvaire a précédemment été validé par notre équipe comme un modèle fiable pour déterminer les mécanismes hépatotoxiques en réponse à une exposition chimique (Podechard et al., 2017), et également pour l'étude des mécanismes de progression de la stéatose hépatique vers la stéatohépatite (Bucher et al., 2018b). De ce fait, pour mes travaux de thèse, l'utilisation de ce modèle de la larve de poisson-zèbre, s'est révélé cohérent pour l'étude des NAFLD dans un contexte d'exposition aux PE.

Dans ce cadre, cette thèse⁷ a été initiée et avait pour objectifs de développer des tests biologiques sur modèle *in vivo* (la larve de poisson-zèbre) permettant d'évaluer la capacité des PE à induire l'initiation des NAFLD (1^{er} test), ainsi que leur progression vers le stade pathologique de la NASH (2nd test). Le dernier objectif était de valider au sein de notre laboratoire, un test obésogène, préalablement développé par nos partenaires du projet et visant à évaluer la capacité des PE à induire l'augmentation d'adiposité de poissons-zèbres à l'âge juvénile.

⁷ Cette thèse a été réalisée à l'IRSET INSERM U1085 de Rennes et a été financée par le programme de l'UE pour l'action en matière de recherche et d'innovation (RIA), Horizon 2020 (Projet Oberon, convention de subvention n° 825712) et par la région Bretagne (ARED)

Pour la mise en place de batteries de tests envisagées dans le projet Oberon, un ensemble de 10 PE a été sélectionné, par le consortium, en raison de leur pertinence en termes d'exposition humaine et de leurs effets sur les maladies métaboliques. Ce panel de PE regroupe le bisphénol **BPA** et ses substituts **BPS** et **BPF** ; les phtalates **DEHP** et **DBP** ; les composés perfluorés **PFOA** et **PFOS** ; le **DDE**, principal métabolite de l'insecticide DTT ; le métal lourd **Cadmium** ; et enfin le conservateur **butyl-parabène** (Les caractéristiques des 10 PE utilisés dans le projet Oberon sont répertoriées dans le Tableau S4 fourni en Annexe).

La première étape de ce projet a donc été de mettre en place un test biologique sur la larve de poisson-zèbre, permettant d'évaluer la capacité des PE à induire l'initiation de la stéatose hépatique. Basé sur une technique d'imagerie par fluorescence permettant de quantifier l'accumulation de lipides hépatiques, ce test conclut quant à la capacité d'une molécule à induire la stéatose à travers le calcul d'un score de stéatose. Ce test, intitulé « Steatosis Assay On Zebrafish » (StAZ), a été développé et utilisé pour le criblage des 10 PE du projet afin de déterminer leur potentiel stéatogène. Les mécanismes impliqués dans l'initiation de la stéatose ont ensuite été analysés avec un intérêt particulier pour les perturbations du métabolisme des lipides. Nous nous sommes également intéressés à l'étude du remodelage membranaire dont l'implication dans l'hépatotoxicité et la pathogénèse des NAFLD a été démontré par de précédents travaux de notre équipe (Podechard et al., 2017 ; Imran and al., 2018). Cette étude a fait l'objet d'une publication, actuellement en révision, dans l'édition spéciale « Metabolism Disrupting Chemicals: Screening, Testing and Molecular Pathway Identification » du journal « International Journal of Molecular Sciences » ; celle-ci s'intitule : « A new in-vivo zebrafish bioassay evaluating liver steatosis identifies DDE as a steatogenic endocrine disruptor, partly through SCD1 regulation » (Le Mentec et al., 2022).

Par la suite, l'objectif a été de développer un second test, permettant d'évaluer, cette fois, la capacité des PE à induire la transition pathologique de la stéatose vers la steatohépatite, sur ce même modèle de larve de poisson-zèbre, mais présentant au préalable une stéatose induite par un régime riche en graisse. Dans ce contexte, afin de mettre en évidence la progression pathologique de la stéatose hépatique, la mort cellulaire, le stress oxydant et l'inflammation, ont été évalués, comme critères caractéristiques de la NASH. Ces caractéristiques ont pu être étudiées par des techniques d'imageries par fluorescence, mais également par histologie ou par l'étude de l'expression des gènes.

Enfin, la validation inter-laboratoire du test obésogène « Zebrafish Obesogenic Test », développé par nos collaborateurs du projet, a été entreprise. Cette étape est nécessaire au processus de validation des tests standardisés et réglementés.

PARTIE 3 : LES RESULTATS

I. Développement du « Steatosis Assay on Zebrafish » et étude mécanistique des effets pro-stéatogènes du DDE

i. Article

Un nouveau test biologique *in-vivo* sur le poisson-zèbre évaluant la stéatose hépatique identifie le DDE comme un perturbateur endocrinien stéatogène, en partie *via* la régulation de SCD1

Hélène Le Mentec, Emmanuelle Monnier, Antoine Legrand, Céline Monvoisin, Dominique Lagadic-Gossmann, Normand Podechard

Les NAFLD sont les pathologies hépatiques chroniques les plus fréquentes, touchant environ 25% de la population mondiale. Le premier stade de la maladie, la stéatose hépatique, est caractérisé par une accumulation excessive de lipides stockés au sein de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes. Si cet état est réversible et bénin, il sensibilise cependant le foie aux agressions secondaires et prédispose à la progression vers des stades pathologiques avancés (steatohépatite, cirrhose, fibrose, cancer). De nombreux facteurs ont été décrits pour participer au développement des NAFLD (alimentation, prédispositions génétiques, dysfonctions métaboliques), mais dernièrement, l'exposition aux contaminants environnementaux et plus particulièrement aux PE, a été considérée comme un nouveau facteur important jouant un rôle dans la pathogénèse des NAFLD. Du fait de leur présence ubiquitaire dans notre environnement (plastiques, revêtements, pesticides, cosmétiques, etc.), et de leurs effets sur la santé humaine, ces PE sont particulièrement préoccupants.

Conformément au cadre réglementaire européen pour réduire l'utilisation de certains PE et protéger les consommateurs, de nouvelles méthodes permettant de mieux prédire les effets de PE sont nécessaires. Dans ce contexte, nous avons cherché à **mettre en place un test biologique sur modèle *in vivo* permettant d'évaluer la capacité des PE à induire l'initiation des NAFLD.**

Ainsi, nous avons développé un test, intitulé « Steatosis Assay On Zebrafish » (StAZ), qui permet d'identifier les molécules capables d'induire une stéatose. Ce test utilise le modèle alternatif de la larve de poisson-zèbre (avant 5 jours post-fertilisation, jpf, hors réglementation), qui présente de nombreux avantages techniques (taille, vitesse de développement, transparence), le rendant compatible avec le souhait de développer un test d'imagerie haut-débit. Brièvement, le test StAZ consiste à exposer des larves de poisson-zèbre à différentes molécules à partir de 3 jpf pendant 48h. Par la suite, le colorant Nile Red est utilisé pour marquer les lipides neutres hépatiques avant acquisition par microscopie confocale d'images de différentes zones du foie pour chaque larve. La stéatose est ensuite évaluée grâce à un score de stéatose, calculé par le biais d'analyses automatisées que nous avons développées. Celle-ci sont basées sur la quantification de l'intensité de fluorescence du Nile Red et du nombre et de la surface occupée par les GL. Ce test a été développé dans un premier temps sur une souche sauvage de poisson-zèbre puis adapté et optimisé sur une souche transgénique possédant un foie fluorescent bleu (*AB-tg(Fab10 :CFP ;cry :mRFP)*). En effet, pour ce modèle, la quantification des lipides marqués en vert dans le foie fluorescent bleu a permis d'accroître l'automatisation de notre méthode d'analyse du score de stéatose, avec pour objectif la standardisation du test StAZ.

Après la mise au point technique du test StAZ, nous avons criblé un ensemble de 10 PE pour leur potentiel stéatogène. Cet ensemble de PE, sélectionné en raison de leur pertinence par rapport à l'exposition humaine et leurs effets sur les maladies métaboliques, regroupent : le bisphénol **BPA** et ses substituts **BPS** et **BPF** ; les phtalates **DEHP** et **DBP** ; les composés perfluorés **PFOA** et **PFOS** ; le **DDE**, principal métabolite de l'insecticide DDT ; le métal **Cadmium** ; et enfin le conservateur **butyl-parabène**. Ainsi, après exposition des larves de poisson-zèbre à des concentrations non toxiques de chaque PE allant de 1 nM à 10µM, le test StAZ a permis d'identifier le DDE comme molécule capable d'induire significativement une augmentation du score de stéatose, témoignant ainsi de son potentiel stéatogène.

Afin d'explorer les mécanismes impliqués dans l'initiation de la stéatose induite par le DDE, notre première approche a été l'étude de l'expression de gènes impliqués dans :

- le métabolisme des lipides et la stéatose (LDN ; import, stockage, dégradation et export des AG ; métabolisme du cholestérol et des sphingolipides)
- La régulation des précédents gènes (récepteurs nucléaires)
- la progression vers la NASH (inflammation, stress oxydant et mort cellulaire)
- les fonctions mitochondriales en lien avec les NAFLD

Ainsi les principales perturbations observées nous ont orientés vers un rôle important de la désaturase *Scd1*, dont l'expression est induite par le DDE, et qui peut expliquer une augmentation de la lipogenèse initiatrice de la stéatose.

Des perturbations de l'expression de gènes liés à la mitochondrie ont aussi été observées. Nous avons donc conduit une étude de l'activité mitochondriale grâce à la technologie Seahorse qui permet d'évaluer les niveaux d'activité de la phosphorylation oxydative. N'ayant pas observé de changements significatifs, nous avons pu exclure un rôle majeur des dysfonctions mitochondriales dans notre modèle.

Par ailleurs, la dérégulation de *scd1* mais aussi des gènes impliqués dans le métabolisme des sphingolipides et du cholestérol, constituants majeurs des membranes plasmiques, nous ont amenés à étudier le remodelage membranaire. En effet, ce mécanisme a précédemment été décrit par notre équipe comme étant responsable d'une toxicité hépatique pouvant être impliqué dans la pathogénèse des NAFLD. Pour cela, le remodelage membranaire a été évalué par l'analyse de marquage avec la sonde fluorescente di-4-ANEPPDHQ. Cela nous a permis de conclure que le DDE était capable d'induire une diminution de l'ordre membranaire et donc une fluidification des membranes au niveau du foie.

Enfin, le rôle de la désaturase *Scd1* a été évalué à la fois dans l'induction de la stéatose et dans le remodelage membranaire induits par le DDE. En utilisant un inhibiteur de l'activité *Scd1*, A939575, une diminution du score de stéatose et de la fluidification des membranes hépatiques a été mise en évidence démontrant ainsi que :

- *scd1* est impliqué dans l'induction de la stéatose par le DDE
- l'induction de *scd1* participe au remodelage membranaire induit par le DDE et plus exactement dans la fluidification des membranes



Article

A new *in-vivo* zebrafish bioassay evaluating liver steatosis identifies DDE as a steatogenic endocrine disruptor, partly through SCD1 regulation

Hélène Le Mentec¹, Emmanuelle Monniez¹, Antoine Legrand¹, Céline Monvoisin², Dominique Lagadic-Gossmann^{1*}, Normand Podechard^{1*#}

¹ Univ Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé environnement et travail) – UMR_S 1085, F-35000 Rennes, France

² UMR 1236-MOBIDIC, Université Rennes, INSERM, Etablissement Français du Sang Bretagne, 35043, Rennes, France

* Co-last authors

Correspondence: norman.podechard@univ-rennes1.fr

Abstract: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), which starts with liver steatosis, is a growing worldwide epidemic, responsible for chronic liver diseases. Among its risk factors, exposure to environmental contaminants, such as endocrine disrupting compounds (EDC), has been recently emphasized. Given this important public health concern, regulation agencies need novel simple and fast biological tests to evaluate chemical risks. In this context, we developed a new *in vivo* bio-assay called StAZ (Steatogenic Assay on Zebrafish) using an alternative model to animal experimentation, the zebrafish larva, to screen EDCs for their steatogenic properties. Taking advantage of the transparency of zebrafish larvae, we established a method based on fluorescent staining with Nile Red to estimate liver lipid content. Following testing of known steatogenic molecules, 10 EDCs suspected to induce metabolic disorders were screened and DDE, the main metabolite of the insecticide DDT, was identified as a potent inducer of steatosis. To confirm this and optimize the assay, we used it in a transgenic zebrafish line expressing a blue fluorescent liver protein reporter. To get insight into DDE's effect, the expression of several genes related to steatosis was analyzed; an up-regulation of *scd1* expression, probably relying on PXR activation, was found, partly responsible for both membrane remodeling and steatosis.

Citation: To be added by editorial staff during production.

Academic Editor: Firstname
Lastname

Received: date
Accepted: date
Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Keywords: Zebrafish larvae; bioassay; endocrine disruptor compounds; NAFLD; liver steatosis; DDE.

1. Introduction

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a growing worldwide epidemic, responsible for an increasing number of chronic liver diseases and consecutive mortality [1]. The global prevalence of NAFLD is around 25% of the general population worldwide and could rise to 60-90% in some subpopulations, particularly those exhibiting metabolic diseases such as type 2 Diabetes mellitus (T2DM) and obesity [1]. NAFLD covers a large panel of liver diseases, starting with liver steatosis characterized by an excessive accumulation within hepatocytes of fatty acids (mainly as triglycerides) inside lipid droplets. Although steatosis is considered as a benign liver disease, this stage sensitizes the liver to subsequent harmful aggressions; thus in 20% of cases, steatosis progresses to an inflammatory pathological state called non-alcoholic steatohepatitis (NASH), thereby predisposing toward more severe and irreversible complications such as cirrhosis and/or hepatocellular carcinoma [2–4]. However, the factors inducing the pathological development and progression and the underlying molecular mechanisms are not yet fully

understood and remain to be further elucidated in order to better prevent the deleterious effects of the advanced stages of NAFLD.

Genetic predisposition, dietary habits and metabolic disorders like obesity and T2DM are the main risk factors of NAFLD. More recently, it has been acknowledged that exposure to environmental factors may also promote NAFLD [5], thus leading to the concepts of TAFLD and TASH (Toxicant-Associated Fatty Liver Diseases and Toxicant-Associated Steatohepatitis)[6–8]. Among environmental factors, endocrine disrupting compounds (EDCs), also called metabolism disrupting chemicals (MDCs), have been described for their ability to disrupt metabolic functions involved in the development of hepatic steatosis and the progression to steatohepatitis [9–13].

EDCs encompass a heterogeneous group of chemicals (plastics, plasticizers, pesticides, industrial solvents, heavy metals...) that have been mass produced throughout the past four decades, driven by their widespread use. Direct measurements of EDC levels in human blood and urine showed ubiquitous exposure to EDCs, through diet, lifestyle, air contamination [14]. EDCs can interfere with any aspect of the endocrine system, including hormone production, release, transport, metabolism, receptor binding and/or activation. Notably, several EDCs can interact with nuclear receptors such as PPAR, CAR, PXR, LXR, or AhR, thus altering lipid metabolism and inducing the initiation or progression of TAFLD [10,15]. Among them, perfluorinated compounds, PCBs, phthalates (dibutyl phthalate [DBP], di(2)ethylhexyl)phthalate [DEHP]), dioxins (e.g. TCDD), BPA or also DDE (dichlorodiphenyldichloroethylene), the main metabolite of the insecticide DDT, have been associated with the development of steatosis in liver [9,16–18]. Although regulatory measures have been taken by EU to restrict the use of certain EDCs (like BPA and DDE), some of them have been replaced by substitutes whose safety has not been demonstrated (e.g. bisphenol S (BPS) and bisphenol F (BPF) as substitutes to BPA). In addition, due to the large number of new chemicals and to the lack of readily accessible and validated assays, it is still difficult to fully establish their potential health impacts notably regarding the liver [19]. Therefore, there is a need to develop toxicological bioassays/screening methods to identify potential EDCs disturbing liver lipid metabolism, thus affording support to risk assessment of EDCs in relation to TAFLD.

In this context, the *in vivo* zebrafish larva model offers numerous advantages : complexity and variety of cell and organ interactions compared to *in vitro* models [20–23]; small size, transparency, rapid development (the liver is functional 3 days post-fertilization, dpf [22]); liver similarities to human with regard to functions and sensitivity towards xenobiotics (metabolism, toxicity, cellular & molecular responses) [21,24–29]; endocrine system similarities to human (nuclear/metabolic receptors mediating EDC effects and endocrine disruption) [30]. Concerning NAFLD and TAFLD, it has been shown that zebrafish can, in response to environmental triggers, develop hepatic steatosis [26,31–34] or transition from steatosis to steatohepatitis [35,36]. Moreover in recent years, the zebrafish model at the embryonic and larval stages has become one of the most popular vertebrate models used for high-throughput drug screening and for studying lipid metabolism disorders and related diseases including NAFLD [34,37–39], notably in relation with EDCs (e.g. tributyltin [40,41]; perfluorooctane sulfonate [33]). Furthermore, according to the current European Union Animal Welfare Regulation (EU 2010), zebrafish younger than 5 days post-fertilization is not regulated by animal welfare legislation [42], and thus considered as an alternative model to animal experimentation. Based on all those properties, the zebrafish larva model is therefore an easily accessible, alternative experimental model for the *in vivo* screening of EDCs for their potential involvement in the development of liver steatosis and its transition to steatohepatitis.

In the present study, we developed an *in vivo* assay based on the quantification of lipid accumulation by fluorescent image analysis (Steatosis Assay on Zebrafish, StAZ) that highlights the induction of steatosis by EDCs. Using this bioassay, we investigated the effects of a panel of 10 selected endocrine disruptors on the induction of NAFLD. This

panel of ten EDCs (Table 1) was established based on their relevance to human exposure, potential toxicity and metabolism disrupting properties (including obesity, diabetes and NAFLD). Most of them are of regulatory interest in Europe (*e.g.*, BPA, DEHP), and some are well-known EDCs (*e.g.*, heavy metals, DDE] while several substitutes were also selected due to the lack of knowledge on their health effects (*e.g.*, BPS and BPF). The main result of our EDC screening demonstrated that DDE is able to induce steatosis. This result was confirmed using an optimized StAZ test based on the use of a transgenic zebrafish model expressing a blue fluorescent protein in liver.

In an attempt to decipher the mechanisms involved in the initiation of steatosis caused by DDE, the mRNA expression of lipid metabolism-related genes was assessed. Our results suggest an increase of *de novo* lipogenesis as the main pathway of DDE-induced steatosis, notably linked to an increase of stearyl-CoA-desaturase 1 (*scd1*) expression that was found to be partly responsible for both membrane remodeling and liver steatosis.

Table 1. List of the EDCs studied in the project and urinary or serum levels detected in the cohort study ESTEBAN

Category (Main sources)	Chemical Name <i>Exposure levels in Human [43]</i>	Metabolic disruption
Aromatic compounds, plasticizers (Food containers, sales receipt, toys)	Bisphenol A (BPA) <i>0.01-0.45 μM (urine)</i>	Obesity: Increase food intake, body weight and adiposity <i>in vivo</i> [44]; stimulate adipocyte differentiation, lipogenesis; decrease adipocyte insulin sensitivity; activate the cannabinoid system, increase lipogenic gene expression (PPAR γ ,
	Bisphenol F (BPF) <i>0.001-0.17 μM (urine)</i>	C/EBP α , LPL, SREBP-1c, FAS, SCD1) <i>in vitro</i>
	Bisphenol S (BPS) <i>0.001-1.3 μM (urine)</i>	Diabetes: Increase glucose intolerance and insulin resistance; disrupt pancreatic β cells' function <i>via</i> mitochondrial disruption and an increase of ROS production [45] NAFLD: Increase of liver lipid synthesis and accumulation [46,47]; interact with metabolic receptors (PPAR γ) [47–49] and lipogenic gene targets (SREBP-1c, FASN, CD36) [18,47–50]; induce mitochondrial dysfunction [49,51,52] and oxidative stress [51,53–55]; induce hepatic inflammation and endoplasmic reticulum stress promoting the progression to NASH [48]
Organic compounds, plasticizers (Food containers, kitchen utensils, toys, cosmetics, perfumes, medical tubing, adhesives, paints)	Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) <i>45-69 nM (urine)</i> Dibutyl phthalate (DBP) <i>62-71 nM (urine)</i>	Obesity: Increase food intake, body weight and visceral white adipose tissue <i>in vivo</i> ; promote adipocyte proliferation; increase insulin resistance and glucose intolerance <i>in vitro</i> [56] Diabetes: Decrease β -cells' insulin signalling; induce oxidative stress [57] NAFLD: Disrupt liver lipid metabolism through PPARs and/or SREBP1c signalling pathway [58], leading to hyperlipidaemia; induce oxidative stress and inflammation [59–62]

Fluorinated tensoactives (Stain resistant coating in clothing, kitchen utensils, home furnishings, food packaging, paint)	Perfluorooctanoic acid (PFOA) 3.7-5.0 nM (urine) Perfluorooctanesulfonic acid (PFOS) 4.4-8.1 nM (urine)	Obesity: Induce adipocyte differentiation through PPAR γ activation; increase expression of adipogenic genes <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> Diabetes: Increase insulin resistance and glucose intolerance [63] NAFLD: Increase triglyceride (TG) levels and hepatic lipid droplet accumulation [64]; alter lipid metabolism; activate PPAR α signalling [65–67]; decrease β -oxidation and lipid transport (PFOS) [68–71] and mitochondrial dysfunction (PFOA) [72]; induce inflammation [73]
Insecticide (Decomposition product of DDT, insecticides and repellents (anti-mosquito), food)	Dichloro diphenyl-dichloro ethylene (DDE) 0.32-0.57 nM (serum)	Obesity: Increases body weight and fat mass, reduces energy expenditure and thermogenesis <i>in vivo</i> ; increases adipocyte differentiation and proliferation; up-regulates adipogenesis mediators (C/EBP α , SREBP1, PPAR γ); increases fatty acid uptake and adipokine release (adiponectin, leptin, resistin) <i>in vitro</i> [74,75] NAFLD: Increases liver lipids level [74] and alters their metabolism [76]; induces liver mitochondrial dysfunction [77–79] and oxidative stress <i>in vivo</i> [80].
Heavy metal (by-products of waste treatment, food industry, fertilizers, electrical equipments, pigments for paints)	Cadmium (CdCl ₂) 2.5-13.6 nM (urine)	Obesity: Increases adiposity [81] Diabetes: Impairs glucose metabolism leading to insulin resistance, ROS production, mitochondrial dysfunction and apoptosis of β -cells [82]. NAFLD: Increases lipid accumulation through hepatic lipogenesis [81,83]; promotes oxidative stress [83,84]; causes mitochondrial dysfunction [84]; decreases β -oxidation [85]; dysregulates autophagy [84,86]; increases inflammation [81,83]
Anti-microbial conservator (Preservatives in foods, personal care products and cosmetics)	Butyl-paraben (BtP) 2.6 nM (urine)	Obesity: Promotes adipogenesis <i>in vitro</i> , increases body weight and adipocyte size <i>in vivo</i> [87]

115

2. Results

116

2.1. Development and validation of the Steatogenic Assay on Zebrafish and Screening of EDCs for their capacity to induce steatosis

117

118

To address the need by regulatory instances of fast and reproducible tests to evaluate chemicals, we developed a test using zebrafish larvae with the aim to screen the potential of EDCs (or other chemicals) to induce steatosis. This bio-assay, that we called Steatogenic Assay on Zebrafish (StAZ), is based on the fluorescence imaging of liver lipid droplets after Nile red staining following exposure of zebrafish larvae between 3 to 5 dpf (see Figure 1 for the flowchart of the assay).

119

120

121

122

123

124

To demonstrate the sensitivity of the StAZ to detect steatosis induction, reference molecules known to induce hepatic lipid accumulation such as ethanol, valproate, amiodarone, and TCDD [24,88–90] were first tested; we also evaluated the impact of a high fat diet, already known to induce steatosis in zebrafish larvae at 5 dpf after one day of feeding [35]. Following these treatments, liver lipid accumulation was investigated using Nile Red (NR) staining. As previously described, NR is a selective fluorescent

125

126

127

128

129

130

lipophilic dye that exhibits green fluorescence (λ_{ex} 488 nm; λ_{em} 530 nm) when bound to neutral lipids, which enables intracellular lipid droplet detection and quantification of hepatic lipids by high resolution confocal microscopy imaging [91–93]. To normalize the measurement of NR green-fluorescence intensity, specific of lipid, we used the blue (λ_{ex} 405 nm; λ_{em} 488 nm) auto-fluorescence signal. A steatosis score was calculated for each molecule as described in Material and Methods.

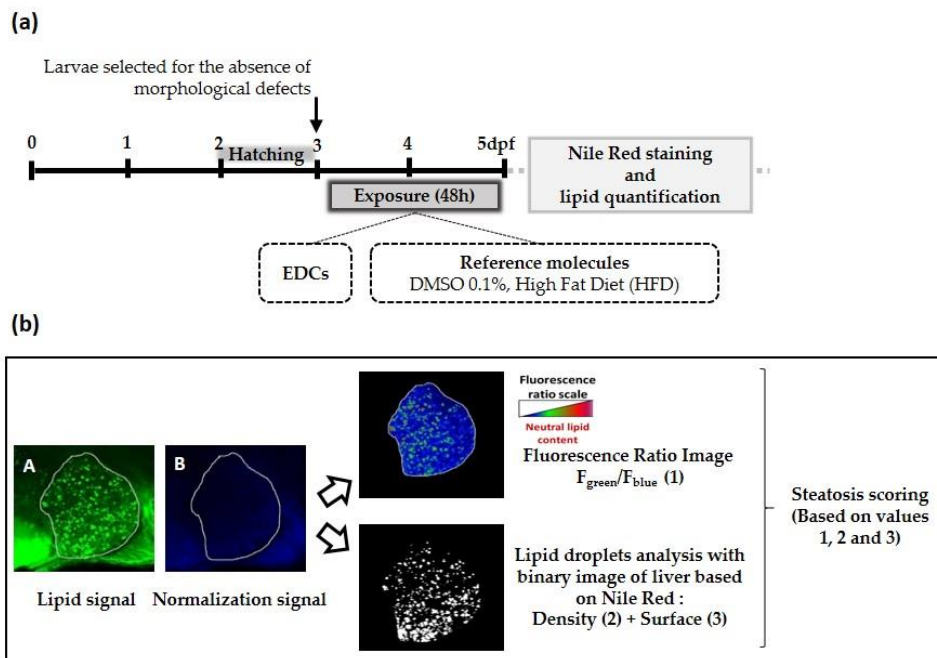


Figure 1: Experimental design of the StAZ bioassay (a) Steatogenic Assay on Zebrafish (StAZ) protocol. Zebrafish larvae at 3 days post-fertilization (dpf) were exposed to the selected compounds at non-toxic concentrations, to the positive control (HFD) or to vehicle alone (DMSO 0.1%), during 48h. Following exposure, larvae were euthanized, fixed and hepatic lipid accumulation was measured using Nile Red staining and fluorescence signal quantification. (b) Fluorescent signal quantification workflow. After image acquisition of stained zebrafish larvae with confocal fluorescence microscopy, two types of images were obtained: a first one with a green signal - characteristic of neutral lipid fluorescence - and a second one with a blue signal for normalization - insensitive to neutral lipids- (image A and B, respectively). Using Fiji imaging processing software and home-made macros, three parameters were calculated: (1) the ratio of fluorescence intensity of image A to image B *per* liver area (F_{green}/F_{blue}), (2) the amount of lipid droplets *per* liver area, and (3) the surface occupied by lipid droplets *per* liver area. Based on these three parameters, a steatosis score was calculated. Each parameter was pondered by a specific coefficient determined empirically.

Among the reference treatments tested, only the HFD-fed larvae showed a significant increase in the steatosis score calculated by our test (Figure 2), indicative of lipid accumulation in the liver. For ethanol exposed larvae, despite the large induction of the steatosis score, this was not significant. However, this therefore was in line with steatosis initiation following HFD-feeding or ethanol consumption, as previously reported in literature [35,88,94,95]. The other steatogenic molecules failed to induce a significant steatosis with the StAZ, but they showed a trend towards an increase, notably for amiodarone and valproate. These results will be discussed below, and could indicate a low sensitivity of the StAZ test.

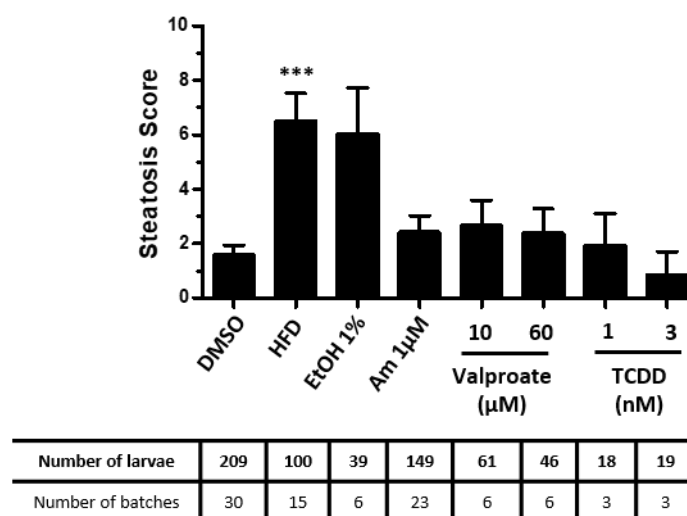


Figure 2: Screening of the steatogenic molecules with the StAZ bio-assay. Zebrafish larvae at 3 dpf were exposed to selected steatogenic controls: high fat diet (HFD), Ethanol 1% v/v (EtOH 1%), Amiodarone (1 µM), Valproate (10 / 60 µM) or TCDD (1 / 3 nM). Following exposure, larvae were euthanized, fixed and steatosis score (cf. Figure 1b) was calculated based on Nile Red staining and image-based automated analysis after confocal microscopy acquisition. Values are mean +/- SEM, with the number of batches and larvae indicated in the table underneath the graph. *** P < 0.001, by comparison with control group using Kruskal-Wallis test.

Subsequently, the StAZ bio-assay was used to screen 10 EDCs belonging to different classes or families of chemicals and chosen for their relevance to human exposure and potential toxicity (Table 1).

We first investigated the toxicity of these EDCs on mortality and larvae morphology to determine non-toxic concentrations of each molecule (Table 2 in Materials and Methods). We then exposed zebrafish larvae to these concentrations ranging from 1 nM (relevant to human exposures or doses found in the environment) to 10 µM (considered a high dose). Screening of these EDCs with the StAZ identified DDE as able to significantly increase the steatosis score at the highest doses of 1 and 10 µM, in a dose-dependent manner. Regarding the other EDCs, even if a trend for paraben, bisphenols and phthalates was found, there was no significant change of the steatosis score (Figure 3).

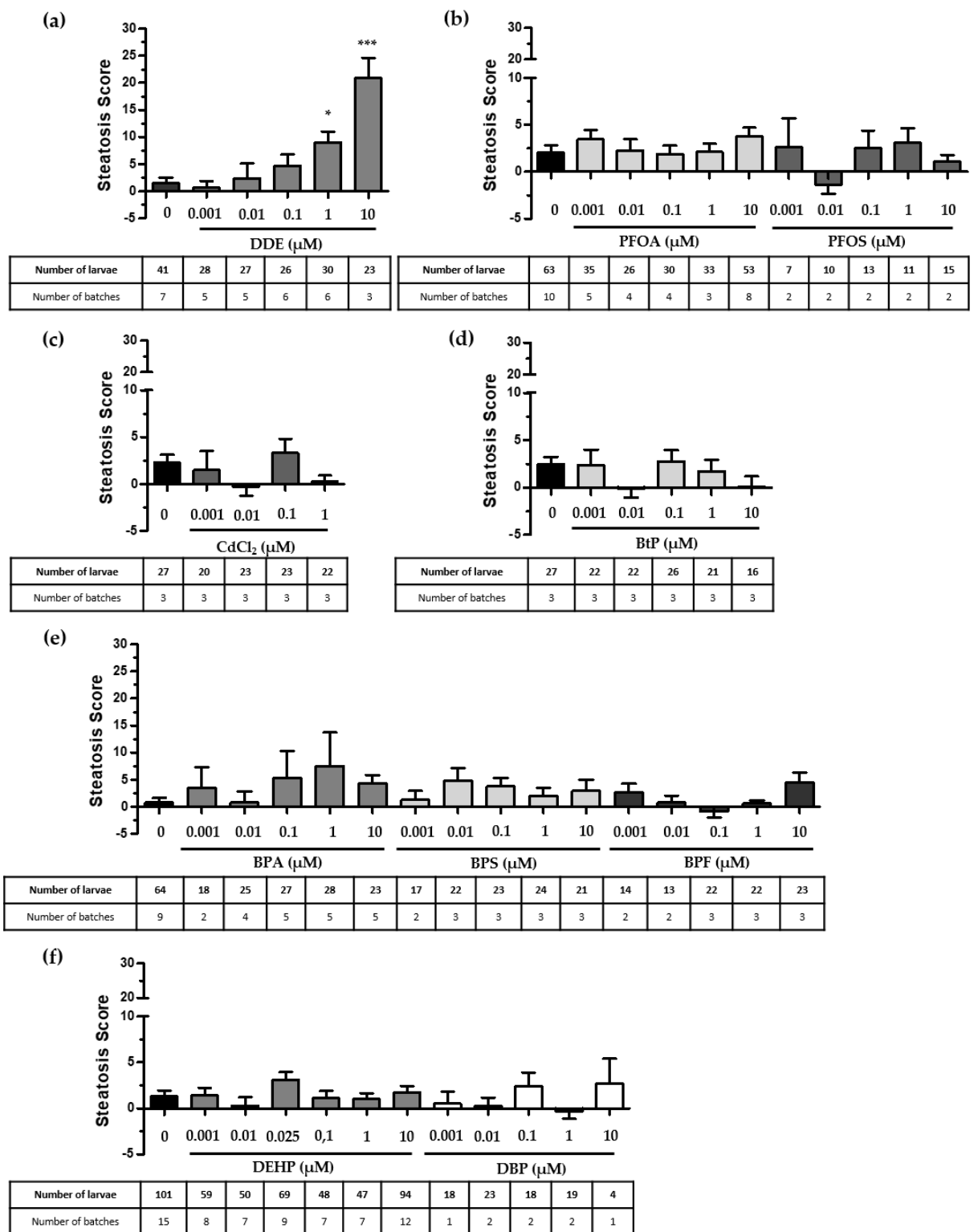


Figure 3: Screening of endocrine disruptors with the Steatogenic Assay on Zebrafish. Zebrafish larvae at 3 days post-fertilization were exposed to the selected compounds at non-toxic concentrations: DDE (A), Perfluorinated compounds (B), Cadmium (C), Butyl-Paraben (D), Bisphenols (E), phthalates (F) or to vehicle alone, during 48h. Following exposure, larvae were euthanized, fixed and steatosis scores (based on lipid fluorescence intensity, lipid droplet density and area in the liver) were calculated based on Nile Red staining and image-based automated analysis after confocal microscopy acquisition. Values are mean +/- SEM; with the number of batches and larvae indicated in the table underneath the graph. * P < 0.05, ***< 0.001 by comparison with control group using Kruskal-Wallis test.

182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192

2.2. Optimization and validation of the StAZ bio-assay using a blue fluorescent liver transgenic zebrafish model

In order to optimize the StAZ and to confirm the steatogenic effect of DDE, we used a transgenic line of zebrafish (AB-Tg(Fabp10 :CFP ;cry :mRFP). In this zebrafish line, the gene of the blue fluorescent protein CFP (cyan fluorescent protein) is under the control of the liver specific promoter of fabp10 (fatty acid binding protein 10, *alias* liver fabp); thus, these fishes have a blue fluorescent liver. This model, in addition to the ease of detection of the liver on fluorescent confocal images, also generates a better signal to normalize the liver Nile red fluorescence (the fluorescence intensity is stronger than the autofluorescence used in wild-type animals and the signal is limited to the liver).

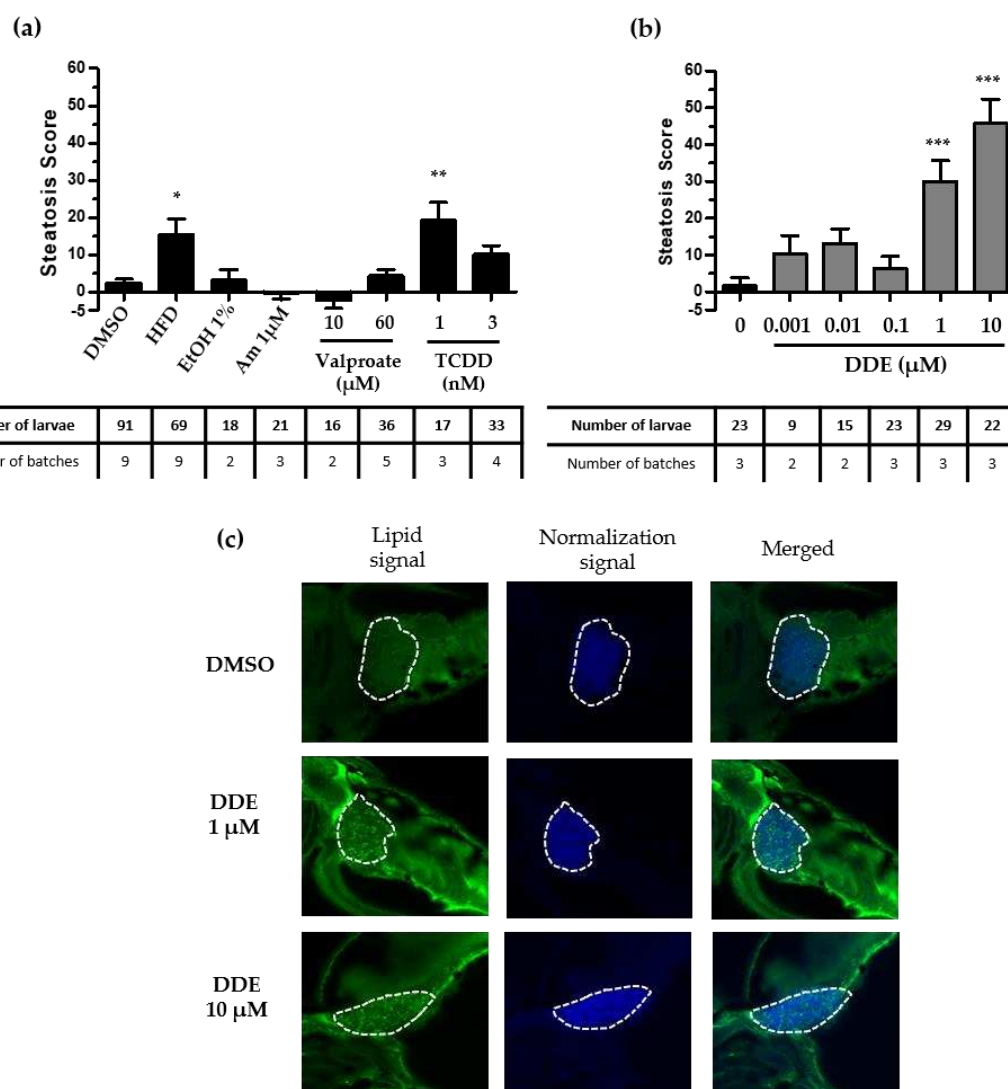


Figure 4: Screening of the steatogenic molecules and validation of the steatogenic effect with the StAZ using the transgenic zebrafish model. Zebrafish transgenic larvae at 3 days post-fertilization were exposed to positive control steatogenic conditions (HFD, Ethanol, Amiodarone, Valproate, TCDD) (a), to DDE at concentrations ranging from 0.001 to 10 µM (b), or to vehicle alone (a,b), during 48h. Following exposure, larvae were euthanized, fixed and steatosis scores (based on lipid fluorescence intensity, lipid droplet density and area in the liver) were calculated based on Nile Red (NR) staining and image-based automated analysis after confocal microscopy acquisition. Values are mean +/- SEM, with the number of batches and larvae indicated in the table underneath the graph. *P<0.05, **P<0.01, ***P < 0.001, by comparison with control group using Kruskal-Wallis test. (C): Confocal microscopy images obtained after DDE (1 /10 µM) or vehicle control exposure and Nile red staining showing lipid droplets stained in green. The liver is delimited by the dotted lines.

Using this model, 48h-treatments with HFD or TCDD (1 nM) were found to induce a significant increase in the steatosis score in contrast to ethanol (Figure 4a). Moreover, we validated the effect of the highest doses of DDE, and observed a significant induction of steatosis both by the increase of steatosis score (Figure 4b) and by the increase of hepatic lipid droplets amount observed by microscopy (Figure 4c). Furthermore, the use of this transgenic zebrafish line appeared to increase the sensitivity of the assay as the scores obtained for DDE were higher.

2.3. The steatogenic effect of DDE involves perturbation of lipid metabolism

In order to determine how DDE induced excessive hepatic lipid accumulation, we performed a large scale RT-qPCR gene expression analysis by using the microfluidic Fluidigm-Biomark technology, which allows to carry out 9216 PCR reactions in parallel (96 samples \times 96 assays) [96]. In addition to genes involved in lipid homeostasis, genes related to liver toxicity and oxidative stress, and nuclear receptors were investigated because of their involvement in NAFLD. As seen on the heatmap, most of the changes induced by DDE occurred at doses of 1 and 10 μ M, which was coherent with the effects observed on steatosis (Figure 5).

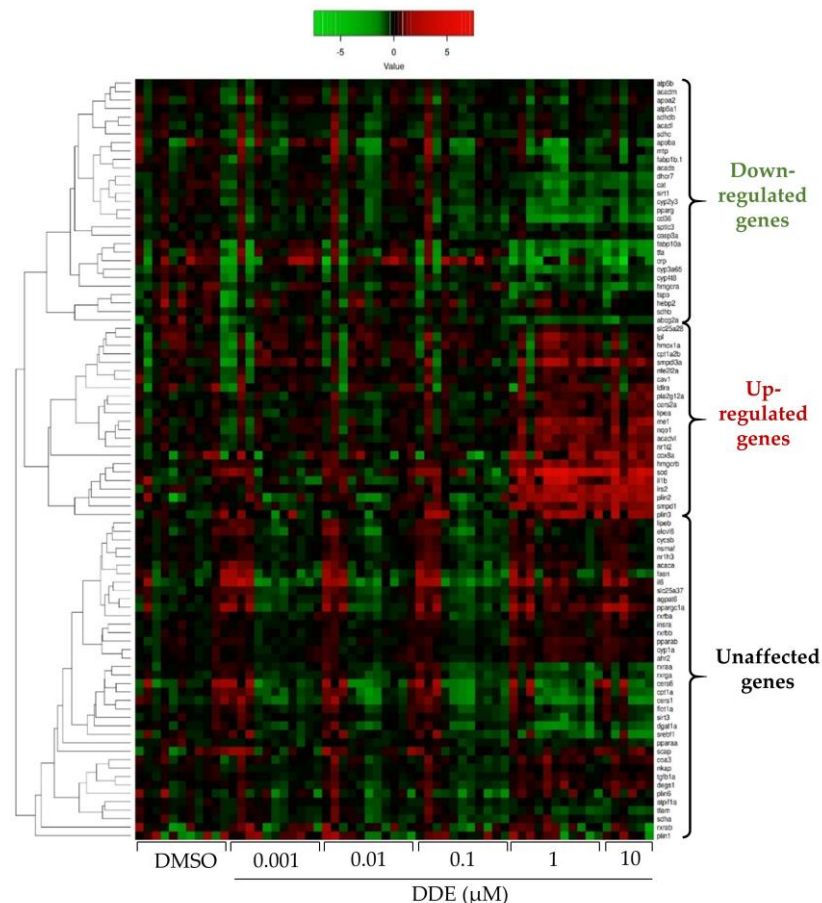


Figure 5: Heatmap showing the impact of DDE on mRNA expression of different genes related to metabolic pathways. mRNA expression was evaluated by RT-qPCR gene expression analysis by using the microfluidic Fluidigm-Biomark technology. Zebrafish larvae were exposed to DDE (from 1 nM to 10 μ M) during 48h, from 3 to 5 dpf. mRNA expressions of 90 genes related to nuclear receptors, lipid homeostasis, liver metabolism, inflammation and oxidative stress were analysed; results are shown as a heatmap (each row represents an independent mRNA sample extracted from a pool of zebrafish larvae). Data are expressed as mean expressions relative to mRNA levels measured in DMSO control larvae, set at 0 (log₂ fold change) ($n \geq 8$).

- Expression of genes involved in lipid homeostasis: 243
In line with an accumulation of FA in lipid droplets, treatment with DDE at 1 and 10 244
 μM considerably induced genes involved in *de novo* lipogenesis (DNL), *scd1* (Stearoyl- 245
CoA desaturase-1) and *me1* (malic enzyme 1), and genes related to FA storage, perilipin 246
1 and 2 (*plin2* and *plin3*). In addition, expression of genes related to FA uptake were 247
reduced following DDE exposure (*fabp10a*, *fabp11b* and *cd36*; Figure 6a). We also 248
observed a non-significant decrease in the expression of *cpt1aa* and *apob*, that are markers 249
of fatty acid β -oxidation in mitochondria and fatty acid export, respectively. In contrast, 250
expression of *dgat1* (diacylglycerol O-acyltransferase 1), known to catalyse the 251
incorporation of diacylglycerol in triglycerides for their storage in lipid droplets, was 252
reduced by DDE. 253
254
- Expression of genes related to sphingolipid, phospholipid and cholesterol 255
metabolism: 256
To get further insight into the pathways involved in the development of steatosis 257
induced by DDE, we next investigated the expression of genes involved in the metabolism 258
of sphingolipid and cholesterol in response to DDE exposure. A decrease of cholesterol 259
synthesis was suggested with a down-regulation of *hmgcr* (*hmg-coa* reductase) and 260
dhcr7 (7 dehydrocholesterol reductase), involved respectively in the first and the last step 261
of cholesterol biosynthesis. An increase of sphingolipid synthesis was suggested, with an 262
up-regulation in the expression of *smpd1* (sphingomyelin phosphodiesterase 1) and 263
smpd13a (Sphingomyelin Phosphodiesterase Acid Like 3A), coding for sphingomyelinase, 264
involved in the ceramide synthesis, one of the most common sphingolipids. Our analysis 265
further revealed significant down-regulation of *cerS1* (ceramide synthase S1) expression, 266
involved in ceramide synthesis (Figure 6b). Overall, these results suggest that DDE can 267
perturb cholesterol and sphingolipid metabolism. 268
269
- Expression of nuclear receptors and other transcription factors involved in the 270
regulation of lipid homeostasis : 271
Most of the effects of EDCs are due to their interactions with nuclear receptors also known 272
as metabolic receptors. As shown in Figure 6c, the mRNA expression of the nuclear 273
receptors *pxr* and *ppara* (peroxisome proliferator activated receptor α), described to be 274
involved in hepatic lipogenesis and β -oxidation, were significantly induced upon DDE 275
exposure. 276
Concomitantly, we found that DDE reduced the expression of several genes also 277
involved in the regulation of fatty acid metabolism such as *pparg* (peroxisome 278
proliferators activated receptor γ), *rxraa* (retinoic x receptor α a) and *srebf1* (Figure 6c). 279
280
- Expression of gene markers of hepatic toxicity: 281
Exposure to DDE, at the highest doses of 1 and 10 μM , increased the expression of 282
toxicity and inflammation genes. As shown in Figure 6d, DDE up-regulated the 283
expression of *il1b* (interleukin 1 β) and down-regulated that of *crp* (*C-reactive protein*), *tfa* 284
(transferrin α), and *cat* (catalase), indicating inflammation and liver damage caused by 285
DDE exposure. In addition, the highest doses of DDE caused up-regulation of the anti- 286
oxidant genes *hmx1* (heme oxygenase 1) and *nqo1* (NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 287
1), reflecting a potential induction of oxidative stress (Figure 6d). 288
289
- Comparison between HFD and DDE effects on gene expression: 290
Looking to responses between HFD and DDE, there are only 3 genes showing same 291
kind of variation (*me1*, *plin3* and *srebf1*); looking at *scd1* expression, note that opposite 292
effects of these two treatments were detected (Figure 6). 293
294

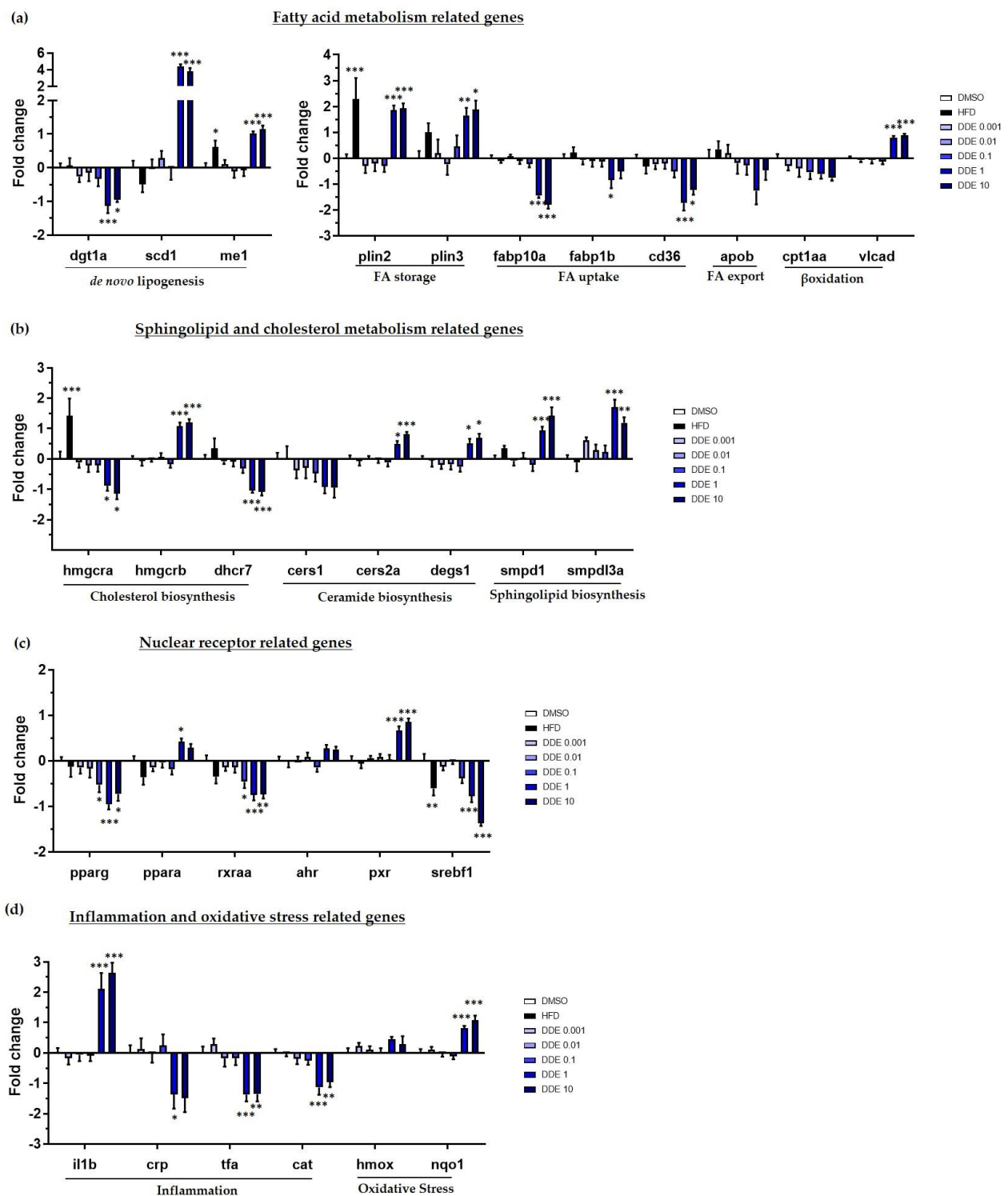


Figure 6: Impact of HFD and DDE on mRNA expression of several genes involved in lipid metabolism characteristic of steatosis and in toxicity. mRNA expression was evaluated by RT-qPCR gene expression analysis by using the microfluidic Fluidigm-Biomark technology. Zebrafish larvae were exposed to HFD or DDE (from 1 nM to 10 μ M) during 48h, from 3 to 5 dpf. mRNA expressions of genes related to fatty acid metabolism (a), sphingolipid and cholesterol metabolism (b), nuclear receptors (c) and inflammation and oxidative stress (d), are shown. Data are expressed relative to mRNA levels measured in DMSO control larvae, set at 0 (log 2 fold change). Values are the mean \pm SEM (n \ge 8). * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, by comparison with control group using ANOVA and Dunnett's test.

2.4. Assessment of the mitochondrial dysfunction mediated by DDE exposure in zebrafish larva 306

Due to the well-recognized role of mitochondrial dysfunction in NAFLD [97] and 307
based upon our gene expression results suggesting both a decrease of β -oxidation and 308
potential oxidative stress, we examined the expression of genes implicated in 309
mitochondria metabolism (Figure 7a). Our results showed only slight changes in 310
mitochondria-related gene expression (genes related to ATP synthase or respiratory chain 311
complex). Nevertheless, it could be observed a down-regulation upon DDE 1 μ M of 312
sirtuin genes (sirtuin deacetylase 1 and 3), known to be implicated in the regulation of 313
mitochondrial activity and cellular redox control. We also found increased expression of 314
the ppar γ coactivator-1 α (ppargc1 α), an inducible transcriptional coactivator involved in 315
the regulation of energy metabolism and mitochondrial biogenesis. Finally, a down- 316
regulation of abcg2a expression (a known mitochondrial transporter of metabolites) was 317
also detected. 318

As DDE was found to dysregulate some genes involved in mitochondrial 319
metabolism, we evaluated mitochondrial respiration in DDE-exposed zebrafish larvae. To 320
this end, we used a protocol adapted from Raftery *et al.* [98] based on the Agilent Seahorse 321
technology, which allows the measurement of oxygen consumption from live zebrafish 322
larvae. Using these experimental conditions, we observed no significant effect of DDE on 323
mitochondrial respiration (Figure 7b). Altogether, our data do not indicate an effect of 324
DDE on oxidative phosphorylation following a 48h-exposure to 0.1, 1, and 10 μ M of DDE. 325
326

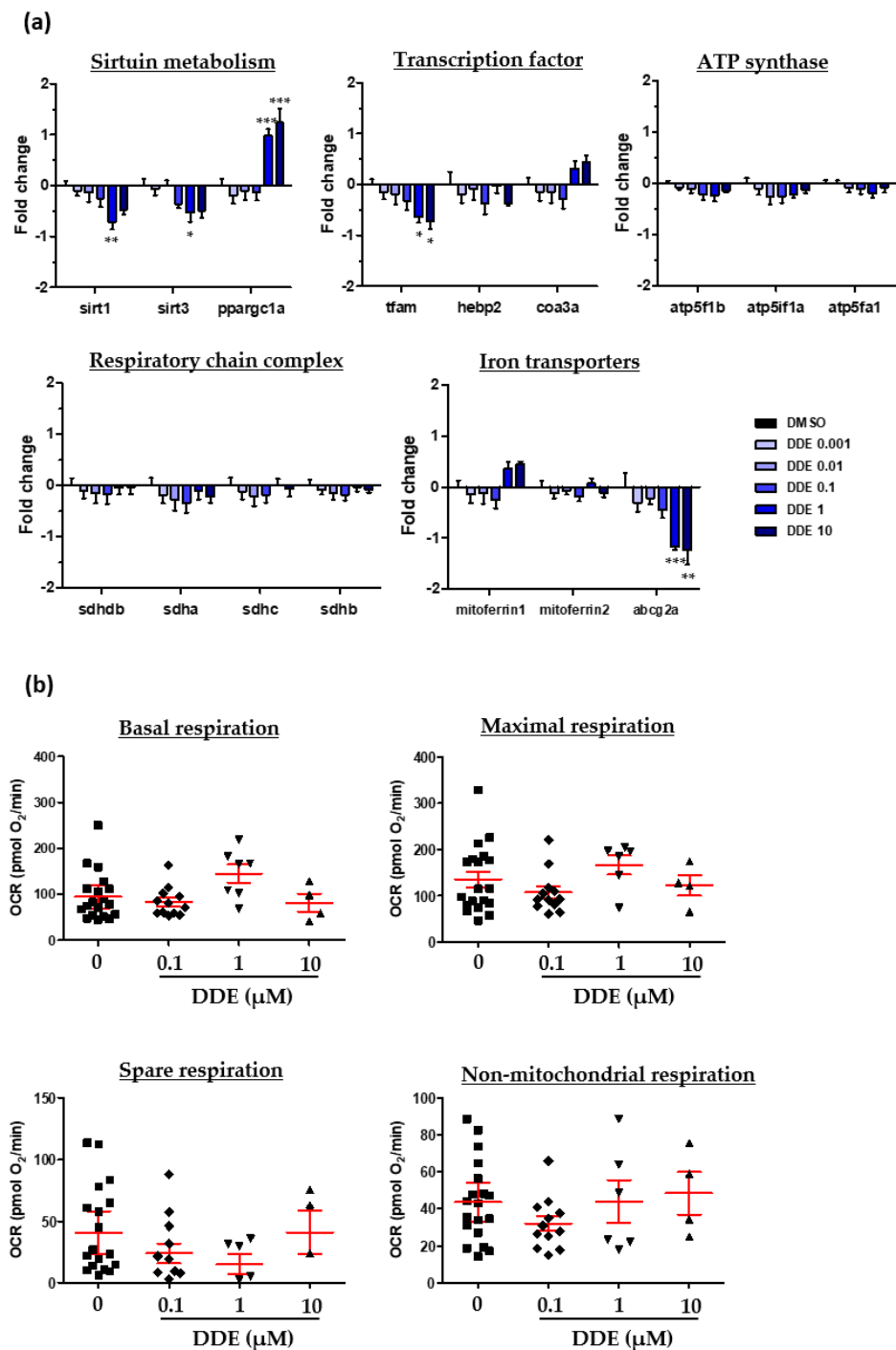


Figure 7: Assessment of potential mitochondrial dysfunction induced by DDE. Zebrafish larvae at 3 dpf were exposed to DDE (from 1 nM to 10 μ M) or to control vehicle during 48h. **(a)** Impact of DDE on the mRNA expression of several genes involved in mitochondrial metabolism. mRNA expression was evaluated by RT-qPCR gene expression analysis by using the microfluidic Fluidigm-Biomark technology. Data are expressed relative to mRNA levels measured in DMSO control larvae, set at 0 (log₂ fold change) (n \geq 8). **(b)** Evaluation of respiration after DDE exposure of zebrafish larvae. Measurements on zebrafish larvae were realized on a Seahorse XFe24 Analyzer of mitochondrial oxygen consumption. Values are the mean of oxygen consumption rate (OCR, in pmol of O₂/min) \pm SEM measured from at least 4 larvae *per* condition. Values are the mean \pm SEM. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, by comparison with control group using ANOVA and Dunnett's test.

327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339

2.5. DDE-induced membrane remodeling in zebrafish larvae

One of the main processes identified through our gene expression analysis was a perturbation of the metabolism of sphingolipid and cholesterol, main constituents of the plasma membrane. Biochemical alterations of plasma membrane lipid content is one of the features of plasma membrane remodeling which is linked to alterations of plasma membrane fluidity or modifications of lipid raft properties. Moreover, membrane remodeling has already been shown in the context of steatosis, and our team previously identified it as a key mechanism in the progression of steatosis towards a steatohepatitis-like state in zebrafish larvae co-exposed to B[a]P and ethanol [99]. Therefore, we investigated if DDE could induce such membrane remodeling by analysing membrane order with the fluorescent hydrophobic probe—di-4-ANEPPDHQ. This allowed us to calculate a generalized polarization (GP) value representative of the membrane order that depends on the chemical and physical properties of membranes—lipid composition and packing, fluidity and lipid bilayer thickness, and local hydration.

After staining whole zebrafish larvae with di-4-ANEPPDHQ, liver images were acquired by computing the GP value obtained from fluorescence images of lipid bilayers with low-membrane lipid order—the liquid disordered (Ld) phase—and with high-membrane lipid order—the liquid ordered (Lo) phase—, allowing us to estimate membrane order in the liver, as previously described [99]. Exposure of zebrafish larvae to DDE induced a global dose-dependent decrease of membrane order in liver cells, with a significant effect being observed at the highest concentration (Figure 8). As the GP factor depends on the degree of rigidity of the membrane, DDE exposure appears to induce membrane remodeling, with a fluidization of liver membranes, which is coherent with the suggested inhibition of cholesterol synthesis and *scd1* increase (Figure 6a, 6b). These data suggest that membrane remodeling is involved in the steatosis induced by DDE in zebrafish larvae.

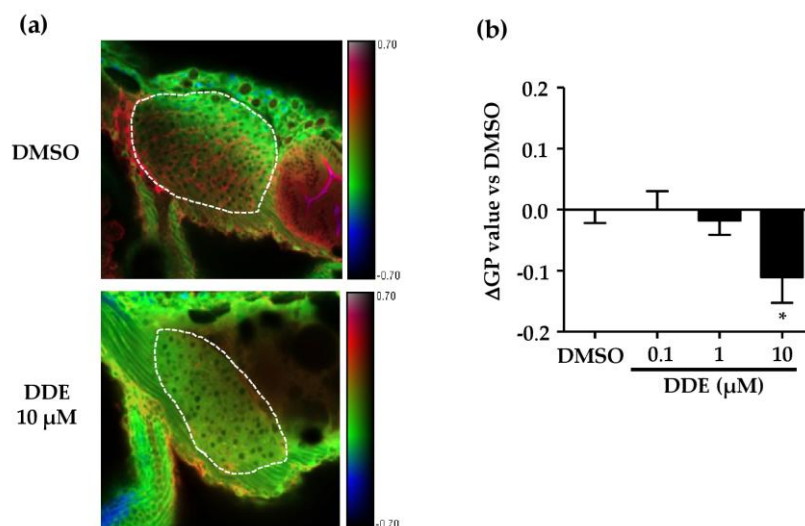


Figure 8: DDE exposure induced membrane remodeling in the liver of zebrafish larvae. Membrane order characteristic of membrane remodeling was assessed in liver of zebrafish larvae at 3 dpf after exposure for 48h to DDE (0.1 / 1 / 10 μM) or to control vehicle. Zebrafish larvae were stained with di-4-ANEPPDHQ—a membrane order-sensitive fluorescent probe—and analyzed by confocal fluorescence microscopy. Membrane order in membranes of zebrafish liver was measured by computing the generalized polarization (GP) factor. (a) Representative liver images of control vehicle (DMSO) and DDE (10 μM) treatment (magnification ×400). The liver is delimited by the dotted lines. (b) Changes in GP values (ΔGP) were expressed as the difference between individual larva GP value and the mean GP calculated in control larvae (DMSO). Values are the mean ± standard error of the mean (SEM) of at least 20 larvae. * P < 0.05 by comparison with the control group using ANOVA and Dunnett's test.

2.6. Involvement of *scd1* in the pro-steatogenic and membrane remodeling effects of DDE

Our data indicate that the pro-steatogenic effect of DDE is probably mediated by an increase of *de novo* lipogenesis and specifically by *scd1* up-regulation. In order to firmly confirm that *scd1* is involved in the initiation of steatosis induced by DDE, zebrafish larvae exposed to DDE were treated with an inhibitor of SCD1 activity (A939572). As illustrated in Figure 9, the SCD1 inhibitor at 5 μM significantly reduced DDE-induced lipid droplet accumulation in the liver of zebrafish even though a significant increase of steatosis score was still observed with 10 μM DDE in the presence of the inhibitor.

SCD1 catalyses the synthesis of mono-unsaturated fatty acids (MUFA) from saturated fatty acids (SFA); so it is a major regulator of membrane fluidity by controlling the MUFA/SFA ratio [100]. Because of the involvement of SCD1 in the initiation of steatosis and its role in the modification of the MUFA/SFA ratio, we investigated whether SCD1 was involved in DDE-induced membrane remodeling. We found that the SCD1 inhibitor, A939572 (5 μM), largely reduced DDE-induced membrane fluidization, thus demonstrating the involvement of SCD1 in DDE-induced membrane remodeling (Figure 9b).

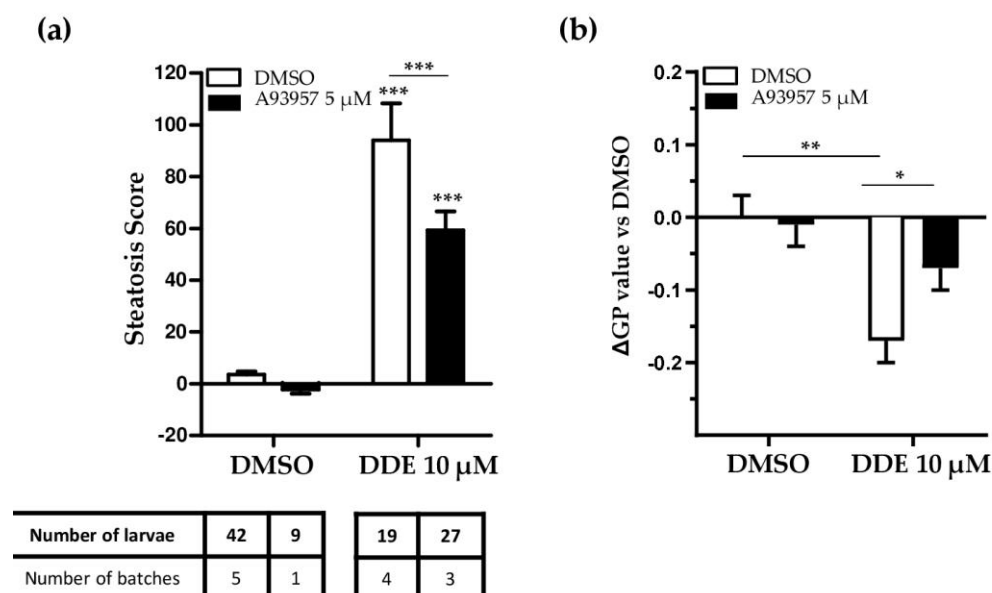


Figure 9: SCD1 inhibition decreases hepatic lipid accumulation and membrane remodeling after exposure to DDE. Zebrafish transgenic larvae at 3 days post-fertilization were co-exposed to a specific SCD1 inhibitor (A939572 5 μM) and to DDE (10 μM) during 48h. **(a)** For the steatosis score evaluation, larvae were euthanized following exposure, fixed and steatosis scores (based on lipid fluorescence intensity, lipid droplet density and area in the liver) were calculated based on Nile Red staining and image-based automated analysis after confocal microscopy acquisition. Values are mean \pm SEM; with the number of batches and larvae indicated in the table underneath the graph *** $P < 0.001$, by comparison with control group using 2-way ANOVA and Bonferroni tests. **(b)** Membrane order was assessed in liver cells of zebrafish larvae after staining with di-4-ANEPPDHQ—a membrane order-sensitive fluorescent probe—and analyzed by confocal fluorescence microscopy. Membrane order in membranes of zebrafish liver was measured by computing the generalized polarization (GP) factor. Changes in GP values (ΔGP) were expressed as the difference between individual larva GP value and the mean GP measured in control larvae (DMSO). Values are mean \pm SEM for $n \geq 3$ batches per conditions. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, by comparison with all groups using ANOVA and Newman-Keuls test

3. Discussion

The main objectives of this study were to develop an *in-vivo* bio-assay in zebrafish larvae to evaluate the capacity of chemicals, especially EDCs, to induce liver steatosis, and then to use this test to screen a panel of 10 EDCs. This allowed us to identify DDE as a

highly steatogenic molecule and we further investigated the potential mechanisms involved.

We chose to develop our assay with the zebrafish larva model as it combines advantages of *in vivo* models (integration of cell and organ interactions) while being considered an alternative to animal experimentation [42]. In order to evaluate lipid accumulation in the liver, we used an imaging approach based on staining with the lipophilic fluorescent dye, Nile red. To develop and challenge our assay, we used a set of chemicals or diet classically described to induce steatosis in rodent or human as well as in similar zebrafish models. However, in our model some of these chemicals failed to induce a significant increase of the steatosis score generated by our test (figure 2b). In fact, in our experimental conditions, amiodarone and valproate were found to be highly toxic in comparison to what was reported in literature. We were unable to reach concentration levels reported to cause steatosis (10 μM for amiodarone or from 200 to 600 μM for valproate) without excessive mortality (Supplementary Figure s5 and Table s6).

Nevertheless steatosis could be induced with a high fat diet, in line with previous works [35,88,94,95]. In this context, we decided to use our test to screen a panel of 10 selected EDCs (Figure 3). Among these, only one compound, DDE, was found to significantly increase the steatosis score and its impact was even more pronounced than that of the HFD. Of the other tested EDCs, none induced significant increases of steatosis in our assay although they have been linked to the development of steatosis in the literature. It should be noted that these prosteatogenic effects were not all described in zebrafish larva and not all through direct assessment of liver lipid content. For example, BPA was described to increase liver lipid content associated with an up-regulation of hepatic SREBP and *de novo* lipogenesis-related genes in rodent and zebrafish adult models [101,102]. But, in the same experimental conditions, BPA at a concentration of 1 μM failed to induce significant hepatic lipid accumulation in zebrafish larvae despite a similar trend, as we observed in our model [49]. Among bisphenols, exposure to BPS has been shown to induce lipid visceral accumulation; although quantification of hepatic TG is lacking [44]. To our knowledge, only the long-term effects of BPS on the development of hepatic steatosis have been performed and only on adult zebrafish [48,103]. DEHP was described to promote lipid accumulation through PPAR α /SREBP1c signalling based on *in vitro* studies [104]. Even though low doses of DEHP (5.8 nM) were shown to modulate the expression of liver genes related to FA metabolism [61], only exposure to the main DEHP metabolite, MEHP at 200 $\mu\text{g/L}$, was shown to increase liver lipid accumulation in zebrafish larvae at 120 hpf [105]. Many studies have also linked PFOS to the induction of steatosis in adult and larval zebrafish, through a decrease in mitochondrial β -oxidation, an increase in FA synthesis, or an induction of endoplasmic reticulum stress [33,70,71]. In addition, previous studies on zebrafish exposed to cadmium have shown an accumulation of hepatic TG and LD associated with increased lipogenesis and induction of oxidative stress but only in adult zebrafish and at higher concentrations than the ones tested in this study [84,106]. Overall, our results are consistent with the observations from the literature and the discrepancies can be attributed to differences of exposure doses or stages of zebrafish. This lends support to the reliability of our assay.

A reason that could explain the lack of positive readout in our assay of certain compounds would be the limited exposure time of 48h; increasing exposure time or concentrations could then accentuate lipid accumulation. However, our aim was to use zebrafish larvae as an alternative model to animal experimentation, *i.e.* before the age of 5 dpf. In addition, as the liver appears to be functional at 3 dpf, it seemed reasonable to keep an exposure window of 48h (3 to 5 dpf).

Because of the relative low sensitivity of our zebrafish larva assay, we thought to optimize the test by using a transgenic zebrafish line engineered to have a fluorescent liver. This model facilitates the acquisition of confocal images, as the liver is easily detected. In addition, the stronger blue liver fluorescence in the transgenic zebrafish improved the normalization of the Nile red fluorescence compared to that performed

based on the autofluorescence blue signal observed in the wild-type zebrafish. We tested this optimized method with positive control compounds and with DDE (Figure 4) and it globally gave better results; the steatosis score for DDE was even greater. One criticism that could be raised is that the liver blue reporter protein is expressed under the control of the *fabp10a* gene promoter, and thus, if its expression is decreased, it could give artefactual increase of the steatosis score. This was actually the case in response to DDE exposure causing both a decrease of *fabp10a* mRNA levels (Figure 6a) and of the intensity of the blue fluorescent signal (data not shown). Hence, this might explain why the steatosis score was higher for DDE in the Liblue model than in the wild-type zebrafish model. However, fluorescence of the CFP signal could also be considered as a marker of hepatotoxicity [88] and thus, it could also indicate that DDE, at 1 and 10 μM , is deleterious to the liver. In this context, the CFP signal might reflect liver integrity (quantity of hepatocytes, transcriptional and metabolic functions). Therefore, if a liver with a loss of integrity (marked by a decrease of CFP intensity) is loaded with a high quantity of lipid (higher Nile red staining), it seems reasonable to think that the chemical responsible for these effects could be both hepatotoxic and steatogenic. Taken together, the use of the Liblue model facilitates screening and, in the future, a specific analysis of the CFP signal could be integrated in the analytical processes of our test to evaluate liver toxicity at the same time as steatogenic chemical properties.

Overall, the screening of the 10 EDCs selected using our test allow us to identify one of them, DDE, as an inducer of steatosis. However, improvements are still needed to improve sensitivity. In addition, our test could also be used to screen molecules able to reduce steatosis, for example, in co-treatment with HFD. Indeed, a quite similar approach has been recently successfully developed for small-scale screening of protective molecules towards hepatic liver accumulation on zebrafish larvae between 7 to 8 dpf [104].

To get insight into the underlying mechanisms of DDE's steatogenic properties, the expression of a set of 89 genes (Figure 5 & 6) was analysed upon DDE exposure. In coherence with results on steatosis, the built heatmap (Figure 5) clearly showed an effect of DDE exposure at the concentrations of 1 and 10 μM . Focusing on the genes related to fatty acid metabolism (Figure 6a), the steatogenic effects of DDE were consistent with the up-regulation of perilipin 1 and 3 that are key structural proteins of lipid droplets [107]. Regarding the potential mechanisms of the accumulation of fatty acids into lipid droplets, the strongest positive impact of DDE exposure was on *de novo* lipogenesis-related genes, *i.e.* *me1* and *scd1* (Figure 6a). Malic enzyme *me1* is particularly interesting knowing that this enzyme is involved in fatty acid and cholesterol biosynthesis by generating a required co-factor, NADPH [108]. In addition, an association between increased ME1 gene expression and liver lipid accumulation has already been observed in different steatosis models, notably following high-fructose diet in mice [108,109]. Thus, we could hypothesize that the induction of *me1* by DDE participates in the liver lipid accumulation. This remains to be tested. Some genes usually involved in steatosis have been described to have decreased expression in our study. For example, the expression of genes encoding FA transporters (*fabp10a*, *fabp11b* and *cd36*) are decreased in our study, which may be paradoxical but considered as a compensatory mechanism to limit the entry of FA into the cell and prevent their accumulation. Similarly, the expression of *dgat1*, known to catalyse the final step of TG synthesis for storage in lipid droplets, is reduced by DDE. However, several isoforms of *dgats* exist and it is worth noting that compensation might exist between the different isoforms of *dgats* [110].

Changes of genes expression induced by HFD and DDE have been shown to considerably differ (Figure 6). In fact, as molecular pathways differ (increase of lipid uptake, decrease of lipid export, decrease of lipid oxidation...) depending on the cause of steatosis, thus, it's not surprising to observe such different profiles in gene expressions. Indeed, this is one of the reasons why we developed this test, *i.e.* to directly measure the accumulation of lipids that is the physiological characteristic of steatosis, independently

of the pathways leading to this accumulation, rather than studying this indirectly by one very specific pathway.

Regarding the up-regulation of *scd1*, it has previously been shown in other models that it can lead to NAFLD [111], especially as it is required for the synthesis of hepatic triglycerides and cholesterol esters [112]. SCD1 is an endoplasmic reticulum-bound microsomal enzyme that catalyses the formation of monounsaturated fatty acids (MUFA) from saturated fatty acids (SFA), by incorporating a double bond at the delta-9 position. Its substrates are palmitic acid (C16:0) and stearic acid (C18:0) and they are converted respectively by SCD1 to two MUFA, palmitoleic (C16:1) and oleic (C18:1) acids. Both are major elements for the synthesis of triglycerides and cholesterol esters (principal components of lipid droplets), and of phospholipids [111,112]. Thus, SCD1, a rate-limiting enzyme of these processes, is also a major regulator of membrane fluidity by controlling MUFA/SFA ratios [100].

In this study, we demonstrated that *scd1* is a key enzyme involved in the steatogenic effect of DDE as the increase in lipid accumulation by DDE was significantly reduced by *scd1* inhibition (Figure 9a). To our knowledge, this is the first time that such a mechanism has been observed concerning the steatosis induced by DDE. A large number of nutritional and hormonal factors finely regulate SCD1 expression through several transcriptional factors like SREBP-1c, LXR, PPAR- α , C/EBP- α , NF- κ B, NF- γ , AP-1, Sp1, TR and PGC1- α [113]. In addition, it has also been shown that PXR can induce SCD1 expression directly or indirectly through LXR and SREBP1 [114,115]. DDE has been reported to activate PXR [116] and accordingly we found an increase of PXR expression following DDE exposure (Figure 6c). In this context, we could hypothesize that PXR activation by DDE would be responsible for *scd1* induction in our model.

In the present study, DDE exposure significantly induced zebrafish liver cell membrane remodeling by decreasing the overall membrane order that reflects increased membrane fluidity. A link between membrane remodeling and steatosis has already been demonstrated [117–119], in particular with a spatial redistribution of membrane phospholipids in the liver. In fact, effects on the composition of phospholipids ultimately determine membrane fluidity; for this reason, the role of SCD1 is considerable in the physiology of cell membranes. The degree of fatty acid unsaturation in membrane phospholipids affects many membrane-associated functions and can be influenced by altered activities of lipid-metabolizing enzymes such as fatty acid desaturases like SCD1. Moreover, SCD1 expression affects the fatty acid composition of membrane phospholipids, triglycerides and cholesterol esters, and inhibition of *scd1* activity has already been shown to increase membrane saturation [112]. Increased desaturation of newly synthesized fatty acids increases substrate availability for synthesis of unsaturated phospholipids. Furthermore, the generated fatty acyl chains of polyunsaturated phospholipids assume a flexible and bent conformation, resulting in decreased membrane order. This might explain why inhibiting *scd1* activation significantly hampered the membrane fluidization upon DDE, as observed in Figure 8b. *Scd1* up-regulation and potential consequent changes in MUFA/SFA ratios are probably not the only mechanisms involved. Indeed, reversion of DDE-induced membrane remodeling by *scd1* inhibitor was only partial at 5 μ M (Figure 8b) and ineffective at lower concentrations able to reduce steatosis (data not shown). Inhibition of cholesterol synthesis, suggested by our gene expression analyses, could also be involved, as well as changes in ceramide and sphingolipid metabolism (Figure 6b). Further studies should be performed to determine the effect of DDE exposure on the lipid composition in the liver and particularly in hepatocyte membranes to better understand to which extent each process is involved. Finally, as membrane remodeling has been described in the pathogenesis of NAFLD [117–119], it could be interesting to precisely determine its role in the context of DDE exposure both following acute (between 3 to 5 dpf) or long-term exposures in steatosis and in its progression to NASH using known modulator of membrane remodeling. Indeed, we previously demonstrated that membrane remodeling was involved in the progression of

steatosis towards steatohepatitis upon BaP/ethanol co-exposure [99]. Still in the context of metabolic diseases, it could also be interesting to extend investigations on membrane remodeling upon DDE exposure to others tissues such as pancreas, gut or adipose tissue.

4. Conclusion

Overall, in the present study, we have developed an *in vivo* bio-assay that might be useful to screen EDCs potentially implicated in the initiation of steatosis. This steatogenic bio-assay, StAZ, enabled us to highlight the steatogenic effect of DDE. This process involves the regulation of lipid metabolism-related genes with an increase in *de novo* lipogenesis likely dependent on *scd1* activation. In addition, a new mode of action of DDE was shown with the involvement of *scd1* activation-dependent liver membrane fluidization.

5. Materials and Methods

5.1. Zebrafish Maintenance

Zebrafish (wild-type AB strain and the Liblue transgenic lines (AB-Tg(Fab10 :CFP ;cry :mRFP), ZeClinics Headquarters, Barcelona)) were handled, treated and killed in agreement with European Union regulations concerning the use and protection of experimental animals (Directive 2010/63/EU). Fertilized zebrafish embryos-collected following natural spawning—were obtained from Biosit (Rennes, France). Embryos and larvae (sex not yet established at this stage) were maintained in bath water (90 µg/ml Instant Ocean [Aquarium Systems, Sarrebourg, France], 0.58 mM CaSO₄, 416 µg/L methylene blue, dissolved in reverse-osmosis purified water) at 29°C with an 14L:10D photoperiod under static conditions.

5.2. Chemicals and larva exposure

Bisphenol A (BPA, Cat No 239658), Bisphenol S (BPS, Cat No 103039), Bisphenol F (BPF, Cat No B47006), Di(2-ethylhexyl) phtalate (DEHP , Cat No 36735), dibutylphtalate (DBP, 524980), Perfluorooctanesulfonic acid, (PFOS, Cat No 77282), Perfluorooctanoic acid (PFOA, Cat No 171468), Dichlorodiphenyldichloroethylen (DDE, Cat No 35487) Cadmium (CdCl₂, Cat No 202908), butyl-paraben (BtP, Cat No 54680), Valproic acid (Cat No P6273), Amiodarone hydrochloride (Cat No A8423), SCD1 inhibitor (A939572; SML2356) were all purchased from Sigma-Aldrich (St.Louis, MO). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD;CIL-ED-901) was purchased from LGC Standard. 1000X stock solutions of each compound were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) and stored at -20°C; final dilutions of 0.1% v/v were used.

The exposure protocol is shown in Figure 1. Briefly at 3 days post-fertilization (dpf), zebrafish eleuthero-embryo (simply called larvae hereinafter) were selected for the absence of morphological defects (edema, spinal curvature, impaired swimming). Selected larvae were then incubated in glass containers, at a density of 1 larva/ mL of medium, containing endocrine disruptors (0.001, 0.01, 0.1, 1 or 10 µM) or vehicle alone (0.1 % DMSO) directly added to the incubation medium. The toxicities of each EDC were determined upfront and concentrations used generally ranged from levels found in population (see Table 1, concentration in the nM range) to concentrations below the threshold inducing larvae mortality (Table 2). Exposures were maintained from 3 to 5 dpf. At the end of the exposure period, 5 dpf old zebrafish were processed for fluorescence image analysis to evaluate liver lipid content.

As positive controls, zebrafish were fed daily during 1h before medium renewal with a high fat diet (HFD) (HFD; dried chicken egg yolk containing around 53% of fat; Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA). Validation of the protocol to induce liver steatosis has been previously published [35,36]; of note, lipid accumulation was clearly detected as soon as 1 day of HFD.

Table 2. Evaluation of EDC toxicity on zebrafish larvae. The toxicity of each compound was evaluated in terms of mortality and morphological damage: green 0-10%, yellow 10-30%, orange 30-80%, red 100% of affected larvae. The dotted lines indicate the concentration ranges of each compound tested with the StAZ.

Mortality								Morphological damage							
ED (μM)	0,001	0,01	0,1	1	10	50	100	ED (μM)	0,001	0,01	0,1	1	10	50	100
BPA															
BPS															
BPF															
DEHP															
DBP															
PFOA															
PFOS															
DDE															
CdCl ₂															
BtPb															

5.3. Neutral Lipid Staining with Nile Red

At 5 dpf, after 48h exposure, zebrafish larvae were washed in phosphate buffered saline (PBS) and then fixed in 4% paraformaldehyde in PBS at 4 °C. A staining protocol of liver neutral lipids using Nile red was adapted from previous reports [120,121]. After washing in PBS, whole larvae were stained for 1 h with Nile red at 5 μg/mL (N3013, Sigma-Aldrich; stock solution was prepared at 100 μg/mL in acetone). The larvae were then washed twice in PBS and placed in baths of increasing glycerol concentrations (20% - 50% - 80%), before being mounted on slides with PBS 20% /glycerol 80%. Images of zebrafish larvae were acquired as described below.

5.4. Quantitative analysis of hepatic lipid fluorescence signals

To evaluate neutral lipid content, fluorescence images of zebrafish larvae stained with Nile Red were acquired with a confocal fluorescence microscope LEICA TCS SP8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). A first image—characteristic of neutral lipid fluorescence—was taken under excitation at 488 nm using an argon ion laser with a photomultiplier tube (PMT) range of 500–580 nm whereas a second image—insensitive to neutral lipids—was taken under excitation at 405 nm with a diode laser with a PMT range of 450–480 nm. Using Fiji imaging processing software (ImageJ) with three developed macros (Supplementary File s1, s2, s3), liver area is delimited by user for each larva with the first one, and then, with the two others, three parameters were calculated:

(1) Ratio: this is the value corresponding to fluorescence intensity of image A in liver area divided by the fluorescence intensity of image B in the liver area (F_{green}/F_{blue}). To use it in score calculation, this ratio is corrected and divided by the mean of same fluorescence ratio determined for the group of larvae exposed to DMSO.

$$Ratio_x = \frac{\left(\left(\frac{F_{green}}{F_{blue}} \right)_x - mean \left(\frac{F_{green}}{F_{blue}} \right)_{DMSO} \right)}{mean \left(\frac{F_{green}}{F_{blue}} \right)_{DMSO}}$$

(2) LD_dens: this is the density of lipid droplets, which correspond to the amount of lipid droplets reported to the surface of the liver.

(3) LD_area: this value is the surface occupied by lipid droplets in liver area.

Based on these three parameters, a steatosis score was calculated as follows. Each parameter was pondered by a specific coefficient. These coefficients have been set empirically in order to give a homogenous weight to each parameter in the score and to get the highest discrimination with positive and negative control (This is illustrated by the supplementary Figure S7).

$$\text{Steatosis score} = (\text{Ratio} \times 400) + (\text{LD}_{\text{dens}} \times 10000) + (\text{LD}_{\text{area}} \times 100)$$

To determine a steatosis score for each larva, images of 3 optical slices have been taken and analyzed and the mean of these 3 scores has been use as score of this larva.

5.5. Analysis of gene expression by Fluidigm Biomark HD System Technology

Gene expression levels in whole zebrafish larvae exposed to EDCs during 48h (3 to 5 dpf) were assessed using the Fluidigm BioMark HD system. Briefly, for mRNA extraction, 30 whole zebrafish larvae were pooled and homogenized in 100 μ L TRIzol reagent, and total RNA was extracted according to the manufacturer's protocol with TRIzol reagent (Gibco, Carlsbad, CA,USA). RNA samples were then reverse-transcribed and cDNAs were obtained using the Fluidigm reverse transcription Master Mix, and were then preamplified for 12 cycles in the presence of the Fluidigm Pre-Amp Master Mix. Gene expression was then measured with the Biorad EvaGreen SuperMix on a 96.96 Dynamic Array IFC. After quality control verification, mRNA expression was calculated with the $\Delta\Delta$ Ct method and normalized by using actb2, 18s and gapdh as reference. Sequences of the tested zebrafish primers and official gene names are provided in Supplementary Table s4 (information about the primer conditions is available upon request).

5.6. Membrane Order Determination by Fluorescence Staining

Plasma membrane order in zebrafish liver was assessed by confocal fluorescence microscopy using the membrane order-sensitive fluorescent probe, di-4-ANEPPDHQ (Molecular Probes, Life Technologies). This probe displays a fluorescent spectral blue-shift from 620 nm, when incorporated into lipid bilayers with a low-membrane lipid order (liquid disordered phase, Ld), to 560 nm, when inserted into lipid bilayers with a high-membrane lipid order (liquid-ordered phase, Lo). After acquisition using confocal fluorescence microscopy of both disordered and ordered-phase fluorescence images, a new image, indicative of membrane lipid order, was obtained by calculating the generalized polarization (GP) value—a ratiometric measurement of fluorescence intensities for each pixel which is associated to membrane lipid order [122]. Briefly, after EDC exposure, larvae were washed in PBS and fixed in 4% paraformaldehyde in PBS at 4 °C. After two washes in PBS, larvae were stained with 10 μ M di-4-ANEPPDHQ for 3 hours at 28°C. Larvae were then washed twice in PBS and dipped in several baths of progressively higher glycerol concentrations. After which they were mounted in 80% glycerol in PBS for observation with a LEICA TCS SP8 confocal fluorescence microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). At 488 nm excitation with an argon ion laser, ordered membrane images were acquired with a photomultiplier tube (PMT) with a range of 500–580 nm, whereas for disordered membrane images the PMT used had a range of 620–750 nm (magnification \times 400). Using Fiji imaging processing software (ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, USA) and the macro published by Owen et al. [122]. GP images were generated according to the following calculation: $GP = (I_{500-580} - I_{620-750}) / (I_{500-580} + I_{620-750})$. In order to avoid potential variations across different batches of larvae or different stainings, for each experiment—one batch of zebrafish larvae/one staining procedure—GP values were expressed as the difference (Δ GP) between individual larva GP value and the mean GP of control larvae (DMSO) within the same experiment.

5.7. Assessment of mitochondrial oxygen consumption

To evaluate the oxygen consumption rate (OCR) of mitochondria in zebrafish larvae using the Seahorse XFe24 Analyzer (Agilent Technologies), we used specific exposure conditions and adapted the protocol from Rafferty et al. [98]. Briefly, larvae of 3 dpf were exposed to toxicants for 48h (3 to 5 dpf). Following treatment, larvae were anesthetized

with 31.25 mg/L tricaine (MS-222, Sigma-Aldrich) in bath water. Larvae were then placed in 24 multi-well plate for Seahorse (1 larva/well). Larvae were fixed at the bottom of the wells with a grid insert, and the volume of bath water was adjusted to 500 μ L per well. Twenty min after anesthesia onset, larvae were placed in the Seahorse XFe24 analyzer for assessment of OCR (28°C, 1 read per cycle of 4 min) using the following phases and inhibitors: Phase 1 : 6 cycles (24 min); Phase 2 : addition of 2.5 μ M FCCP (carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone), 8 cycles (32 min); Phase 3: addition of 6.25 mM NaN₃ (sodium azide), 20 cycles (80 min). Using Wave software (version 2.6.0, Agilent Technologies), OCR levels were analyzed in order to obtain basal, maximal, and spare mitochondrial and non-mitochondrial respiration levels with at least 4 larvae per condition.

5.8. Statistical analyses

All values were presented as mean \pm SEM (standard error of the mean) from at least three independent experiments except for the StAZ bioassay for which, the number of larvae and independent batches are detailed in the figure legends. Multiple comparisons among groups were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Dunnett's post-test/Newman-Keuls post-test, or using a Kruskal-Wallis test followed by a Dunns post-test using GraphPad Prism8 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Differences were considered significant when $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***)

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: www.mdpi.com/xxx/s1,

- Supplementary File s1: Word file containing the first analysis macro in text format for the calculation of the steatosis score;
- Supplementary File s2: Word file containing the second analysis macro in text format for the calculation of the steatosis score;
- Supplementary File s3: Word file containing the third analysis macro in text format for the calculation of the steatosis score;
- Supplementary Table s4: Excel file containing sequences of the primers used in RT-qPCR;
- Supplementary Figure s5: Drug-induced dose-related zebrafish mortality;
- Supplementary File Table s6: Selected chemical treatment studies in zebrafish.
- Supplementary Figure s7: Comparison of parameters for steatosis score

Author Contributions: Conception and Methodology of the study (H.L.M; D.L-G ;N.P); Acquisition of data (H.L.M ; E.M ; A.L ; C.M); Analysis and interpretation of data (H.L.M ; E.M ;N.P); Drafting the article or revising it critically for important intellectual content (H.L.M ; D.L-G ;N.P); Software (ImageJ Macro conception : H.L.M; N.P); Funding Acquisition (D.L-G ;N.P)

Funding: This work is integrated in the OBERON project which is a collaborative project funded by the EU Framework Programme for Research and Innovation Action (RIA), Horizon 2020, under grant agreement no 825712. H.L.M is a recipient of a fellowship from the Région Bretagne (ARED), and is also financially supported by the Oberon project.

Institutional Review Board Statement: "Not applicable".

Informed Consent Statement: "Not applicable".

Data Availability Statement: “Not applicable”

Acknowledgments: We first wish to thank BIOSIT (UMS BIOSIT, Rennes, France), notably Marie-Madeleine Gueguen, for providing zebrafish eggs. We are also very grateful to MRiC platforms (UMS BIOSIT, Rennes, France), notably Stéphanie Dutertre and Xavier Pinson (MRiC) for their help with confocal mi-croscopic imagery. We would also like to thank Karin Tarte (UMR U1236-MICMAC, Rennes, France) for access to the Fluidigm Biomark HD System Technology. As well, we are grateful to Catherine Lavau for her help on English editing process

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest with the contents of this article

References

1. Younossi Non-Alcoholic Fatty Liver Disease – A Global Public Health Perspective. *J. Hepatol.* **2019**, *70*, 531–544, doi:10.1016/j.jhep.2018.10.033.
2. Fazel, Y.; Koenig, A.B.; Sayiner, M.; Goodman, Z.D.; Younossi, Z.M. Epidemiology and Natural History of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Metabolism* **2016**, *65*, 1017–1025, doi:10.1016/j.metabol.2016.01.012.
3. Hardy, T.; Oakley, F.; Anstee, Q.M.; Day, C.P. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathogenesis and Disease Spectrum. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2016**, *11*, 451–496, doi:10.1146/annurev-pathol-012615-044224.
4. Polyzos, S.A.; Mantzoros, C.S. Nonalcoholic Fatty Future Disease. *Metabolism* **2016**, *65*, 1007–1016, doi:10.1016/j.metabol.2015.12.009.
5. Younossi, Z.; Anstee, Q.M.; Marietti, M.; Hardy, T.; Henry, L.; Eslam, M.; George, J.; Bugianesi, E. Global Burden of NAFLD and NASH: Trends, Predictions, Risk Factors and Prevention. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *15*, 11–20, doi:10.1038/nrgastro.2017.109.
6. Joshi-Barve, S.; Kirpich, I.; Cave, M.C.; Marsano, L.S.; McClain, C.J. Alcoholic, Nonalcoholic, and Toxicant-Associated Steatohepatitis: Mechanistic Similarities and Differences. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **2015**, *1*, 356–367, doi:10.1016/j.jcmgh.2015.05.006.
7. Wahlang, B.; Beier, J.I.; Clair, H.B.; Bellis-Jones, H.J.; Falkner, K.C.; McClain, C.J.; Cave, M.C. Toxicant-Associated Steatohepatitis. *Toxicol. Pathol.* **2013**, *41*, 343–360, doi:10.1177/0192623312468517.
8. Wahlang, B.; Jin, J.; Beier, J.I.; Hardesty, J.E.; Daly, E.F.; Schneggelberger, R.D.; Falkner, K.C.; Prough, R.A.; Kirpich, I.A.; Cave, M.C. Mechanisms of Environmental Contributions to Fatty Liver Disease. *Curr. Environ. Health Rep.* **2019**, doi:10.1007/s40572-019-00232-w.
9. Heindel, J.J.; Blumberg, B.; Cave, M.; Machtinger, R.; Mantovani, A.; Mendez, M.A.; Nadal, A.; Palanza, P.; Panzica, G.; Sargis, R.; et al. Metabolism Disrupting Chemicals and Metabolic Disorders. *Reprod. Toxicol.* **2017**, *68*, 3–33, doi:10.1016/j.reprotox.2016.10.001.
10. Foulds, C.E.; Treviño, L.S.; York, B.; Walker, C.L. Endocrine-Disrupting Chemicals and Fatty Liver Disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2017**, *13*, 445–457, doi:10.1038/nrendo.2017.42.
11. Bernal, K.; Touma, C.; Erradhouani, C.; Boronat-Belda, T.; Gaillard, L.; Al Kassir, S.; Le Mentec, H.; Martin-Chouly, C.; Podechard, N.; Lagadic-Gossmann, D.; et al. Combinatorial Pathway Disruption Is a Powerful Approach to Delineate Metabolic Impacts of Endocrine Disruptors. *FEBS Lett.* *n/a*, doi:10.1002/1873-3468.14465.
12. Heindel, J.J.; Howard, S.; Agay-Shay, K.; Arrebola, J.P.; Audouze, K.; Babin, P.J.; Barouki, R.; Bansal, A.; Blanc, E.; Cave, M.C.; et al. Obesity II: Establishing Causal Links between Chemical Exposures and Obesity. *Biochem. Pharmacol.* **2022**, *199*, 115015, doi:10.1016/j.bcp.2022.115015.
13. Kassotis, C.D.; vom Saal, F.S.; Babin, P.J.; Lagadic-Gossmann, D.; Le Mentec, H.; Blumberg, B.; Mohajer, N.; Legrand, A.; Munic Kos, V.; Martin-Chouly, C.; et al. Obesity III: Obesogen Assays: Limitations, Strengths, and New Directions. *Biochem. Pharmacol.* **2022**, *199*, 115014, doi:10.1016/j.bcp.2022.115014.

14. Imprégnation de la population française par les bisphénols A, S et F. Programme national de. 58. 797
15. Cave, M.C.; Clair, H.B.; Hardesty, J.E.; Falkner, K.C.; Feng, W.; Clark, B.J.; Sidey, J.; Shi, H.; Aqel, B.A.; McClain, C.J.; et al. Nuclear Receptors and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1859*, 1083–1099, doi:10.1016/j.bbagr.2016.03.002. 798
800
16. Deierlein, A.L.; Rock, S.; Park, S. Persistent Endocrine-Disrupting Chemicals and Fatty Liver Disease. *Curr. Environ. Health Rep.* **2017**, *4*, 439–449, doi:10.1007/s40572-017-0166-8. 801
802
17. Al-Eryani, L.; Wahlang, B.; Falkner, K.C.; Guardiola, J.J.; Clair, H.B.; Prough, R.A.; Cave, M. Identification of Environmental Chemicals Associated with the Development of Toxicant-Associated Fatty Liver Disease in Rodents. *Toxicol. Pathol.* **2015**, *43*, 482–497, doi:10.1177/0192623314549960. 803
804
805
18. Marmugi, A.; Ducheix, S.; Lasserre, F.; Polizzi, A.; Paris, A.; Priymenko, N.; Bertrand-Michel, J.; Pineau, T.; Guillou, H.; Martin, P.G.P.; et al. Low Doses of Bisphenol a Induce Gene Expression Related to Lipid Synthesis and Trigger Triglyceride Accumulation in Adult Mouse Liver. *Hepatology* **2012**, *55*, 395–407, doi:10.1002/hep.24685. 806
807
808
19. Revised Guidance Document 150 on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption | En | OECD Available online: <https://www-oecd-org.passerelle.univ-rennes1.fr/chemicalsafety/guidance-document-on-standardised-test-guidelines-for-evaluating-chemicals-for-endocrine-disruption-2nd-edition-9789264304741-en.htm> (accessed on 11 October 2022). 809
810
811
812
20. Chu, J.; Sadler, K.C. New School in Liver Development: Lessons from Zebrafish. *Hepatology* **2009**, *50*, 1656–1663, doi:10.1002/hep.23157. 813
814
21. Goessling, W.; Sadler, K.C. Zebrafish: An Important Tool for Liver Disease Research. *Gastroenterology* **2015**, *149*, 1361–1377, doi:10.1053/j.gastro.2015.08.034. 815
816
22. Pham, D.-H.; Zhang, C.; Yin, C. Using Zebrafish to Model Liver Diseases-Where Do We Stand? *Curr. Pathobiol. Rep.* **2017**, *5*, 207–221, doi:10.1007/s40139-017-0141-y. 817
818
23. Schlegel, A. Studying Non-Alcoholic Fatty Liver Disease with Zebrafish: A Confluence of Optics, Genetics, and Physiology. *Cell. Mol. Life Sci.* **2012**, *69*, 3953–3961, doi:10.1007/s00018-012-1037-y. 819
820
24. Driessen, M.; Kienhuis, A.S.; Pennings, J.L.A.; Pronk, T.E.; van de Brandhof, E.-J.; Roodbergen, M.; Spaink, H.P.; van de Water, B.; van der Ven, L.T.M. Exploring the Zebrafish Embryo as an Alternative Model for the Evaluation of Liver Toxicity by Histopathology and Expression Profiling. *Arch. Toxicol.* **2013**, *87*, 807–823, doi:10.1007/s00204-013-1039-z. 821
822
823
824
25. Driessen, M.; Kienhuis, A.S.; Vitins, A.P.; Pennings, J.L.A.; Pronk, T.E.; Brandhof, E.-J. van den; Roodbergen, M.; Water, B. van de; Ven, L.T.M. van der Gene Expression Markers in the Zebrafish Embryo Reflect a Hepatotoxic Response in Animal Models and Humans. *Toxicol. Lett.* **2014**, *230*, 48–56, doi:10.1016/j.toxlet.2014.06.844. 825
826
827
26. Driessen, M.; Vitins, A.P.; Pennings, J.L.A.; Kienhuis, A.S.; Water, B. van de; van der Ven, L.T.M. A Transcriptomics-Based Hepatotoxicity Comparison between the Zebrafish Embryo and Established Human and Rodent in Vitro and in Vivo Models Using Cyclosporine A, Amiodarone and Acetaminophen. *Toxicol. Lett.* **2015**, *232*, 403–412, doi:10.1016/j.toxlet.2014.11.020. 828
829
830
831
27. Goldstone, J.V.; McArthur, A.G.; Kubota, A.; Zanette, J.; Parente, T.; Jönsson, M.E.; Nelson, D.R.; Stegeman, J.J. Identification and Developmental Expression of the Full Complement of Cytochrome P450 Genes in Zebrafish. *BMC Genomics* **2010**, *11*, 643, doi:10.1186/1471-2164-11-643. 832
833
834
28. Podechard, N.; Chevanne, M.; Fernier, M.; Tête, A.; Collin, A.; Cassio, D.; Kah, O.; Lagadic-Gossmann, D.; Sergent, O. Zebrafish Larva as a Reliable Model for in Vivo Assessment of Membrane Remodeling Involvement in the Hepatotoxicity of Chemical Agents. *J. Appl. Toxicol.* **2017**, *37*, 732–746, doi:10.1002/jat.3421. 835
836
837

29. Howe, K.; Clark, M.D.; Torroja, C.F.; Torrance, J.; Berthelot, C.; Muffato, M.; Collins, J.E.; Humphray, S.; McLaren, K.; Matthews, L.; et al. The Zebrafish Reference Genome Sequence and Its Relationship to the Human Genome. *Nature* **2013**, *496*, 498, doi:10.1038/nature12111. 838-840
30. Schaaf, M.J.M. Nuclear Receptor Research in Zebrafish. *J. Mol. Endocrinol.* **2017**, *59*, R65–R76, doi:10.1530/JME-17-0031. 841-842
31. Sapp, V.; Gaffney, L.; EauClaire, S.F.; Matthews, R.P. Fructose Leads to Hepatic Steatosis in Zebrafish That Is Reversed by Mechanistic Target of Rapamycin (MTOR) Inhibition. *Hepatol. Baltim. Md* **2014**, *60*, 1581–1592, doi:10.1002/hep.27284. 843-845
32. Amali, A.A.; Rekha, R.D.; Lin, C.J.-F.; Wang, W.-L.; Gong, H.-Y.; Her, G.-M.; Wu, J.-L. Thioacetamide Induced Liver Damage in Zebrafish Embryo as a Disease Model for Steatohepatitis. *J. Biomed. Sci.* **2006**, *13*, 225–232, doi:10.1007/s11373-005-9055-5. 846-848
33. Fai Tse, W.K.; Li, J.W.; Kwan Tse, A.C.; Chan, T.F.; Hin Ho, J.C.; Sun Wu, R.S.; Chu Wong, C.K.; Lai, K.P. Fatty Liver Disease Induced by Perfluorooctane Sulfonate: Novel Insight from Transcriptome Analysis. *Chemosphere* **2016**, *159*, 166–177, doi:10.1016/j.chemosphere.2016.05.060. 849-851
34. Ma, J.; Yin, H.; Li, M.; Deng, Y.; Ahmad, O.; Qin, G.; He, Q.; Li, J.; Gao, K.; Zhu, J.; et al. A Comprehensive Study of High Cholesterol Diet-Induced Larval Zebrafish Model: A Short-Time *In Vivo* Screening Method for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Drugs. *Int. J. Biol. Sci.* **2019**, *15*, 973–983, doi:10.7150/ijbs.30013. 852-854
35. Bucher, S.; Tête, A.; Podechard, N.; Liamin, M.; Le Guillou, D.; Chevanne, M.; Coulouarn, C.; Imran, M.; Gallais, I.; Fernier, M.; et al. Co-Exposure to Benzo[a]Pyrene and Ethanol Induces a Pathological Progression of Liver Steatosis *In Vitro* and *In Vivo*. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, doi:10.1038/s41598-018-24403-1. 855-857
36. Imran, M.; Chalmel, F.; Sergent, O.; Evrard, B.; Le Mentec, H.; Legrand, A.; Dupont, A.; Bescher, M.; Bucher, S.; Fromenty, B.; et al. Transcriptomic Analysis in Zebrafish Larvae Identifies Iron-Dependent Mitochondrial Dysfunction as a Possible Key Event of NAFLD Progression Induced by Benzo[a]Pyrene/Ethanol Co-Exposure. *Cell Biol. Toxicol.* **2022**, doi:10.1007/s10565-022-09706-4. 858-861
37. Vliegenthart, A.D.B.; Tucker, C.S.; Del Pozo, J.; Dear, J.W. Zebrafish as Model Organisms for Studying Drug-Induced Liver Injury. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2014**, *78*, 1217–1227, doi:10.1111/bcp.12408. 862-863
38. Saydmohammed, M.; Tsang, M. High-Throughput Automated Chemical Screens in Zebrafish. In *High Content Screening: A Powerful Approach to Systems Cell Biology and Phenotypic Drug Discovery*; Johnston, P.A., Trask, O.J., Eds.; Methods in Molecular Biology; Springer: New York, NY, 2018; pp. 383–393 ISBN 978-1-4939-7357-6. 864-866
39. Hölttä-Vuori, M.; Salo, V.T.V.; Nyberg, L.; Brackmann, C.; Enejder, A.; Panula, P.; Ikonen, E. Zebrafish: Gaining Popularity in Lipid Research. *Biochem. J.* **2010**, *429*, 235–242, doi:10.1042/BJ20100293. 867-868
40. Lyssimachou, A.; Santos, J.G.; André, A.; Soares, J.; Lima, D.; Guimarães, L.; Almeida, C.M.R.; Teixeira, C.; Castro, L.F.C.; Santos, M.M. The Mammalian “Obesogen” Tributyltin Targets Hepatic Triglyceride Accumulation and the Transcriptional Regulation of Lipid Metabolism in the Liver and Brain of Zebrafish. *PLOS ONE* **2015**, *10*, e0143911, doi:10.1371/journal.pone.0143911. 869-872
41. Zhang, J.; Sun, P.; Kong, T.; Yang, F.; Guan, W. Tributyltin Promoted Hepatic Steatosis in Zebrafish (*Danio Rerio*) and the Molecular Pathogenesis Involved. *Aquat. Toxicol.* **2016**, *170*, 208–215, doi:10.1016/j.aquatox.2015.11.028. 873-874
42. Strähle, U.; Scholz, S.; Geisler, R.; Greiner, P.; Hollert, H.; Rastegar, S.; Schumacher, A.; Selderslaghs, I.; Weiss, C.; Witters, H.; et al. Zebrafish Embryos as an Alternative to Animal Experiments—A Commentary on the Definition of the Onset of Protected Life Stages in Animal Welfare Regulations. *Reprod. Toxicol.* **2012**, *33*, 128–132, doi:10.1016/j.reprotox.2011.06.121. 875-878

43. Biosurveillance Esteban Available online: 879
<https://www.santepubliquefrance.fr/recherche/#search=biosurveillance%20esteban&publications=rapport,%20synth%C3%A8se&sort=date> (accessed on 21 January 2023). 880
881
44. Wang, W.; Zhang, X.; Wang, Z.; Qin, J.; Wang, W.; Tian, H.; Ru, S. Bisphenol S Induces Obesogenic Effects through Deregulating Lipid Metabolism in Zebrafish (*Danio Rerio*) Larvae. *Chemosphere* **2018**, *199*, 286–296, doi:10.1016/j.chemosphere.2018.01.163. 882
883
884
45. Anastasiou, I.A.; Eleftheriadou, I.; Tentolouris, A.; Sarantis, P.; Angelopoulou, A.; Katsaouni, A.; Mourouzis, I.; Karamouzis, M.V.; Gorgoulis, V.; Pantos, C.; et al. Low Concentrations of Bisphenol A Promote the Activation of the Mitochondrial Apoptotic Pathway on Beta-TC-6 Cells via the Generation of Intracellular Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Superoxide. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2022**, *36*, e23099, doi:10.1002/jbt.23099. 885
886
887
888
46. Wang, J.; Yu, P.; Xie, X.; Wu, L.; Zhou, M.; Huan, F.; Jiang, L.; Gao, R. Bisphenol F Induces Nonalcoholic Fatty Liver Disease-like Changes: Involvement of Lysosome Disorder in Lipid Droplet Deposition. *Environ. Pollut.* **2021**, *271*, 116304, doi:10.1016/j.envpol.2020.116304. 889
890
891
47. Qiu, W.; Liu, S.; Yang, F.; Dong, P.; Yang, M.; Wong, M.; Zheng, C. Metabolism Disruption Analysis of Zebrafish Larvae in Response to BPA and BPA Analogs Based on RNA-Seq Technique. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2019**, *174*, 181–188, doi:10.1016/j.ecoenv.2019.01.126. 892
893
894
48. Qin, J.; Ru, S.; Wang, W.; Hao, L.; Ru, Y.; Wang, J.; Zhang, X. Long-Term Bisphenol S Exposure Aggravates Non-Alcoholic Fatty Liver by Regulating Lipid Metabolism and Inducing Endoplasmic Reticulum Stress Response with Activation of Unfolded Protein Response in Male Zebrafish. *Environ. Pollut.* **2020**, *263*, 114535, doi:10.1016/j.envpol.2020.114535. 895
896
897
898
49. Sun, L.; Ling, Y.; Jiang, J.; Wang, D.; Wang, J.; Li, J.; Wang, X.; Wang, H. Differential Mechanisms Regarding Triclosan vs. Bisphenol A and Fluorene-9-Bisphenol Induced Zebrafish Lipid-Metabolism Disorders by RNA-Seq. *Chemosphere* **2020**, *251*, 126318, doi:10.1016/j.chemosphere.2020.126318. 899
900
901
50. Wei, J.; Sun, X.; Chen, Y.; Li, Y.; Song, L.; Zhou, Z.; Xu, B.; Lin, Y.; Xu, S. Perinatal Exposure to Bisphenol A Exacerbates Nonalcoholic Steatohepatitis-like Phenotype in Male Rat Offspring Fed on a High-Fat Diet. *J. Endocrinol.* **2014**, *222*, 313–325, doi:10.1530/JOE-14-0356. 902
903
904
51. Huc, L.; Lemarié, A.; Guéraud, F.; Héliers-Toussaint, C. Low Concentrations of Bisphenol A Induce Lipid Accumulation Mediated by the Production of Reactive Oxygen Species in the Mitochondria of HepG2 Cells. *Toxicol. In Vitro* **2012**, *26*, 709–717, doi:10.1016/j.tiv.2012.03.017. 905
906
907
52. Lv, Q.; Gao, R.; Peng, C.; Yi, J.; Liu, L.; Yang, S.; Li, D.; Hu, J.; Luo, T.; Mei, M.; et al. Bisphenol A Promotes Hepatic Lipid Deposition Involving Kupffer Cells M1 Polarization in Male Mice. *J. Endocrinol.* **2017**, *234*, 143–154, doi:10.1530/JOE-17-0028. 908
909
910
53. Jiang, Y.; Xia, W.; Zhu, Y.; Li, X.; Wang, D.; Liu, J.; Chang, H.; Li, G.; Xu, B.; Chen, X.; et al. Mitochondrial Dysfunction in Early Life Resulted from Perinatal Bisphenol A Exposure Contributes to Hepatic Steatosis in Rat Offspring. *Toxicol. Lett.* **2014**, *228*, 85–92, doi:10.1016/j.toxlet.2014.04.013. 911
912
913
54. Azevedo, L.F.; Porto Dechandt, C.R.; Cristina de Souza Rocha, C.; Hornos Carneiro, M.F.; Alberici, L.C.; Barbosa, F. Long-Term Exposure to Bisphenol A or S Promotes Glucose Intolerance and Changes Hepatic Mitochondrial Metabolism in Male Wistar Rats. *Food Chem. Toxicol.* **2019**, *132*, 110694, doi:10.1016/j.fct.2019.110694. 914
915
916
55. Khan, S.; Beigh, S.; Chaudhari, B.P.; Sharma, S.; Aliul Hasan Abdi, S.; Ahmad, S.; Ahmad, F.; Parvez, S.; Raisuddin, S. Mitochondrial Dysfunction Induced by Bisphenol A Is a Factor of Its Hepatotoxicity in Rats. *Environ. Toxicol.* **2016**, *31*, 1922–1934, doi:10.1002/tox.22193. 917
918
919

56. Klötting, N.; Hesselbarth, N.; Gericke, M.; Kunath, A.; Biemann, R.; Chakaroun, R.; Kosacka, J.; Kovacs, P.; Kern, M.; Stumvoll, M.; et al. Di-(2-Ethylhexyl)-Phthalate (DEHP) Causes Impaired Adipocyte Function and Alters Serum Metabolites. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0143190, doi:10.1371/journal.pone.0143190. 920-922
57. She, Y.; Jiang, L.; Zheng, L.; Zuo, H.; Chen, M.; Sun, X.; Li, Q.; Geng, C.; Yang, G.; Jiang, L.; et al. The Role of Oxidative Stress in DNA Damage in Pancreatic β Cells Induced by Di-(2-Ethylhexyl) Phthalate. *Chem. Biol. Interact.* **2017**, *265*, 8–15, doi:10.1016/j.cbi.2017.01.015. 923-925
58. Ito, Y.; Kamijima, M.; Nakajima, T. Di(2-Ethylhexyl) Phthalate-Induced Toxicity and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha: A Review. *Environ. Health Prev. Med.* **2019**, *24*, 47, doi:10.1186/s12199-019-0802-z. 926-927
59. Chen, H.; Zhang, W.; Rui, B.; Yang, S.; Xu, W.; Wei, W. Di(2-Ethylhexyl) Phthalate Exacerbates Non-Alcoholic Fatty Liver in Rats and Its Potential Mechanisms. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2016**, *42*, 38–44, doi:10.1016/j.etap.2015.12.016. 928-930
60. Zhang, W.; Shen, X. -yue; Zhang, W.; Chen, H.; Xu, W.; Wei, W. Di-(2-Ethylhexyl) Phthalate Could Disrupt the Insulin Signaling Pathway in Liver of SD Rats and L02 Cells via PPAR γ . *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2017**, *316*, 17–26, doi:10.1016/j.taap.2016.12.010. 931-933
61. Huff, M.; da Silveira, W.A.; Carnevali, O.; Renaud, L.; Hardiman, G. Systems Analysis of the Liver Transcriptome in Adult Male Zebrafish Exposed to the Plasticizer (2-Ethylhexyl) Phthalate (DEHP). *Sci. Rep.* **2018**, *8*, doi:10.1038/s41598-018-20266-8. 934-936
62. Zhang, W.; Li, J.; Wei, X.; Wang, Q.; Yang, J.; Hou, H.; Du, Z.; Wu, X. Effects of Dibutyl Phthalate on Lipid Metabolism in Liver and Hepatocytes Based on PPAR α /SREBP-1c/FAS/GPAT/AMPK Signal Pathway. *Food Chem. Toxicol.* **2021**, *149*, 112029, doi:10.1016/j.fct.2021.112029. 937-939
63. Lv, Z.; Li, G.; Li, Y.; Ying, C.; Chen, J.; Chen, T.; Wei, J.; Lin, Y.; Jiang, Y.; Wang, Y.; et al. Glucose and Lipid Homeostasis in Adult Rat Is Impaired by Early-Life Exposure to Perfluorooctane Sulfonate. *Environ. Toxicol.* **2013**, *28*, 532–542, doi:10.1002/tox.20747. 940-942
64. Du, Y.; Shi, X.; Liu, C.; Yu, K.; Zhou, B. Chronic Effects of Water-Borne PFOS Exposure on Growth, Survival and Hepatotoxicity in Zebrafish: A Partial Life-Cycle Test. *Chemosphere* **2009**, *74*, 723–729, doi:10.1016/j.chemosphere.2008.09.075. 943-945
65. Yan, S.; Wang, J.; Dai, J. Activation of Sterol Regulatory Element-Binding Proteins in Mice Exposed to Perfluorooctanoic Acid for 28 Days. *Arch. Toxicol.* **2015**, *89*, 1569–1578, doi:10.1007/s00204-014-1322-7. 946-947
66. Rosen, M.B.; Abbott, B.D.; Wolf, D.C.; Corton, J.C.; Wood, C.R.; Schmid, J.E.; Das, K.P.; Zehr, R.D.; Blair, E.T.; Lau, C. Gene Profiling in the Livers of Wild-Type and PPAR α -Null Mice Exposed to Perfluorooctanoic Acid. *Toxicol. Pathol.* **2008**, *36*, 592–607, doi:10.1177/0192623308318208. 948-950
67. Rosen, M.B.; Schmid, J.E.; Das, K.P.; Wood, C.R.; Zehr, R.D.; Lau, C. Gene Expression Profiling in the Liver and Lung of Perfluorooctane Sulfonate-Exposed Mouse Fetuses: Comparison to Changes Induced by Exposure to Perfluorooctanoic Acid. *Reprod. Toxicol.* **2009**, *27*, 278–288, doi:10.1016/j.reprotox.2009.01.007. 951-953
68. Wan, H.T.; Zhao, Y.G.; Wei, X.; Hui, K.Y.; Giesy, J.P.; Wong, C.K.C. PFOS-Induced Hepatic Steatosis, the Mechanistic Actions on β -Oxidation and Lipid Transport. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **2012**, *1820*, 1092–1101, doi:10.1016/j.bbagen.2012.03.010. 954-956
69. Wang, L.; Wang, Y.; Liang, Y.; Li, J.; Liu, Y.; Zhang, J.; Zhang, A.; Fu, J.; Jiang, G. PFOS Induced Lipid Metabolism Disturbances in BALB/c Mice through Inhibition of Low Density Lipoproteins Excretion. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 4582, doi:10.1038/srep04582. 957-959

70. Cheng, J.; Lv, S.; Nie, S.; Liu, J.; Tong, S.; Kang, N.; Xiao, Y.; Dong, Q.; Huang, C.; Yang, D. Chronic Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) Exposure Induces Hepatic Steatosis in Zebrafish. *Aquat. Toxicol.* **2016**, *176*, 45–52, doi:10.1016/j.aquatox.2016.04.013. 960
961
962
71. Yi, S.; Chen, P.; Yang, L.; Zhu, L. Probing the Hepatotoxicity Mechanisms of Novel Chlorinated Polyfluoroalkyl Sulfonates to Zebrafish Larvae: Implication of Structural Specificity. *Environ. Int.* **2019**, *133*, 105262, doi:10.1016/j.envint.2019.105262. 963
964
965
72. Hagenaaers, A.; Vergauwen, L.; Benoot, D.; Laukens, K.; Knapen, D. Mechanistic Toxicity Study of Perfluorooctanoic Acid in Zebrafish Suggests Mitochondrial Dysfunction to Play a Key Role in PFOA Toxicity. *Chemosphere* **2013**, *91*, 844–856, doi:10.1016/j.chemosphere.2013.01.056. 966
967
968
73. Quist, E.M.; Filgo, A.J.; Cummings, C.A.; Kissling, G.E.; Hoenerhoff, M.J.; Fenton, S.E. Hepatic Mitochondrial Alteration in CD-1 Mice Associated with Prenatal Exposures to Low Doses of Perfluorooctanoic Acid (PFOA). *Toxicol. Pathol.* **2015**, *43*, 546–557, doi:10.1177/0192623314551841. 969
970
971
74. Cano-Sancho, G.; Salmon, A.G.; La Merrill, M.A. Association between Exposure to *p,p'*-DDT and Its Metabolite *p,p'*-DDE with Obesity: Integrated Systematic Review and Meta-Analysis. *Environ. Health Perspect.* **2017**, *125*, 096002, doi:10.1289/EHP527. 972
973
974
75. Pestana, D.; Teixeira, D.; Meireles, M.; Marques, C.; Norberto, S.; Sá, C.; Fernandes, V.C.; Correia-Sá, L.; Faria, A.; Guardão, L.; et al. Adipose Tissue Dysfunction as a Central Mechanism Leading to Dysmetabolic Obesity Triggered by Chronic Exposure to *p,p'*-DDE. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 2738, doi:10.1038/s41598-017-02885-9. 975
976
977
76. Rodríguez-Alcalá, L.M.; Sá, C.; Pimentel, L.L.; Pestana, D.; Teixeira, D.; Faria, A.; Calhau, C.; Gomes, A. Endocrine Disruptor DDE Associated with a High-Fat Diet Enhances the Impairment of Liver Fatty Acid Composition in Rats. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 9341–9348, doi:10.1021/acs.jafc.5b03274. 978
979
980
77. Morales-Prieto, N.; Ruiz-Laguna, J.; Sheehan, D.; Abril, N. Transcriptome Signatures of *p,p'*-DDE-Induced Liver Damage in *Mus Spretus* Mice. *Environ. Pollut.* **2018**, *238*, 150–167, doi:10.1016/j.envpol.2018.03.005. 981
982
78. Elmore, S.E.; La Merrill, M.A. Oxidative Phosphorylation Impairment by DDT and DDE. *Front. Endocrinol.* **2019**, *10*, 122, doi:10.3389/fendo.2019.00122. 983
984
79. Liu, Q.; Wang, Q.; Xu, C.; Shao, W.; Zhang, C.; Liu, H.; Jiang, Z.; Gu, A. Organochloride Pesticides Impaired Mitochondrial Function in Hepatocytes and Aggravated Disorders of Fatty Acid Metabolism. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 46339, doi:10.1038/srep46339. 985
986
987
80. Migliaccio, V.; Scudiero, R.; Sica, R.; Lionetti, L.; Putti, R. Oxidative Stress and Mitochondrial Uncoupling Protein 2 Expression in Hepatic Steatosis Induced by Exposure to Xenobiotic DDE and High Fat Diet in Male Wistar Rats. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0215955, doi:10.1371/journal.pone.0215955. 988
989
990
81. Green, A.J.; Hoyo, C.; Mattingly, C.J.; Luo, Y.; Tzeng, J.-Y.; Murphy, S.K.; Buchwalter, D.B.; Planchart, A. Cadmium Exposure Increases the Risk of Juvenile Obesity: A Human and Zebrafish Comparative Study. *Int. J. Obes.* **2018**, *42*, 1285–1295, doi:10.1038/s41366-018-0036-y. 991
992
993
82. Buha, A.; Đukić-Čosić, D.; Čurčić, M.; Bulat, Z.; Antonijević, B.; Moulis, J.-M.; Goumenou, M.; Wallace, D. Emerging Links between Cadmium Exposure and Insulin Resistance: Human, Animal, and Cell Study Data. *Toxics* **2020**, *8*, 63, doi:10.3390/toxics8030063. 994
995
996
83. Kim, J.-Y.; Kim, S.-J.; Bae, M.A.; Kim, J.-R.; Cho, K.-H. Cadmium Exposure Exacerbates Severe Hyperlipidemia and Fatty Liver Changes in Zebrafish via Impairment of High-Density Lipoproteins Functionality. *Toxicol. In Vitro* **2018**, *47*, 249–258, doi:10.1016/j.tiv.2017.11.007. 997
998
999

84. Pan, Y.-X.; Luo, Z.; Zhuo, M.-Q.; Wei, C.-C.; Chen, G.-H.; Song, Y.-F. Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction Mediated Cd-Induced Hepatic Lipid Accumulation in Zebrafish *Danio Rerio*. *Aquat. Toxicol.* **2018**, *199*, 12–20, doi:10.1016/j.aquatox.2018.03.017. 1000–1002
85. He, X.; Gao, J.; Hou, H.; Qi, Z.; Chen, H.; Zhang, X.-X. Inhibition of Mitochondrial Fatty Acid Oxidation Contributes to Development of Nonalcoholic Fatty Liver Disease Induced by Environmental Cadmium Exposure. *Environ. Sci. Technol.* **2019**, *53*, 13992–14000, doi:10.1021/acs.est.9b05131. 1003–1005
86. Rosales-Cruz, P.; Domínguez-Pérez, M.; Reyes-Zárate, E.; Bello-Monroy, O.; Enríquez-Cortina, C.; Miranda-Labra, R.; Bucio, L.; Gómez-Quiroz, L.E.; Rojas-Del Castillo, E.; Gutiérrez-Ruíz, M.C.; et al. Cadmium Exposure Exacerbates Hyperlipidemia in Cholesterol-Overloaded Hepatocytes via Autophagy Dysregulation. *Toxicology* **2018**, *398–399*, 41–51, doi:10.1016/j.tox.2018.02.007. 1006–1009
87. Cano, R.; Pérez, J.L.; Dávila, L.A.; Ortega, Á.; Gómez, Y.; Valero-Cedeño, N.J.; Parra, H.; Manzano, A.; Véliz Castro, T.I.; Albornoz, M.P.D.; et al. Role of Endocrine-Disrupting Chemicals in the Pathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Comprehensive Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 4807, doi:10.3390/ijms22094807. 1010–1012
88. Zhang, X.; Li, C.; Gong, Z. Development of a Convenient In Vivo Hepatotoxin Assay Using a Transgenic Zebrafish Line with Liver-Specific DsRed Expression. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e91874, doi:10.1371/journal.pone.0091874. 1013–1014
89. He, J.-H.; Guo, S.-Y.; Zhu, F.; Zhu, J.-J.; Chen, Y.-X.; Huang, C.-J.; Gao, J.-M.; Dong, Q.-X.; Xuan, Y.-X.; Li, C.-Q. A Zebrafish Phenotypic Assay for Assessing Drug-Induced Hepatotoxicity. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2012**, *67*, 25–32, doi:10.1016/j.vascn.2012.10.003. 1015–1017
90. Zuo, Z.; Chen, S.; Wu, T.; Zhang, J.; Su, Y.; Chen, Y.; Wang, C. Tributyltin Causes Obesity and Hepatic Steatosis in Male Mice. *Environ. Toxicol.* **2011**, *26*, 79–85, doi:10.1002/tox.20531. 1018–1019
91. Fam, T.; Klymchenko, A.; Collot, M. Recent Advances in Fluorescent Probes for Lipid Droplets. *Materials* **2018**, *11*, 1768, doi:10.3390/ma11091768. 1020–1021
92. Greenspan, P.; Fowler, S.D. Spectrofluorometric Studies of the Lipid Probe, Nile Red. *J. Lipid Res.* **1985**, *26*, 781–789, doi:10.1016/S0022-2275(20)34307-8. 1022–1023
93. Ahmad, O.; Wang, B.; Ma, K.; Deng, Y.; Li, M.; Yang, L.; Yang, Y.; Zhao, J.; Cheng, L.; Zhou, Q.; et al. Lipid Modulating Anti-Oxidant Stress Activity of Gastrodin on Nonalcoholic Fatty Liver Disease Larval Zebrafish Model. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1984, doi:10.3390/ijms20081984. 1024–1026
94. Kashyap, B.; Pegorsch, L.; Frey, R.A.; Sun, C.; Shelden, E.A.; Stenkamp, D.L. Eye-Specific Gene Expression Following Embryonic Ethanol Exposure in Zebrafish: Roles for Heat Shock Factor 1. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* **2014**, *43*, 111–124, doi:10.1016/j.reprotox.2013.12.002. 1027–1029
95. Passeri, M.J.; Cinaroglu, A.; Gao, C.; Sadler, K.C. Hepatic Steatosis in Response to Acute Alcohol Exposure in Zebrafish Requires Sterol Regulatory Element Binding Protein Activation. *Hepatology* **2009**, *49*, 443–452, doi:10.1002/hep.22667. 1030–1032
96. Olwagen, C.P.; Adrian, P.V.; Madhi, S.A. Performance of the Biomark HD Real-Time QPCR System (Fluidigm) for the Detection of Nasopharyngeal Bacterial Pathogens and *Streptococcus Pneumoniae* Typing. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 6494, doi:10.1038/s41598-019-42846-y. 1033–1035
97. Begriche, K.; Massart, J.; Robin, M.-A.; Bonnet, F.; Fromenty, B. Mitochondrial Adaptations and Dysfunctions in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology* **2013**, *58*, 1497–1507, doi:10.1002/hep.26226. 1036–1037
98. Raftery, T.D.; Jayasundara, N.; Di Giulio, R.T. A Bioenergetics Assay for Studying the Effects of Environmental Stressors on Mitochondrial Function in Vivo in Zebrafish Larvae. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol. CBP* **2017**, *192*, 23–32, doi:10.1016/j.cbpc.2016.12.001. 1038–1040

99. Imran, M.; Sergent, O.; Tête, A.; Gallais, I.; Chevanne, M.; Lagadic-Gossmann, D.; Podechard, N. Membrane Remodeling as a Key Player of the Hepatotoxicity Induced by Co-Exposure to Benzo[a]Pyrene and Ethanol of Obese Zebrafish Larvae. *Biomolecules* **2018**, *8*, 26, doi:10.3390/biom8020026. 1041-1043
100. Paton, C.M.; Ntambi, J.M. Biochemical and Physiological Function of Stearoyl-CoA Desaturase. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **2009**, *297*, E28–E37, doi:10.1152/ajpendo.90897.2008. 1044-1045
101. Lin, Y.; Ding, D.; Huang, Q.; Liu, Q.; Lu, H.; Lu, Y.; Chi, Y.; Sun, X.; Ye, G.; Zhu, H.; et al. Downregulation of MiR-192 Causes Hepatic Steatosis and Lipid Accumulation by Inducing SREBF1: Novel Mechanism for Bisphenol A-Triggered Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **2017**, *1862*, 869–882, doi:10.1016/j.bbalip.2017.05.001. 1046-1049
102. Martella, A.; Silvestri, C.; Maradonna, F.; Gioacchini, G.; Allarà, M.; Radaelli, G.; Overby, D.R.; Di Marzo, V.; Carnevali, O. Bisphenol A Induces Fatty Liver by an Endocannabinoid-Mediated Positive Feedback Loop. *Endocrinology* **2016**, *157*, 1751–1763, doi:10.1210/en.2015-1384. 1050-1052
103. Wang, W.; Zhang, X.; Qin, J.; Wei, P.; Jia, Y.; Wang, J.; Ru, S. Long-Term Bisphenol S Exposure Induces Fat Accumulation in Liver of Adult Male Zebrafish (*Danio Rerio*) and Slows Yolk Lipid Consumption in F1 Offspring. *Chemosphere* **2019**, *221*, 500–510, doi:10.1016/j.chemosphere.2019.01.020. 1053-1055
104. Zhang, W.; Shen, X.-Y.; Zhang, W.-W.; Chen, H.; Xu, W.-P.; Wei, W. The Effects of Di 2-Ethyl Hexyl Phthalate (DEHP) on Cellular Lipid Accumulation in HepG2 Cells and Its Potential Mechanisms in the Molecular Level. *Toxicol. Mech. Methods* **2017**, *27*, 245–252, doi:10.1080/15376516.2016.1273427. 1056-1058
105. Sant, K.E.; Moreau, H.M.; Williams, L.M.; Jacobs, H.M.; Bowsher, A.M.; Boisvert, J.D.; Smolowitz, R.M.; Pantazis, J.; Annunziato, K.; Nguyen, M.; et al. Embryonic Exposures to Mono-2-Ethylhexyl Phthalate (MEHP) Induce Larval Steatosis in Zebrafish Independent of Nrf2a Signaling. *J. Dev. Orig. Health Dis.* **2021**, *12*, 132–140, doi:10.1017/S2040174420000057. 1059-1062
106. Kim, J.-Y.; Kim, S.-J.; Bae, M.A.; Kim, J.-R.; Cho, K.-H. Cadmium Exposure Exacerbates Severe Hyperlipidemia and Fatty Liver Changes in Zebrafish via Impairment of High-Density Lipoproteins Functionality. *Toxicol. In Vitro* **2018**, *47*, 249–258, doi:10.1016/j.tiv.2017.11.007. 1063-1065
107. Itabe, H.; Yamaguchi, T.; Nimura, S.; Sasabe, N. Perilipins: A Diversity of Intracellular Lipid Droplet Proteins. *Lipids Health Dis.* **2017**, *16*, 83, doi:10.1186/s12944-017-0473-y. 1066-1067
108. Simmen, F.A.; Alhallak, I.; Simmen, R.C.M. Malic Enzyme 1 (ME1) in the Biology of Cancer: It's Not Just Intermediary Metabolism. *J. Mol. Endocrinol.* **2020**, *65*, R77–R90, doi:10.1530/JME-20-0176. 1068-1069
109. Sekita, A.; Okazaki, Y.; Katayama, T. Dietary Phytic Acid Prevents Fatty Liver by Reducing Expression of Hepatic Lipogenic Enzymes and Modulates Gut Microflora in Rats Fed a High-Sucrose Diet. *Nutrition* **2016**, *32*, 720–722, doi:10.1016/j.nut.2016.01.003. 1070-1072
110. Li, C.; Li, L.; Lian, J.; Watts, R.; Nelson, R.; Goodwin, B.; Lehner, R. Roles of Acyl-CoA:Diacylglycerol Acyltransferases 1 and 2 in Triacylglycerol Synthesis and Secretion in Primary Hepatocytes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2015**, *35*, 1080–1091, doi:10.1161/ATVBAHA.114.304584. 1073-1075
111. Jeyakumar, S.M.; Vajreswari, A. Stearoyl-CoA Desaturase 1: A Potential Target for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease?-Perspective on Emerging Experimental Evidence. *World J. Hepatol.* **2022**, *14*, 168–179, doi:10.4254/wjh.v14.i1.168. 1076-1078
112. Miyazaki, M.; Kim, Y.-C.; Gray-Keller, M.P.; Attie, A.D.; Ntambi, J.M. The Biosynthesis of Hepatic Cholesterol Esters and Triglycerides Is Impaired in Mice with a Disruption of the Gene for Stearoyl-CoA Desaturase 1*. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 30132–30138, doi:10.1074/jbc.M005488200. 1079-1081

113. Mauvoisin, D.; Mounier, C. Hormonal and Nutritional Regulation of SCD1 Gene Expression. *Biochimie* **2011**, *93*, 1082–1083, 78–86, doi:10.1016/j.biochi.2010.08.001.
114. Lee, J.H.; Zhou, J.; Xie, W. PXR and LXR in Hepatic Steatosis: A New Dog and an Old Dog with New Tricks. *Mol. Pharm.* **2008**, *5*, 1084–1085, 60–66, doi:10.1021/mp700121u.
115. Zhang, J.; Wei, Y.; Hu, B.; Huang, M.; Xie, W.; Zhai, Y. Activation of Human Stearoyl-Coenzyme A Desaturase 1 Contributes to the Lipogenic Effect of PXR in HepG2 Cells. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e67959, 1086–1087, doi:10.1371/journal.pone.0067959.
116. Mortensen, A.S.; Arukwe, A. The Persistent DDT Metabolite, 1,1-Dichloro-2,2-Bis(p-Chlorophenyl)Ethylene, Alters Thyroid Hormone-Dependent Genes, Hepatic Cytochrome P4503A, and Pregnane × Receptor Gene Expressions in Atlantic Salmon (*Salmo Salar*) Parr. *Environ. Toxicol. Chem.* **2006**, *25*, 1091–1092, 1607–1615, doi:10.1897/05-376R1.1.
117. Hall, Z.; Bond, N.J.; Ashmore, T.; Sanders, F.; Ament, Z.; Wang, X.; Murray, A.J.; Bellafante, E.; Virtue, S.; Vidal-Puig, A.; et al. Lipid Zonation and Phospholipid Remodeling in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatol. Baltim. Md* **2017**, *65*, 1093–1095, 1165–1180, doi:10.1002/hep.28953.
118. Gianfrancesco, M.A.; Paquot, N.; Piette, J.; Legrand-Poels, S. Lipid Bilayer Stress in Obesity-Linked Inflammatory and Metabolic Disorders. *Biochem. Pharmacol.* **2018**, *153*, 1096–1097, 168–183, doi:10.1016/j.bcp.2018.02.022.
119. Meng, H.; Gonzales, N.M.; Lonard, D.M.; Putluri, N.; Zhu, B.; Dacso, C.C.; York, B.; O'Malley, B.W. XBP1 Links the 12-Hour Clock to NAFLD and Regulation of Membrane Fluidity and Lipid Homeostasis. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1098–1099, 6215, doi:10.1038/s41467-020-20028-z.
120. Hugo, S.E.; Schlegel, A. A Genetic Screen for Zebrafish Mutants with Hepatic Steatosis Identifies a Locus Required for Larval Growth. *J. Anat.* **2017**, *230*, 1101–1102, 407–413, doi:10.1111/joa.12570.
121. Tingaud-Sequeira, A.; Ouadah, N.; Babin, P.J. Zebrafish Obesogenic Test: A Tool for Screening Molecules That Target Adiposity. *J. Lipid Res.* **2011**, *52*, 1103–1104, 1765–1772, doi:10.1194/jlr.D017012.
122. Owen, D.M.; Rentero, C.; Magenau, A.; Abu-Siniyeh, A.; Gaus, K. Quantitative Imaging of Membrane Lipid Order in Cells and Organisms. *Nat. Protoc.* **2012**, *7*, 1105–1106, 24–35, doi:10.1038/nprot.2011.419.

Article title: A new in-vivo zebrafish bioassay evaluating liver steatosis identifies DDE as a steatogenic endocrine disruptor, partly through SCD1 regulation.

Journal: International Journal of Molecular Sciences - MDPI

Hélène Le Mentec¹, Emmanuelle Monniez¹, Antoine Legrand¹, Céline Monvoisin², Dominique Lagadic-Gossmann^{1*}, Normand Podechard^{1*#}

¹ Univ Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé environnement et travail) – UMR_S 1085, F-35000 Rennes, France

² UMR U1236-MICMAC, Immunology and Cell Therapy Lab, Rennes University Hospital, Rennes, France.

Supplementary Materials:

- **Supplementary File s1:** Word file containing the first analysis macro in text format for the calculation of the steatosis score
- **Supplementary File s2:** Word file containing the second analysis macro in text format for the calculation of the steatosis score
- **Supplementary File s3:** Word file containing the third analysis macro in text format for the calculation of the steatosis score
- **Supplementary Table s4:** Excel file containing sequences of the primers used in RT-qPCR
- **Supplementary Figure s5:** Drug-induced dose-related zebrafish mortality
- **Supplementary File Table s6:** Selected chemical treatment studies in zebrafish
- **Supplementary Figure s7:** Screening of the steatogenic molecules with the StAZ bio-assay

Supplementary File Table s4:

Full-name	Zebrafish				
	Gene	Gene ID	mRNA accession number	Primer sequence	
				Forward	Reverse
/	18s		NR_145818.1	TTACCCCAGGCTCGGAAAAC	CGGGAAGGTCTTTGAACCCA
ATP-binding cassette sub-family G (WHITE) member 2a	abcg2a	735312	NM_001042775.1	TTCTGGATGAACCCACGACC	CACCAGTTTTCTCCACCA
Acetyl-CoA carboxylase alpha (acaca)	acaca	559403	XM_017356109.2	GGGCACAAAGACCGACAGAT	GCTTCCTTAAAGCCTGGCGA
Acyl-CoA dehydrogenase very long chain	acadvl	573723	NM_212611.1	GGTCTTGCCAGAGCTTCCC	CCTGCATGACTCTCTCGTGG
Acyl-CoA dehydrogenase long chain	acadl	394156	NM_201181.2	ATCCCATAGCCAAGGCGTTT	TTGAAACGTCCAGGCACCAA
Acyl-CoA dehydrogenase medium chain	acadm	406283	NM_213010.2	AAGGTTTTGAGGGCAGGTGT	GGGGAAAGGATATTCGCCAC
Acyl-CoA dehydrogenase short chain	acads	445288	NM_001003743.1	TTGCCTCTCATCAGGCCATC	TTTGGATCTCGCTGGTTCCC
acyl-CoA oxidase 1, palmitoyl	acox1	449662	NM_001005933.2	AGTCAGCACGAGCTCTCTCC	GCCCTACAAAGTAAAAGGCA
aryl hydrocarbon receptor	ahr	30517	NM_131264.1	GGTCAAGAAACGGAAGCC	GAGAAGGGTAGAAGGTTGGTCAG
Apolipoprotein Ba	apoB	566465	XM_689735.9	TGAGAATGGGGCTTTGGGTC	TATGTCGTGAGGGACGGGAA
apolipoprotein A-II	apoa2	322327	NM_001130586.1	TCATCAAATCGCTGGTGGTT	CAACATAGGGTCTGAAGTAATGGC
cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1b	aroB / cyp19a1b	60640	NM_131642.2	TCGGCACGCCGTGCAACTAC	CATACCTATGCATTGCAGACC
ATP synthase inhibitory factor subunit 1a	atp5if1a	100037369	NM_001089521.1	TACTTCAGGCAAAGGAGCGGG	ACCCACACAGAGGAAAAGGCA
ATP synthase F1 subunit alpha	atp5fa1	553755	NM_001077355.1	ATCTCTGTGAGGGAGCCCAT	CAATGGCGGTTTTGCCAGTC
ATP synthase F1 subunit beta	atp5fb1	554135	NM_001024429.2	AGGCTGGATCAGAGGTGTCT	TGAGCAAAGGTGGTAGCAGG
actin, beta 2	actb2	57934	NM_181601.4	ACGAGAGATCTTCACTCCCCT	CCAACCATCACTCCCTGATGT
caspase 3 apoptosis-related cysteine peptidase a	casp3a	140621	NM_131877.3	TGATGCCAAGCCTCAATCCC	GTGATCGTCATGGGCAACTG
catalase	cat	30068	NM_130912.2	CAAGGTCTGGTCCCATAAA	TGACTGGTAGTGGAGGTAA
caveolin 1	cav1	323695	NM_001024162.1	TCAACCGAGACCCAAAGCAT	CACGCAAGGCACCACG
cd36 molecule (thrombospondin receptor)	cd36	436636	NM_001002363.1	GCTGGCAAGGTGAAACATCAG	TTCTTGCCAGGAACGGGTG
ceramide synthase 1	cerS1	568169	XM_009295953.3	TGAGCCATTTGGACAGTGGT	CCCCTCTTCCAGTCGTAA
ceramide synthase 2a	cerS2a	259251	NM_153671.1	GTTCAGAGAGGCCAGTTGGAG	CTGCCACATCTCCTTCGTA
ceramide synthase 6	cerS6	567867	XM_688191.8	CCGACTGGTCTTTGAGAGTTT	AACCGCTTCTCATCAGGGTG
cytochrome C oxidase assembly factor 3a	coa3a	100141351	NM_001114916.2	ACCCGACAAAAGAAGCCCTG	AGTCTTCGGTACACGCACTT
carnitine palmitoyltransferase 1Aa	cpt1aa	558088	XM_005166473.4	ACAGCGTTTCACTCTGTTCT	ACGTGCTGACTGAGTCCCT
carnitine palmitoyltransferase 1A2b	cpt1a2b	550361	XM_005164059.4	CCTGTATCGCCGAAAGGTCA	GTGCTGCAGAACATCAGTCTC
cytochrome P450, family 1, subfamily A	cyp1a	140634	NM_131879.2	GGTCAAGAAACGGAAGAAGCC	GAGAAGGGTAGAAGGTTGGTCAG
cytochrome P450, family 2, subfamily Y, polypeptide 3	cyp2y3	368352	NM_001020822.1	TATTCCTATGCTGCACTCTG	AGGAGCGTTTACCTGCAGAA
cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 65	cyp3a65	553969	NM_001037438.1	GAACCTCTGTTCTGTTGATCG	CACTCTCTTCTGTTGTTGTCT
cytochrome P450, family 4, subfamily T, polypeptide 8	cyp4t8	387527	NM_199216.2	ACAACAACAGAACCCAAAGATGAC	GGAACCAGGAGTGAGCAGT

delta(4)-desaturase, sphingolipid 1	degs1	327075	NM_212700.1	ACGACGACTACCAATGGTGAAA	TCCGACCAGTTTTCGCTTGA
delta(4)-desaturase, sphingolipid 2	degs2	402799	NM_001163366.1	GCACACCTTCTCCCTCTCTT	CTTGATTTCCAGGATACTTAGCCAAT
Diacylglycerol O-acyltransferase 1a	dgat1a	325875	NM_199730.1	AAATGGCACAGCGGGATACA	GTCGGAACCATCCACTGCTG
7 dehydrocholesterol reductase	dhcr7	378446	NM_201330.2	CAGGGTGAGAAAGCGGCATA	CCAATCCACCTCCCATGCTC
ELOVL fatty elongase 6	elovl6	317738	NM_199532.1	TGGATGCAGGAGAACTGGAAG	ACTGAAGGCGCAAGTGTTA
estrogen receptor 1	era	259252	NM_152959.1	CTGGAGATGCTGGACGCTCA	GCTGCAGCTCCTCCTCTGG
fatty acid binding protein 1b, tandem duplicate 1	fabp1b	554095	NM_001024651.2	CGAGGAGAACGGAAACCAGT	CGAGCGTCAGAGTGTGACC
fatty acid binding protein 10a	fabp10a	171481	NM_152960.1	TTACGCTCAGGAGAACTACG	CTTCTGATCATGGTGGTTC
fatty acid synthase	fasn	559001	XM_009306806.3	GAGAAAGCTTGCCAAACAGG	GAGGGTCTGCAGGAGACAG
flotillin 1a	flot1	561345	NM_130913.1	CATCAGAGTGAGAGGAGAGGC	TCTTTGTAGTGCTGGAAGGC
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	gapdh	317743	NM_001115114.1	GAGGCTTCTCACAAACGAGGA	TGCCACGATCTCCACTTTC
Glycerol-3-phosphate acyltransferase 4	gpat4	678522	NM_001040249.2	GTCTCACGATGCTCCAATATAAA	AGCCATTTCTGACATATCTGTTGC
heme binding protein 2	hebp2	393167	NM_200198.1	AGTTGTGACTGGCATGGAGC	ATCTGGGTCACTGGGTTTGG
3-hydroxy-3-methylglutarym-CoA reductase a	hmgcra	559054	NM_001079977.2	CACATGACTACAACAGATCAAAAG	AGAAGAAGGGATCGGTTGCG
3-hydroxy-3-methylglutarym-CoA reductase b	hmgcrb	541479	NM_001014292.2	TGATGGAGAGTCCAGAGCGA	GCTCCAACCACCTTTGAGT
heme oxygenase 1	hmox1	791518	NM_001127516.1	GCAGCATCCCAAAGTCTGTC	TAAACTCCCATGCCAACCGT
interleukin 1, beta	il1b	405770	NM_212844.2	GAACAGAATGAAGCACATCAAACC	ACGGCACTGAATCCACCAC
interleukin 6	il6	100885851	NM_001261449.1	TCAACTTCTCCAGCGTGATG	TCTTCCCTCTTTCTCCTCTG
insulin receptor alpha	insra	245699	NM_001142672.1	AGTCCACGGAGCAAAGAGTG	GTGGGCAGCTTCATACCTTTC
insulin receptor substrate 2b	irs2b	572001	XM_695654.9	CACGGCAACAACAGTAAAAGACTA	CAGCCGAGGACTGAAGTTGT
3-ketodihydrosphingosine reductase	kdsr	394114	NM_201139.2	GGCCTTGACAGATGAAATGAAA	CTTGCTCCGTTGAGAGACA
low density lipoprotein receptor a	ldlra	387529	NM_001030283.1	GTGTGAGTGTGAGGATGGCT	GCGCCCTGATGCTGTA
Lipoprotein lipase	lpl	30354	NM_131127.1	CCTGGTCAACCCCAATCCAT	ACATACCCGTGACCGTCCAT
lipase, hormone sensitive a (hsl α)	lipea	568368	NM_001316725.1	CAGGTAAGCAAAGGTTGTCCG	TTCATGACCCCAACAGACG
lipase, hormone sensitive b (hsl β)	lipeb	557893	XM_009292349.2	GAAGAAGTCTGGGAGCGGTG	TGCCTTGGTGCCATCACTATT
nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3	lxr/ nr1h3	548341	NM_001017545.3	AATCGTCACTTAGGGGTGC	CGCAGAAAGGGTGGACATCT
nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3	lxra (nr1h3)	548341	NM_001017545.3	ATGTCCACCCTTTCTGCGAC	TCTCTGTTCACTTCTGCCA
malic enzyme 1	me1	768196	NM_001310037.1	GTTACACGCAACCCCATCT	GGCCATTAGAAAGACATACCTGT
solute carrier family 25 (mitochondrial iron transporter) member 37	mitoferin1 (slc25a37)	387000	NM_001039971.2	GCACACGCTCTATTTCCGC	CTCCCTGCCACACCGTTAG
solute carrier family 25 (mitochondrial iron transporter) member 28	mitoferin2 (slc25a28)	100535877	NM_213119.2	CCTGCCCACGCACTTACT	CATCCGCTGTTCACTTCTC
Microsomal triglyceride transfer protein	mttp	406207	NM_212970.2	GCTTCCAGATGCCAGCCTAT	GTGACATCCACGGTTTCTGC
Nuclear factor kappa B	nfkB3 (rela)	415099	NM_001001839.2	GCTTGCCTCGTCTTGGTGA	CCGTGTCGTGATTTGTGCTC
NAD(P)H dehydrogenase quinone 1	nqo1	322506	NM_205542.3	TCTGACAAAGAAAGGCTACAAGTC	ATACACAAAGTCTCGGGATT
nuclear factor erythroid 2-like 2a	nrf2 (nfe2l2a)	360149	NM_182889.1	TCGGGTTTGTCCCTAGATG	AGGTTTGGAGTGTCCGCTA
neutral sphingomyelinase (N-SMase) activation associated factor	nsmaf	550506	XM_003199002.5	CCCAGACAAACAGGCGAA	CCGTTTCTTCTACTGCCCT

Phospholipase A2 group X1IA	pla2g12a	402802	NM_001082799.1	CCGCTGTTGGGTTTCAGTTTG	ACGGCTTACATCCCAAGTGC
Perilipin 1	plin1	100024436	XM_021467809.1	GATGAGCATGGGCAAGTCAAG	AGTCGCCTAGGAATCAGCCC
Perilipin 2	plin2	794841	NM_001030262.1	ACTTGAACTGCACAACAGATTTT	TGGGTGTTGTTCTTGGTGT
Perilipin 3	plin3	335278	XM_021478401.1	ACTCCGCCTAACTTTGCCTT	CGGGAGATCACACTCTGTTGTT
Perilipin 6	plin6	794783	XM_005158066.4	GGCCCATCTGAGCACACTAAA	ACACGGTTTAGGACGTTCCC
peroxisome proliferator-activated receptor gamma	pparg	557037	NM_131467.1	GGTTTCATTACGGCGTTTAC	TGGTTCACGTCACTGGAGAA
peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha	ppargc1a	553418	XM_017357140.2	ACCTGTTTGAGATAGATGAGGAAA	AACGAAGCAACCCGTCCT
peroxisome proliferator-activated receptor alpha a	pparaa	563298	NM_001161333.1	AGCGGGAAAGAGGAACACAAA	TGAATGACGAAGGGCGGAGT
peroxisome proliferator-activated receptor alpha b	pparab	557714	NM_001102567.1	CGTCGTCAAGTGTTCAGGT	AGGCACTTCTGGAATCGACA
Nuclear receptor subfamily 1, group I, member 2	pxr (nr112)	565875	NM_001098617.2	CAGTACGTCAATGTCCCGCTT	CGCTTCATCGCACGTCTGAAA
Retinoid X receptor, alpha a	rxraa	555578	NM_001161551.1	ACCGCTCCTCAGGTAAACAC	CCTGGACGGCTTCTCTCTTC
Retinoid X receptor, alpha b	rxrab	793011	NM_131153.1	AGGAACCCATCCCTGTCCC	ACCCCGTAGTGTTCACCTGA
Retinoid X receptor, beta a	rxrba	30530	NM_131275.1	CGCGGCCCTAAATAAGCCAT	GAAGCAAAACGATCAGCCTCTC
retinoid X receptor, beta b	rxrbb	30486	NM_131238.1	ACTCCTCGATGTCCGTGTCT	CGCCATAATGCTTCCCCGA
retinoid x receptor, gamma a	rxrga	30464	NM_131217.4	CAGGACGGCGAAACGAGAC	GCAACGAAGAAGTCTGAGATGGAGAT
stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	scd1	386661	NM_198815.2	CGACCCTCACAACCTCAAACCG	CAACGAAGCACATCAACACCA
succinate dehydrogenase complex assembly factor 3	sdhaf3	449654	NM_001005926.2	CCGATTTCTGCCATTGACC	TTGTAGTTCTGCCATCCACCA
succinate dehydrogenase complex subunit B iron sulfur (lp)	sdhb	562149	NM_001098740.1	CCAGACACAGTCGGAGACAAA	CATAGCACACGAGCCACAGA
succinate dehydrogenase complex subunit C integral membrane protein	sdhc	445129	NM_001003523.2	CATCTACAAGTGGTCTGTCCCA	GCCCGAAGGTCAAGGAGTGA
succinate dehydrogenase complex, subunit D, integral membrane protein b	sdhdb	445500	NM_001004004.2	AGCCCTCTGTTATTTGCCCC	GACCCAGAACCCGCATAGTT
sirtuin 3	sirt3	558775	NM_001080174.1	TCTTGAGGTGGAGCCCTTTGC	ACTACTTGTCTCTGCCAACATTCA
sphingomyelin phosphodiesterase 1	smpdl1	556700	NM_001326536.1	GGTGGGAAATCACGAGAGCA	TAGAAACCACCACGGCGTAT
sphingomyelin phosphodiesterase acid like 3a	smpdl3	541525	NM_001014338.1	AGAGCCATTTTCAAACAACCCTG	TCTGGCAGGACGATGAACTAA
sterol regulatory element binding transcription factor 1	srebf1	793274	NM_001105129.1	AGCTCGCCTCAGTCAATTCC	ATTGGTGAAGCCGACACT
transferrin-a	tfa	30255	NM_001291499.1	GAAAATCCCAGAGTCAGCCA	TTCATCTCCAACAGCCTTCC
transcription factor A	tfam	571106	NM_001077389.1	GGGAAGTACTACGAGGCAA	GTGCTCTCCACGATTGA
transforming growth factor, beta 1a	tgfb1a	359834	NM_182873.1	GGAAGGCAACACAAGGTGGA	GGCTTACTTATCAATCCCGACT
translocator protein	tspo	450011	NM_001006032.2	CTGGACCCCATCTTCTTCG	CTTGGGCTCTGGGTGTCTC

Supplementary File Figure s5:

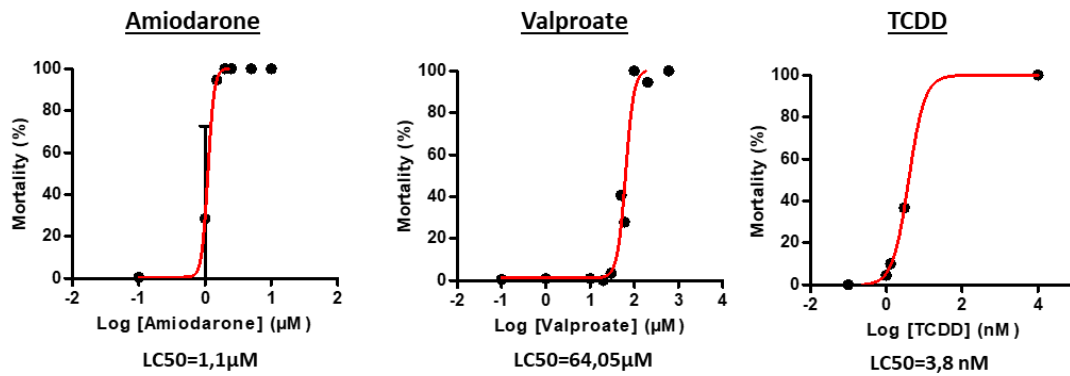


Figure S5: Drug-induced dose-related zebrafish mortality. 3 days post-fertilization zebrafish larvae were exposed to the steatogenic molecules Amiodarone, Valproate and TCDD, during 48h. Lethal concentration 50 (LC50) was determined.

Supplementary File Table s6:

Table s6: Selected chemical treatment studies in zebrafish. Comparison of the doses tested in the literature and those used for our studies

	Steatogenic molecules concentrations described in the literature to induce steatosis	Concentrations (μM) tested on the laboratory
Amiodarone	10-3.3-1.1 μM ^{1,2}	1-0.1 μM
Valproic acid	600-200-67 μM ^{1,3}	60-10-1-0.1 μM
TCDD	0.1-10 nM ⁵ 0-1000 ng/L (0-3 nM) ⁴ 0.01-100 μM ⁶	1-3 nM
Ethanol	1-1.5-2% ^{4,7,8}	1%

References:

¹ Driessen M, Kienhuis AS, Pennings JL, Pronk TE, van de Brandhof EJ, Roodbergen M, Spaik HP, van de Water B, van der Ven LT. Exploring the zebrafish embryo as an alternative model for the evaluation of liver toxicity by histopathology and expression profiling. *Arch Toxicol*. 2013 May;87(5):807-23. doi: 10.1007/s00204-013-1039-z. Epub 2013 Apr 6. PMID: 23559145.

² Driessen M, Kienhuis AS, Vitins AP, Pennings JL, Pronk TE, van den Brandhof EJ, Roodbergen M, van de Water B, van der Ven LT. Gene expression markers in the zebrafish embryo reflect a hepatotoxic response in animal models and humans. *Toxicol Lett*. 2014 Oct 1;230(1):48-56. doi: 10.1016/j.toxlet.2014.06.844. Epub 2014 Jul 24. PMID: 25064622.

³ He JH, Guo SY, Zhu F, Zhu JJ, Chen YX, Huang CJ, Gao JM, Dong QX, Xuan YX, Li CQ. A zebrafish phenotypic assay for assessing drug-induced hepatotoxicity. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2013 Jan-Feb;67(1):25-32. doi: 10.1016/j.vascn.2012.10.003. Epub 2012 Nov 3. PMID: 23128142.

⁴ Zhang X, Li C, Gong Z. Development of a convenient in vivo hepatotoxin assay using a transgenic zebrafish line with liver-specific DsRed expression. *PLoS One*. 2014 Mar 13;9(3):e91874. doi: 10.1371/journal.pone.0091874. PMID: 24626481; PMCID: PMC3953600.

⁵ Li ZH, Xu H, Zheng W, Lam SH, Gong Z. RNA-sequencing analysis of TCDD-induced responses in zebrafish liver reveals high relatedness to in vivo mammalian models and conserved biological pathways. *PLoS One*. 2013 Oct 30;8(10):e77292. doi: 10.1371/journal.pone.0077292. PMID: 24204792; PMCID: PMC3813628.

⁶ Ton C, Lin Y, Willett C. Zebrafish as a model for developmental neurotoxicity testing. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2006 Jul;76(7):553-67. doi: 10.1002/bdra.20281. PMID: 16933308.

⁷ Passeri MJ, Cinaroglu A, Gao C, Sadler KC. Hepatic steatosis in response to acute alcohol exposure in zebrafish requires sterol regulatory element binding protein activation. *Hepatology*. 2009 Feb;49(2):443-52. doi: 10.1002/hep.22667. PMID: 19127516; PMCID: PMC2635426.

⁸ Kashyap B, Pegorsch L, Frey RA, Sun C, Shelden EA, Stenkamp DL. Eye-specific gene expression following embryonic ethanol exposure in zebrafish: roles for heat shock factor 1. *Reprod Toxicol*. 2014 Jan;43:111-24. doi: 10.1016/j.reprotox.2013.12.002. Epub 2013 Dec 16. PMID: 24355176; PMCID: PMC3918430.

Supplementary File Table s7:

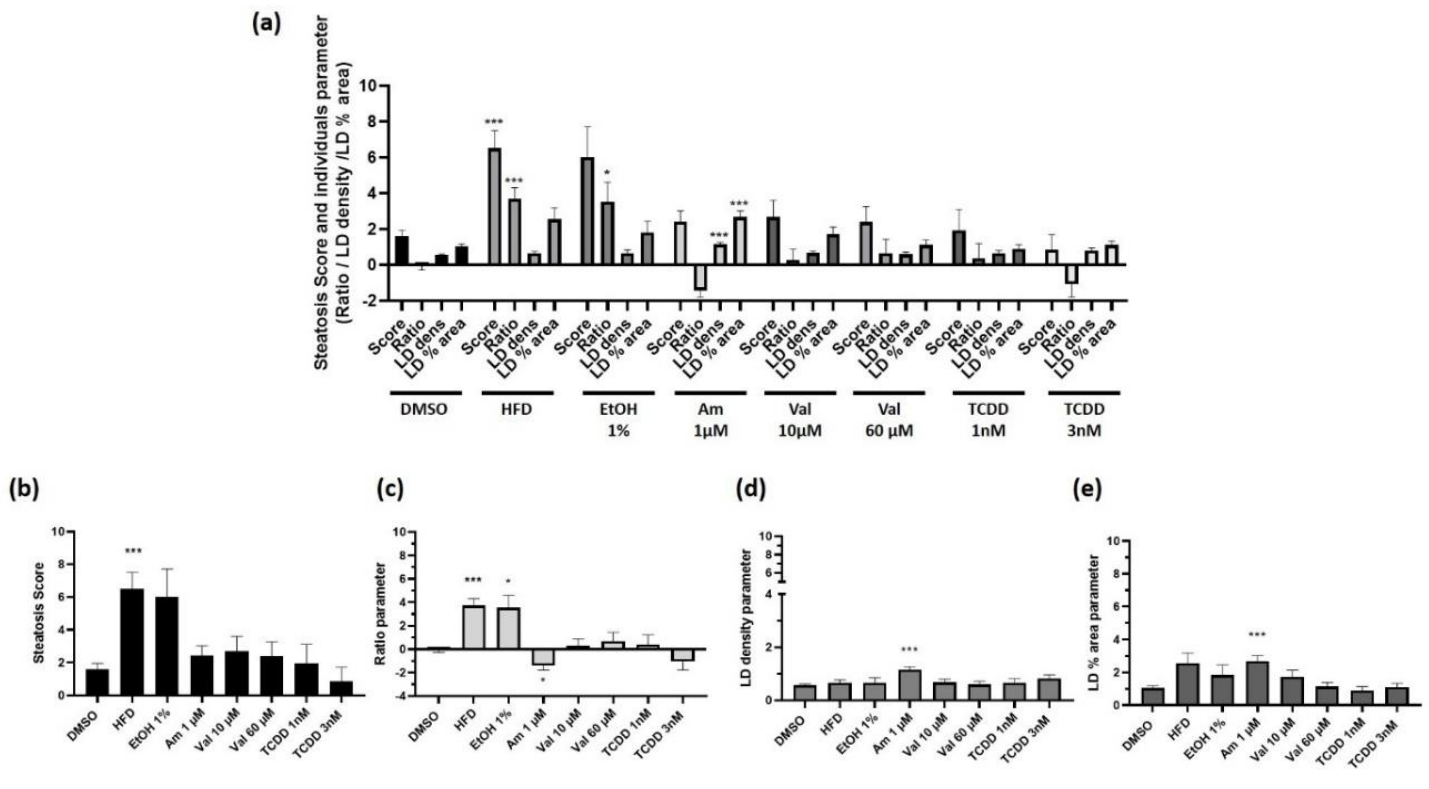


Figure S7: Screening of the steatogenic molecules with the StAZ bio-assay. Zebrafish larvae at 3 dpf were exposed to selected steatogenic controls: high fat diet (HFD), Ethanol 1% v/v (EtOH 1%), Amiodarone (1 μ M), Valproate (10 / 60 μ M) or TCDD (1 / 3 nM). Following exposure, larvae were euthanized, fixed and steatosis score was calculated based on Nile Red staining and image-based automated analysis after confocal microscopy acquisition. Means of steatosis score and of each parameters measured, ratio, lipid droplet density and area, are presented together (a) or separately (b)(c)(d)(e). Values are mean \pm SEM, (n as [treatment]/number of larvae: [DMSO]/ 209; [HFD]/100; [EtOH 1%]/39; [Ami 1 μ M]/149; [Val 10 μ M]/61; [Val 60 μ M]/46; [TCDD 1nM]/18; [TCDD 1nM]/19). *** P < 0.001, by comparison with control group using Kruskal-Wallis test.

ii. Résultats complémentaires et discussions de l'article

a. **Mise au point du test StAZ**

Le développement de tests évaluant la toxicité de molécules chimiques sur un organisme *in vivo*, tels qu'ils sont demandés par l'OCDE, nécessite la mise en place de protocoles standardisés et reproductibles, pour permettre une robustesse des tests et des résultats. Ainsi, dans un premier temps, la mise au point du test stéatogène StAZ a nécessité plusieurs ajustements techniques, que ce soit concernant les paramètres d'élevages et d'expositions des larves de poisson-zèbre, les doses d'expositions aux différentes molécules ou encore la méthode d'analyse de la stéatose.

1. Elevage, expositions et contraintes

En laboratoire, l'environnement du poisson-zèbre est très important en particulier lorsque l'on cherche à évaluer l'effet de l'exposition à une substance. Et ce d'autant plus lorsque l'on sait que certains paramètres comme la température, le pH ou encore la luminosité peuvent impacter certaines réponses. C'est pourquoi une mise au point et une gestion minutieuse de ces paramètres physico-chimiques (T°C : 29,5°C / composition du milieu d'élevage : Sels Instant Océan [90 µg / ml], sulfate de calcium [0,58 mM], bleu de méthylène [416µg/L] / pH : 6,8 à 7,8) a été nécessaire pour le développement d'un test standardisé et assurer également un développement optimal des larves.

Dans le développement du test StAZ, la nécessité d'un contrôle positif inducteur de stéatose a été indispensable pour pouvoir évaluer et comparer le potentiel stéatogène des différents PE du projet. Cependant, les molécules utilisées (amiodarone, acide valproïque, TCDD et éthanol, décrites pour induire la stéatose, notamment sur le modèle du poisson-zèbre), n'ont pas induit d'augmentation de lipides hépatiques, mais se sont, en plus, révélées hautement toxiques, entraînant une forte mortalité des larves de poisson-zèbre à 5 jpf (Supplementary datas de l'article : Figure s5 + Table s6). Dans ces circonstances, nous n'avons pas été en mesure d'atteindre les niveaux de concentration signalés comme induisant la stéatose (10 µM pour l'amiodarone ou 600 µM pour le valproate) sans mortalité excessive. Même si ces résultats sont surprenants et diffèrent avec ceux décrits dans la littérature, cela peut cependant s'expliquer de plusieurs façons.

Des **différences entre les souches** utilisées, notamment au niveau de leur sensibilité, peuvent expliquer des différences de réponses à certains composés chimiques. Il a, par exemple, été identifié, dans le cadre d'une exposition au solvant DMSO, des effets différents en fonction des souches de poisson-zèbre (Christou et al., 2020). De même, il a été mis en évidence, par exemple que, des poissons-zèbres adultes de souche TU étaient plus tolérants à l'Éthanol que ceux de souche WIK (Pannia et al., 2014). Une autre étude témoigne du fait que cette souche semblerait en effet plus résistante, puisque, exposée au TNBS (acide 2,4,6-trinitrobenzènesulfonique, inducteur d'inflammation intestinale), elle présente également une meilleure survie comparée à

la souche AB. Cette étude souligne ainsi des différences physiologiques importantes dans la façon dont les souches répondent à l'inflammation (Padovani et al., 2022).

Ces différences de réponses toxicologiques selon les souches peuvent s'expliquer par une différence de fond génétique et des variations génétiques entre les souches (Barata et al., 2000; Coe et al., 2009; Nowak et al., 2007). Notamment de faibles variations génétiques ont été corrélées à une tolérance plus faible aux polluants (Nowak et al., 2007). Ainsi, il est important de tenir compte des différences entre les souches ou des effets de consanguinité sur les réponses aux traitements expérimentaux entre les différentes études, puisque, les résultats des tests de toxicité peuvent différer entre les souches et le fond génétique utilisé (Brown et al. 2001).

Les souches communément utilisées en laboratoire et appelées « souches sauvages » comprennent les souches AB, TE, TL, WIK, EK et sont décrites comme ayant des niveaux de variabilité génétique faibles. Cependant, il a été démontré qu'une même souche de poissons provenant de différentes sources pouvait également présenter des variations génétiques, notamment pour la souche AB (Coe et al., 2009), qui est celle utilisée dans nos expérimentations et dans les différentes études citées précédemment. Ainsi, il peut être supposé que la souche AB, que nous avons utilisé, ait dérivé par rapport à celles utilisées dans les autres études de toxicité rapportées dans la littérature et soit donc devenue plus sensible à la toxicité des traitements utilisés. Cette hypothèse est soutenue par le fait que le modèle transgénique LiBlue utilisé pour l'optimisation du test StAZ, également de souche AB, était plus résistant et présentait moins de mortalité aux molécules stéatogènes. Il pourrait être intéressant de comparer les résultats obtenus avec les contrôles positifs stéatogènes, avec d'autres souches de poisson-zèbre comme la TL ou la WIK, qui présentent un niveau plus faible de variation génétique, ou avec la souche TU qui semble plus résistante.

La **période d'exposition** peut également paraître comme critique dans l'exposition aux toxiques. En effet, cette fenêtre d'exposition, très restreinte dans notre test (entre 3 jpf et 5 jpf) nous permet de rester dans le cadre du modèle alternatif (en dehors du cadre de l'expérimentation animale) (Strähle et al., 2012). Cependant, même si le foie a été démontré comme fonctionnel, il n'est cependant pas encore totalement mature et continue à se développer après 5 jpf (Cox and Goessling, 2015). Ainsi, dans certains cas, un retard de croissance de la larve pourrait expliquer l'absence ou la mauvaise métabolisation des composés et une toxicité. Sachant que dans les premiers jours de développement, la température influence considérablement la vitesse de développement, il est important de bien contrôler ce paramètre. Une température plus élevée pourrait permettre un développement plus rapide, et notamment au niveau du foie. Celui-ci pourrait être alors plus performant pour métaboliser certains composés mais cela serait donc associé avec l'atteinte plus rapide du stade d'entrée dans le champ de l'expérimentation animale de la larve, ce qui est incompatible avec la volonté de développer un test sur un modèle alternatif.

Pour pallier ces problèmes de sensibilité aux molécules stéatogènes et de mortalité conséquente, nous avons utilisé comme contrôle positif, l'alimentation à 4 jpf avec un régime riche en graisse (HFD, high fat diet). Et même si la prise alimentaire d'une larve de 4 jpf est discutable et

hétérogène à ce stade-là, cela a précédemment été décrit et publié dans notre équipe comme inducteur de stéatose sur la larve de poisson-zèbre (Bucher et al., 2018b). C'est également avec ce procédé que nous avons pu retrouver des niveaux de stéatose importants et reproductibles.

2. Methodes de coloration et d'analyse

Le test StAZ est basé sur la mise en évidence de l'accumulation de lipides par coloration et visualisation par microscopie. Différents colorants lipophiles permettent de visualiser les lipides au sein des cellules hépatiques, par microscopie dans le visible ou à fluorescence : l' Oil Red O, le Sudan Black, le Nile Red, le LipiBlue, le Bodipy 793/503, le Bodipy 505/515, etc.

La coloration Oil Red O est communément utilisée pour mettre en évidence l'accumulation de lipides hépatique chez la larve de poisson-zèbre (Zheng et al., 2015). Même si elle est facile à réaliser et à visualiser (car nécessite une simple loupe binoculaire), le manque de distinction des délimitations du foie ne permet pas toujours, à cet âge de 5 jpf, de discriminer les lipides au niveau du foie de ceux se trouvant dans la cavité viscérale. De plus, un retard de résorption du sac vitellin peut entraîner une accumulation de la coloration Oil Red O dans la zone viscérale et empêcher de bien localiser le foie. Ainsi pour le panel A de la Figure 32, nous observons que le DDE à 0,1 1 et 10 μM entraîne une augmentation de coloration au niveau hépatique et une bonne distinction du foie par rapport au contrôle iOc (milieu seul). Le panel B de la Figure montre la difficulté d'identifier spécifiquement le foie, du fait d'une coloration diffuse au niveau de la cavité viscérale.

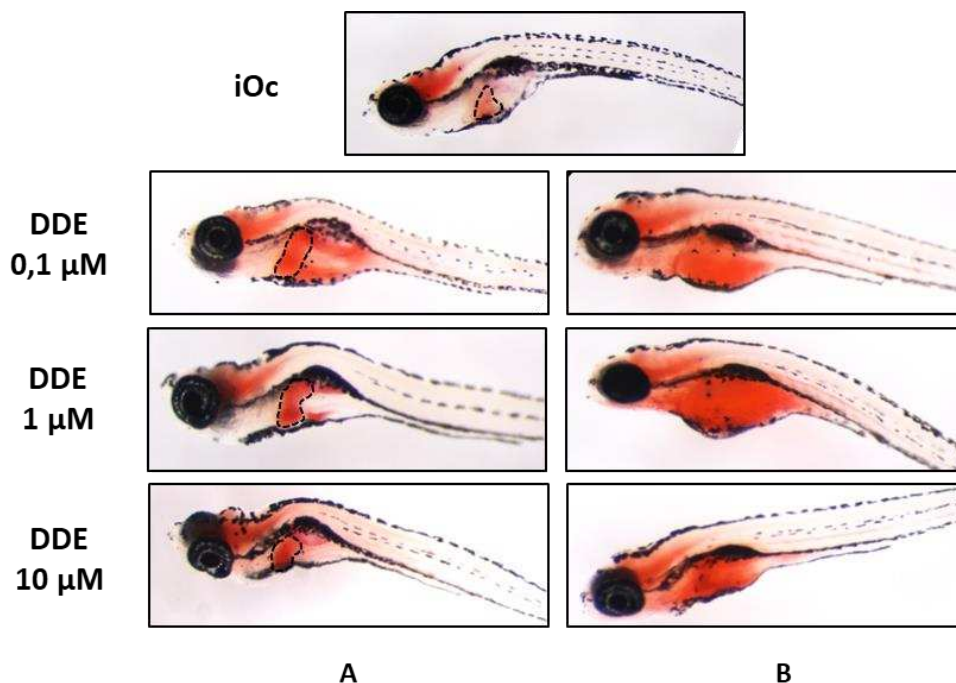


Figure 32: Accumulation de lipides dans la cavité viscérale des poissons-zèbres mise en évidence par la coloration Oil Red O. Les larves de poisson-zèbre de 3 jpf sont exposées au milieu seul (iOc) ou au DDE (0,1/1/10 μM) pendant 48h. Après exposition, les larves ont été euthanasiées, fixées et colorées au Oil Red O et observées grâce à une loupe binoculaire (grossissement x2). Les larves de poisson-zèbre du panel A présentent des contours hépatiques identifiables suite à la coloration ORO, alors que celles du panel B présentent une coloration diffuse au niveau de l'abdomen, qui ne permettait pas de distinguer nettement les contours hépatiques.

Ainsi, d'autres types de colorations ont été testées pour évaluer l'accumulation de lipides hépatiques, et la coloration au Nile Red a été la méthode la plus optimale et la plus sensible pour mettre en évidence la stéatose dans notre modèle. En effet, l'utilisation de ce colorant lipophile fluorescent spécifique des lipides neutres (TG et esters de cholestérol) permet la détection des GL intracellulaires et la quantification des lipides hépatiques par microscopie confocale (Ahmad et al., 2019; Fam et al., 2018; Greenspan and Fowler, 1985) (Figure 33).

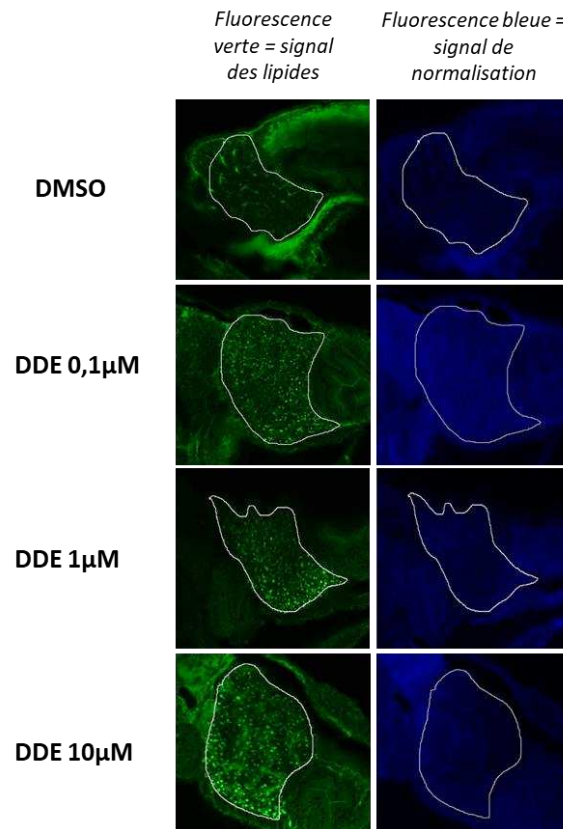


Figure 33: Accumulation de lipides hépatiques et présence de GL mises en évidence par la coloration Nile Red. Les larves de poisson-zèbre de 3 jpf sont exposées au contrôle DMSO (0,1%) et au DDE (0,1/1/10 µM) pendant 48h. Après exposition, les larves ont été euthanasiées, fixées et colorées au Nile Red. Les images de fluorescence verte, spécifiques des lipides, et bleue, non spécifiques des lipides, ont été acquises par microscopie confocale (grossissement x63).

Les méthodes actuelles d'étude des lipides hépatiques et des GL dans ces modèles reposent sur l'imagerie statique ou l'utilisation de colorants fluorescents, ce qui limite l'étude de leur dynamique *in vivo*. Pour pallier ce problème et utilisant l'avantage technique de la manipulation génétique des poissons-zèbres, il existe dorénavant de nombreuses souches transgéniques permettant de suivre en temps réel le trafic et l'accumulation des GL au sein du poisson. C'est le cas, par exemple, de la lignée *Fus(EGP-plin2)* dont la protéine périlipine 2, protéine structurale des GL, a été couplée au fluorochrome EGP, permettant l'étude des GL *in vivo* (Wilson et al., 2021) ; ou encore de la lignée *tg(-3.5ubb:plin2-tdTomato)*, dans laquelle la protéine fluorescente tdTOMATO est exprimée sous le contrôle du promoteur de la périlipine 2. D'ailleurs, l'utilisation de ce transgène dans un poisson-zèbre casper transparent a notamment permis l'imagerie *in vivo*

des dépôts de GL au niveau du tissu adipeux ainsi que le criblage de composés capables de réguler les GL dans le poisson-zèbre (Lumaquin et al., 2021). Cependant, à ces modèles transgéniques permettant l'étude des lipides hépatiques de manière indirecte (quantification de l'expression d'une protéine/ou de son gène présent dans les GL), nous avons préféré un marquage direct des lipides hépatiques par coloration Nile Red. En effet, ces lignées transgéniques citées précédemment peuvent être sujettes à discussion sur la véritable teneur en lipides dans les hépatocytes si la régulation de la protéine cible est altérée par les traitements.

Par la suite, pour pouvoir quantifier l'accumulation de lipides intracellulaires après coloration, nous avons mis en place une méthode d'analyse utilisant des macros, développées sur le logiciel Image J. Cette méthode d'analyse semi-automatisée a été initiée, avec pour objectif, une standardisation/automatisation de notre test stéatogène, et ainsi permettre une meilleure reproductibilité. Pour rappel, les 3 macros décrites dans l'article permettent (1) de contourner les zones de foies pour chaque larve sur les images acquises en microscopie (macro n°1 : manuelle), (2) de quantifier l'accumulation des lipides par le calcul des ratios de fluorescence du signal lipidique normalisé (macro n°2 : automatisée), (3) de quantifier la présence de GL hépatiques par le calcul de leur densité et de leur surface par aire du foie (macro n°3 : semi automatisée). Ces paramètres calculés sont ensuite pondérés par des coefficients multiplicateurs choisis empiriquement, mais reflétant les observations faites en microscopie, pour pouvoir calculer un score de stéatose.

$$\text{Steatosis score} = (\text{Ratio} \times 400) + (LD_{dens} \times 10000) + (LD_area \times 100)$$

L'objectif final serait d'automatiser au maximum cette méthode d'analyse, pour éliminer le biais du manipulateur lors de l'analyse et permettre une meilleure standardisation quant à l'évaluation du score de stéatose dans notre test StAZ. Pour ce faire, le développement et l'utilisation de la lignée transgénique de poisson-zèbre Liblue (*AB-tg(Fab10 :CFP ;cry :mRFP)*), au foie fluorescent bleu, va nous servir pour une meilleure détection des zones hépatiques, sur les images de microscopie, avec pour but *in fine* de rendre automatique les macro n°1 et 3.

3. Criblage des PE grâce au StAZ

Ce test StAZ a permis de cribler différents PE dont les effets sur les maladies métaboliques sont suspectés (cas du BPS et BPF, par exemple) ou déjà décrits (cas du DDE, par exemple) dans la littérature. Suite aux screenings des PE par le test StAZ, outre le cas du DDE, il a été surprenant de constater qu'aucun autre des PE testés n'était capable d'induire d'augmentation significative du score de stéatose sur le modèle du poisson-zèbre, et ce, malgré des études démontrant leur implication dans l'initiation des NAFLD (Tableau S3). Il faut cependant prendre en considération les différences de doses d'expositions (doses fortes/doses environnementales) ou de stades de poisson-zèbre utilisés (larvaire/juvenile/adulte), qui peuvent expliquer les différences entre les études.

L'absorption, la bioaccumulation et la distribution des molécules toxiques dépendent du stade de développement du poisson zèbre. Au stade larvaire de 3 jpf, l'absorption se fait principalement par voie orale et cutanée (van Pomerén et al., 2017). Dans notre test, l'exposition aux molécules a été faite selon une méthode statique, avec ajout de la molécule directement dans l'eau sans renouvellement de milieu pendant 48h. Cependant, on peut se questionner au sujet de la dose réelle d'exposition des larves de poisson-zèbre, pouvant peut-être expliquer les différences d'effets stéatogènes des molécules. Des analyses chimiques par HPLC (chromatographie en phase liquide haute performance), pourraient permettre de connaître de manière fiable la dose d'exposition, ainsi que la dose retrouvée dans le milieu à la fin des 48h d'exposition, ou encore la dose retrouvée directement dans la larve ; ceci devrait ainsi permettre d'établir une corrélation entre la dose nominale d'exposition et les effets observés. Bien que ces expérimentations n'aient pas été présentées, elles ont été entreprises par des collaborateurs du projet en charge des études OMICS haut-débit.

Il est à noter que, chez la larve de poisson-zèbre avant 5 jpf, et donc à un stade où la larve ne se nourrit pas, la source principale de lipides provient du sac vitellin, réservoir de lipides et de nutriments hérités de la mère et nécessaires au développement de l'embryon. Ces lipides sont activement métabolisés dans cet organe avant d'être transportés dans l'organisme et transformés en lipoprotéines dans l'intestin avant le début de l'alimentation. Le poisson-zèbre puise dans cette réserve jusqu'à son épuisement autour de 120hpf, âge auquel la résorption du sac vitellin est atteinte, et observable par une diminution de la quantité de lipides dans la zone viscérale (zone du sac vitellin) (Miyares et al., 2014).

Un **défaut de résorption de ce sac vitellin**, source unique de lipides, implique une rétention des lipides au sein de cette réserve et laisse donc suggérer des perturbations du métabolisme et du transport des lipides. Ce mécanisme a notamment déjà été mis en évidence sur des larves de poisson-zèbre traitées au BPA (Martínez et al., 2020a) et au propyl-parabène (Perugini et al., 2020) où l'absorption des lipides à partir de cette réserve vitelline était diminuée (phénomène qualifié de syndrome de malabsorption du sac vitellin). Au contraire, l'exposition au PFOS diminue la rétention des lipides du sac vitellin suggérant la capacité des larves à utiliser toute l'énergie stockée nécessaire à leur croissance (Martínez et al., 2019b).

Dans certains cas, la rétention des lipides du sac vitellin peut être en partie attribuable à un **retard de croissance** induit par les expositions aux composés toxiques. Par exemple, l'augmentation de l'aire relative du sac vitellin chez des embryons exposés à la TBT a été mise en relation avec le fait que les larves soient de plus petite taille (Martínez et al., 2019a). Ainsi, dans nos études futures, il serait intéressant d'étudier les effets du DDE, mais aussi des autres PE, sur la rétention ou non des lipides au niveau du sac vitellin. Cette notion est notamment à considérer dans le déroulé du test StAZ, puisque une molécule capable d'interférer avec le métabolisme du sac vitellin peut avoir un effet sur la rétention des lipides qui peut se répercuter sur le métabolisme lipidique hépatique.

4. Optimisation et perspectives du StAZ

Le test StAZ mis au point sur une lignée sauvage de poisson-zèbre et optimisé sur la lignée LiBlue nous a permis de cribler les 10 PE du projet et d'identifier la molécule DDE comme molécule capable d'induire la stéatose.

Le but d'un développement d'un tel test est de pouvoir proposer à l'OCDE de nouvelles méthodes standardisées permettant d'évaluer les effets des PE sur le développement des NAFLD. Si le protocole de notre test a été validé en interne dans notre laboratoire et fait actuellement l'objet d'une validation inter-laboratoire, il est important de noter que dans l'état actuel des choses, il n'est pas encore assez avancé pour être proposé à l'OCDE. En effet en ce qui concerne l'utilisation des solvants, l'OCDE recommande une concentration maximale de solvant de 0,1mL/L (0,01%v/v) pour les essais aquatiques (OECD, 2019). Or, dans notre cas, le test StAZ utilise le DMSO comme solvant à une concentration de 0,1%v/v.

En outre, la question du DMSO pose problème dans son utilisation en tant que solvant dans les tests d'évaluation des toxiques. Premièrement, il a été décrit que l'exposition à un stade embryonnaire pendant 48h au DMSO à des concentrations allant jusqu'à 0,1%, affectait l'expression des gènes liés au métabolisme et au développement (Turner et al., 2012). Ensuite, des effets synergiques, additifs ou antagonistes peuvent apparaître entre le solvant et la molécule chimique testée, sous estimant ou sur estimant la toxicité de la molécule. Des effets synergiques ont notamment été montrés sur des embryons de poisson-zèbre exposés au DMSO (0,1%) et au métal vanadium (50ppm), où l'utilisation combinée de ces deux molécules entraînait une plus forte toxicité (développement de malformations), alors que les deux molécules seules n'induisaient pas de toxicité (Kim and Lee, 2021). Enfin, le DMSO a été décrit comme pouvant avoir des propriétés de perturbation endocrinienne. Une étude sur des hépatocytes de saumons exposés au DMSO à 0,1% pendant 48h a montré une augmentation de l'expression des récepteurs aux œstrogènes et de la vitellogenine (biomarqueur de perturbations oestrogéniques chez le poisson) (Mortensen and Arukwe, 2006). Dans ce sens, les récentes lignes directrices de l'OCDE pour les tests de perturbation endocrinienne chez les espèces aquatiques indiquent que les solvants peuvent être un facteur de confusion dans les tests de toxicité aquatique et déconseillent spécifiquement l'utilisation de solvants, à moins que cela ne soit techniquement inévitable. Dans notre cas, du fait de la faible solubilité de certains composés dans l'eau, l'utilisation du DMSO comme solvant de dilution et comme contrôle négatif dans nos expérimentations nous a semblé indispensable mais pourrait être revue à la baisse. L'utilisation d'une concentration moindre en DMSO (0,01%v/v), pourrait ainsi permettre au test StAZ d'être proposé comme test OCDE permettant d'évaluer les nouvelles molécules arrivant sur le marché, pour leur capacité à induire une stéatose hépatique.

Enfin, le manque de protocole standardisé sur le poisson-zèbre permettant d'évaluer les effets des PE dans les maladies métaboliques, nous encourage à proposer notre test StAZ, une fois optimisé et validé, pour évaluer les toxiques pouvant agir comme molécules stéatogènes. De plus, couplé à des études haut-débit comme les études OMICS, il pourrait contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes d'induction de la stéatose.

b. Mode d'action et effets du DDE – Etude de l'expression génique

1. Effet du DDE dans le métabolisme des lipides

L'accumulation de lipides induite dans le développement de la stéatose est généralement due aux dérèglements de plusieurs processus biologiques. Afin de comprendre par quels mécanismes le DDE était capable d'induire l'accumulation excessive de lipides hépatiques sur la larve de poisson-zèbre, une étude à moyenne échelle de l'expression des gènes a été menée en utilisant la technologie microfluidique Fluidigm-Biomark. Ainsi, de nombreux gènes impliqués dans l'homéostasie des lipides ; et notamment ceux intervenant dans l'absorption des AG, la LDN, l'export et l'oxydation des AG ; ont pu être analysés.

Il est à noter que si la plupart des PE sont décrits pour avoir des effets suivant une relation dose/réponse non monotone, dans notre étude la majorité des effets observés ont été mis en évidence de manière significative aux fortes doses de DDE (1 et 10 μ M).

De manière intéressante dans notre étude, certains gènes étudiés ont été montrés comme réprimés, contredisant ce qui est habituellement décrit dans le cadre de la stéatose. C'est par exemple le cas des gènes codant pour les **transporteurs Fabp10a, Fabp1 ou encore Cd36**, responsables du transport intracellulaire ou de l'entrée des AG dans la cellule (Figure 6a de l'article). Cela peut être vu comme un mécanisme de compensation permettant de limiter l'entrée d'AG et ainsi prévenir leur accumulation. L'expression du gène ***dgat1***, codant pour l'enzyme impliquée dans la dernière étape de synthèse des TG est également diminuée dans notre étude, et cela, malgré le fait que le DDE induise une augmentation des lipides neutres hépatiques (TG et esters de cholestérol), démontrée grâce au test StAZ. Des expériences supplémentaires seraient donc nécessaires pour étudier l'expression protéique et l'activité de Dgat afin de pouvoir conclure quant à son implication (mise en évidence d'une réelle diminution d'activité). De plus, ***DGAT*** existe sous deux isoformes et il semblerait que l'isoforme ***DGAT1*** oriente plutôt vers la formation de TG empaquetés dans les VLDL, alors que ***DGAT2*** produisent des TG stockés dans les GL (Alves-Bezerra and Cohen, 2017; Rui, 2014). Ainsi, cette diminution significative de l'expression de ***dgat1*** serait cohérente avec la diminution observée (non significative) de la plupart des gènes liés à l'export des TG dans les VLDL (***apob, apoa2, mtpp***) (Figure 34a). Alors que, même si les résultats ne sont pas significatifs, une augmentation de ***dgat2*** semble induite par le DDE à 10 μ M et pourrait expliquer l'augmentation des TG (Figure 34b).

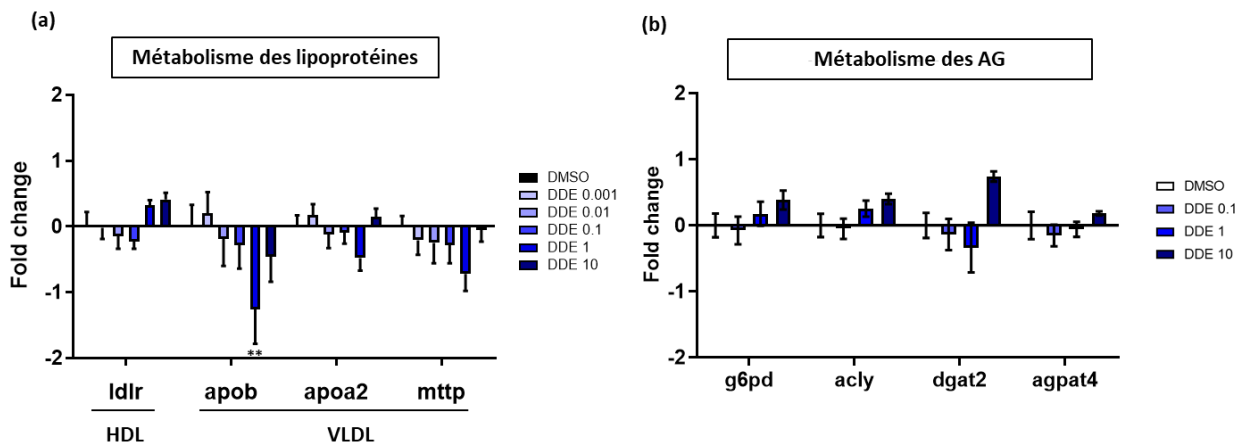


Figure 34 : Effets du DDE sur l'expression des ARNm des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides caractéristiques de la stéatose. Des larves de poisson-zèbre ont été exposées au DDE (0,1 , 1 et 10 μ M) pendant 48h, de 3 à 5 jpf. L'expression de l'ARNm, évaluée par RT-qPCR, des gènes liés au métabolisme des lipoprotéines (a) et des AG (b) est présentée. Les données sont exprimées par rapport aux niveaux d'ARNm mesurés dans les larves témoins DMSO, fixés à 0 (variation log 2 fois). Les valeurs sont la moyenne \pm SEM (n= 7-9).

sreb1 (orthologue de *SREBP-1c* chez l'homme) est l'un des principaux facteurs de transcription impliqué dans la synthèse des AG *via* la LDN. Dans notre étude, la diminution de son expression peut expliquer l'absence de régulation de ses gènes cibles impliqués dans la LDN, tels que *fasn* (orthologue de *FAS*), *acaca* (orthologue de l'*ACC*) et *elov16* (Figure 35a). Enfin, si ces dérégulations laissent suggérer une action du DDE dans la diminution de la synthèse d'AG, il faut cependant rappeler la forte accumulation de TG mis en évidence par le test StAZ. Ainsi, on pourrait plutôt suggérer que la diminution des niveaux transcriptionnels de *sreb1* puisse constituer un mécanisme d'adaptation compensatoire permettant de contrer l'accumulation de lipides induite par le DDE, suite à la forte accumulation de TG.

Si dans notre étude, le DDE diminue significativement l'expression de *sreb1*, on sait également que d'autres facteurs de transcription sont impliqués dans l'activation de la LDN, comme ChREBP et C/EBP α . Par exemple, l'augmentation protéique de C/ebp α et de Ppar γ ont été mises en évidence chez le poisson-zèbre exposé de 6hpf à 120hpf au BPA (200 μ g/L) en lien avec l'augmentation de l'expression concomitante des gènes *fasn*, *acc* (Sun et al., 2020). Dans ce sens, nous avons observé que le DDE à 1 et 10 μ M induisait une augmentation significative des gènes *cebpa* et *chrebp* codant pour ces facteurs de transcriptions, pouvant expliquer l'augmentation de la LDN malgré l'inhibition de *sreb1* (Figure 35b). L'augmentation des niveaux de ChREBP dans les NAFLD a été proposé comme un mécanisme de défense potentiel, qui certes, augmenterait la LDN mais protégerait le foie des lésions hépatiques (notamment de l'augmentation des taux de cholestérol lipotoxique) et de la progression vers la NASH (Zhang et al., 2017). Ainsi, même si SREBP-1 est considéré comme le principal régulateur de la LDN dans les NAFLD, on pourrait considérer dans notre cas que l'activation de ChREBP pourrait être moins préjudiciable que celle de SREBP-1c.

Il a également été décrit que l'inhibition de SREBP-1c pouvait induire une augmentation compensatoire des niveaux de SREBP-2 (Liang et al., 2002). Dans notre étude, cette activation compensatoire de *sreb2* n'a pas été mise en évidence sous l'effet DDE (Figure 35b).

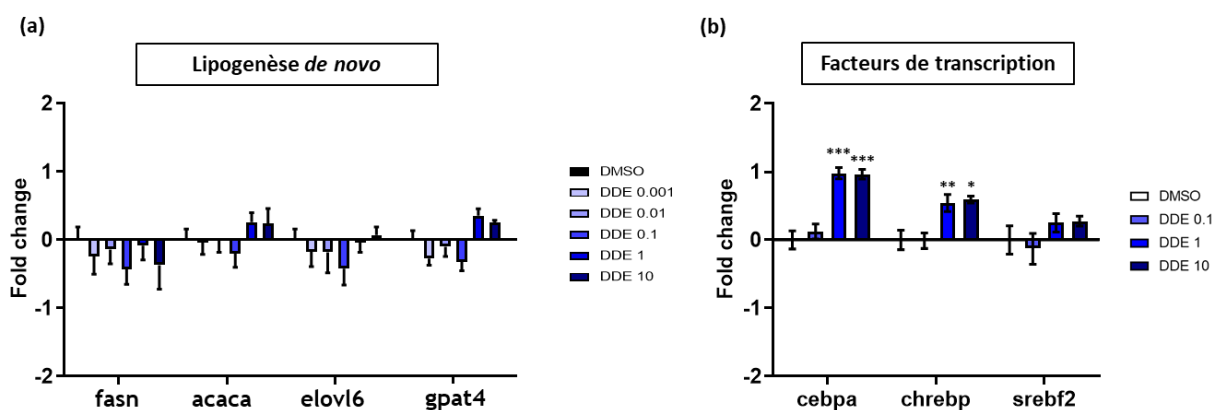


Figure 35: Effet du DDE sur l'expression des ARNm des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides. Des larves de poisson-zèbre ont été exposées au DDE (de 1nM à 10 μ M) pendant 48h, de 3 à 5 jpf. L'expression de l'ARNm, évaluée par RT-qPCR, des gènes liés à la lipogénèse *de novo* (a) et aux facteurs de transcriptions (b) est présentée. Les données sont exprimées par rapport aux niveaux d'ARNm mesurés dans les larves témoins DMSO, fixés à 0 (variation log 2 fois). Les valeurs sont la moyenne \pm SEM (n=7-9). * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, par comparaison avec le groupe témoin en utilisant ANOVA et le test de Dunnett.

Au total, l'étude par la technologie Fluidigm, de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides, a permis une analyse mécanistique ciblée en se focalisant sur les gènes particulièrement décrits dans la littérature pour être dérégulés dans le cadre de la stéatose. Notre approche mécanistique s'est limitée à regarder l'expression des principaux facteurs de transcription régulant le métabolisme des lipides mais nous n'avons pas concrètement mesuré quels étaient leurs niveaux d'activité (expérience avec des gènes rapporteurs ou avec des inhibiteurs). Cela doit être envisagé afin de mieux caractériser le mode d'action des PE.

Dans la littérature, les effets du DDE ont déjà été impliqués dans la dérégulation des lipides hépatiques (Olsvik and Sjøfteland, 2018; Rodríguez-Alcalá et al., 2015), la perturbation de la balance redox associée à des dommages oxydatifs (Elmore and La Merrill, 2019; Migliaccio et al., 2019; Morales-Prieto et al., 2018), des dysfonctions mitochondriales (Liu et al., 2017; Morales-Prieto et al., 2018) ainsi que la dérégulation de l'adipogénèse (Cano-Sancho et al., 2017; Pestana et al., 2017). Dans ce contexte d'induction de la stéatose par le DDE sur des larves de poisson-zèbre, des études sans a priori seraient nécessaires, comme des analyses transcriptomiques pour mettre en évidence la régulation de voies de signalisation permettant d'analyser toutes les voies de signalisation et de mettre en évidence de nouveaux mécanismes par lesquels le DDE induirait le développement des NAFLD.

2. Effet du DDE dans l'inflammation

Lorsque les GL s'accumulent dans le foie, une série de troubles fonctionnels des organites peuvent se produire en raison de la lipotoxicité de certains lipides, tels que le dysfonctionnement mitochondrial et le stress du RE, favorisant par la suite le stress oxydant et la production de métabolites pro-inflammatoires (Deng et al., 2022; Geng et al., 2021; Hughey et al., 2022).

Dans la perspective d'étudier l'inflammation pouvant être induite par le DDE et ainsi, initier la transition vers les stades NASH, quelques gènes impliqués dans les processus pro-inflammatoires ont été analysés. L'exposition au DDE à 1 et 10 μM a significativement induit une forte augmentation au niveau transcriptionnel des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β (Figure 6d de l'article), ainsi qu'une légère augmentation de l'IL-6 et du TGF- β (Figure 36a). De plus, aux fortes concentrations de DDE, le facteur de transcription NF-kB est également induit (Figure 36b), suggérant que, en plus d'induire l'apparition des NAFLD, le DDE pourrait favoriser le développement d'une inflammation hépatique.

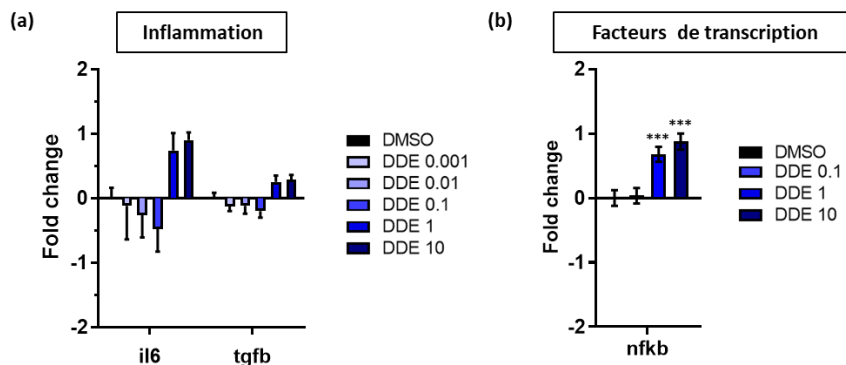


Figure 36: Effet du DDE sur l'expression des ARNm des gènes impliqués dans l'inflammation. Des larves de poisson-zèbre ont été exposées au DDE (de 1 nM à 10 μM) pendant 48h, de 3 à 5 jpf. L'expression de l'ARNm, évaluée par RT-qPCR, des gènes liés à l'inflammation (a) et du facteur de transcription *nfkb* (b) est présentée. Les données sont exprimées par rapport aux niveaux d'ARNm mesurés dans les larves témoins DMSO, fixés à 0 (variation log 2 fois). Les valeurs sont la moyenne \pm SEM (n=7-9). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, par comparaison avec le groupe témoin en utilisant ANOVA et le test de Dunnett.

c. Implication de SCD1 dans la stéatose

Dans notre étude, nous avons montré que la stéatose induite par le DDE sur la larve de poisson-zèbre pouvait en partie être médiée par la désaturase *Scd1*. En effet, en inhibant son activité avec le A93957, l'accumulation de lipides hépatiques mise en évidence avec le test StAZ était significativement réduite (Figure 9 de l'article).

Présente sous 5 isoformes, la SCD1 est exprimée de manière ubiquitaire, mais fortement induite dans le foie et le cœur après une alimentation riche en glucides. Cette enzyme catalyse la synthèse d'AGMI (principalement d'acide palmitoléique et d'acide oléique, à savoir les plus abondants des AGMI) à partir d'AGS. Par la suite, ces AGMI servent à la synthèse de TG, d'esters de cholestérol et de phospholipides. Cette enzyme est notamment co-localisée à la membrane du RE avec l'enzyme DGAT qui est également nécessaire à la synthèse de TG. Dans notre étude, la forte augmentation d'expression du gène *scd1* serait donc en partie responsable de l'augmentation de la synthèse de TG hépatiques mise en évidence par coloration Nile Red.

SCD1 est connue pour être principalement régulée par SREBP-1c ; cependant l'expression de ce dernier est fortement diminuée par le DDE dans nos conditions expérimentales. Toutefois, SCD1 peut également être régulée par les récepteurs nucléaires tels que LXR, PPAR α ou encore PXR (López-Velázquez et al., 2012). Dans notre étude, l'expression du gène codant pour Pxr est

augmentée de manière significative par le DDE, suggérant qu'il pourrait être responsable de l'induction de *scd1*, bien que ceci reste à tester. Il pourrait ainsi être intéressant d'inhiber son activité (par l'utilisation d'antagoniste ou d'un KO par exemple) et de voir si cela a un effet sur l'activité de *Scd1* et sur l'accumulation de lipides hépatiques. De plus, *Pxr* a déjà été décrit comme étant impliqué dans l'augmentation de la synthèse de TG (Zhou et al., 2008) et l'inhibition de ce récepteur a déjà été proposée comme potentiel traitement dans les NAFLD (Sookoian et al., 2010).

Enfin pour appuyer le rôle prépondérant de SCD1 dans la pathogénèse des NAFLD, il est également important de rappeler qu'un traitement inhibant spécifiquement son activité a été décrit pour améliorer les NAFLD. En effet, des essais de phase 3 sont en cours sur l' *Aramchol™*, un conjugué d'acide arachidonique et cholique inhibant SCD1 (Lanthier, 2020). Cette molécule a amélioré la steatohépatite et la fibrose chez les rongeurs et réduit la stéatose dans un essai clinique précoce (Safadi et al., 2014). Les résultats de la phase 2b, publiés en 2021, rapportent une réduction de la stéatose hépatique associée à une résolution de la NASH avec amélioration de la fibrose (Ratziu et al., 2021). SCD1 étant une enzyme impliquée dans la LDN, il s'agit, dans ce cas, d'une approche visant à traiter la NASH en ciblant un des mécanismes pouvant mener à la stéatose. Ce même genre d'approche est également réalisé avec le GS-0976 et le PF-05221304, inhibiteurs d'une autre enzyme de la LDN, l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) (Guirguis et al., 2021; Lanthier, 2020).

Néanmoins, il a également été décrit que SCD1 pourrait agir comme un facteur de protection en retardant l'évolution des NAFLD. En effet, comme mentionné précédemment, la conversion des AGS en AGMI par SCD1, semblerait protéger de la lipotoxicité des AGS (Benhamed et al., 2012). En accord avec cela, une étude a montré que l'inhibition pharmacologique spécifique de SCD1 sensibilisait les cellules à l'apoptose, du fait de l'accumulation d'AGS (Li et al., 2009). Ainsi, une augmentation de l'activité de SCD1 pourrait, malgré tout, être protectrice dans le cas d'une surcharge en AGS lipotoxiques, en favorisant leur conversion en AGMI et leur stockage. De même, malgré la prévention de la stéatose, les souris SCD1-KO, atteintes de NASH induite par un régime déficient en méthionine et en choline, présentent une augmentation de la fibrose hépatique et de l'apoptose des hépatocytes (Ducheix et al., 2016). Le résultat final de l'inhibition de SCD1 pourrait donc mener à une aggravation de la NASH due à l'accumulation intracellulaire d'AGS cytotoxiques.

Ainsi, il est suggéré que SCD1 est augmentée dans un contexte d'initiation de la stéatose pour contribuer à l'augmentation de la synthèse d'AG, mais que son activité est par la suite diminuée, entraînant une augmentation significative des niveaux d'AGS hépatiques lipotoxiques, favorisant ainsi la progression de la stéatose vers la steatohépatite (Li et al., 2009). Il serait intéressant de suivre son activité et d'évaluer son rôle dans cette transition pathologique sur le modèle de poisson-zèbre exposé au DDE.

d. Remodelage membranaire

Le remodelage membranaire peut être caractérisé comme une modification des caractéristiques des radeaux lipidiques et/ou l'altération de la fluidité membranaire. Ce phénomène a déjà été bien décrit dans notre équipe comme un mécanisme d'hépatotoxicité induit par l'exposition à des produits chimiques (B[a]P et éthanol), sur des modèles *in vitro* et *in vivo* (Collin et al., 2014;

Nourissat et al., 2008; Podechard et al., 2017; Tekpli et al., 2012). De plus, le remodelage membranaire a également été récemment proposé comme participant à la pathogénèse des NAFLD (Hall et al., 2017; Imran et al., 2018). Cette dernière étude issue de notre laboratoire a ainsi démontré sur le modèle de larves de poisson-zèbre stéatosées (induite par une régime HFD), que la co-exposition au B[a]P et à l'éthanol altérait de manière significative les propriétés des membranes hépatiques, et ce, en augmentant l'ordre membranaire et en altérant la distribution spatiale des radeaux lipidiques.

C'est pourquoi, dans notre étude, nous avons exploré l'implication *in vivo* du remodelage membranaire, et plus particulièrement de la fluidité membranaire dans le développement de la stéatose induite par le DDE. En outre, le rôle de SCD1 dans la balance AGS/AGI nous a également suggéré un effet du DDE sur le remodelage membranaire. De manière contradictoire avec ce qui est décrit dans la littérature dans le cadre des NAFLD⁸, nous avons démontré que le DDE était capable de diminuer l'ordre membranaire au niveau des cellules hépatiques, témoignant d'une augmentation de la fluidité membranaire hépatique. Si le rôle de SCD1 dans cet effet a été discuté dans l'article, nous cherchons également d'autres voies impliquées dans ce remodelage membranaire.

1. Origine du remodelage membranaire

Le remodelage membranaire dépend en grande partie de la composition des membranes en lipides. Des études métabolomiques pourraient, notamment, nous permettre d'étudier en détail cette composition et nous informer d'un possible enrichissement ou appauvrissement en certains lipides spécifiques chez la larve de poisson-zèbre à 5jpf exposée au DDE. Leurs caractérisations pourraient nous permettre de confirmer l'augmentation de la fluidité membranaire induite par le DDE, à travers les modifications de la balance AGI/AGS liées à SCD1. De plus, la teneur exacte en cholestérol ou en céramide, pourrait nous renseigner sur d'autres mécanismes potentiels dépendant du remodelage membranaire et impliqués dans le développement et la progression des NAFLD.

Notre équipe a précédemment décrit que la fluidité membranaire pouvait être induite par l'inhibition de la synthèse de cholestérol *via* la diminution de l'activité de l'HMG-CoA réductase (Tekpli et al., 2010). En effet, si le cholestérol assure une rigidification des membranes lipidiques, la diminution de sa synthèse favorise leur fluidification. Dans notre contexte d'étude, l'exposition au DDE des larves de poisson-zèbre induit une inhibition de l'expression de l'*hmgcr* (Figure 6b de l'article) et une augmentation de la fluidité membranaire (Figure 8 de l'article). Cela suggère une diminution de la synthèse de cholestérol qui pourrait être responsable de la fluidification des membranes par appauvrissement en cholestérol. Il serait intéressant de confirmer cette hypothèse en évaluant les niveaux de cholestérol dans les larves, en particulier au niveau

⁸ L'obésité et les désordres métaboliques sont généralement associés à une diminution de la fluidité membranaire avec un enrichissement en AG saturés (Gianfrancesco et al., 2018).

membranaire. Si cette inhibition de synthèse est confirmée, il pourrait donc être intéressant d'augmenter sa synthèse ou son apport, pour potentiellement contrecarrer la fluidification induite par le DDE et également déduire les conséquences de cet effet du DDE sur les membranes. Cette altération de synthèse du cholestérol a notamment été décrite comme pouvant être médiée par le récepteur AhR et par la production d'ERO dans le cas d'une exposition au xénobiotique B[a]P (Tekpli et al., 2012, 2010). L'augmentation des ERO en particulier, induite une augmentation de la peroxydation lipidique, participe à l'augmentation de la fluidité membranaire et au regroupement des radeaux lipidiques (Aliche-Djoudi et al., 2013; Podechard et al., 2017). La diminution d'expression de l'HMG-CoA réductase pourrait également faire intervenir une diminution de l'expression de LXR et de SREBP1c (Tekpli et al., 2012, 2010). Afin de déterminer l'origine du remodelage membranaire sur le modèle de poisson-zèbre dans nos conditions expérimentales, il serait donc intéressant d'étudier à l'avenir l'impact d'AhR, de LXR ou SREBP1c et de la production des ERO.

Par ailleurs, il a été mis en évidence par notre équipe que le remodelage membranaire pouvait être induit par une augmentation de la teneur en céramides au sein des membranes et mener à l'agrégation des radeaux lipidiques puis à des dommages hépatiques (Rebillard et al., 2007). Dans notre cas, le DDE a fortement induit l'expression de deux gènes codant pour l'enzyme sphingomyélinase (*smpd1* et *smpd13*), conduisant à émettre l'hypothèse d'une augmentation de la synthèse des céramides et d'une possible agrégation des radeaux lipidiques. Définis par un ordre membranaire élevé, la distribution spatiale et l'agrégation des radeaux lipidiques peuvent être mises en évidence par l'utilisation de la sonde di-4-ANEPPDHQ et observées par microscopie confocale en s'intéressant spécifiquement aux différentes régions de la membrane plasmique. Les zones membranaires avec une forte valeur GP reflètent ainsi des niveaux élevés de regroupement de ces radeaux lipidiques (Imran et al., 2018).

2. Conséquences du remodelage membranaire sur la stéatose

Du fait de la fluidification induite par le DDE au sein des membranes hépatiques, il serait intéressant d'étudier le rôle de ce remodelage membranaire dans le développement de la stéatose ou dans la progression des NAFLD. L'utilisation de stabilisants membranaires tels que l'acide ursodésoxycholique (UDCA) ou le monosialoganglioside GM1, connus pour inhiber la fluidification membranaire (Sergent et al., 2005), pourrait nous permettre d'identifier le rôle spécifique du remodelage membranaire dans l'induction de la stéatose hépatique par le DDE.

3. Conséquences du remodelage membranaire sur l'apoptose

Le remodelage membranaire induit par des toxiques chimiques et impliquant l'agrégation ou la déstructuration des radeaux lipidiques, a été décrit comme étant à l'origine de dommages hépatiques. Notamment, il a été démontré qu'il pouvait déclencher la mort cellulaire apoptotique : par l'activation de NHE-1 *via* une alcalinisation intracellulaire (Tekpli et al., 2012, 2010), par le recrutement de récepteurs de mort (Rebillard et al., 2007), par un stress oxydant *via*

l'activation de la phospholipase C et l'accumulation de fer pro-oxydant (Collin et al., 2014; Nourissat et al., 2008). Comme la mort des hépatocytes est une caractéristique principale de la NASH/TASH (Wahlang et al., 2019, 2013), le remodelage membranaire pourrait donc être proposé comme un mécanisme clé impliqué dans la progression de la NAFLD lors de l'exposition aux PE. Dans notre contexte d'étude, même si l'induction de la mort cellulaire par le DDE n'a pas été étudiée, il serait intéressant de réaliser cette étude, pour pouvoir mettre en lien le remodelage membranaire avec la progression pathologique des NAFLD (cette notion sera notamment développée dans la seconde partie des résultats portant sur le test ShAZ).

4. Conséquences du remodelage membranaire sur l'inflammation

Dans notre étude, nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression des ARNm de plusieurs marqueurs d'inflammation, tels que *il1b*, *il6* et *nfkb* (Figure 36). Cette induction de l'inflammation pourrait être en lien avec un remodelage membranaire. En effet, de nombreuses études ont démontré le rôle des radeaux lipidiques dans l'inflammation associée à la stéatohépatite (Das et al., 2015; Gianfrancesco et al., 2018). La modification des propriétés physicochimiques des membranes hépatiques, notamment l'agrégation des radeaux lipidiques peut entraîner le recrutement et l'activation de protéines spécifiques au sein de ces microdomaines membranaires ; c'est le cas en particulier des récepteurs de type TLRs (TLR 2, 4 et 9) qui favorisent le développement de processus inflammatoires. Cette activation induit la voie NF- κ B, qui se traduit par la production de plusieurs médiateurs inflammatoires comme IL-1 β et IL-6 et TNF- α (Das et al., 2015; Gianfrancesco et al., 2018; Roh et al., 2015; Roh and Seki, 2013). De plus, l'activation de TLR-4 associée au remodelage membranaire pourrait également activer l'inflammasome NLRP3, qui déclenche alors une réponse inflammatoire et fibrogène. Il a également été décrit, au cours des NAFLD, que le remodelage des phospholipides membranaires (par la LPCAT2 et la PLA2) pouvait favoriser le déclenchement de l'inflammation et du stress oxydant, par la production de métabolites pro-inflammatoires (acide arachidonique et éicosanoïdes) (Hall et al., 2017). Comme prédément, il pourrait être pertinent de moduler le remodelage membranaire induit par le DDE et d'en étudier les conséquences sur l'inflammation et la progression vers la NASH.

L'étude de la déstructuration de ces radeaux en bloquant, par exemple, la synthèse des céramides (supposée comme étant augmentée dans notre étude de par la surexpression de la sphingomyélinase), nous permettrait de mettre en lien la diminution de l'agrégation des radeaux lipidiques et leur effet sur l'inflammation. De plus, l'isolement des radeaux lipidiques pourrait nous permettre de caractériser spécifiquement les protéines contenues au sein de ces radeaux ; puis par des méthodes d'inhibition (utilisation de siRNA, par exemple) d'observer les modifications susceptibles d'être impliquées dans la pathogénèse des NAFLD.

II. Développement du test ShAZ (« Steatohepatitis Assay on Zebrafish »)

En plus de participer au développement des NAFLD, les PE seraient également impliqués dans la progression pathologique favorisant la transition de la stéatose vers la stéatohépatite (Joshi-Barve et al., 2015; Wahlang et al., 2019). En effet, de nombreuses molécules, dont les PE, ont précédemment été décrites pour induire des dysfonctions mitochondriales responsables d'un stress oxydant (Cano et al., 2021; Simões et al., 2018). Les PE sont également capables d'induire la mort cellulaire par apoptose en favorisant la synthèse d'AG lipotoxiques, ainsi que de promouvoir un contexte inflammatoire *via* l'infiltration de cellules inflammatoires et l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires (Cano et al., 2021; Chen et al., 2016; Li et al., 2021; Weng et al., 2020; Xu et al., 2013).

Ainsi, toujours dans une optique de proposer de nouvelles stratégies de tests permettant d'identifier et de caractériser les effets des PE dans le développement des NAFLD ; le deuxième objectif de ma thèse était de développer **un second test biologique, sur le modèle du poisson-zèbre, permettant d'évaluer, cette fois-ci, la capacité des PE à induire la transition pathologique de la stéatose vers la stéatohépatite**. Pour cela, nous avons cherché à mettre en évidence 3 critères caractéristiques de la NASH : le **stress oxydant**, la **mort cellulaire** et **l'inflammation**, avec le développement d'un test standardisé, similaire au test StAZ.

Il convient de noter que pour la plupart des PE faisant l'objet du projet Oberon, à défaut d'avoir observé leurs effets stéatogènes grâce au test StAZ, nous avons toutefois cherché à examiner leurs rôles dans la transition pathologique.

i. Description du test ShAZ

Pour le développement de ce second test biologique intitulé « Steatohepatitis Assay on Zebrafish » (ShAZ), le modèle du poisson-zèbre a été à nouveau utilisé mais, cette fois-ci, dans un cadre d'expérimentation animale (stade > 5 jpf).

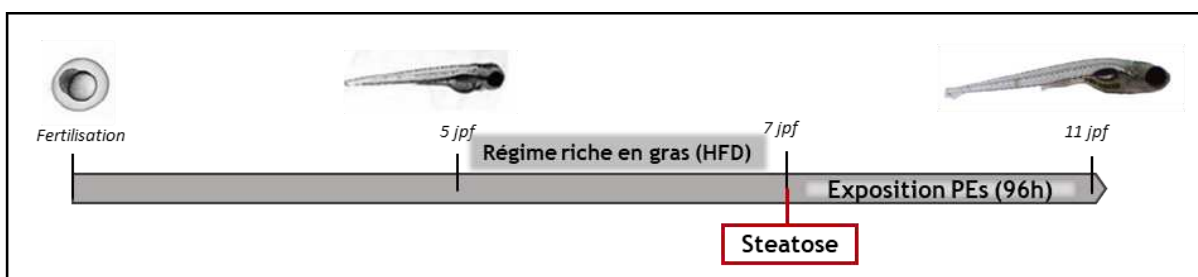


Figure 37 : Design expérimental du protocole ShAZ

La Figure 37 décrit le protocole mis en place pour la réalisation du test ShAZ. Le poisson-zèbre est dans un premier temps nourri avec un régime riche en gras (HFD) à partir de 5 jpf et jusqu'à 7 jpf, dans le but d'induire le développement d'une stéatose hépatique. La larve est ensuite exposée à 7 jpf aux différents PE durant 96h. Dans ce contexte, afin de mettre en évidence la progression pathologique de la stéatose hépatique, la mort cellulaire, le stress oxydant et l'inflammation, ont cherché à être évalués comme critères caractéristiques de la NASH.

ii. Mise au point du test

Préalablement à l'exposition aux PE, la stéatose hépatique a été évaluée chez les larves de poisson-zèbre à 7 jpf après 48h d'alimentation HFD. Ce régime, composé à 50% d'une alimentation dite « standard » et de 50% de jaune d'œuf déshydraté (Sigma-Aldrich, 53% de graisse), a permis d'induire une stéatose sur la larve de poisson-zèbre mise en évidence par une augmentation des lipides hépatiques après coloration des larves au Nile Red (Figure 38).

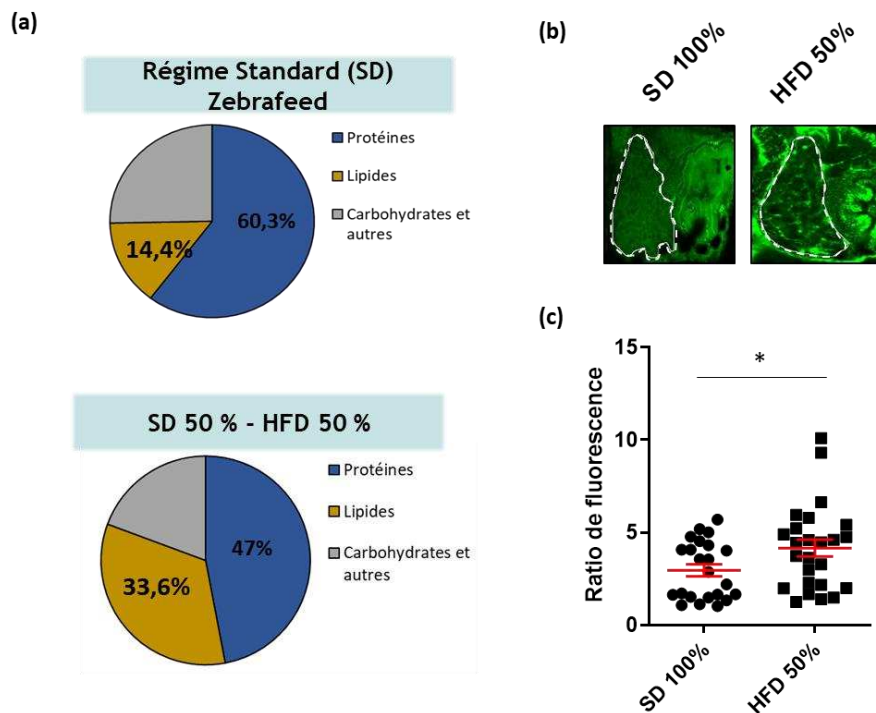
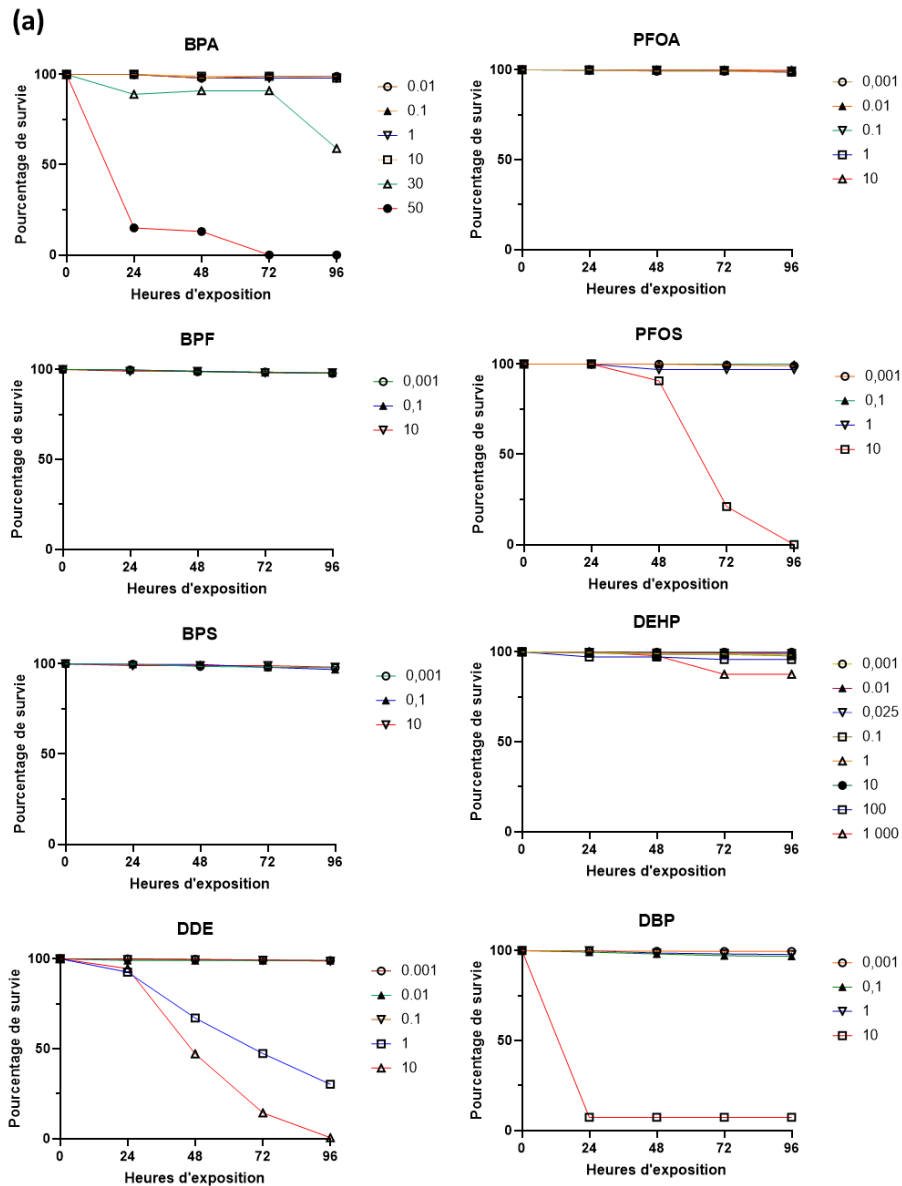


Figure 38: Induction de la stéatose hépatique chez les larves de poisson-zèbre âgées de 7 jpf après 48h d'alimentation avec un régime riche en graisse. (a) Composition exacte des deux régimes dits « standard » (SD) et « riche en graisse » (HFD). Ce dernier est composé de 50% d'alimentation standard (Zebrafeed) et de 50% de jaune d'œuf déshydraté (Sigma-Aldrich) ; (b) Après exposition les larves euthanasiées, fixées, colorées au Nile Red avant acquisition des images par microscopie à fluorescence ; (c) quantification de l'augmentation de fluorescence témoignant de l'accumulation de lipides hépatiques. Les valeurs sont des moyennes +/- SEM (n=25 larves). *P<0,05, par comparaison avec le groupe témoin en utilisant le t-test de Student.

Après confirmation de la stéatose hépatique induite par le régime HFD, la toxicité des différents PE a été évaluée permettant de définir les concentrations non toxiques qui seront utilisées au cours du test ShAZ. Suite à l'exposition des larves stéatosées aux PE (BPA, BPS, BPF, DEHP, DBP, PFOA, PFOS, DDE), à partir de 7 jpf et durant 96h, les différentes concentrations non-toxiques ont pu être définies. Ainsi, dans le but d'utiliser des doses sub-toxiques pour chaque PE tout en restant à des concentrations pertinentes d'une exposition humaine, il a été choisi des doses allant de 1 nM à 10 µM en fonction des molécules (Figure 39).



(b)

PE (µM)	0,001	0,01	0,1	1	10	30	50	100
BPA	Green	Green	Green	Green	Green	Orange	Red	-
BPS	Green	Green	Green	Green	Green	-	-	-
BPF	Green	Green	Green	Green	Green	-	-	-
DEHP	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
DBP	Green	Green	Green	Green	Green	Red	-	-
PFOA	Green	Green	Green	Green	Green	-	-	-
PFOS	Green	Green	Green	Green	Green	Red	-	-
DDE	Green	Green	Green	Green	Green	Orange	Red	-

Figure 39 : Evaluation de la toxicité des PE sur les larves de poisson-zèbre stéatosées à 11 jpf. (a) Effet dose-réponse des PE sur la survie des larves de poisson-zèbre après 96h de traitement. Les larves de poisson-zèbre sont nourries à partir de 5 jpf avec un régime riche en graisse et ont été exposées pendant 96h du 7^{ème} au 11^{ème} jpf aux différents PE: BPA (0,001 ; 0,01 ; 0,1 ; 1 ; 10 ; 30 ; 50 µM) , BPS (0,001 ; 0,1 ; 10 µM) , BPF (0,001 ; 0,1 ; 10 µM), DDE (0,001 ; 0,01 ; 0,1 ; 1 ; 10 µM), PFOA (0,001 ; 0,01 ; 0,1 ; 1 ; 10 µM), PFOS (0,001 ; 0,1 ; 1 ; 10 µM), DEHP (0,001 ; 0,1 ; 0,025 ; 0,1 ; 1 ; 10 ; 100 ; 1000 µM) et DBP (0,001 ; 0,1 ; 1 ; 10 µM). Les données présentées sont la moyenne +/- SEM (n=2-10 batch de 30 larves/conditions). (b) Tableau résumant la toxicité de chaque composé en terme de mortalité : vert 0-10%, jaune 10-30%, orange 30-80%, rouge 100% des larves atteintes. Les lignes en pointillés indiquent les intervalles de concentrations pour chaque composé qui seront testées avec le ShAZ.

Une fois les doses définies, nous avons cherché à évaluer la capacité de ces PE à induire la transition pathologique de la stéatose vers la stéatohépatite en étudiant le stress oxydant, la mort cellulaire et l'inflammation. Pour cela, différentes techniques ont été envisagées et seront décrites par la suite, comme, les études d'expressions géniques, les études histologiques, des techniques biochimiques de dosage, ou encore les techniques d'imagerie par fluorescence. L'objectif final étant de développer un test standardisé utilisant l'imagerie à fluorescence et permettant d'évaluer ces trois critères à la fois, de manière semblable au test StAZ. De la même manière, un « score de stéatohépatite » pourra être établi en prenant en compte ces trois paramètres et permettra de conclure quant à la capacité d'un PE à induire la NASH.

Ainsi, des études préliminaires ont été entreprises, avec notamment l'étude des effets de certaines molécules comme le BPA, le DEHP, ou encore le DDE. Leurs effets dans l'induction de la NASH, ont pu être comparés à ceux de trois contrôles positifs: l'amiodarone à 10 μ M et la thioacétamide (TAA) à 50 mM en condition d'exposition aiguë (4h d'exposition à 11 jpf) ; et la TCDD, à 0,3 nM dans les mêmes conditions d'exposition que les PE (96h à partir de 7 jpf). Ces trois molécules sont en effet connues pour être des inducteurs de stéatose et de stéatohépatite chez l'Homme et/ou dans les modèles *in vivo* (Amali et al., 2006; Verstraelen et al., 2016).

iii. Mise en évidence des dommages hépatiques

Dans un premier temps, la capacité des PE à induire des dommages hépatiques, a pu être évaluée en étudiant, par qRT-PCR, l'expression de gènes reflétant une hépatotoxicité ou, par analyses histologiques, les altérations cellulaires du foie. Même si le critère « hépatotoxique » ne sera pris en compte dans l'évaluation du score de stéatohépatite calculé grâce au ShAZ, ce type d'analyses, permettant d'évaluer le caractère hépatotoxique des PE, nous paraît pertinent dans un premier temps pour confirmer la NASH sur notre modèle de poisson-zèbre, notamment avec le contrôle positif TCDD, et par la suite pouvoir mettre au point notre test.

Les niveaux d'expression de gènes décrits pour refléter une hépatotoxicité tels que *zgc163022*, *tfa* (tous deux liés au métabolisme du fer impliqué dans les lésions hépatiques) ou *crp* (marqueur de la phase aiguë d'atteinte hépatique) ont pu être observés chez des larves stéatosées, exposées durant 96h à différentes concentrations de BPA ou de DEHP (Figure 40). Si le contrôle positif TCDD a induit une augmentation des deux gènes d'hépatotoxicité (*zgc163022* et *tfa*), aucun des deux PE n'a été capable d'induire ces marqueurs ; à l'exception du BPA, pour lequel le gène *tfa*, codant pour la Transferrine α (protéine de transport ferrique), a été significativement surexprimé à toutes les concentrations testées. Il est à noter que la même tendance, bien que non significative, a été observée pour les différentes concentrations de DEHP testées (Figure 40).

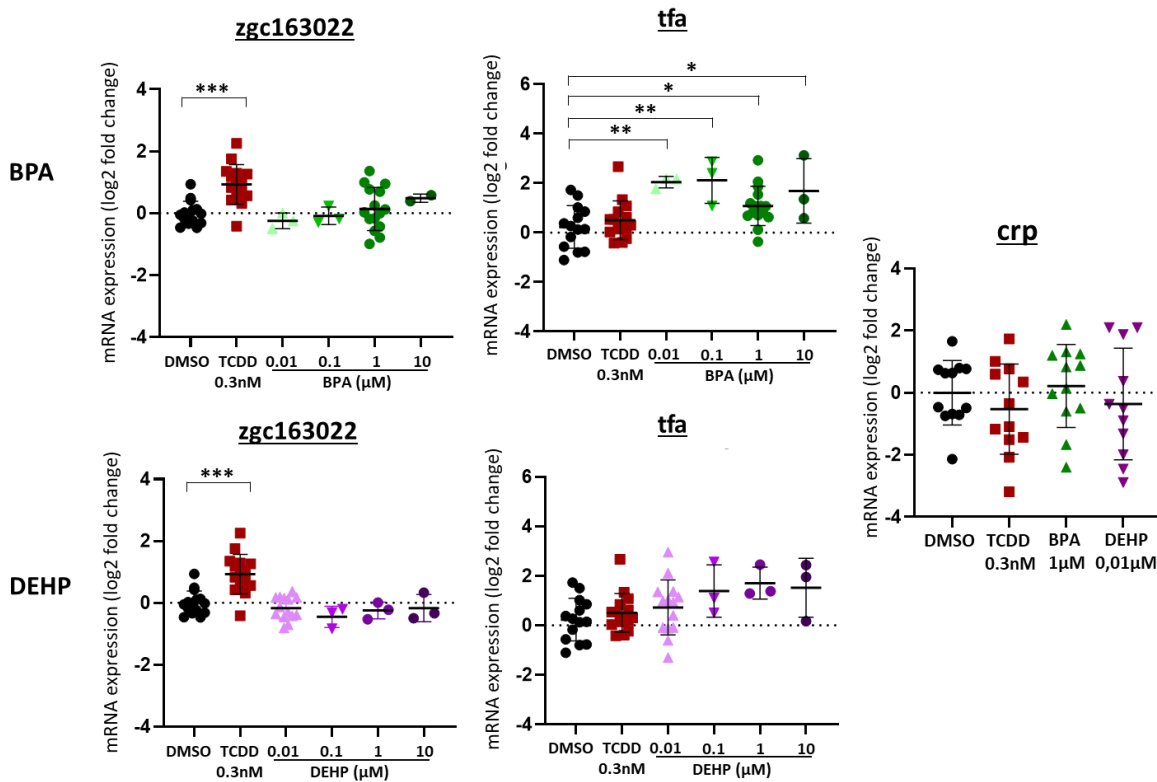


Figure 40 : Effets du BPA et du DEHP sur l'expression des gènes reflétant une hépatotoxicité sur les larves de poisson-zèbre à 11 jpf. Des larves de poisson-zèbre ont été nourries à partir de 5 jpf au régime HFD dans le but d'induire une stéatose, puis ont été exposées à la TCDD (0,3 nM), au BPA (0,01 à 10 μ M), au DEHP (0,01 à 10 μ M) pendant 96h, de 7 à 11 jpf. L'expression de l'ARNm, évaluée par RT-qPCR, des gènes liés à l'hépatotoxicité est présentée. Les données sont exprimées par rapport aux niveaux d'ARNm mesurés dans les larves témoins DMSO, fixés à 0 (variation log 2 fois). Les valeurs sont la moyenne \pm SEM (n=3-15 larves). * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001, par comparaison avec le groupe témoin en utilisant l'ANOVA et le test de Dunnett.

Dans un second temps, toujours dans le but d'étudier les atteintes hépatiques induites par le BPA et le DEHP, nous avons cherché à évaluer les altérations cellulaires du foie après exposition à ces molécules. Pour cela, après exposition des larves de poisson-zèbre stéatosées aux PE et aux contrôles positifs amiodarone, TAA et TCDD, les larves ont été euthanasiées, fixées au PFA 4%, déshydratées, puis incluses en paraffine, d'après les protocoles standards de la plateforme HistoPathology High Precision (H2P2, Rennes, France). Les atteintes hépatiques ont ensuite été évaluées par coloration des coupes histologiques de poisson-zèbre à l'hématoxyline, éosine et safranine (HES) permettant de marquer respectivement les noyaux en violet, le cytoplasme en rose et le collagène en jaune orangé, avant d'être imagées au scanner de lame Nanozoomer NDP (Hamamatsu Photonics K.K., Japan). L'analyse quantitative a été réalisée par comptage des cellules hépatiques altérées pour chacune des conditions. Le terme d'altérations recouvre un ensemble de critères morphologiques tels que la présence de vacuoles, le ballonnement des hépatocytes ou bien encore la présence de lacunes cellulaires (ces critères morphologiques d'altérations hépatiques sont illustrés en Figure 41a).

L'analyse des coupes histologiques a montré que globalement, le BPA et le DEHP entraînaient une augmentation du nombre de cellules altérées dans le foie (d'environ 20-30%) de manière semblable aux contrôles positifs amiodarone, TAA et TCDD (Figure 41b).

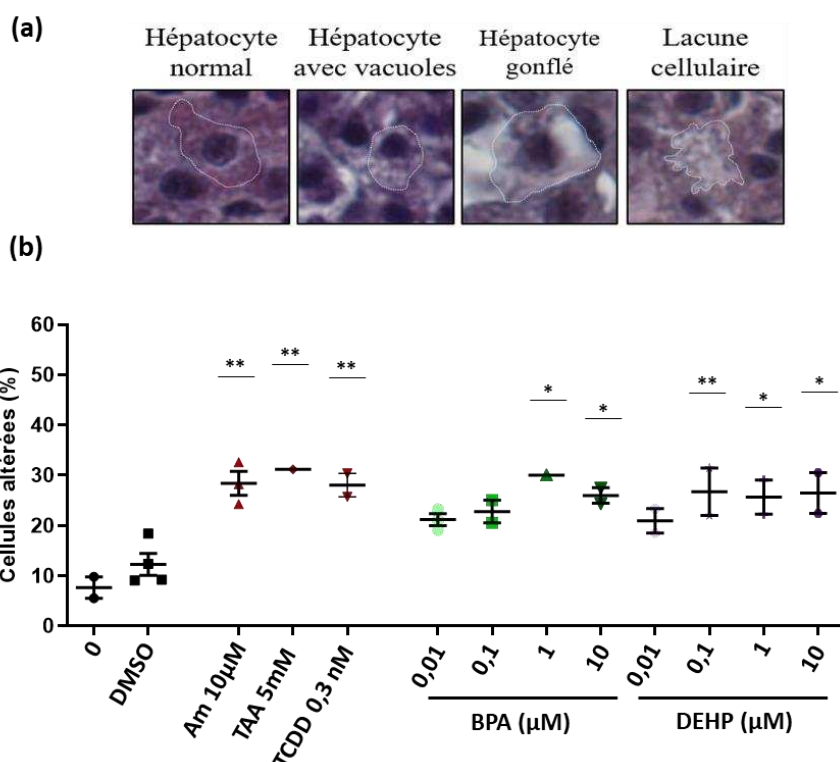


Figure 41 : Quantification des atteintes hépatiques par analyse histologique en coloration HES après exposition des poissons-zèbres aux BPA et au DEHP à 11 jpf. Des larves de poisson-zèbre ont été nourries à partir de 5 jpf au régime HFD dans le but d'induire une stéatose, puis ont été exposées à la TCDD (0,3 nM), au BPA (0,01 à 10 μM) ou au DEHP (0,01 à 10 μM) pendant 96h, de 7 à 11 jpf. Des larves ont également été exposées en aigüe (4h d'exposition), à l'amiodarone (Am) 10 μM et à la TAA 5 mM. Les altérations morphologiques des cellules telles que la présence de vacuoles, de ballonnement ou de lacunes cellulaires, ont été évaluées (a) et quantifiées (b) après marquage HES. Les valeurs sont la moyenne ± SEM (n=2 à 4). * P < 0,05, ** P < 0,01, par comparaison avec le groupe témoin en utilisant l'ANOVA suivi du test non-paramétrique de Kruskal-Wallis.

Dans l'ensemble, bien que ces expériences doivent être reproduites (du fait d'un très petit n, notamment pour les études histologiques), ces résultats semblent suggérer une toxicité hépatique du BPA et du DEHP. Ce type d'estimation histologique des dommages cellulaires est pertinente pour évaluer l'hépatotoxicité, mais pourrait être complétée par le dosage des ASAT/ALAT, marqueurs de souffrances hépatiques pouvant être induites par les PE (Wolf and Wheeler, 2018). Le recours à la microscopie électronique pourrait, de même, nous informer quant aux dommages induits au niveau de la structure membranaire et des organites (absence de crêtes mitochondriales, fusion/fission mitochondriales, présence d'un RE élargi/gonflé, présence d'autophagosomes).

iv. Evaluation du stress oxydant

Par la suite, pour caractériser l'apparition d'un stress oxydant, caractéristique de la NASH, chez les larves de poisson-zèbre exposées aux PE, différentes techniques ont été envisagées, permettant

l'analyse des capacités antioxydantes, de la production des ERO ou des dommages oxydatifs, notamment la peroxydation lipidique. Notre objectif a été, comme précédemment, de valider notre modèle de steatohépatite (induite par la TCDD ou la TAA), en utilisant notamment les études d'expression de gènes, pour pouvoir ensuite développer un test d'imagerie standardisé et adaptable au criblage pour tester les PE d'intérêt.

Evaluation des capacités antioxydantes (par analyse d'expression de gènes ou par dosage enzymatique de protéines)

La NASH est caractérisée par un déséquilibre de la balance redox, résultant d'une production excessive d'ERO et d'un dépassement des capacités des systèmes antioxydants.

La diminution des capacités antioxydantes peut être évaluée en étudiant la régulation de différents gènes impliqués dans cette réponse tels que *NRF2*, *HMOX*, *NQO1*, *SOD*, *CAT* et *GPX*. A titre d'exemple, dans notre étude, la régulation des gènes *nrf2* (un des principaux facteurs de transcription participant à la réponse antioxydante) et de *hmx* (impliqué dans la réponse au stress, notamment médiée par les ERO), a pu être évaluée sur des larves de poisson-zèbre exposées à la TCDD, au BPA et au DEHP. Les résultats, bien qu'encore préliminaires, ont montré que ces PE, dans nos conditions expérimentales, n'induisaient pas de dérégulations significatives de ces deux gènes, comparés au contrôle positif TCDD (Figure 42). Néanmoins, d'autres gènes régulant la réponse au stress, comme ceux cités précédemment, mériteraient d'être étudiés plus en détail.

A l'avenir, les altérations des capacités anti-oxydantes pourraient également être étudiées par la mesure directe de l'activité des enzymes anti-oxydantes. Ainsi le dosage d'enzymes comme la superoxyde dismutase (SOD) et la glutathion S-transférase (GST), ainsi que le dosage des molécules anti-oxydantes non enzymatiques comme le glutathion (GSH), sont couramment utilisées pour témoigner de la dérégulation de la balance redox (Han et al., 2022).

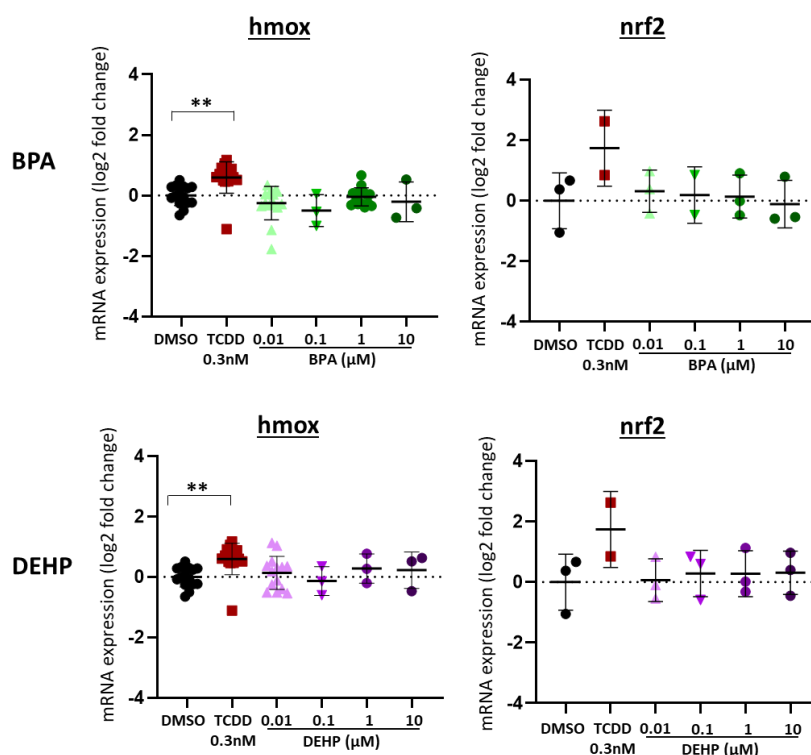


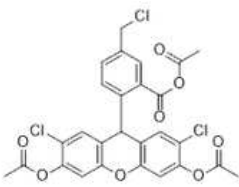
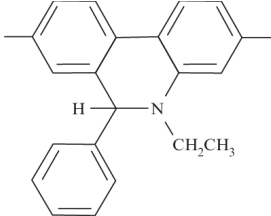
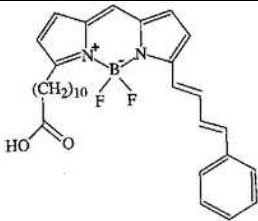
Figure 42 : Effets du BPA et du DEHP sur l'expression des gènes impliqués dans la réponse antioxydante sur les larves de poisson-zèbre à 11 jpf. Des larves de poisson-zèbre ont été nourries à partir de 5 jpf au régime HFD dans le but d'induire une stéatose, puis ont été exposées à la TCDD (0,3 nM), au BPA (0,01 à 10 μ M) ou au DEHP (0,01 à 10 μ M) pendant 96h, de 7 à 11 jpf. L'expression de l'ARNm, évaluée par RT-qPCR, des gènes liés à la réponse antioxydante sont présentées. Les données sont exprimées par rapport aux niveaux d'ARNm mesurés dans les larves témoins DMSO, fixés à 0 (variation log 2 fois). Les valeurs sont la moyenne \pm SEM (n=3-15 larves). ** P < 0,01, par comparaison avec le groupe témoin en utilisant l'ANOVA et le test de Dunnett.

Evaluation du stress oxydant par des techniques de microscopie à fluorescence, pour la mise en évidence des espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Parmi les facteurs pro-oxydants, les ERO produits par la mitochondrie ou par le RE, représentent les principales espèces responsables des dommages oxydatifs. Ces radicaux libres peuvent être mis en évidence par l'utilisation de plusieurs sondes (ci-dessous et Tableau 9). Leur principe général est basé sur le fait qu'elles deviennent fluorescentes lorsqu'elles sont oxydées.

- La sonde **CM-H2DCFDA** (chloromethyl 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate), est clivée par les estérases intracellulaires au niveau des groupements acétates. Par la suite, la sonde peut être oxydée par les ERO présentes dans la cellule ; le produit qui en résulte forme un complexe fluorescent piégé à l'intérieur des cellules.
- La sonde **DHE** (dihydroéthidium) peut être spécifiquement oxydée par différents radicaux libres (l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, l'anion peroxydrite ou encore le Fe(II)) en éthidium fluorescent.
- La sonde **CellRox Deep Red**, pénètre dans les cellules et est oxydée par les ERO, bien que sa formule ne soit pas divulguée, cette molécule semble plus sensible que les précédentes (en particulier sa version **CellROX® Deep Red** qui est celle que nous avons utilisé)

Tableau 9 : Liste non exhaustive des sondes fluorescentes pouvant être utilisées pour étudier le stress oxydant (mise en évidence des ERO ou de la peroxydation lipidique)

Sonde			Structure non connue	
	CM-H₂DCFDA λ_{ex} : 485 nm λ_{em} : 530 nm	DHE λ_{ex} : 518 nm λ_{em} : 605 nm	CellRox Deep Red λ_{ex} : 640 nm λ_{em} : 665 nm	C11-Bodipy581/591 λ_{ex} : 485 nm / λ_{em} : 535 nm λ_{ex} : 595 nm / λ_{em} : 635 nm
Détection	ERO	ERO	ERO	Peroxydation lipidique
Etudes chez le poisson-zèbre	(Tsedensodnom et al., 2013)	(Huang et al., 2020; Li et al., 2022)	(Kulkarni et al., 2022)	(Imran et al., 2022; Podechard et al., 2017)

Evaluation du stress oxydant par des techniques de microscopie à fluorescence, pour la mise en évidence des dommages oxydatifs, notamment de la peroxydation lipidique

Les produits formés au cours de peroxydation lipidique sont classiquement utilisés pour mettre en évidence les dommages oxydatifs. Ces produits, comme le MDA ou le 4-HNE, résultant de l'oxydation des lipides insaturés par les ERO, peuvent s'accumuler au niveau du foie et être analysés par dosage, ou par immunohistochimie (*via* l'utilisation d'anticorps spécifiques, permettant de quantifier leur accumulation), et nous renseigner sur la présence de stress oxydant.

Enfin, les dommages oxydatifs, notamment la peroxydation lipidique, peuvent également être mis en évidence par des techniques de microscopie à fluorescence, comme par exemple, à l'aide de la sonde **C11-Bodipy^{581/591}**. Cette sonde s'incorpore dans les membranes et réagit de manière similaire que les AGPI à la peroxydation lipidique grâce à ses deux doubles liaisons (Tableau 9). La longueur d'onde d'émission de fluorescence de cette molécule passe du rouge au vert en fonction de son degré d'oxydation. Ainsi, après incubation, des larves de poisson-zèbre exposées aux PE, avec cette sonde, la fluorescence peut être mesurée par microscopie confocale, et ce, à deux longueurs d'onde, correspondant à celle de la sonde réduite (λ_{ex} : 595 nm - λ_{em} : 635 nm, en rouge) et à celle de la sonde oxydée (λ_{ex} : 485 nm - λ_{em} : 535 nm, en vert). La peroxydation lipidique est évaluée par le ratio entre ces deux états de la sonde (forme oxydée/forme réduite).

Un test préliminaire a notamment été réalisé sur des larves de poisson-zèbre stéatosées, exposées à partir de 7 jpf pendant 96h à différentes concentrations de DDE et de DEHP. Après coloration au C11-Bodipy et analyse par microscopie confocale, ces expériences n'ont pas permis de mettre en évidence la présence de peroxydation lipidique induite par ces PE. De manière étonnante, des résultats similaires ont été obtenus pour les contrôles positifs testés (TAA, TCDD), malgré le fait qu'ils soient largement décrits dans la littérature pour induire un stress oxydant (Figure 43).

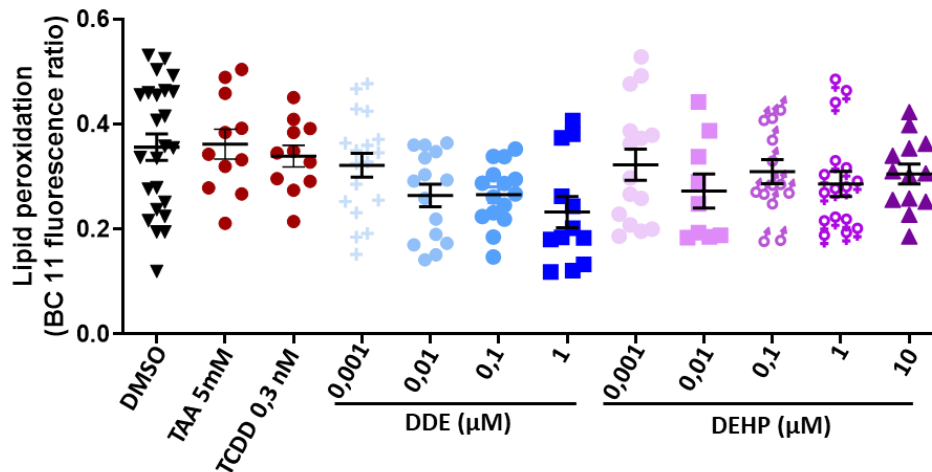


Figure 43 : Mise en évidence de la peroxydation lipidique dans le foie de poisson-zèbre exposé au DDE et au DEHP. Des larves de poisson-zèbre ont été nourries à partir de 5 pf au régime HFD dans le but d'induire une stéatose, puis ont été exposées à la TCDD (0,3 nM), au DDE (0,001 à 1 μ M) ou au DEHP (0,001 à 10 μ M) pendant 96h, de 7 à 11 jpf. Des larves ont également été exposées en conditions aiguës à la TAA (5mM) pendant 4h. Après exposition, les larves ont été euthanasiées, fixées, et colorées au C11-Bodipy avant acquisition des images par microscopie à fluorescence. La quantification de la peroxydation lipidique est calculée sur la base des ratios de fluorescence de la forme oxydée/forme réduite de la sonde. Les valeurs sont des moyennes +/- SEM (n=5-24 larves).

Avec l'objectif de développer un test d'imagerie permettant l'analyse du stress oxydant (que ce soit pour mettre en évidence la production d'ERO ou la peroxydation lipidique), les différents types de sondes précédemment citées, pourraient être testées sur le modèle du poisson-zèbre, dans nos conditions expérimentales d'expositions aux PE. Si pour, nos résultats ne nous permettent pas de trancher pour l'une ou l'autre et de nouvelles expériences seront à réalisées pour aller plus en avant sur l'évaluation du stress oxydant par imagerie.

v. Evaluation de la mort cellulaire

La mort cellulaire par apoptose, peut être mesurée de différentes manières sur la larve de poisson-zèbre : par la détection de cellules à chromatine condensée et fragmentée ou par le dosage de l'activité des caspases effectrices 3/7 entre autres. Si, encore une fois, les techniques d'analyse d'expression de gènes ou histologiques, sont informatives pour la détection des caspases actives et seront utilisées pour valider notre modèle de steatohépatite (induite par la TCDD ou la TAA), l'utilisation de tests d'imageries adaptables au criblage sera préféré pour caractériser l'effet des PE.

Evaluation de l'apoptose par la mise en évidence de cellules à chromatine condensée et fragmentée

La condensation et la fragmentation de la chromatine peuvent être mises en évidence par microscopie à fluorescence après marquage des noyaux à l'aide de la sonde fluorescente **Hoescht 33342** (2'-[4-ethoxyphenyl]-5-[4-methyl-1-piperazinyl]-2,5'bi-1H-benzimidazole trihydrochloride

trihydrate) (Ibarra et al., 2017). Ce colorant de l'ADN, est capable d'entrer dans toutes les cellules et de marquer les noyaux pour rendre compte de leur état de fragmentation. Excité dans l'UV, il émet dans le bleu (λ_{em} 460-490nm), avec une intensité dépendante de l'état de condensation de la chromatine. D'autres colorants fluorescents capables de se lier aux acides nucléiques, comme l'**acridine orange** peuvent également être utilisés (Monaco et al., 2017; Tucker and Lardelli, 2007) (Yabu et al., 2001). Une autre méthode permettant de détecter les cellules apoptotiques, couramment utilisée sur le poisson-zèbre, est la **méthode TUNEL** utilisant le TdT (désoxynucléotidyl transférase terminale) pour mettre en évidence la fragmentation d'ADN (Stoddard et al., 2019).

Evaluation de l'apoptose par l'analyse des caspases effectrices

La mort cellulaire par apoptose peut également être caractérisée en mettant en évidence la caspase 3 clivée, résultant de l'activation de la voie apoptotique⁹. De ce fait, elle peut être identifiée par immunohistochimie (*via* l'utilisation d'anticorps dirigés contre la caspase 3 clivée) pour identifier, par comptage, les cellules en apoptose dans le foie. L'expression du gène *CASP3A*, codant pour la caspase 3 effectrice, peut également, être étudiée pour suggérer l'induction des voies apoptotiques et mettre en évidence la mort cellulaire. A titre d'exemple, des études préliminaires, ont été réalisées sur la régulation de *casp3a* induite par le BPA et le DEHP. Cette étude a permis de confirmer l'effet de la TCDD sur l'induction du gène de la caspase 3, mais n'a pas suggéré de possible induction de l'apoptose par ces PE sur nos larves de poisson-zèbre (Figure 44).

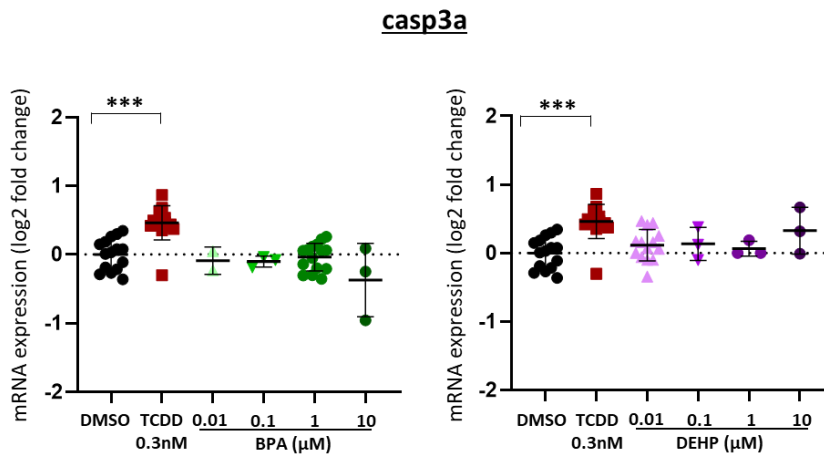


Figure 44: Effets du BPA et du DEHP sur l'expression du gène *casp3a* impliqué dans la mort cellulaire par apoptose sur les larves de poisson-zèbre à 11 jpf. Des larves de poisson-zèbre ont été nourries à partir de 5 jpf au régime HFD dans le but d'induire une stéatose, puis ont été exposées à la TCDD (0,3 nM), au BPA (0,01 à 10 µM) ou au DEHP (0,01 à 10 µM) pendant 96h, de 7 à 11 jpf. L'expression de l'ARNm, évaluée par RT-qPCR, du gène lié à l'apoptose est présentée. Les données sont exprimées par rapport aux niveaux d'ARNm mesurés dans les larves témoins DMSO, fixés à 0 (variation log 2 fois). Les valeurs sont la moyenne \pm SEM (n=3-15 larves). ** P < 0,01, par comparaison avec le groupe témoin en utilisant l'ANOVA et le test de Dunnett.

⁹ Il est à noter que cette caractérisation n'est possible que si la voie apoptotique est dépendante des caspases, l'apoptose caspase-indépendante ne pouvant être évaluée de cette façon.

Enfin, comme pour le stress oxydant, l'utilisation de sondes fluorescentes pourrait permettre de mettre en évidence sur larves entières *in vivo* la présence de cellules en apoptose ou de caspases activées. Les cellules en apoptose subissent une série de changements morphologiques comme la formation de pores dans la membrane, un rétrécissement cellulaire et une condensation suivie d'une fragmentation nucléaire. L'induction de l'apoptose *in vivo* peut être évaluée grâce à la sonde **DEDV-AMC** (acétyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-méthylcoumarine), qui est clivée en AMC (7-amino-4-méthylcoumarine) fluorescent en présence des caspases (Yabu et al., 2001). En parallèle, l'utilisation du **SYTOX Green** peut également permettre de mettre en évidence les cellules en nécrose, type de mort cellulaire également décrite dans le cadre des NAFLD (Stoddard et al., 2019). Des tests préliminaires utilisant la sonde fluorescente **CaspACE™ FITC-VAD-FMK** qui se lie de manière spécifique aux caspases actives n'a pas donné de résultats satisfaisants sur les larves de poisson-zèbre exposées aux contrôles positifs, ainsi qu'aux PE, DEHP et BPA.

Enfin, tirant avantage des nombreuses manipulations génétiques possibles chez le poisson-zèbre, l'utilisation de lignées transgéniques est répandue pour mettre en évidence l'apoptose. Par exemple, il est décrit dans la littérature une lignée de poisson-zèbre génétiquement modifiée par l'ajout d'une construction génique codant pour une forme sécrétée de l'annexine V (A5) et couplée à une protéine fluorescente. Cette lignée permet de marquer les cellules en apoptose sans coloration/marquage « externe », les cellules du poisson produisant elle-même le marqueur. En effet, au cours de l'apoptose, la phosphatidylsérine (PS) est exposée sur le feuillet externe de la bicouche lipidique des membranes plasmiques, sur laquelle l'A5 va venir se fixer spécifiquement. Ce marqueur A5, couplé au fluorochrome YFP et rattaché à un peptide signal de sécrétion (*secA5-YFP*), a montré de bons résultats pour mettre en évidence les cellules en apoptose, comparé à des méthodes traditionnelles (TUNEL, DAPI). Ainsi, l'identification des cellules marquées *secA5-YFP+* par microscopie à fluorescence, permet de quantifier l'apoptose au sein de la larve de poisson-zèbre (van Ham et al., 2010).

Une autre souche transgénique de poisson-zèbre permettant d'évaluer spécifiquement l'activité de la caspase 3 hépatique en utilisant l'imagerie par fluorescence *in vivo* a été récemment développée (Higuchi et al., 2021). Cette lignée exprime la construction « Casper3GR » dans le foie, sous le contrôle du promoteur du gène *pck1* (phosphoénolpyruvate carboxykinase 1). Ce transgène code pour un système de fluorochrome pour le FRET (transfert d'énergie par résonance Förster). Celui-ci est constitué de deux parties fluorescentes : deux protéines fluorescentes (tag-GFP relié à un tag-RFP), reliées par un peptide de séquence DEVD, la séquence substrat de la caspase 3. Lorsque le système est complet et excité, un maximum d'énergie est transféré du tag-GFP au tag-RFP et une émission importante de fluorescence sera observée dans le rouge. A l'inverse, quand le système est séparé, par le clivage spécifique de la séquence DEVD par la caspase 3, il y aura un minimum de transfert d'énergie entre les 2 tags et donc un maximum d'émission de fluorescence verte.

Ainsi, avec l'objectif de développer un test d'imagerie permettant l'analyse de l'apoptose, de nouvelles sondes fluorescentes devront être testées sur le modèle du poisson-zèbre, dans nos conditions expérimentales d'expositions aux PE. Il pourrait également être envisageable d'utiliser les souches transgéniques, listées ci-dessus, pour tester l'effet des PE sur l'induction de l'apoptose.

vi. Evaluation de l'inflammation

L'inflammation induite par les PE est le dernier critère d'évaluation de la NASH que nous cherchons à caractériser. Cette caractéristique peut également être détectée *via* différentes techniques.

Evaluation des marqueurs pro-inflammatoires :

Différents gènes caractéristiques de l'inflammation peuvent être analysés, comme ceux ciblant l'activation des voies de signalisation pro-inflammatoire (*NF-κB*, *JNK*) ; ou ceux codant pour les médiateurs pro-inflammatoires sécrétés, tels que les cytokines et chimiokines, et favorisant le recrutement d'autres cellules de l'inflammation. Une étude a été menée sur des larves exposées au DEHP et au BPA à 11 jpf sur quelques gènes-clés de l'inflammation ; cependant celle-ci n'a montré aucune régulation significative induite par ces PE. Néanmoins, le contrôle positif TCDD induisait de manière significative l'augmentation de l'expression de *tgfb*, d'*il1b*, et une tendance à l'augmentation pour l'expression de *nf-κb*, chez les larves de poisson-zèbre à 11 jpf (Figure 45).

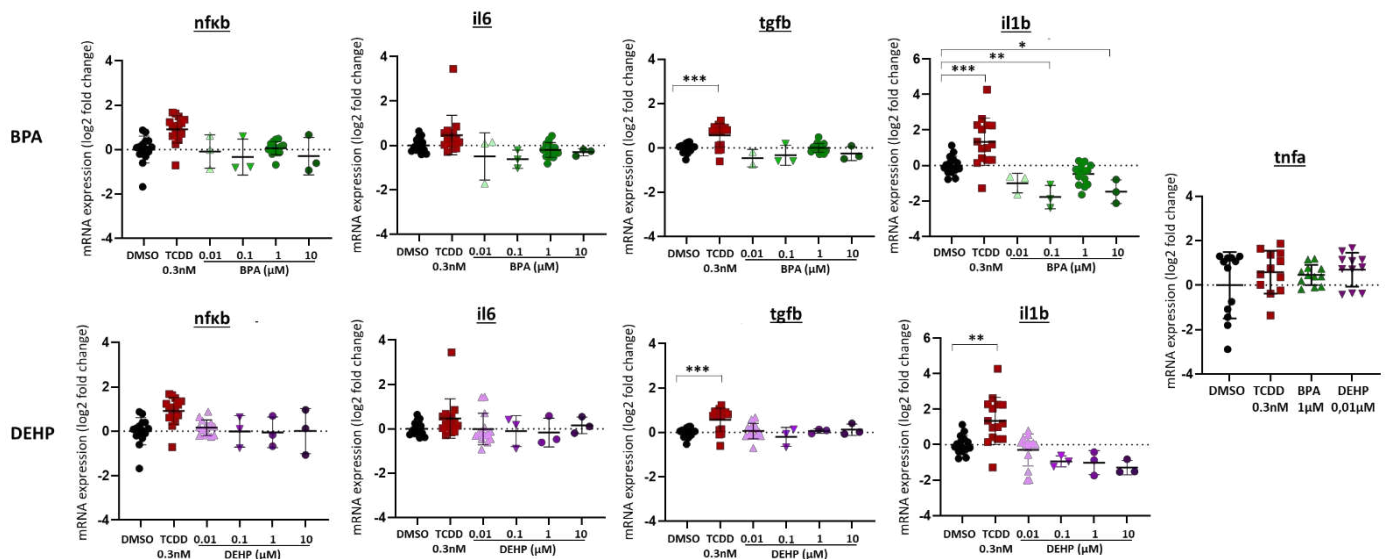


Figure 45 : Effets du BPA et du DEHP sur l'expression des gènes impliqués dans l'inflammation sur les larves de poisson-zèbre à 11 jpf. Des larves de poisson-zèbre ont été nourries à partir de 5 jpf au régime HFD dans le but d'induire une stéatose, puis ont été exposées à la TCDD (0,3 nM), au BPA (0,01 à 10 μM) ou au DEHP (0,01 à 10 μM) pendant 96h, de 7 à 11 jpf. L'expression de l'ARNm, évaluée par RT-qPCR, des gènes liés à l'inflammation est présentée. Les données sont exprimées par rapport aux niveaux d'ARNm mesurés dans les larves témoins DMSO, fixés à 0 (variation log 2 fois). Les valeurs sont la moyenne ± SEM (n=3-15 larves). ** P < 0,01, par comparaison avec le groupe témoin en utilisant l'ANOVA et le test de Dunnett.

Evaluation de l'infiltrat de cellules immunitaires :

Au cours de la NASH, l'inflammation est marquée par le recrutement de cellules immunitaires, telles que les neutrophiles, monocytes, macrophages et lymphocytes au niveau hépatique. Ainsi l'inflammation peut être mise en évidence par histologie en observant les infiltrats de cellules immunitaires par coloration au Rouge Neutre, ou par l'utilisation d'anticorps spécifiques dirigés contre les protéines MPEG ou MPX, marqueurs des macrophages (Shwartz et al., 2019)

Dans la littérature, quelques modèles de poisson-zèbre ont été développés et pourraient être utilisés pour étudier l'inflammation dans la pathogénèse des NAFLD. Notamment, il est décrit des lignées transgéniques exprimant des gènes rapporteurs spécifiques des macrophages et/ou des neutrophiles (transgènes codant pour des protéines fluorescentes sous la dépendance de promoteurs de gènes spécifiques à un type cellulaire). L'utilisation d'un marqueur spécifique des macrophages, MPEG, a permis de développer différentes souches transgéniques, comme la lignée transgénique *tg(mpeg:GFP)*. Celle-ci pourrait notamment permettre de mettre en évidence *in vivo* la dynamique des macrophages par microscopie confocale, lors d'une exposition aux PE sur les larves de poisson-zèbre, dans un contexte de NAFLD (Ellett et al., 2011). La lignée transgénique *tg(mpeg1:mCherryF/tnfa:eGFP-F)*, avec ses doubles marquages, pourrait également être utilisée et donner des informations quant au développement de l'inflammation dans le contexte de la NASH. Celle-ci présente des macrophages fluorescents mais également le tgfb marqué, cytokine principalement synthétisée par les macrophages activés de type M1. Cette lignée a permis, à la fois, de suivre la dynamique et l'activation des macrophages, ainsi que, leur passage en phénotype de type M2, au cours de la résolution de l'inflammation (Nguyen-Chi et al., 2015). Enfin, la lignée transgénique *tg(CETI-PIC3/fabp10:cre)*, combine la capacité d'induire l'expression de cytokines pro-inflammatoires quantifiables, telles que $il1\beta$, $tnf\alpha$ et $ifn\gamma$, et la présence d'un foie fluorescent (Ibrahim et al., 2020; Kulkarni et al., 2022).

Pour conclure sur la **mise au point du test ShAZ**, celle-ci n'a **pas permis d'obtenir un test opérationnel**. Toutefois, des études préliminaires utilisant l'analyse d'expression de gène ou l'analyse histologique, ont été réalisées. Celles-ci ont permis d'observer les effets des contrôles positifs (TCDD et TAA) ainsi que de quelques PE dans l'induction du stress oxydant, de la mort cellulaire et de l'inflammation. Si nos études, notamment par RT-qPCR, ont souligné le rôle de la TCDD dans l'induction de la stéatohépatite (surexpression des gènes impliqués dans la réponse anti-oxydante, dans l'apoptose caspase-dépendante, dans la réponse inflammatoire), **validant ainsi notre modèle de NASH** ; ces mêmes études n'ont pas permis pour le moment de confirmer l'implication des PE dans la progression de cette pathologie. Il est à noter que le temps d'exposition (96h), n'est peut-être pas suffisant pour induire la progression de la NASH, sur notre modèle. Ainsi, cette fenêtre d'exposition pourrait être allongée, au-delà de 11 jpf, pour exposer plus longtemps les larves de poisson-zèbre et appuyer le caractère chronique des expositions. Cependant, si l'étude des régulations d'expressions géniques, les dosages biochimiques ou encore les caractéristiques histologiques sont des techniques informatives, elles ne sont cependant pas compatibles avec la notion de haut-débit que nous recherchons dans le développement du test ShAZ. Ainsi, dans le but de développer un test ShAZ rapide et standardisé, l'utilisation de la microscopie à fluorescence (plus rapide, directe et facilitée par la transparence du modèle), sera préférée avec pour but de pouvoir évaluer les 3 paramètres de la stéatohépatite en même temps (*i.e.* stress oxydant, mort cellulaire, inflammation). Cela nous semble envisageable par l'utilisation de sondes fluorescentes couplée à l'utilisation de lignées transgéniques. Ainsi, en employant les mêmes techniques d'imageries que celles développées pour le test StAZ, nous pourrions envisager le développement d'une méthode d'analyse automatisée pour obtenir *in fine* un test rapide, haut débit et standardisé permettant d'évaluer la progression des NAFLD sous l'effet des PE.

III. Validation inter-laboratoire du test obésogène : « Zebrafish Obesogenic Test »

Comme précisé précédemment, le projet Européen Oberon vise à construire une approche intégrée pour détecter les maladies métaboliques liées à une exposition aux PE. Ainsi il a pour but de développer, d'améliorer et de valider des batteries de test sur modèles *in vitro*, *in vivo* et *in silico*, et ainsi permettre de fournir de nouvelles méthodes standardisées pour évaluer l'effet des PE sur le développement des maladies métaboliques. (Audouze et al., 2020).

Au sein de notre laboratoire, nous nous sommes intéressés au développement de tests permettant d'évaluer les effets de PE dans l'initiation (StAZ) et la progression des NAFLD (ShAZ). Ces tests, développés sur le modèle de la larve de poisson-zèbre, permettent de se rapprocher au plus près des mécanismes intervenant dans la pathologie humaine. Notre premier test développé, le test STAZ, a été optimisé et standardisé en vue d'une validation intra- et inter-laboratoire, qui est actuellement en cours au sein des différents partenaires du projet. Notre second test, le test ShAZ est toujours en cours de développement.

Au sein de ce consortium Oberon, l'équipe du Professeur Babin au laboratoire MRGM de Bordeaux, s'est intéressé aux effets des PE dans le développement d'une autre maladie métabolique, l'obésité. Ainsi, ils ont développé, en 2011, un test biologique d'obésogénécité, intitulé « Zebrafish Obesogenic Test » (ZOT), qui vise à évaluer les propriétés obésogènes des PE en étudiant leur capacité à induire une augmentation d'adiposité dans le poisson-zèbre au stade juvénile (Tingaud-Sequeira et al., 2011). Depuis 2011, le test ZOT a continué d'être optimisé afin d'atteindre un meilleur degré de standardisation et de reproductibilité. Celui-ci a fait l'objet d'une validation inter-laboratoire au sein de notre institut.

i. Contexte

Depuis 2007, le terme de molécule « obésogène » est utilisé pour décrire les toxiques de l'environnement capables de stimuler l'adipogénèse en augmentant la différenciation ainsi que le nombre et la taille des adipocytes, favorisant ainsi le stockage des lipides au sein du tissu adipeux et conduisant au développement de l'obésité (Bernal et al., 2022; Grün and Blumberg, 2007; Heindel et al., 2015). Un certain nombre de produits chimiques obésogènes ont depuis été identifiés, parmi lesquels la plupart sont des PE : le BPA et son substitut le BPS, la TBT ou encore le DEHP, les composés perfluorés PFOA et PFOS et les parabènes (Bernal et al., 2022; Foulds et al., 2017; Griffin et al., 2020; Heindel et al., 2022, 2015; Lustig et al., 2022).

Tout comme pour l'étude des NAFLD, des tests réglementaires standardisés utilisant des organismes entiers sont nécessaire pour détecter les substances agissant comme des obésogènes potentiels. Dans la plupart des tests permettant d'évaluer les propriétés obésogènes des composés, les critères d'évaluation portent sur l'étude de la prolifération des adipocytes. Ces critères ont notamment déjà été évalués sur des modèles *in vivo*, notamment sur le poisson-zèbre (Maradonna and Carnevali, 2018; Riu et al., 2011). Sur ce modèle, il est à noter que, si la différenciation des premiers adipocytes intervient autour de 14 jpf dans la région pancréatique, le tissu adipeux n'est complètement développé que lorsque le poisson atteint une taille comprise

entre 8,8 et 9,5mm, taille normalement atteinte entre 6 et 8 semaines après fécondation (le développement du tissu adipeux étant dépendant de la taille et non pas de l'âge du poisson-zèbre) (Imrie and Sadler, 2010). Les stades juvéniles du poisson-zèbre, stades auxquels le poisson est encore semi-transparent, sont communément utilisés pour les études de la dynamique du tissu adipeux. Ainsi pour les travaux qui suivent, c'est donc ce stade du poisson-zèbre qui a été utilisé pour étudier les effets des PE sur l'adiposité de l'organisme.

Dans ce contexte, le test obésogène, appelé « Zebrafish Obesogenic Test » (ZOT), a été développé par nos partenaires du projet Oberon (Tingaud-Sequeira et al., 2011). Le ZOT consiste à évaluer l'effet induit par une molécule chimique seule, ou en combinaison avec le régime alimentaire, sur la dynamique du tissu adipeux chez le poisson-zèbre à un stade juvénile. Pour cela, des mesures quantitatives d'adiposité sont effectuées avant et après exposition, permettant de statuer sur le caractère obésogène de la molécule. Le ZOT s'est avéré très utile pour caractériser les substances obésogènes ou anti-obésogènes, dont les PE (Lutfi et al., 2017), et leur mécanisme d'action (Ouadah-Boussouf and Babin, 2016). Ce test ZOT a fait l'objet de publications en 2011 et en 2016, mettant en évidence que l'exposition à la TBT, un obésogène reconnu, à des doses supérieures ou égales à 0,05 nM pendant 24h, augmentait l'adiposité des poissons-zèbres juvéniles en comparaison à un contrôle DMSO (Ouadah-Boussouf and Babin, 2016; Tingaud-Sequeira et al., 2011).

Notre objectif a été de reproduire ce test dans le but de valider ces résultats obtenus avec la TBT. Cette étape de validation inter-laboratoire, est nécessaire avant d'envisager une proposition de ce test obésogène à l'OCDE, pour ainsi assurer un meilleur suivi et une identification plus rapide des molécules potentiellement obésogènes.

ii. Mise en place du Zebrafish Obesogenic Test

Le protocole du test ZOT a été mis en place au sein de notre laboratoire et le déroulé du test est présenté en Figure 46. Brièvement, après élevage des larves dans des conditions standardisées, seuls les poissons-zèbres juvéniles d'une longueur standard comprise entre 8,8 et 9,5mm (de la bouche jusqu'à la base de la nageoire) sont sélectionnés pour les expérimentations. Ceux-ci sont ensuite placés individuellement dans des contenants en verre, puis sont nourris une dernière fois ; cette première étape marque le jour 0 du test (J0). Le lendemain (J1), un jour de jeûne est appliqué afin de vider le tractus digestif des aliments, dont la présence pourrait interférer avec le signal de fluorescence du tissu adipeux péri-viscéral. Une première mesure d'adiposité est effectuée sur le poisson-zèbre à jeûne avant exposition à la TBT (J2). Pour cela, chaque poisson est exposé au Nile Red (0,1 µg/ml, 0,25% acétone), anesthésié au 2-phénoxyéthanol (1/2000), puis observé par microscopie à fluorescence. Par la suite, l'intensité de fluorescence verte témoignant de l'adiposité générale du poisson est mesurée, grâce au logiciel ImageJ. Suite à cette première mesure d'adiposité, le poisson-zèbre est exposé au solvant DMSO (0,1%) ou à la TBT (0,5 ou 50 nM) durant 24h à l'obscurité. Après exposition, une deuxième mesure d'adiposité par microscopie à fluorescence est effectuée (J3). Enfin, le pourcentage de variation d'adiposité induite par les molécules (DMSO/TBT) entre J2 et J3 est calculé grâce aux mesures d'intensité de fluorescence globale réalisée à ces temps pour chaque poisson.

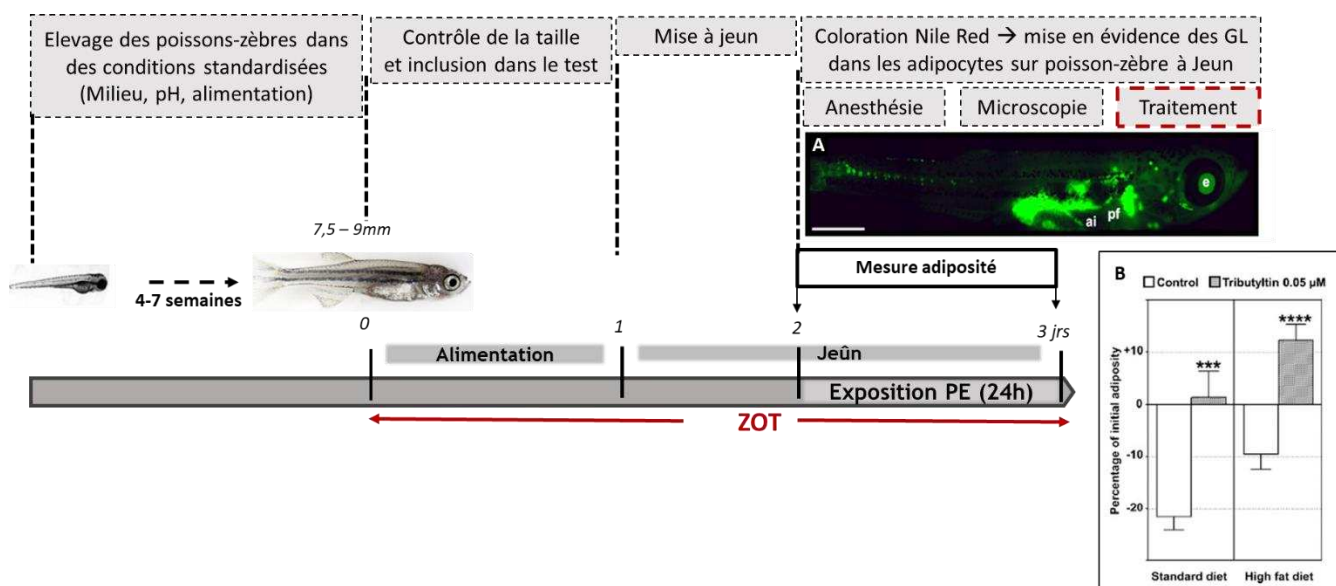


Figure 46 : Schéma présentant le déroulé temporel du test obésogène (ZOT) comportant : l'élevage des poissons-zèbres jusqu'à 6-8 semaines ; l'inclusion dans le test des poissons de taille standard optimale ; l'étape d'alimentation suivie de la mise à jeûn ; et la phase de coloration au Nile Red permettant de mettre en évidence la quantité de lipides au sein des adipocytes par microscopie à fluorescence (Image A). Le caractère obésogène de la TBT est montré sur la Figure B, après analyse quantitative de la fluorescence Nile Red totale des poissons-zèbres exposés au DMSO (0,1%) ou à la TBT 0,05 µM en combinaison avec un régime SD ou HFD. La TBT induit une augmentation d'adiposité quelque soit le régime alimentaire (Issu de Tingaud-Sequeira et al., 2011)

iii. Résultats

Comme pour notre test StAZ, ce test repose sur l'utilisation du colorant Nile Red permettant de mettre en évidence les lipides, mais cette fois-ci dans l'ensemble du corps des poissons-zèbres, y compris dans les adipocytes, pour évaluer l'obésité. Ainsi, en microscopie à fluorescence, suite à l'acquisition d'images de larves entières, l'adiposité générale a été estimée en mesurant l'intensité de fluorescence. Pour chaque condition d'exposition, nous avons évalué la variation d'adiposité induite par 24h de traitement au DMSO ou à la TBT, en prenant une image de chaque larve à jeun pré- et post-traitement et en calculant le pourcentage de variation d'intensité de fluorescence entre les deux.

Nous avons ainsi vérifié si une exposition pendant 24h à la TBT, utilisée à deux doses différentes, induisait une accumulation de lipides dans le tissu adipeux chez les poissons-zèbres juvéniles. Au cours du test ZOT, nous avons observé que les juvéniles en condition contrôle (DMSO 0,1%) avaient perdu en moyenne 13,23% d'adiposité en 24h de traitement. Les juvéniles traités à la TBT à 0,5 nM avaient perdu en moyenne 14,22% d'adiposité, et ceux traités à la TBT à 50 nM, seulement 4,01% d'adiposité en 24h de traitement (Tableau 10). Ainsi, nous avons pu observer que seule l'exposition à la TBT à 50nM entraînait une perte d'adiposité significativement moins important par rapport à celle du DMSO (Figure 47). Au final, ces expériences nous ont permis de reproduire le test ZOT et de retrouver en partie les effets attendus et précédemment décrits d'une exposition à la TBT 50 nM (Ouahad-Boussouf and Babin, 2016).

Tableau 10 : Statistiques descriptives sur la variation d'adiposité mesurée dans le cadre du test ZOT des poissons-zèbres juvéniles exposés pendant 24h au solvant DMSO (0,1%) ou à la TBT (0,5 et 50 nM). Le nombre total de larves exposées et le nombre de pontes utilisées (nombre d'expériences indépendantes d'exposition) sont indiqués.

Condition	Moyenne	SEM	Nombre de larves	Nombre de ponte
DMSO 0,1%	-13,24	2,28	46	8
TBT 0,5 nM	-14,22	1,94	16	3
TBT 50 nM	-4,01	3,22	23	5

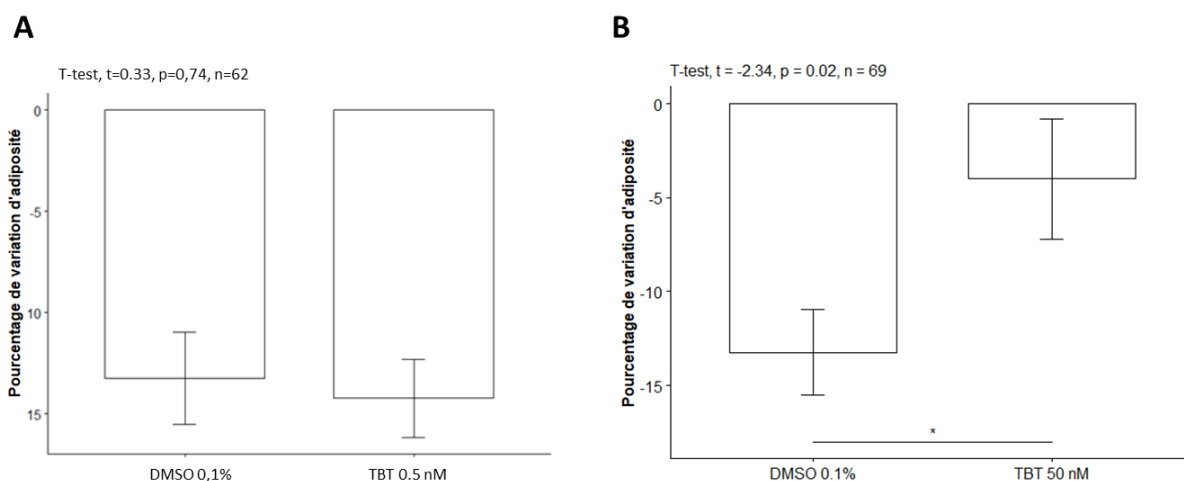


Figure 47 : Pourcentage de variation d'adiposité mesurée grâce au test ZOT chez les poissons-zèbres juvéniles exposés pendant 24h au solvant DMSO (0,1%) ou à la TBT (0,5 et 50 nM) (A, B). Les valeurs sont la moyenne \pm SEM (n=16-46 larves) * P < 0.05, par comparaison avec le groupe témoin en utilisant un t.test de Student

iv. Discussion

En reproduisant le test ZOT, nous avons trouvé qu'une exposition à la TBT à 50 nM pendant 24h à jeûn, limitait la perte d'adiposité normalement observée en condition contrôle chez le poisson-zèbre juvénile. Cependant, nous n'avons pas observé l'augmentation de l'adiposité générale des poissons-zèbres que l'équipe du Pr. Babin avait mise en évidence dans leurs études (Figure 46) (Ouadah-Boussouf and Babin, 2016; Tingaud-Sequeira et al., 2011). En effet, l'exposition à la TBT à 50 nM pendant 24h, avait été décrite pour augmenter l'adiposité de +2% chez les poissons-zèbres juvéniles. Concernant les groupes contrôles exposés au DMSO, nous avons obtenu des résultats du même ordre de grandeur puisqu'ils avaient observé une perte d'adiposité de -20% et -10%, respectivement pour les individus en régime standard (régime qui a été utilisé dans nos expérimentations) et les individus en régime riche en lipides (Ouadah-Boussouf and Babin, 2016; Tingaud-Sequeira et al., 2011). Ainsi, ces premiers résultats encourageants semblent indiquer la possibilité de pouvoir transposer ce test dans un autre laboratoire, malgré de potentielles différences expérimentales affectant la reproductibilité des résultats (comme par exemple, la souche de poisson-zèbre utilisée, la composition de l'alimentation standard, l'appareillage d'acquisition d'images...).

Plusieurs perspectives à ces premiers essais sont envisageables. La première est de tester les autres PE du projet Oberon, connus pour être des obésogènes avérés et pour lesquels il a été observé un effet obésogène par l'équipe de Bordeaux, afin de confirmer ou non ces observations. Ainsi, toujours dans un but de validation inter-laboratoire, l'objectif serait d'amener ce test le plus loin possible dans le processus de validation avant de pouvoir le proposer à l'OCDE. Cependant, comme discuté précédemment pour le test StAZ, l'utilisation du solvant DMSO à 0,1% est supérieure à la concentration maximale de solvant recommandée par l'OCDE pour les essais aquatiques (OECD, 2019). De nouveaux essais sont actuellement en cours dans le laboratoire d'origine du test, pour reproduire le ZOT avec une concentration moindre en DMSO et évaluer les effets des PE sur l'adiposité des poissons-zèbres juvéniles.

D'autre part, il a été observé au cours du test et de l'acquisition d'images en microscopie à fluorescence, que certaines zones d'adipocytes semblaient plus dynamiques que d'autres et reflétaient les variations d'adiposité. En effet, au niveau des adipocytes sous-cutanés à la base de la nageoire anale ou de la queue (mis en évidence dans le carré rouge sur la Figure 48 et 49), il est fréquent d'observer une diminution de taille, voire une disparition totale des adipocytes, chez les poissons contrôles (DMSO) (Figure 48), comparés aux poissons exposés à la TBT (Figure 49). Il serait donc intéressant, par la suite, de cibler l'analyse de ces groupes d'adipocytes isolés. De plus, il est à noter que la mesure d'intensité de fluorescence, qui nous renseigne sur l'adiposité générale du poisson, est très sensible à différents paramètres extrinsèques au test, tels que les réglages lors de l'acquisition d'images en microscopie ou le bruit de fond, et est, de ce fait, moins représentative de l'état global du tissu adipeux. Ainsi, il pourrait être envisagé de mesurer les variations de taille ou d'intensité de fluorescence de ces adipocytes isolés, au cours du test, plutôt que de mesurer la variation d'adiposité totale prise sur larve entière.

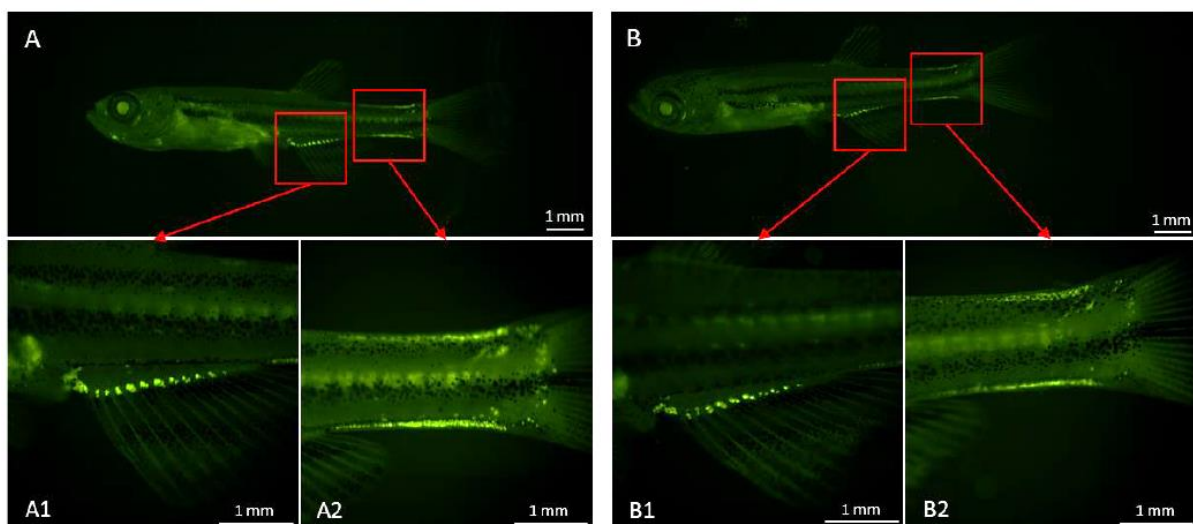


Figure 48 : Images obtenues au microscope à fluorescence au cours du test ZOT sur un poisson-zèbre juvénile avant (A) et après (B) exposition au DMSO (0,1%, condition contrôle) pendant 24h à jeûn. Les encadrés rouges représentent les zooms sur les adipocytes sous-cutanés à la base de la nageoire anale (A1 et B1) et les adipocytes sous-cutanés au niveau de la queue (A2 et B2).

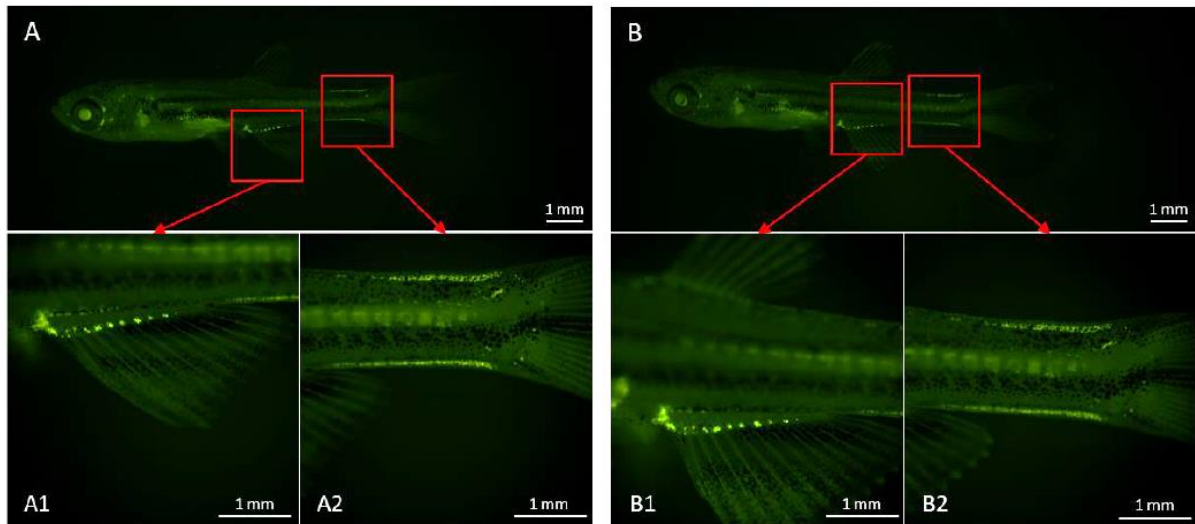


Figure 49 : Images obtenues au microscope à fluorescence au cours du test ZOT sur un poisson-zèbre juvénile avant (A) et après (B) exposition à la TBT (50 nM) pendant 24h à jeûn. Les encadrés rouges représentent les zooms sur les adipocytes sous-cutanés à la base de la nageoire anale (A1 et B1) et les adipocytes sous-cutanés au niveau de la queue (A2 et B2).

PARTIE 4 : DISCUSSION GENERALE ET

CONCLUSION

I. Perspectives concernant l'utilisation des tests StAZ et ShAZ

Au cours de cette thèse, il a été entrepris de développer deux tests biologiques sur modèle *in vivo* (la larve de poisson-zèbre) permettant d'évaluer la capacité des PE à induire l'initiation des NAFLD (1^{er} test), ainsi que leur progression vers le stade pathologique de la NASH (2nd test).

Le **premier test, StAZ**, est actuellement standardisé et optimisé pour être reproduit dans d'autres laboratoires du consortium Oberon, pour permettre d'évaluer les PE agissant comme stéatogènes. Après ajustement de quelques paramètres (notamment de la concentration en solvant DMSO), le test StAZ pourrait donc être suffisamment robuste pour envisager de pouvoir le proposer à l'OCDE, comme test réglementaire pour l'évaluation des PE dans le développement des NAFLD. A l'heure actuelle, ce test a pu être validé en interne au sein de notre laboratoire et est en cours de validation par d'autres laboratoires du consortium Oberon.

De plus, il pourrait être envisagé d'utiliser le StAZ pour évaluer le potentiel stéatogène d'autres PE ou, plus généralement, d'autres toxiques de l'environnement, dont les effets sur les NAFLD ne sont pas encore connus. Il pourrait également être envisagé de tester l'exposition aux PE en combinaison avec le régime HFD, pour observer un éventuel effet potentialisateur dans l'induction de la stéatose. Enfin, pour se rapprocher au plus près d'une exposition humaine, il serait intéressant de tester des mélanges de PE dans l'induction de la stéatose, bien que les analyses mécanistiques soient plus difficilement interprétables concernant ces effets « cocktails ».

Le **second test** développé, le **ShAZ**, vise à mettre en évidence les 3 caractéristiques de la NASH (*i.e.* stress oxydant, mort cellulaire et inflammation). Si celui-ci, beaucoup moins avancé que le premier, est toujours en cours de développement, différentes perspectives sont envisagées. En effet, différentes sondes fluorescentes pourront être utilisées afin de mettre en évidence le stress oxydant (CM-H2DCFDA, DHE, CellRox, C11-Bodipy), la mort cellulaire par apoptose (Hoechst 33342, DEVD-AMC, CaspACE™ FITC-VAD-FMK) ou l'inflammation. Pour le moment, les quelques études préliminaires réalisées n'ont pas été concluantes ; mais cependant, il est possible d'envisager de coupler l'utilisation de sondes fluorescentes avec l'utilisation de lignée transgénique, et ce, pour analyser au sein d'un même test, les 3 critères d'identification de la NASH, ou à défaut au moins 2 de ces caractéristiques. Ainsi, il pourrait être envisagé l'utilisation d'une souche *tg(mpeg:GFP)*, colorée au CellRox Deep red, permettant de caractériser, respectivement, le recrutement de macrophages et la production d'ERO, chez la larve de poisson-zèbre exposée aux PE. Après acquisition de la souche *tg(mpeg:GFP)*, un croisement pourrait être fait avec notre lignée Liblue, favorisant une détection de la zone hépatique (foie fluorescent bleu) et l'identification des macrophages (fluorescents verts) plus aisée, par microscopie confocale. En réalisant d'autres croisements, une combinaison plus complexe pourrait être envisagée, avec :

notre lignée LiBlue, la lignée *tg(mpeg1:mCherryF)*, la lignée (*secA5-YFP*) et une coloration au Cell rox deep red (selon le tableau ci-dessous) ; ce qui permettrait une analyse complète, au niveau du foie, de l'inflammation, de l'apoptose et du stress oxydant sur une même larve.

Tableau 11 : Proposition de combinaison entre souches transgéniques et marquages pour un test ShAZ intégrant l'évaluation simultanée des 3 caractéristiques de la stéatohépatite.

Lignée / Sonde fluorescente	Fluorescence	$\lambda_{\text{émission}}$
LiBlue <i>tg(Fab10 :CFP ;cry :mRFP)</i>	Foie fluorescent bleu	450/480 nm
<i>tg(mpeg1:mCherryF)</i>	Macrophages fluorescents rouges	587/610 nm
<i>tg (secA5-YFP)</i>	Cellules apoptotiques fluorescentes jaunes	512/610 nm
Cell rox deep red	ERO fluorescentes rouges (lointain)	644/665 nm

De plus, en utilisant les mêmes approches techniques et analytiques que le premier test, le but serait de développer un test ShAZ simple, rapide et standardisé, permettant de caractériser la présence de NASH après exposition aux PE. Ainsi, nous souhaiterions développer le même type d'analyse automatisée que celui mis en place pour le StAZ. Dans ce sens, des techniques d'analyses automatisées existent pour quantifier les mesures de fluorescence dans le modèle du poisson-zèbre. C'est le cas, notamment, du logiciel Zirmi, développé sur la plateforme MATLAB (plateforme de calcul numérique et de programmation pour l'analyse de données) et qui permet l'analyse d'images basées sur la cinétique *in vivo* de production des ERO et de recrutement des macrophages chez le poisson-zèbre, analysant donc à la fois le stress oxydant et l'inflammation. Cette analyse automatisée a notamment été développée dans une étude utilisant des poissons-zèbres transgéniques *tg(mpeg:dendra2)* colorés au DHE, et a permis d'évaluer de manière précise le stress oxydant et le recrutement de macrophages sur le site de l'inflammation causée par une plaie (Paredes et al., 2018). Puisque le but d'une analyse automatisée est de permettre une reproductibilité et une standardisation de l'analyse, ce type de méthode pourrait être envisagée et adaptée aux trois caractéristiques à mettre en évidence sur le ShAZ.

II. Le projet Oberon : développer des approches intégrées des tests et de l'évaluation (IATA)

Le but final de ce projet de thèse a été de développer des tests sur modèle *in vivo*, et ainsi pouvoir proposer à l'OCDE de nouvelles méthodes standardisées permettant d'évaluer l'effet des PE sur le développement des maladies métaboliques, et, dans notre cas, des NAFLD.

Comme précisé précédemment, le projet Européen Oberon est un projet multidisciplinaire qui combine de l'épidémiologie, des études *in vitro*, *in vivo* et *in silico*, ainsi que des technologies omiques à haut débit. Ainsi, nos tests seront utilisés au sein du consortium pour établir une stratégie de tests intégrée (*Integrated Approach for Testing and assessment*, IATA), telle que demandée par l'OCDE et permettant de détecter les PE liés aux maladies métaboliques, ainsi que d'en appréhender les modes d'action (Audouze et al., 2020). Dans ce cadre, une attention particulière est portée sur les dérégulations classiquement liées au PE, c'est-à-dire leur capacité à interférer avec les récepteurs nucléaires. Ainsi, différentes approches au sein du projet Oberon

s'intéresse à caractériser ces interactions à l'initiation de toute une cascade de signalisation. Par exemple, les études basées sur les modèles bio-informatiques, tels que la modélisation QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationship*), ont comme objectif de pouvoir prédire les effets d'une variation au niveau moléculaire sur l'activité biologique. Ou encore, les études *in vitro*, utilisant des lignées cellulaires de poisson-zèbre transfectées avec des sous-types de PPARs, couplés à la luciférase, sont utilisées pour quantifier l'activité biologique des PE vis-à-vis des sous-types de récepteurs PPARs.

En combinant ces données *in silico* et *in vitro*, ainsi que celles de nos tests *in vivo*, et l'ensemble des données des différentes approches menées au sein Oberon, il semble possible de développer et d'identifier de nouvelles voies par lesquels les PE conduisent aux maladies métaboliques. Ces voies conduisant à des effets indésirables, aussi appelées AOP (Adverse Outcome Pathways), sont une représentation structurée des événements biologiques entraînant des effets indésirables. Les AOP utilisent les informations mécanistiques disponibles concernant une réponse toxicologique ; ces voies décrivent les liens causaux ou mécanistiques entre un événement d'initiation (le plus souvent au niveau moléculaire, comme par exemple la liaison d'une molécule à un récepteur), une série d'événements clés intermédiaires (au niveau cellulaire) et l'effet néfaste (au niveau de l'organe, de l'organisme ou d'une population) (Figure 50). Grâce à cela, la caractérisation de ces AOP permettrait d'identifier certains mécanismes d'action classiquement décrits pour les PE (régulation *via* les récepteurs nucléaires), mais également d'identifier de nouveaux mécanismes d'action en lien avec les PE et le développement de maladies métaboliques (comme par exemple, l'implication du fer et des vésicules extracellulaires développées plus bas). La compréhension de nouveaux modes d'actions par lesquels les PE sont capables de favoriser le développement des maladies métaboliques, permettront *in fine* une meilleure évaluation des risques pour les effets sur la santé humaine.

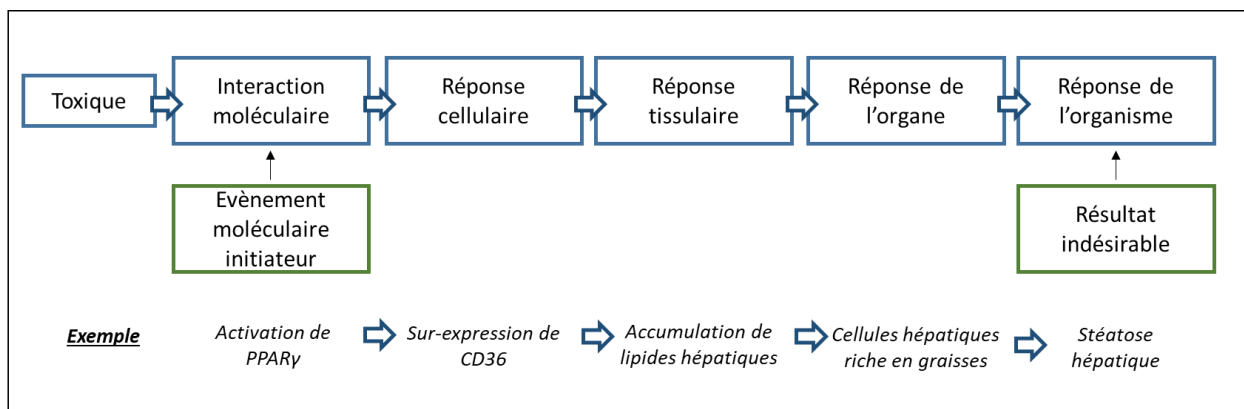


Figure 50 : Représentation des évènements biologiques menant à la construction d'une AOP (Adverse Outcome Pathways). Liens causaux ou mécanistiques entre un événement d'initiation, au niveau moléculaire, et la série d'événements cellulaire, tissulaire et au niveau de l'organe, menant au développement d'un effet indésirable. L'exemple d'un toxique activant le récepteur PPAR γ et entraînant une cascade d'évènements menant au développement de la stéatose hépatique est donné.

III. Etude de nouveaux biomarqueurs dans la pathogénèse des NAFLD

Comprendre les mécanismes d'action de toxiques, comme les PE, au niveau moléculaire et cellulaire, est essentiel pour déterminer des biomarqueurs d'exposition ou d'effet, ainsi que de nouvelles cibles thérapeutiques. Ainsi, dans le contexte des NAFLD, la recherche de biomarqueurs pourrait permettre une meilleure évaluation des risques pour la santé humaine, le diagnostic clinique ou pour la surveillance de populations sensibles. Dans ce sens, le fer libre et les vésicules extracellulaires, dont le sujet n'a pas encore été abordé au cours de cette thèse, pourraient servir de biomarqueurs dans la pathogénèse des NAFLD.

i. Le fer libre

Une notion qui n'a pas été abordé au cours de cette thèse, est l'implication du fer dans le stress oxydant (Bresgen and Eckl, 2015). En effet, il joue un rôle important dans la production d'ERO, notamment dans la génération de radicaux hydroxyles. Le fer se trouve sous plusieurs formes dans la cellule, mais seul le fer libre, c'est-à-dire non lié à des protéines comme la ferritine ou la transferrine, peut participer à de telles réactions redox (Kruszewski, 2003). Il est appelé fer de bas poids moléculaire (BPM) car il se complexe à des molécules de bas poids moléculaires comme le glutathion, le citrate, l'ATP/AMP ou le pyrophosphate (Galaris and Pantopoulos, 2008).

Une perturbation de l'homéostasie du fer a notamment été mise en évidence lors de la transition de la stéatose vers la steatohépatite induite par la co-exposition B[a]P/éthanol sur le modèle de poisson-zèbre (Imran et al., 2022). Cette étude rapportait l'augmentation du métabolisme de l'hème (accumulation de l'hème et de sa forme oxydée, l'hémine ; ainsi que la surexpression des gènes responsables de la biosynthèse de l'hème), comme pouvant être impliqué dans le stress oxydant et dans la progression des NAFLD. De plus, la même étude, démontrait une accumulation de fer libre mitochondrial dans les hépatocytes des larves de poisson-zèbre. Il a été suggéré que cette accumulation de fer mitochondrial serait dépendante d'AhR et serait également associée à un dysfonctionnement mitochondrial, conduisant, de ce fait, à la progression de la stéatose vers la NASH. Comme de nombreuses études ont établi un lien entre le rôle du fer dans l'hépatotoxicité et l'exposition aux toxiques environnementaux (Fader and Zacharewski, 2017), il pourrait être intéressant d'évaluer l'implication du fer, comme marqueur du stress oxydant, dans notre contexte d'exposition aux PE. Notamment, la mesure du fer BPM, qui agit comme un agent pro-oxydant, pourrait être envisagé par résonance paramagnétique électronique (RPE) (Sergent et al., 1997); ou encore des dosages de l'hème, de l'hémine ou encore de la bilirubine (produit catabolique de l'hème), témoignant de perturbations de l'homéostasie du fer, pourraient être réalisés pour expliquer de nouvelles voies mécanistiques impliquées dans la pathogénèse des NAFLD, dans le cadre d'une exposition aux PE.

De plus, notre équipe a précédemment constaté une augmentation de l'absorption du fer, due à la fluidisation de la membrane dans les cellules épithéliales hépatiques lors d'une exposition au B[a]P (Gorria et al., 2006). Il a également été rapporté, sur un modèle primaire d'hépatocytes de rat, que le remodelage membranaire en réponse à la co-exposition au B[a]P/éthanol entraînait une perméabilisation lysosomale responsable d'une augmentation intracellulaire de la teneur en

fer. Ainsi, bien que ces travaux portent sur l'exposition aux HAP, il serait intéressant dans nos conditions expérimentales, pour lesquelles nous observons également un remodelage membranaire induit par le DDE, de mettre en lien une augmentation possible d'absorption du fer hépatique et l'induction du remodelage membranaire. Ce mécanisme pourrait être appréhendé par l'étude de la régulation des transporteurs de fer (comme la mitoferrine, impliquée dans l'entrée du fer au niveau des mitochondries), ou encore par l'étude des gènes contrôlant la biosynthèse de l'hème (notamment la ferrochélatase, protéine responsable de l'incorporation du fer). Enfin, du fait que la ferroptose (mort cellulaire principalement dépendante du fer et du stress oxydant) soit également un mécanisme de mort cellulaire décrit depuis peu dans la NASH (Qi et al., 2020), ces études pourraient permettre d'identifier de nouveaux mécanismes impliqués dans la pathogénèse des NAFLD induite par les PE.

Il est à noter que l'implication du fer dans la toxicité induite par les PE a été peu décrite dans la littérature. Une étude a ainsi décrit chez le poisson Médaka, que l'exposition au DEHP entraînait une mort cellulaire dépendante du fer, associée à une surcharge en fer, une augmentation de la teneur en MDA et une diminution des niveaux de glutathion (Yin et al., 2021). Une analyse transcriptomique a également révélé que l'exposition à un mélange de PFAS entraînait un stress oxydant lié à la ferroptose (Dale et al., 2022). Récemment, le cadmium a également été associé à l'accumulation de fer et à la ferroptose des cellules β pancréatiques, contribuant à l'inflammation chronique induite par ce PE (Hong et al., 2022). Enfin, et de manière intéressante, l'exposition au DDE a mis en évidence l'augmentation des niveaux de coproporphyrines urinaires, suggérant que l'effet toxique du DDE pourrait être médié par une perturbation de la voie de synthèse de l'hème (Sunyer et al., 2008). Ainsi, une étude plus approfondie des perturbations de l'homéostasie du fer, après exposition aux PE, serait particulièrement intéressante pour décrire de nouvelles voies mécanistiques menant au développement de NAFLD.

ii. Les vésicules extracellulaires

Un autre mécanisme contribuant à la pathogénèse des NAFLD est celui associé aux vésicules extracellulaires (VE) (Eguchi and Feldstein, 2018). Notre équipe s'intéresse depuis quelques années, aux VE comme biomarqueurs d'expositions et d'effets des toxiques environnementaux et a participé à l'essor de cette récente thématique. Les VE sont des nanostructures subcellulaires libérées par les cellules dans le milieu extracellulaire, et reconnues comme acteurs à part entière de la communication intercellulaire et inter-organes. Elles permettent, en effet, l'échange entre les cellules de lipides, protéines et acides nucléiques qu'elles soient voisines ou distantes.

Les VE sont reconnues pour participer au développement des troubles métaboliques. Notamment, les VE libérées par les hépatocytes en condition physiologique¹⁰, voient leur production augmentée et leur contenu modifié en conditions pathologiques (particulièrement en condition de stress oxydant, de stress du RE, de mort cellulaire ou d'inflammation) ; c'est le cas notamment

¹⁰ En conditions physiologiques, les VE produites par le foie participent à l'homéostasie hépatique. En effet, les VE issues des hépatocytes peuvent stimuler la prolifération des hépatocytes (Nojima et al., 2016), participer à la détoxification (de par leur contenu riche en enzymes de détoxification) (Conde-Vancells et al., 2008), ou encore à la tolérance immunitaire du foie (Holman et al., 2019).

dans les NAFLD (Hirsova et al., 2016b; Lee et al., 2017). Ainsi, de par un enrichissement des VE en molécules potentiellement impliquées dans des processus pathologiques; celles-ci ont été décrites comme pouvant participer au déclenchement ou à la progression des NAFLD (Eguchi and Feldstein, 2018; Latifkar et al., 2019). Par exemple, l'exposition d'hépatocytes aux AG (mimant une condition de stéatose), peut entraîner la libération de VE par ces cellules, qui sont ensuite impliquées dans l'inflammation et favorisent le recrutement de monocytes (Guo et al., 2019), l'activation (Hirsova et al., 2016b) et la migration des macrophages (Ibrahim et al., 2016; Liao et al., 2018).

Enfin, l'exposition à certains toxiques de l'environnement (particules fines, HAP, métaux, composés perfluorés) entraîne également une augmentation de la libération de VE, dont le contenu en protéines et en miR peut être modifié (Pavanello et al., 2016; van Meteren et al., 2019). De plus, récemment, l'implication des récepteurs CAR et AhR, a également été décrite comme augmentant la production de VE induite par les HAP (van Meteren et al., 2019). Il convient également de noter que, dans un contexte d'exposition aux HAP, la modification de la fluidité membranaire induite sur des cellules hépatiques *in vitro* (déplétion en cholestérol, fluidification), était également impliquée dans l'augmentation de la production de VE hépatiques, ainsi que dans la mort cellulaire (van Meteren et al., 2019).

Enfin, du fait que ces VE soient présentes dans les fluides biologiques et dû à la diversité de leurs contenus (acides nucléiques, lipides, protéines), elles peuvent refléter l'état physiologique ou pathologique des tissus. Ainsi, elles pourraient servir de potentiels biomarqueurs non invasifs de diagnostic ou de pronostic dans les NAFLD de par leur quantité mais aussi, et surtout, de par leur qualité, c'est-à-dire leur composition (Thietart and Rautou, 2020).

Si notre équipe s'est intéressée au rôle des VE, dans le cadre d'une exposition au HAP, il est à noter que l'exposition au PE pourrait également être mise en relation avec les VE. En effet, comme précédemment décrit, les PE sont capables d'induire des modifications épigénétiques, notamment *via* la dérégulation des miR, pouvant par la suite, prédisposer au développement de NAFLD. Ces miR peuvent notamment être transportés par les VE à travers les fluides biologiques. Ainsi il est possible d'imaginer que les PE pourraient *via* ces VE favoriser le développement de NAFLD. Dans ce sens, il a été rapporté que le BPA était capable de modifier le contenu en miRNA dans les VE mais dans un cadre pathologique différent (Rodosthenous et al., 2019). Récemment, des techniques ont été développées pour visualiser les VE dans le corps des larves de poisson-zèbre (Verweij et al., 2019). Il serait donc intéressant dans notre étude d'explorer le rôle des VE dans la pathogénèse des NAFLD lors d'une exposition aux PE et plus particulièrement, au moment de la transition pathologique vers la stéatohépatite.

IV. Conclusion générale

En conclusion, face à la nécessité de développer de nouvelles méthodes permettant de mieux caractériser les effets des PE sur les maladies métaboliques, dont font partie les NAFLD ; nous avons développé un test stéatogène : le « Steatosis Assay On Zebrafish », StAZ. Celui-ci permet d'évaluer la capacité d'une molécule chimique à induire la stéatose hépatique. Ce test a été développé sur le modèle *in vivo* de la larve de poisson-zèbre avant 5 jpf ; il est basé sur une technique d'imagerie par fluorescence, permettant de quantifier l'accumulation de lipides hépatiques, grâce à la sonde Nile Red. L'analyse semi-automatisée que nous avons développée, permet le calcul d'un score de stéatose, prenant en compte à la fois, la quantification de l'intensité de fluorescence du Nile Red, ainsi que, le nombre et de la surface occupée par les GL. Grâce au StAZ, un ensemble de 10 PE a été criblé, à des doses sub-toxiques et pertinentes de l'environnement ; et le toxique DDE, principal métabolite de l'insecticide DDT, a été identifié comme molécule capable d'induire significativement une augmentation du score de stéatose, témoignant ainsi de son potentiel stéatogène. Le StAZ, a été initialement développé sur un modèle sauvage de poisson-zèbre, puis transposé et optimisé sur la lignée Liblue *AB-tg(Fab10 :CFP ;cry :mRFP)*.

Par la suite, d'un point de vue mécanistique, cette étude a mis en évidence que le DDE était capable de perturber l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides (LDN ; import, stockage, dégradation et export des AG; métabolisme du cholestérol et des sphingolipides), avec un rôle important de la désaturase *scd1*, dont l'expression est induite par le DDE, et qui peut expliquer une augmentation de la lipogenèse initiatrice de la stéatose. Par ailleurs, la dérégulation de *scd1* mais aussi des gènes impliqués dans le métabolisme des sphingolipides et du cholestérol, constituants majeurs des membranes plasmiques, nous ont amenés à étudier le remodelage membranaire, démontré par notre équipe comme pouvant être impliqué dans la pathogénèse des NAFLD. Nous avons ainsi démontré que le DDE était capable d'induire une diminution de l'ordre membranaire et donc une fluidification des membranes au niveau du foie. Par l'utilisation d'un inhibiteur de l'activité de *scd1*, nous avons mis en évidence une diminution du score de stéatose et de la fluidification des membranes hépatiques démontrant que *scd1* est, à la fois, impliquée dans l'induction de la stéatose par le DDE, et , participe au remodelage membranaire induit par le DDE et plus exactement dans la fluidification des membranes.

Le deuxième objectif a été de développer un second test biologique, sur le modèle du poisson-zèbre, permettant d'évaluer la capacité des toxiques à induire la transition pathologique de la stéatose vers la steatohépatite ; et ce, en mettant en évidence le stress oxydant, la mort cellulaire et l'inflammation. Ce test, intitulé « Steatohepatitis Assay on Zebrafish » utilise une larve de poisson-zèbre plus âgée, de 7 jpf, présentant au préalable une stéatose induite par un régime HFD. Pour le moment, dans les études préliminaires menées, les techniques utilisées, comme les analyses histologiques ou les études de la régulation génique, nous ont permis de confirmer la présence d'une steatohépatite avec les contrôles positifs (TAA ou TCDD), validant notre modèle NASH. Par la suite, des expériences de marquage avec des sondes fluorescentes ont été entreprises pour envisager la mise en place d'un test d'imagerie par microscopie à fluorescence.

Cependant celles-ci n'ont pour le moment pas donné de résultats satisfaisants, en ne permettant pas de mettre en évidence les 3 critères d'évaluation de la NASH, cités précédemment. Ainsi, si ce test ShAZ est toujours en cours de développement, il est à noter que les méthodes de microscopie à fluorescence seront utilisées, nous permettant de rendre ce test compatible avec la notion de haut débit, notion recherchée dans le développement d'un test standardisé.

Enfin, nous avons reproduit et validé le test obésogène « Zebrafish Obesogenic Test », qui a été développé par nos collaborateurs du projet Oberon. Celui-ci vise à évaluer la capacité des molécules à induire une augmentation d'adiposité sur le poisson-zèbre. En reproduisant le test ZOT, nous avons trouvé qu'une exposition à la TBT à 50 nM pendant 24h à jeûn, inhibait la perte d'adiposité normalement observée en condition contrôle chez le poisson-zèbre juvénile, confirmant ainsi, ses propriétés obésogènes. Cette étape de validation inter-laboratoire, amène le test ZOT à une étape supérieure dans le processus de proposition de test à l'OCDE.

Dans l'ensemble, ces résultats mettent en avant le développement de tests *in vivo* standardisés permettant d'identifier et de caractériser les effets des PE dans le développement des maladies métaboliques. Dans la stratégie d'étude de l'impact des PE, ces tests pourront être utilisés ou adaptés pour étudier les effets de ces molécules en mélange, si possible en restant à des faibles doses (au plus proche de ce qui est retrouvé chez l'Homme) et également avec différentes cinétiques afin d'appréhender l'aspect chronique de l'exposition à ces molécules.

Par la suite, ces tests, ainsi que le test ZOT, pourraient être complétés par des études OMICS (lipidomique, transcriptomique, protéomique, métabolomique) afin de mieux caractériser les modes d'actions des PE dans ce contexte. Cette stratégie est notamment envisagée dans le projet Oberon où, pour les modèles que nous avons développés, des échantillons ont été collectés pour ce type d'analyse. De plus, les nouvelles technologies associant microscopie et spectrométrie pourraient également être utilisées sur nos modèles et permettre d'étudier plus précisément au niveau du foie, ou d'un autre tissu d'intérêt, les changements occasionnés par les PE. Par exemple, la technologie d'imagerie RAMAN et d'analyse moléculaire 3D a pu être réalisée en parallèle d'analyse transcriptomique sur des foies de larves de poisson-zèbre nourries avec un régime enrichi en cholestérol. Ces analyses ont permis de visualiser simultanément au niveau hépatique les changements d'expression génique et du métabolisme des lipides pour mettre en évidence l'impact du régime sur la régulation des voies PPARs, l'accumulation des lipides hépatiques et sur leur composition (Chen et al., 2020). De plus, cette technologie est suffisamment résolutive pour permettre d'aller rechercher la composition des membranes biologiques (cellules ou VE) et ainsi obtenir plus d'information sur un possible remodelage membranaire (Pilarczyk et al., 2014).

Depuis des décennies, la production de nombreuses substances chimiques et leur utilisation ne cesse d'augmenter. Leur évaluation des risques sur la santé humaine n'est pas toujours aisée, du fait d'un très grand nombre de substances chimiques à évaluer, ou du manque de méthodes efficaces pour caractériser leurs effets sur la santé. Conformément au cadre réglementaire mis en place par l'UE, pour réduire l'utilisation de certains PE et protéger les consommateurs, il est devenu primordial de développer des méthodes de tests efficaces et rapides permettant de

prédire correctement les effets de PE, et dans notre cas, leurs effets sur les maladies métaboliques, dont le lien est plus que suspecté. Dans ce sens, le projet multidisciplinaire Oberon vise à développer des batteries de tests permettant d'identifier les PE capables d'induire l'obésité, le diabète ou les NAFLD. Ainsi, nos tests biologiques s'inscrivent dans cet objectif, visant à une meilleure évaluation des risques et à une meilleure réglementation des PE. Ils pourraient être proposés dans le cadre de l'OCDE ou encore aux agences de réglementation (ECHA et EFSA) permettant ainsi de tester les effets de molécules chimiques seules ou en mélange, avant leur mise sur le marché. A travers ces tests évaluant l'effet des PE sur la santé humaine, nous cherchons une meilleure régulation des produits chimiques, dont certains effets nocifs sont trop souvent détectés de nombreuses années après leur mise sur le marché.

BIBLIOGRAPHIE

A

- 203, O.T.No., 2019. Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD. <https://doi.org/10.1787/9789264069961-en>
- Abbas, S., Greige-Gerges, H., Karam, N., Piet, M.-H., Netter, P., Magdalou, J., 2010. Metabolism of parabens (4-hydroxybenzoic acid esters) by hepatic esterases and UDP-glucuronosyltransferases in man. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 25, 568–577. <https://doi.org/10.2133/dmpk.dmpk-10-rg-013>
- Abdel-Maboud, M., Menshawy, A., Menshawy, E., Emara, A., Alshandidy, M., Eid, M., 2020. The efficacy of vitamin E in reducing non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *Ther. Adv. Gastroenterol.* 13, 1756284820974917. <https://doi.org/10.1177/1756284820974917>
- Abdel-Misih, S.R.Z., Bloomston, M., 2010. Liver Anatomy. *Surg. Clin. North Am.* 90, 643–653. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2010.04.017>
- Abu-Elheiga, L., Brinkley, W.R., Zhong, L., Chirala, S.S., Woldegiorgis, G., Wakil, S.J., 2000. The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 1444–1449.
- Abu-Elheiga, L., Matzuk, M.M., Kordari, P., Oh, W., Shaikenov, T., Gu, Z., Wakil, S.J., 2005. Mutant mice lacking acetyl-CoA carboxylase 1 are embryonically lethal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 12011–12016. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505714102>
- Acaroz, U., Ince, S., Arslan-Acaroz, D., Gurler, Z., Demirel, H.H., Kucukkurt, I., Eryavuz, A., Kara, R., Varol, N., Zhu, K., 2019. Bisphenol-A induced oxidative stress, inflammatory gene expression, and metabolic and histopathological changes in male Wistar albino rats: protective role of boron †Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c8tx00312b. *Toxicol. Res.* 8, 262–269. <https://doi.org/10.1039/c8tx00312b>
- Adam, A.-C., Lie, K.K., Moren, M., Skjærven, K.H., 2017. High dietary arachidonic acid levels induce changes in complex lipids and immune-related eicosanoids and increase levels of oxidised metabolites in zebrafish (*Danio rerio*). *Br. J. Nutr.* 117, 1075–1085. <https://doi.org/10.1017/S0007114517000903>
- Adam, A.-C., Lie, K.K., Whatmore, P., Jakt, L.M., Moren, M., Skjærven, K.H., 2019. Profiling DNA methylation patterns of zebrafish liver associated with parental high dietary arachidonic acid. *PLoS ONE* 14, e0220934. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220934>
- Adiels, M., Taskinen, M.-R., Packard, C., Caslake, M.J., Soro-Paavonen, A., Westerbacka, J., Vehkavaara, S., Häkkinen, A., Olofsson, S.-O., Yki-Järvinen, H., Borén, J., 2006. Overproduction of large VLDL particles is driven by increased liver fat content in man. *Diabetologia* 49, 755–765. <https://doi.org/10.1007/s00125-005-0125-z>
- Afonso, M.B., Rodrigues, P.M., Carvalho, T., Caridade, M., Borralho, P., Cortez-Pinto, H., Castro, R.E., Rodrigues, C.M.P., 2015. Necroptosis is a key pathogenic event in human and experimental murine models of non-alcoholic steatohepatitis. *Clin. Sci.* 129, 721–739. <https://doi.org/10.1042/CS20140732>
- Afonso, M.B., Rodrigues, P.M., Mateus-Pinho, M., Simão, A.L., Gaspar, M.M., Majdi, A., Arretxe, E., Alonso, C., Santos-Laso, A., Jimenez-Agüero, R., Eizaguirre, E., Bujanda, L., Pareja, M.J., Banales, J.M., Ratziu, V., Gautheron, J., Castro, R.E., Rodrigues, C.M.P., 2021. RIPK3 acts as a lipid metabolism regulator contributing to inflammation and carcinogenesis in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* 70, 2359–2372. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-321767>

- Aguilar-Olivos, N.E., Carrillo-Córdova, D., Oria-Hernández, J., Sánchez-Valle, V., Ponciano-Rodríguez, G., Ramírez-Jaramillo, M., Chablé-Montero, F., Chávez-Tapia, N.C., Uribe, M., Méndez-Sánchez, N., 2015. The nuclear receptor FXR, but not LXR, up-regulates bile acid transporter expression in non-alcoholic fatty liver disease. *Ann. Hepatol.* 14, 487–493. [https://doi.org/10.1016/S1665-2681\(19\)31170-6](https://doi.org/10.1016/S1665-2681(19)31170-6)
- Ahmad, O., Wang, B., Ma, K., Deng, Y., Li, M., Yang, L., Yang, Y., Zhao, J., Cheng, L., Zhou, Q., Shang, J., 2019. Lipid Modulating Anti-oxidant Stress Activity of Gastrodin on Nonalcoholic Fatty Liver Disease Larval Zebrafish Model. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 1984. <https://doi.org/10.3390/ijms20081984>
- Ahn, J., Lee, H., Chung, C.H., Ha, T., 2011. High fat diet induced downregulation of microRNA-467b increased lipoprotein lipase in hepatic steatosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 414, 664–669. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.09.120>
- Ahn, S.B., Jang, K., Jun, D.W., Lee, B.H., Shin, K.J., 2014. Expression of Liver X Receptor Correlates with Intrahepatic Inflammation and Fibrosis in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Dig. Dis. Sci.* 59, 2975–2982. <https://doi.org/10.1007/s10620-014-3289-x>
- Akazawa, Y., Cazanave, S., Mott, J.L., Elmi, N., Bronk, S.F., Kohno, S., Charlton, M.R., Gores, G.J., 2010. Palmitoleate attenuates palmitate-induced bim and PUMA up-regulation and hepatocyte lipoapoptosis. *J. Hepatol.* 52, 586–593. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.01.003>
- Al-Eryani, L., Wahlang, B., Falkner, K.C., Guardiola, J.J., Clair, H.B., Prough, R.A., Cave, M., 2015. Identification of Environmental Chemicals Associated with the Development of Toxicant-associated Fatty Liver Disease in Rodents. *Toxicol. Pathol.* 43, 482–497. <https://doi.org/10.1177/0192623314549960>
- Aleström, P., D'Angelo, L., Midtlyng, P.J., Schorderet, D.F., Schulte-Merker, S., Sohm, F., Warner, S., 2020. Zebrafish: Housing and husbandry recommendations. *Lab. Anim.* 54, 213–224. <https://doi.org/10.1177/0023677219869037>
- Aliche-Djoudi, F., Podechard, N., Collin, A., Chevanne, M., Provost, E., Poul, M., Le Hégarat, L., Catheline, D., Legrand, P., Dimanche-Boitrel, M.-T., Lagadic-Gossmann, D., Sergent, O., 2013. A role for lipid rafts in the protection afforded by docosahexaenoic acid against ethanol toxicity in primary rat hepatocytes. *Food Chem. Toxicol.* 60, 286–296. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.061>
- Alkhoury, N., Dixon, L.J., Feldstein, A.E., 2009. Lipotoxicity in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Not All Lipids Are Created Equal. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 3, 445–451. <https://doi.org/10.1586/egh.09.32>
- Al-Obaidi, Z.A.F., Erdogan, C.S., Sümer, E., Özgün, H.B., Gemici, B., Sandal, S., Yilmaz, B., 2022. Investigation of obesogenic effects of hexachlorobenzene, DDT and DDE in male rats. *Gen. Comp. Endocrinol.* 327, 114098. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2022.114098>
- Alonso, C., Fernández-Ramos, D., Varela-Rey, M., Martínez-Arranz, I., Navasa, N., Van Liempd, S.M., Lavin, J.L., Mayo, R., Ilisso, C.P., de Juan, V.G., Iruarrizaga-Lejarreta, M., delaCruz-Villar, L., Mincholé, I., Robinson, A., Crespo, J., Martín-Duce, A., Romero-Gomez, M., Sann, H., Platon, J., Van Eyk, J., Aspichueta, P., Noureddin, M., Falcón-Pérez, J.M., Anguita, J., Aransay, A.M., Martínez-Chantar, M.L., Lu, S.C., Mato, J.M., 2017. Metabolomic Identification of Subtypes of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* 152, 1449-1461.e7. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.01.015>
- Alshehri, A.S., El-kott, A.F., El-Kenawy, A.E., Khalifa, H.S., AlRamlawy, A.M., 2021. Cadmium chloride induces non-alcoholic fatty liver disease in rats by stimulating miR-34a/SIRT1/FXR/p53 axis. *Sci. Total Environ.* 784, 147182. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147182>
- Alves-Bezerra, M., Cohen, D.E., 2017. Triglyceride metabolism in the liver. *Compr. Physiol.* 8, 1–8. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170012>

- Amali, A.A., Rekha, R.D., Lin, C.J.-F., Wang, W.-L., Gong, H.-Y., Her, G.-M., Wu, J.-L., 2006. Thioacetamide induced liver damage in zebrafish embryo as a disease model for steatohepatitis. *J. Biomed. Sci.* 13, 225–232. <https://doi.org/10.1007/s11373-005-9055-5>
- Ambolet-Camoit, A., Ottolenghi, C., Leblanc, A., Kim, M.J., Letourneur, F., Jacques, S., Cagnard, N., Guguen-Guillouzo, C., Barouki, R., Aggerbeck, M., 2015. Two persistent organic pollutants which act through different xenosensors (alpha-endosulfan and 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin) interact in a mixture and downregulate multiple genes involved in human hepatocyte lipid and glucose metabolism. *Biochimie* 116, 79–91. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.07.003>
- Amsterdam, A., Hopkins, N., 2006. Mutagenesis strategies in zebrafish for identifying genes involved in development and disease. *Trends Genet.* 22, 473–478. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.06.011>
- An, S., Lee, E., Jeong, S.-H., Hong, Y., Ahn, S., Yang, Y.-J., 2021. Perinatal exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate induces hepatic lipid accumulation mediated by diacylglycerol acyltransferase 1. *Hum. Exp. Toxicol.* 40, 1698–1709. <https://doi.org/10.1177/09603271211003314>
- Anderson, E.L., Howe, L.D., Jones, H.E., Higgins, J.P.T., Lawlor, D.A., Fraser, A., 2015. The Prevalence of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Children and Adolescents: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS ONE* 10, e0140908. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140908>
- Anderson, R.G.W., Jacobson, K., 2002. A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science* 296, 1821–1825. <https://doi.org/10.1126/science.1068886>
- Angrish, M.M., Kaiser, J.P., McQueen, C.A., Chorley, B.N., 2016. Tipping the Balance: Hepatotoxicity and the 4 Apical Key Events of Hepatic Steatosis. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 150, 261–268. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw018>
- Anjani, K., Lhomme, M., Sokolovska, N., Poitou, C., Aron-Wisnewsky, J., Bouillot, J.-L., Lesnik, P., Bedossa, P., Kontush, A., Clement, K., Dugail, I., Tordjman, J., 2015. Circulating phospholipid profiling identifies portal contribution to NASH signature in obesity. *J. Hepatol.* 62, 905–912. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.11.002>
- Anstee, Q.M., Reeves, H.L., Kotsiliti, E., Govaere, O., Heikenwalder, M., 2019. From NASH to HCC: current concepts and future challenges. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 16, 411–428. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0145-7>
- Antizar-Ladislao, B., 2008. Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT)-contaminated marine environment. A review. *Environ. Int.* 34, 292–308. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.09.005>
- Apostolopoulou, M., Gordillo, R., Gancheva, S., Strassburger, K., Herder, C., Esposito, I., Schlensak, M., Scherer, P.E., Roden, M., 2020. Role of ceramide-to-dihydroceramide ratios for insulin resistance and non-alcoholic fatty liver disease in humans. *BMJ Open Diabetes Res. Care* 8, e001860. <https://doi.org/10.1136/bmjdr-2020-001860>
- Arab, J.P., Arrese, M., Trauner, M., 2018. Recent Insights into the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Annu. Rev. Pathol.* 13, 321–350. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020117-043617>
- Araya, J., RODRIGO, R., VIDELA, L.A., THIELEMANN, L., ORELLANA, M., PETTINELLI, P., PONIACHIK, J., 2004. Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n-6/n-3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin. Sci.* 106, 635–643. <https://doi.org/10.1042/CS20030326>
- Arguello, G., Balboa, E., Arrese, M., Zanlungo, S., 2015. Recent insights on the role of cholesterol in non-alcoholic fatty liver disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1852, 1765–1778. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.05.015>

- Armstrong, L.E., Guo, G.L., 2019. Understanding Environmental Contaminants' Direct Effects on Non-alcoholic Fatty Liver Disease Progression. *Curr. Environ. Health Rep.* <https://doi.org/10.1007/s40572-019-00231-x>
- Armstrong, M.J., Hull, D., Guo, K., Barton, D., Hazlehurst, J.M., Gathercole, L.L., Nasiri, M., Yu, J., Gough, S.C., Newsome, P.N., Tomlinson, J.W., 2016. Glucagon-like peptide 1 decreases lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis. *J. Hepatol.* 64, 399–408. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.08.038>
- Arroyave-Ospina, J.C., Wu, Z., Geng, Y., Moshage, H., 2021. Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Implications for Prevention and Therapy. *Antioxidants* 10, 174. <https://doi.org/10.3390/antiox10020174>
- Asahi, J., Kamo, H., Baba, R., Doi, Y., Yamashita, A., Murakami, D., Hanada, A., Hirano, T., 2010. Bisphenol A induces endoplasmic reticulum stress-associated apoptosis in mouse non-parenchymal hepatocytes. *Life Sci.* 87, 431–438. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.08.007>
- Asaoka, Y., Terai, S., Sakaida, I., Nishina, H., 2013. The expanding role of fish models in understanding non-alcoholic fatty liver disease 11.
- Ashraf, M.W., Salam, A., Mian, A., 2017. Levels of Organotin Compounds in Selected Fish Species from the Arabian Gulf. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 98, 811–816. <https://doi.org/10.1007/s00128-017-2083-9>
- Ateş, P.S., Ünal, İ., Üstündağ, Ü.V., Alturfan, A.A., Yiğitbaşı, T., Emekli-Alturfan, E., 2018. Methylparaben induces malformations and alterations on apoptosis, oxidant–antioxidant status, ccnd1 and myca expressions in zebrafish embryos. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 32, e22036. <https://doi.org/10.1002/jbt.22036>
- Aubert, J., Begriche, K., Knockaert, L., Robin, M.A., Fromenty, B., 2011. Increased expression of cytochrome P450 2E1 in nonalcoholic fatty liver disease: Mechanisms and pathophysiological role. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* 35, 630–637. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2011.04.015>
- Audouze, K., Sarigiannis, D., Alonso-Magdalena, P., Brochot, C., Casas, M., Vrijheid, M., Babin, P.J., Karakitsios, S., Coumoul, X., Barouki, R., 2020. Integrative Strategy of Testing Systems for Identification of Endocrine Disruptors Inducing Metabolic Disorders—An Introduction to the OBERON Project. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 2988. <https://doi.org/10.3390/ijms21082988>
- Averina, M., Brox, J., Huber, S., Furberg, A.-S., 2021. Exposure to perfluoroalkyl substances (PFAS) and dyslipidemia, hypertension and obesity in adolescents. The Fit Futures study. *Environ. Res.* 195, 110740. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.110740>
- Azevedo, L.F., Porto Dechandt, C.R., Cristina de Souza Rocha, C., Hornos Carneiro, M.F., Alberici, L.C., Barbosa, F., 2019. Long-term exposure to bisphenol A or S promotes glucose intolerance and changes hepatic mitochondrial metabolism in male Wistar rats. *Food Chem. Toxicol.* 132, 110694. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110694>

B

- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L.V., Koh, G.Y., Nagy, A., Semenkovich, C.F., Gordon, J.I., 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 15718–15723. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407076101>
- Baffy, G., 2013. Hepatocellular Carcinoma in Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Epidemiology, Pathogenesis, and Prevention. *J. Clin. Transl. Hepatol.* 1, 131–137. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2013.00005>
- Baillie-Hamilton PF. Chemical toxins: a hypothesis to explain the global obesity epidemic. *J Altern Complement Med.* 2002 Apr;8(2):185-92. doi: 10.1089/107555302317371479. PMID: 12006126.

- Ballestri, S., Nascimbeni, F., Baldelli, E., Marrazzo, A., Romagnoli, D., Lonardo, A., 2017. NAFLD as a Sexual Dimorphic Disease: Role of Gender and Reproductive Status in the Development and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Inherent Cardiovascular Risk. *Adv. Ther.* 34, 1291–1326. <https://doi.org/10.1007/s12325-017-0556-1>
- Bambino, K., Chu, J., 2017. Zebrafish in Toxicology and Environmental Health, in: *Current Topics in Developmental Biology*. Elsevier, pp. 331–367. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.10.007>
- Banerjee, M., Robbins, D., Chen, T., 2015. Targeting xenobiotic receptors PXR and CAR in human diseases. *Drug Discov. Today* 20, 618–628. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.11.011>
- Barata, C., Baird, D.J., Amat, F., Soares, A.M.V.M., 2000. Comparing population response to contaminants between laboratory and field: an approach using *Daphnia magna* ephippial egg banks. *Funct. Ecol.* 14, 513–523. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.2000.00445.x>
- Barouki, R., Aggerbeck, M., Aggerbeck, L., Coumoul, X., 2012a. The aryl hydrocarbon receptor system. *Drug Metabol. Drug Interact.* 27, 3–8. <https://doi.org/10.1515/dmdi-2011-0035>
- Barouki, R., Gluckman, P.D., Grandjean, P., Hanson, M., Heindel, J.J., 2012b. Developmental origins of non-communicable disease: Implications for research and public health. *Environ. Health* 11, 42. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-11-42>
- Barrett, T., Troup, D.B., Wilhite, S.E., Ledoux, P., Rudnev, D., Evangelista, C., Kim, I.F., Soboleva, A., Tomashevsky, M., Marshall, K.A., Phillippy, K.H., Sherman, P.M., Muetter, R.N., Edgar, R., 2009. NCBI GEO: archive for high-throughput functional genomic data. *Nucleic Acids Res.* 37, D885–D890. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn764>
- Barretto, S.A., Lasserre, F., Huillet, M., Régnier, M., Polizzi, A., Lippi, Y., Fougerat, A., Person, E., Bruel, S., Bétoulières, C., Naylies, C., Lukowicz, C., Smati, S., Guzylack, L., Olier, M., Théodorou, V., Mselli-Lakhal, L., Zalko, D., Wahli, W., Loiseau, N., Gamet-Payrastre, L., Guillou, H., Ellero-Simatos, S., 2021. The pregnane X receptor drives sexually dimorphic hepatic changes in lipid and xenobiotic metabolism in response to gut microbiota in mice. *Microbiome* 9, 93. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01050-9>
- Barreiro, F.J., Kobayashi, S., Bronk, S.F., Werneburg, N.W., Malhi, H., Gores, G.J., 2007. Transcriptional Regulation of Bim by FoxO3A Mediates Hepatocyte Lipoapoptosis*. *J. Biol. Chem.* 282, 27141–27154. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704391200>
- Baskin-Bey, E.S., Anan, A., Isomoto, H., Bronk, S.F., Gores, G.J., 2007. Constitutive androstane receptor agonist, TCPOBOP, attenuates steatohepatitis in the methionine choline-deficient diet-fed mouse. *World J. Gastroenterol.* WJG 13, 5635–5641. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i42.5635>
- Bastos Sales, L., Kamstra, J.H., Ceniijn, P.H., van Rijt, L.S., Hamers, T., Legler, J., 2013. Effects of endocrine disrupting chemicals on in vitro global DNA methylation and adipocyte differentiation. *Toxicol. In Vitro* 27, 1634–1643. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.04.005>
- BasuRay, S., Wang, Y., Smagris, E., Cohen, J.C., Hobbs, H.H., 2019. Accumulation of PNPLA3 on lipid droplets is the basis of associated hepatic steatosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 9521–9526. <https://doi.org/10.1073/pnas.1901974116>
- Batista, T.M., Alonso-Magdalena, P., Vieira, E., Amaral, M.E.C., Cederroth, C.R., Nef, S., Quesada, I., Carneiro, E.M., Nadal, A., 2012. Short-Term Treatment with Bisphenol-A Leads to Metabolic Abnormalities in Adult Male Mice. *PLoS ONE* 7, e33814. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033814>
- Battle, H.I., Hisaoka, K.K., 1952. Effects of ethyl carbamate (urethan) on the early development of the teleost *Brachydanio rerio*. *Cancer Res.* 12, 334–340.

- Baulies, A., Montero, J., Matías, N., Insausti, N., Terrones, O., Basañez, G., Vallejo, C., de La Rosa, L.C., Martinez, L., Robles, D., Morales, A., Abian, J., Carrascal, M., Machida, K., Kumar, D.B.U., Tsukamoto, H., Kaplowitz, N., Garcia-Ruiz, C., Fernández-Checa, J.C., 2017. The 2-oxoglutarate carrier promotes liver cancer by sustaining mitochondrial GSH despite cholesterol loading. *Redox Biol.* 14, 164–177. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.08.022>
- Bayliak, M.M., Abrat, O.B., Storey, J.M., Storey, K.B., Lushchak, V.I., 2019. Interplay between diet-induced obesity and oxidative stress: Comparison between *Drosophila* and mammals. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 228, 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.09.027>
- Beausoleil, C., Le Magueresse-Battistoni, B., Viguié, C., Babajko, S., Canivenc-Lavier, M.-C., Chevalier, N., Emond, C., Habert, R., Picard-Hagen, N., Mhaouty-Kodja, S., 2022. Regulatory and academic studies to derive reference values for human health: The case of bisphenol S. *Environ. Res.* 204, 112233. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112233>
- Becares, N., Gage, M.C., Voisin, M., Shrestha, E., Martin-Gutierrez, L., Liang, N., Louie, R., Pourcet, B., Pello, O.M., Luong, T.V., Goñi, S., Pichardo-Almarza, C., Røberg-Larsen, H., Diaz-Zuccarini, V., Steffensen, K.R., O'Brien, A., Garabedian, M.J., Rombouts, K., Treuter, E., Pineda-Torra, I., 2019. Impaired LXR α Phosphorylation Attenuates Progression of Fatty Liver Disease. *Cell Rep.* 26, 984-995.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.12.094>
- Becker, P.P., Rau, M., Schmitt, J., Malsch, C., Hammer, C., Bantel, H., Müllhaupt, B., Geier, A., 2015. Performance of Serum microRNAs -122, -192 and -21 as Biomarkers in Patients with Non-Alcoholic Steatohepatitis. *PLoS ONE* 10, e0142661. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142661>
- Begrache, K., Massart, J., Robin, M.-A., Bonnet, F., Fromenty, B., 2013. Mitochondrial adaptations and dysfunctions in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 58, 1497–1507. <https://doi.org/10.1002/hep.26226>
- Belser, M., Cansız, D., Ünal, İ., Üstündağ, Ü.V., Dandin, E., Ak, E., Alturfan, A.A., Emekli-Alturfan, E., 2022. Bisphenol A reveals its obesogenic effects through disrupting glucose tolerance, oxidant–antioxidant balance, and modulating inflammatory cytokines and fibroblast growth factor in zebrafish. *Toxicol. Ind. Health* 38, 19–28. <https://doi.org/10.1177/07482337211054372>
- Bellantì, F., Mitarotonda, D., Tamborra, R., Blonda, M., Iannelli, G., Petrella, A., Sanginario, V., Iuliano, L., Vendemiale, G., Serviddio, G., 2014. OP2-6 - Oxysterols induce mitochondrial impairment and hepatocellular toxicity in non-alcoholic fatty liver disease. *Free Radic. Biol. Med.* 75, S16–S17. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.594>
- Bellantì, F., Villani, R., Tamborra, R., Blonda, M., Iannelli, G., di Bello, G., Facciorusso, A., Poli, G., Iuliano, L., Avolio, C., Vendemiale, G., Serviddio, G., 2017. Synergistic interaction of fatty acids and oxysterols impairs mitochondrial function and limits liver adaptation during nafld progression. *Redox Biol.* 15, 86–96. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.11.016>
- Bence, K.K., Birnbaum, M.J., 2020. Metabolic drivers of non-alcoholic fatty liver disease. *Mol. Metab.* 50, 101143. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101143>
- Benchoula, K., Khatib, A., Jaffar, A., Ahmed, Q.U., Sulaiman, W.M.A.W., Wahab, R.A., El-Seedi, H.R., 2019. The promise of zebrafish as a model of metabolic syndrome. *Exp. Anim.* 68, 407–416. <https://doi.org/10.1538/expanim.18-0168>
- Benhamed, F., Denechaud, P.-D., Lemoine, M., Robichon, C., Moldes, M., Bertrand-Michel, J., Ratziau, V., Serfaty, L., Housset, C., Capeau, J., Girard, J., Guillou, H., Postic, C., 2012. The lipogenic transcription factor ChREBP dissociates hepatic steatosis from insulin resistance in mice and humans. *J. Clin. Invest.* 122, 2176–2194. <https://doi.org/10.1172/JCI41636>

- Benjamin, S., Masai, E., Kamimura, N., Takahashi, K., Anderson, R.C., Faisal, P.A., 2017. Phthalates impact human health: Epidemiological evidences and plausible mechanism of action. *J. Hazard. Mater.* 340, 360–383. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.06.036>
- Berardis, S., Sokal, E., 2014. Pediatric non-alcoholic fatty liver disease: an increasing public health issue. *Eur. J. Pediatr.* 173, 131–139. <https://doi.org/10.1007/s00431-013-2157-6>
- Bernal, A.J., Jirtle, R.L., 2010. Epigenomic Disruption: The Effects of Early Developmental Exposures. *Birt. Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* 88, 938–944. <https://doi.org/10.1002/bdra.20685>
- Bernal, K., Touma, C., Erradhouani, C., Boronat-Belda, T., Gaillard, L., Al Kassir, S., Le Mentec, H., Martin-Chouly, C., Podechard, N., Lagadic-Gossmann, D., Langouet, S., Brion, F., Knoll-Gellida, A., Babin, P.J., Sovadinova, I., Babica, P., Andreau, K., Barouki, R., Vondracek, J., Alonso-Magdalena, P., Blanc, E., Kim, M.J., Coumoul, X., 2022. Combinatorial pathway disruption is a powerful approach to delineate metabolic impacts of endocrine disruptors. *FEBS Lett.* n/a. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14465>
- Berriot-Varoqueaux, N., Aggerbeck, L.P., Samson-Bouma, M.-E., Wetterau, J.R., 2000. The Role of the Microsomal Triglyceride Transfer Protein in Abetalipoproteinemia. *Annu. Rev. Nutr.* 20, 663–697. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.20.1.663>
- Bertheloot, D., Latz, E., Franklin, B.S., 2021. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cell. Mol. Immunol.* 18, 1106–1121. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00630-3>
- Bertrand, S., Thisse, B., Tavares, R., Sachs, L., Chaumot, A., Bardet, P.-L., Escrivà, H., Duffraisse, M., Marchand, O., Safi, R., Thisse, C., Laudet, V., 2007. Unexpected Novel Relational Links Uncovered by Extensive Developmental Profiling of Nuclear Receptor Expression. *PLoS Genet.* 3, e188. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030188>
- Beydoun, H.A., Beydoun, M.A., Jeng, H.A., Zonderman, A.B., Eid, S.M., 2016. Bisphenol-A and Sleep Adequacy among Adults in the National Health and Nutrition Examination Surveys. *Sleep* 39, 467–476. <https://doi.org/10.5665/sleep.5466>
- Bideyan, L., Nagari, R., Tontonoz, P., 2021. Hepatic transcriptional responses to fasting and feeding. *Genes Dev.* 35, 635–657. <https://doi.org/10.1101/gad.348340.121>
- Bieghs, V., van Gorp, P.J., Walenbergh, S., Gijbels, M.J., Verheyen, F., Buurman, W.A., Briles, D.E., Hofker, M.H., Binder, C.J., Shiri-Sverdlov, R., 2012. Specific immunization strategies against oxidized LDL: a novel way to reduce non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Hepatology* 56, 894–903. <https://doi.org/10.1002/hep.25660>
- Birchmeier, W., 2016. Orchestrating Wnt signalling for metabolic liver zonation. *Nat. Cell Biol.* 18, 463–465. <https://doi.org/10.1038/ncb3349>
- Bitter, A., Rümmele, P., Klein, K., Kandel, B.A., Rieger, J.K., Nüssler, A.K., Zanger, U.M., Trauner, M., Schwab, M., Burk, O., 2015. Pregnane X receptor activation and silencing promote steatosis of human hepatic cells by distinct lipogenic mechanisms. *Arch. Toxicol.* 89, 2089–2103. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1348-x>
- Blériot, C., Barreby, E., Dunsmore, G., Ballaire, R., Chakarov, S., Ficht, X., De Simone, G., Andreatta, F., Fumagalli, V., Guo, W., Wan, G., Gessain, G., Khalilnezhad, A., Zhang, X.M., Ang, N., Chen, P., Morgantini, C., Azzimato, V., Kong, W.T., Liu, Z., Pai, R., Lum, J., Shihui, F., Low, I., Xu, C., Malleret, B., Kairi, M.F.M., Balachander, A., Cexus, O., Larbi, A., Lee, B., Newell, E.W., Ng, L.G., Phoo, W.W., Sobota, R.M., Sharma, A., Howland, S.W., Chen, J., Bajenoff, M., Yvan-Charvet, L., Venteclef, N., Iannacone, M., Aouadi, M., Ginhoux, F., 2021. A subset of Kupffer cells regulates metabolism through the expression of CD36. *Immunity* 54, 2101–2116.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.08.006>

- Blumberg, B., 2011. Obesogens, stem cells and the maternal programming of obesity. *J. Dev. Orig. Health Dis.* 2, 3–8. <https://doi.org/10.1017/S2040174410000589>
- Bock, K.W., 2021. Aryl hydrocarbon receptor (AHR), integrating energy metabolism and microbial or obesity-mediated inflammation. *Biochem. Pharmacol.* 184, 114346. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114346>
- Boden, G., She, P., Mozzoli, M., Cheung, P., Gumireddy, K., Reddy, P., Xiang, X., Luo, Z., Ruderman, N., 2005. Free Fatty Acids Produce Insulin Resistance and Activate the Proinflammatory Nuclear Factor- κ B Pathway in Rat Liver. *Diabetes* 54, 3458–3465. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.12.3458>
- Bollig, F., Perner, B., Besenbeck, B., Köthe, S., Ebert, C., Taudien, S., Englert, C., 2009. A highly conserved retinoic acid responsive element controls wt1a expression in the zebrafish pronephros. *Development* 136, 2883–2892. <https://doi.org/10.1242/dev.031773>
- Bonacini, M., Kassamali, F., Kari, S., Lopez Barrera, N., Kohla, M., 2021. Racial differences in prevalence and severity of non-alcoholic fatty liver disease. *World J. Hepatol.* 13, 763–773. <https://doi.org/10.4254/wjh.v13.i7.763>
- Boursier, J., Mueller, O., Barret, M., Machado, M., Fizanne, L., Araujo-Perez, F., Guy, C.D., Seed, P.C., Rawls, J.F., David, L.A., Hunault, G., Oberti, F., Calès, P., Diehl, A.M., 2016. The severity of NAFLD is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota. *Hepatol. Baltim. Md* 63, 764–775. <https://doi.org/10.1002/hep.28356>
- Boutot, M.E., Whitcomb, B.W., Abdelouahab, N., Baccarelli, A.A., Boivin, A., Caku, A., Gillet, V., Martinez, G., Pasquier, J.-C., Zhu, J., Takser, L., St-Cyr, L., Suvorov, A., 2021. In Utero Exposure to Persistent Organic Pollutants and Childhood Lipid Levels. *Metabolites* 11, 657. <https://doi.org/10.3390/metabo11100657>
- Bouyanfif, A., Jayarathne, S., Koboziev, I., Moustaid-Moussa, N., 2019. The Nematode *Caenorhabditis elegans* as a Model Organism to Study Metabolic Effects of ω -3 Polyunsaturated Fatty Acids in Obesity. *Adv. Nutr.* 10, 165–178. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy059>
- Braunbeck, T., Görge, G., Storch, V., Nagel, R., 1990. Hepatic steatosis in zebra fish (*Brachydanio rerio*) induced by long-term exposure to γ -hexachlorocyclohexane. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 19, 355–374. [https://doi.org/10.1016/0147-6513\(90\)90036-5](https://doi.org/10.1016/0147-6513(90)90036-5)
- Bresgen, N., Eckl, P.M., 2015. Oxidative stress and the homeodynamics of iron metabolism. *Biomolecules* 5, 808–847. <https://doi.org/10.3390/biom5020808>
- Brion, F., Le Page, Y., Piccini, B., Cardoso, O., Tong, S.-K., Chung, B., Kah, O., 2012. Screening Estrogenic Activities of Chemicals or Mixtures In Vivo Using Transgenic (*cyp19a1b*-GFP) Zebrafish Embryos. *PLoS ONE* 7, e36069. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036069>
- Brotzmann, K., Escher, S.E., Walker, P., Braunbeck, T., 2022. Potential of the zebrafish (*Danio rerio*) embryo test to discriminate between chemicals of similar molecular structure—a study with valproic acid and 14 of its analogues. *Arch. Toxicol.* 96, 3033–3051. <https://doi.org/10.1007/s00204-022-03340-z>
- Brown, G.T., Kleiner, D.E., 2016. Histopathology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Metabolism.* 65, 1080–1086. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.11.008>
- Bruce, K.D., Cagampang, F.R., Argenton, M., Zhang, J., Ethirajan, P.L., Burdge, G.C., Bateman, A.C., Clough, G.F., Poston, L., Hanson, M.A., McConnell, J.M., Byrne, C.D., 2009. Maternal high-fat feeding primes steatohepatitis in adult mice offspring, involving mitochondrial dysfunction and altered lipogenesis gene expression. *Hepatology* 50, 1796–1808. <https://doi.org/10.1002/hep.23205>
- Bucher, S., Le Guillou, D., Allard, J., Pinon, G., Begriche, K., Tête, A., Sergent, O., Lagadic-Gossmann, D., Fromenty, B., 2018a. Possible Involvement of Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in a Cellular Model of

NAFLD Progression Induced by Benzo[a]pyrene/Ethanol CoExposure. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018, 4396403. <https://doi.org/10.1155/2018/4396403>

Bucher, S., Tête, A., Podechard, N., Liamin, M., Le Guillou, D., Chevanne, M., Coulouarn, C., Imran, M., Gallais, I., Fernier, M., Hamdaoui, Q., Robin, M.-A., Sergent, O., Fromenty, B., Lagadic-Gossmann, D., 2018b. Co-exposure to benzo[a]pyrene and ethanol induces a pathological progression of liver steatosis in vitro and in vivo. *Sci. Rep.* 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24403-1>

Buckley, J.P., Engel, S.M., Braun, J.M., Whyatt, R.M., Daniels, J.L., Mendez, M.A., Richardson, D.B., Xu, Y., Calafat, A.M., Wolff, M.S., Lanphear, B.P., Herring, A.H., Rundle, A.G., 2016. Prenatal phthalate exposures and body mass index among 4 to 7 year old children: A pooled analysis. *Epidemiol. Camb. Mass* 27, 449–458. <https://doi.org/10.1097/EDE.0000000000000436>

Buerger, A.N., Schmidt, J., Chase, A., Paixao, C., Patel, T.N., Brumback, B.A., Kane, A.S., Martyniuk, C.J., Bisesi, J.H., 2019. Examining the responses of the zebrafish (*Danio rerio*) gastrointestinal system to the suspected obesogen diethylhexyl phthalate. *Environ. Pollut.* 245, 1086–1094. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.032>

Buzzetti, E., Pinzani, M., Tsochatzis, E.A., 2016. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism, Nonalcoholic Fatty Liver Disease: From Epidemiology to Emerging Treatment(s)* 65, 1038–1048. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.12.012>

C

Caballero, F., Fernández, A., De Lacy, A.M., Fernández-Checa, J.C., Caballería, J., García-Ruiz, C., 2009. Enhanced free cholesterol, SREBP-2 and StAR expression in human NASH. *J. Hepatol.* 50, 789–796. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.12.016>

Cai, C., Lin, Y., Yu, C., 2019. Circulating miRNAs as Novel Diagnostic Biomarkers in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Can. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2019, 2096161. <https://doi.org/10.1155/2019/2096161>

Caito, S.W., Newell-Caito, J., Martell, M., Crawford, N., Aschner, M., 2020. Methylmercury Induces Metabolic Alterations in *Caenorhabditis elegans*: Role for C/EBP Transcription Factor. *Toxicol. Sci.* 174, 112–123. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz244>

Calzadilla Bertot, L., Adams, L., 2016. The Natural Course of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 774. <https://doi.org/10.3390/ijms17050774>

Camsari, C., Folger, J.K., Rajput, S.K., McGee, D., Latham, K.E., Smith, G.W., 2019. Transgenerational Effects of Periconception Heavy Metal Administration on Adipose Weight and Glucose Homeostasis in Mice at Maturity. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 168, 610–619. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz008>

Canbay, A., Feldstein, A.E., Higuchi, H., Werneburg, N., Grambihler, A., Bronk, S.F., Gores, G.J., 2003. Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression. *Hepatology* 38, 1188–1198. <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50472>

Cano, R., Pérez, J.L., Dávila, L.A., Ortega, Á., Gómez, Y., Valero-Cedeño, N.J., Parra, H., Manzano, A., Véliz Castro, T.I., Alborno, M.P.D., Cano, G., Rojas-Quintero, J., Chacín, M., Bermúdez, V., 2021. Role of Endocrine-Disrupting Chemicals in the Pathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Comprehensive Review. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 4807. <https://doi.org/10.3390/ijms22094807>

Cano-Nicolau, J., Vaillant, C., Pellegrini, E., Charlier, T.D., Kah, O., Coumailleau, P., 2016. Estrogenic Effects of Several BPA Analogs in the Developing Zebrafish Brain. *Front. Neurosci.* 10, 112. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00112>

- Cano-Sancho, G., Salmon, A.G., La Merrill, M.A., 2017. Association between Exposure to *p,p'*-DDT and Its Metabolite *p,p'*-DDE with Obesity: Integrated Systematic Review and Meta-Analysis. *Environ. Health Perspect.* 125, 096002. <https://doi.org/10.1289/EHP527>
- Cao, H., Wiemerslage, L., Marttila, P.S.K., Williams, M.J., Schiöth, H.B., 2016. Bis-(2-ethylhexyl) Phthalate Increases Insulin Expression and Lipid Levels in *Drosophila melanogaster*. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 119, 309–316. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12587>
- Cao, X.-L., Zhang, J., Goodyer, C.G., Hayward, S., Cooke, G.M., Curran, I.H.A., 2012. Bisphenol A in human placental and fetal liver tissues collected from Greater Montreal area (Quebec) during 1998–2008. *Chemosphere* 89, 505–511. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.05.003>
- Cariello, M., Piccinin, E., Moschetta, A., 2021. Transcriptional Regulation of Metabolic Pathways via Lipid-Sensing Nuclear Receptors PPARs, FXR, and LXR in NASH. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 1519–1539. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2021.01.012>
- Carten, J.D., Bradford, M.K., Farber, S.A., 2011. Visualizing digestive organ morphology and function using differential fatty acid metabolism in live zebrafish. *Dev. Biol.* 360, 276–285. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.09.010>
- Casals-Casas, C., Desvergne, B., 2011. Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annu. Rev. Physiol.* 73, 135–162. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-012110-142200>
- Cave, M., Appana, S., Patel, M., Falkner, K.C., McClain, C.J., Brock, G., 2010a. Polychlorinated Biphenyls, Lead, and Mercury Are Associated with Liver Disease in American Adults: NHANES 2003–2004. *Environ. Health Perspect.* 118, 1735–1742. <https://doi.org/10.1289/ehp.1002720>
- Cave M, Falkner KC, Henry L, Costello B, Gregory B, McClain CJ. Serum cytokeratin 18 and cytokine elevations suggest a high prevalence of occupational liver disease in highly exposed elastomer/polymer workers. *J Occup Environ Med.* 2011 Oct;53(10):1128-33. doi: 10.1097/JOM.0b013e31822cfd68. PMID: 21915069; PMCID: PMC3190062.
- Cave, M., Falkner, K.C., Ray, M., Joshi-Barve, S., Brock, G., Khan, R., Homme, M.B., McClain, C.J., 2010b. Toxicant-Associated Steatohepatitis In Vinyl Chloride Workers. *Hepatol. Baltim. Md* 51, 474–481. <https://doi.org/10.1002/hep.23321>
- Cave, M.C., Clair, H.B., Hardesty, J.E., Falkner, K.C., Feng, W., Clark, B.J., Sidey, J., Shi, H., Aqel, B.A., McClain, C.J., Prough, R.A., 2016. Nuclear receptors and nonalcoholic fatty liver disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1859, 1083–1099. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.03.002>
- Cazanave, S.C., Elmi, N.A., Akazawa, Y., Bronk, S.F., Mott, J.L., Gores, G.J., 2010. CHOP and AP-1 cooperatively mediate PUMA expression during lipoapoptosis. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 299, G236–G243. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00091.2010>
- Cazanave, S.C., Gores, G.J., 2010. Mechanisms and clinical implications of hepatocyte lipoapoptosis. *Clin. Lipidol.* 5, 71–85. <https://doi.org/10.2217/clp.09.85>
- Cazanave, S.C., Mott, J.L., Elmi, N.A., Bronk, S.F., Werneburg, N.W., Akazawa, Y., Kahraman, A., Garrison, S.P., Zambetti, G.P., Charlton, M.R., Gores, G.J., 2009. JNK1-dependent PUMA Expression Contributes to Hepatocyte Lipoapoptosis. *J. Biol. Chem.* 284, 26591–26602. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.022491>
- Cederbaum, A.I., Wu, D., Mari, M., Bai, J., 2001. CYP2E1-dependent toxicity and oxidative stress in HepG2 cells, 2
1Guest Editor: Arthur Cederbaum 2This article is part of a series on “Alcohol, Oxidative Stress and Cell Injury.” The full list of papers may be found on the homepage of the journal. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 1539–1543. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00743-2](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00743-2)

- Centers for Disease Control and Prevention, 2021. Fourth national report on human exposure to environmental chemicals. National Center for Environmental Health. <https://doi.org/10.15620/cdc:105345>
- Cermelli, S., Ruggieri, A., Marrero, J.A., Ioannou, G.N., Beretta, L., 2011. Circulating MicroRNAs in Patients with Chronic Hepatitis C and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *PLoS ONE* 6, e23937. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023937>
- Chalasani, N., Wilson, L., Kleiner, D.E., Cummings, O.W., Brunt, E.M., Ünalp, A., 2008. Relationship of steatosis grade and zonal location to histological features of steatohepatitis in adult patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* 48, 829–834. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.01.016>
- Chalasani, N., Younossi, Z., Lavine, J.E., Charlton, M., Cusi, K., Rinella, M., Harrison, S.A., Brunt, E.M., Sanyal, A.J., 2018. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 67, 328–357. <https://doi.org/10.1002/hep.29367>
- Chamorro-Garcia, R., Blumberg, B., 2014. Transgenerational effects of obesogens and the obesity epidemic. *Curr. Opin. Pharmacol.* 19, 153–158. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2014.10.010>
- Chamorro-García, R., Sahu, M., Abbey, R.J., Laude, J., Pham, N., Blumberg, B., 2013. Transgenerational inheritance of increased fat depot size, stem cell reprogramming, and hepatic steatosis elicited by prenatal exposure to the obesogen tributyltin in mice. *Environ. Health Perspect.* 121, 359–366. <https://doi.org/10.1289/ehp.1205701>
- Chang, Z.-Q., Lee, S.-Y., Kim, H.-J., Kim, J.R., Kim, S.-J., Hong, I.-K., Oh, B.-C., Choi, C.-S., Goldberg, I.J., Park, T.-S., 2011. Endotoxin activates de novo sphingolipid biosynthesis via nuclear factor kappa B-mediated upregulation of Sptlc2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 94, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2010.12.003>
- Chao, H.-W., Chao, S.-W., Lin, H., Ku, H.-C., Cheng, C.-F., 2019. Homeostasis of Glucose and Lipid in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 298. <https://doi.org/10.3390/ijms20020298>
- Charlton, M., Sreekumar, R., Rasmussen, D., Lindor, K., Nair, K.S., 2002. Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 35, 898–904. <https://doi.org/10.1053/jhep.2002.32527>
- Charlton, M.R., Burns, J.M., Pedersen, R.A., Watt, K.D., Heimbach, J.K., Dierkhising, R.A., 2011. Frequency and Outcomes of Liver Transplantation for Nonalcoholic Steatohepatitis in the United States. *Gastroenterology* 141, 1249–1253. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.06.061>
- Chaurasia, B., Summers, S.A., 2015. Ceramides – Lipotoxic Inducers of Metabolic Disorders. *Trends Endocrinol. Metab.* 26, 538–550. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.07.006>
- Chaurasia, B., Tippetts, T.S., Monibas, R.M., Liu, J., Li, Y., Wang, Liping, Wilkerson, J.L., Sweeney, C.R., Pereira, R.F., Sumida, D.H., Maschek, J.A., Cox, J.E., Kaddai, V., Lancaster, G.I., Siddique, M.M., Poss, A., Pearson, M., Satapati, S., Zhou, H., McLaren, D.G., Previs, S.F., Chen, Y., Qian, Y., Petrov, A., Wu, M., Shen, X., Yao, J., Nunes, C.N., Howard, A.D., Wang, Liangsu, Erion, M.D., Rutter, J., Holland, W.L., Kelley, D.E., Summers, S.A., 2019. Targeting a ceramide double bond improves insulin resistance and hepatic steatosis. *Science* 365, 386–392. <https://doi.org/10.1126/science.aav3722>
- Chen, B., Zheng, Y.-M., Zhang, J.-P., 2018. Comparative Study of Different Diets-Induced NAFLD Models of Zebrafish. *Front. Endocrinol.* 9, 366. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00366>
- Chen, B., Zheng, Y.-M., Zhang, M.-Q., Han, Y., Zhang, J.-P., Hu, C.-Q., 2020. Microarray Expression Profiling and Raman Spectroscopy Reveal Anti-Fatty Liver Action of Berberine in a Diet-Induced Larval Zebrafish Model. *Front. Pharmacol.* 10, 1504. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01504>

- Chen, H., Sheng, L., Gong, Z., Ru, S., Bian, H., 2018. Investigation of the molecular mechanisms of hepatic injury upon naphthalene exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology* 27, 650–660. <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1943-3>
- Chen, H., Zhang, W., Rui, B., Yang, S., Xu, W., Wei, W., 2016. Di(2-ethylhexyl) phthalate exacerbates non-alcoholic fatty liver in rats and its potential mechanisms. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 42, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.12.016>
- Chen, J., Talwalkar, J.A., Yin, M., Glaser, K.J., Sanderson, S.O., Ehman, R.L., 2011. Early Detection of Nonalcoholic Steatohepatitis in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease by Using MR Elastography. *Radiology* 259, 749–756. <https://doi.org/10.1148/radiol.11101942>
- Chen, L., Yang, G., 2014. PPARs Integrate the Mammalian Clock and Energy Metabolism. *PPAR Res.* 2014, 653017. <https://doi.org/10.1155/2014/653017>
- Chen, M.-Y., Liu, H.-P., Cheng, J., Chiang, S.-Y., Liao, W.-P., Lin, W.-Y., 2019. Transgenerational impact of DEHP on body weight of *Drosophila*. *Chemosphere* 221, 493–499. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.193>
- Chen, N., Shan, Q., Qi, Y., Liu, W., Tan, X., Gu, J., 2020. Transcriptome analysis in normal human liver cells exposed to 2, 3, 3', 4, 4', 5 - Hexachlorobiphenyl (PCB 156). *Chemosphere* 239, 124747. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124747>
- Chen, X., Li, Linzhao, Liu, X., Luo, R., Liao, G., Li, Lan, Liu, J., Cheng, J., Lu, Y., Chen, Y., 2018. Oleic acid protects saturated fatty acid mediated lipotoxicity in hepatocytes and rat of non-alcoholic steatohepatitis. *Life Sci.* 203, 291–304. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.04.022>
- Chen, Z., Tian, R., She, Z., Cai, J., Li, H., 2020. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic. Biol. Med.* 152, 116–141. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.025>
- Cheng, J., Lv, S., Nie, S., Liu, J., Tong, S., Kang, N., Xiao, Y., Dong, Q., Huang, C., Yang, D., 2016. Chronic perfluorooctane sulfonate (PFOS) exposure induces hepatic steatosis in zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 176, 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.04.013>
- Cheng, X., Li, J., Guo, D., 2018. SCAP/SREBPs Are Central Players in Lipid Metabolism and Novel Metabolic Targets in Cancer Therapy. *Curr. Top. Med. Chem.* 18, 484–493. <https://doi.org/10.2174/1568026618666180523104541>
- Cheung O, Puri P, Eicken C, Contos MJ, Mirshahi F, Maher JW, Kellum JM, Min H, Luketic VA, Sanyal AJ. Nonalcoholic steatohepatitis is associated with altered hepatic MicroRNA expression. *Hepatology.* 2008 Dec;48(6):1810-20. doi: 10.1002/hep.22569. PMID: 19030170; PMCID: PMC2717729.
- Chi, N.C., Shaw, R.M., De Val, S., Kang, G., Jan, L.Y., Black, B.L., Stainier, D.Y.R., 2008. Foxn4 directly regulates tbx2b expression and atrioventricular canal formation. *Genes Dev.* 22, 734–739. <https://doi.org/10.1101/gad.1629408>
- Chiappini, F., Coilly, A., Kadar, H., Gual, P., Tran, A., Desterke, C., Samuel, D., Duclos-Vallée, J.-C., Touboul, D., Bertrand-Michel, J., Brunelle, A., Guettier, C., Le Naour, F., 2017. Metabolism dysregulation induces a specific lipid signature of nonalcoholic steatohepatitis in patients. *Sci. Rep.* 7, 46658. <https://doi.org/10.1038/srep46658>
- Chiu, C.-C., Ching, Y.-H., Li, Y.-P., Liu, J.-Y., Huang, Y.-T., Huang, Y.-W., Yang, S.-S., Huang, W.-C., Chuang, H.-L., 2017. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Is Exacerbated in High-Fat Diet-Fed Gnotobiotic Mice by Colonization with the Gut Microbiota from Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Nutrients* 9, 1220. <https://doi.org/10.3390/nu9111220>

- Christou, M., Kavaliauskis, A., Ropstad, E., Fraser, T.W.K., 2020. DMSO effects larval zebrafish (*Danio rerio*) behavior, with additive and interaction effects when combined with positive controls. *Sci. Total Environ.* 709, 134490. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134490>
- Chu, J., Sadler, K.C., 2009. New school in liver development: Lessons from zebrafish. *Hepatology* 50, 1656–1663. <https://doi.org/10.1002/hep.23157>
- Cichocki, J.A., Furuya, S., Konganti, K., Luo, Y.-S., McDonald, T.J., Iwata, Y., Chiu, W.A., Threadgill, D.W., Pogribny, I.P., Rusyn, I., 2017. Impact of Nonalcoholic Fatty Liver Disease on Toxicokinetics of Tetrachloroethylene in Mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 361, 17–28. <https://doi.org/10.1124/jpet.116.238790>
- Cinaroglu, A., Gao, C., Imrie, D., Sadler, K.C., 2011. Activating transcription factor 6 plays protective and pathological roles in steatosis due to endoplasmic reticulum stress in zebrafish. *Hepatology* 54, 495–508. <https://doi.org/10.1002/hep.24396>
- Cleal, M., Gibbon, A., Fontana, B.D., Parker, M.O., 2020. The importance of pH: How aquarium water is affecting behavioural responses to drug exposure in larval zebrafish. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 199, 173066. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2020.173066>
- Cobbina, E., Akhlaghi, F., 2017. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) – pathogenesis, classification, and effect on drug metabolizing enzymes and transporters. *Drug Metab. Rev.* 49, 197–211. <https://doi.org/10.1080/03602532.2017.1293683>
- Coe, T.S., Hamilton, P.B., Griffiths, A.M., Hodgson, D.J., Wahab, M.A., Tyler, C.R., 2009. Genetic variation in strains of zebrafish (*Danio rerio*) and the implications for ecotoxicology studies. *Ecotoxicology* 18, 144–150. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0267-0>
- Collin, A., Hardonnière, K., Chevanne, M., Vuillemin, J., Podechard, N., Burel, A., Dimanche-Boitrel, M.-T., Lagadic-Gossmann, D., Sergent, O., 2014. Cooperative interaction of benzo[a]pyrene and ethanol on plasma membrane remodeling is responsible for enhanced oxidative stress and cell death in primary rat hepatocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 72, 11–22. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.029>
- Colombini, M., 2010. Ceramide channels and their role in mitochondria-mediated apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.*, 16th European Bioenergetics Conference 2010 1797, 1239–1244. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2010.01.021>
- Conde-Vancells, J., Rodriguez-Suarez, E., Embade, N., Gil, D., Matthiesen, R., Valle, M., Elortza, F., Lu, S.C., Mato, J.M., Falcon-Perez, J.M., 2008. Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. *J. Proteome Res.* 7, 5157–5166. <https://doi.org/10.1021/pr8004887>
- Corton, J.C., Cunningham, M.L., Hummer, B.T., Lau, C., Meek, B., Peters, J.M., Popp, J.A., Rhomberg, L., Seed, J., Klaunig, J.E., 2014. Mode of action framework analysis for receptor-mediated toxicity: The peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) as a case study. *Crit. Rev. Toxicol.* 44, 1–49. <https://doi.org/10.3109/10408444.2013.835784>
- Cox, A.G., Goessling, W., 2015. The lure of zebrafish in liver research: regulation of hepatic growth in development and regeneration. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 32, 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2015.03.002>
- Cruz-Garcia, L., Schlegel, A., 2014. Lxr-driven enterocyte lipid droplet formation delays transport of ingested lipids. *J. Lipid Res.* 55, 1944–1958. <https://doi.org/10.1194/jlr.M052845>
- Csak, T., Bala, S., Lippai, D., Satishchandran, A., Catalano, D., Kodys, K., Szabo, G., 2015. microRNA-122 regulates hypoxia-inducible factor-1 and vimentin in hepatocytes and correlates with fibrosis in diet-induced steatohepatitis. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* 35, 532–541. <https://doi.org/10.1111/liv.12633>

- Csak, T., Pillai, A., Ganz, M., Lippai, D., Petrasek, J., Park, J.-K., Kodys, K., Dolganiuc, A., Kurt-Jones, E.A., Szabo, G., 2014. Both bone marrow-derived and non-bone marrow-derived cells contribute to AIM2 and NLRP3 inflammasome activation in a MyD88-dependent manner in dietary steatohepatitis. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* 34, 1402–1413. <https://doi.org/10.1111/liv.12537>
- Cui, Y., Lv, S., Liu, J., Nie, S., Chen, J., Dong, Q., Huang, C., Yang, D., 2017. Chronic perfluorooctanesulfonic acid exposure disrupts lipid metabolism in zebrafish. *Hum. Exp. Toxicol.* 36, 207–217. <https://doi.org/10.1177/0960327116646615>
- Cullinan, S.B., Diehl, J.A., 2006. Coordination of ER and oxidative stress signaling: The PERK/Nrf2 signaling pathway. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 317–332. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.09.018>
- Cunningham, R.P., Porat-Shliom, N., 2021. Liver Zonation – Revisiting Old Questions With New Technologies. *Front. Physiol.* 12, 732929. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.732929>
- Cyphert, H.A., Ge, X., Kohan, A.B., Salati, L.M., Zhang, Y., Hillgartner, F.B., 2012. Activation of the Farnesoid X Receptor Induces Hepatic Expression and Secretion of Fibroblast Growth Factor 21. *J. Biol. Chem.* 287, 25123–25138. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.375907>

D

- Dai, W., Wang, K., Zheng, X., Chen, X., Zhang, W., Zhang, Y., Hou, J., Liu, L., 2015. High fat plus high cholesterol diet lead to hepatic steatosis in zebrafish larvae: a novel model for screening anti-hepatic steatosis drugs. *Nutr. Metab.* 12. <https://doi.org/10.1186/s12986-015-0036-z>
- Dai, W., Ye, L., Liu, A., Wen, S.W., Deng, J., Wu, X., Lai, Z., 2017. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Medicine (Baltimore)* 96, e8179. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000008179>
- Dale, K., Yadetie, F., Horvli, T., Zhang, X., Frøysa, H.G., Karlsen, O.A., Goksøyr, A., 2022. Single PFAS and PFAS mixtures affect nuclear receptor- and oxidative stress-related pathways in precision-cut liver slices of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Sci. Total Environ.* 814, 152732. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152732>
- Dallio, M., Diano, N., Masarone, M., Gravina, A.G., Patanè, V., Romeo, M., Di Sarno, R., Errico, S., Nicolucci, C., Abenavoli, L., Scarpellini, E., Boccuto, L., Persico, M., Loguercio, C., Federico, A., 2019. Chemical Effect of Bisphenol A on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 16, 3134. <https://doi.org/10.3390/ijerph16173134>
- Dallio, M., Masarone, M., Errico, S., Gravina, A.G., Nicolucci, C., Sarno, R.D., Gionti, L., Tuccillo, C., Persico, M., Stiuso, P., Diano, N., Loguercio, C., Federico, A., 2018. Role of bisphenol A as environmental factor in the promotion of non-alcoholic fatty liver disease: in vitro and clinical study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 47, 826–837. <https://doi.org/10.1111/apt.14499>
- Dapito, D.H., Mencin, A., Gwak, G.-Y., Pradere, J.-P., Jang, M.-K., Mederacke, I., Caviglia, J.M., Khiabani, H., Adeyemi, A., Bataller, R., Lefkowitz, J.H., Bower, M., Friedman, R., Sartor, R.B., Rabadan, R., Schwabe, R.F., 2012. Promotion of Hepatocellular Carcinoma by the Intestinal Microbiota and TLR4. *Cancer Cell* 21, 504–516. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.007>
- Darbre, 2015. *Endocrine Disruption and Human Health - 1st Edition [WWW Document]*. URL <https://www.elsevier.com/books/endocrine-disruption-and-human-health/darbre/978-0-12-801139-3> (accessed 11.24.22).
- Darbre, P.D., 2017. Endocrine Disruptors and Obesity. *Curr. Obes. Rep.* 6, 18–27. <https://doi.org/10.1007/s13679-017-0240-4>

- Darbre, P.D., Harvey, P.W., 2008. Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. *J. Appl. Toxicol.* 28, 561–578. <https://doi.org/10.1002/jat.1358>
- Das, S., Alhasson, F., Dattaroy, D., Pourhoseini, S., Seth, R.K., Nagarkatti, M., Nagarkatti, P.S., Michelotti, G.A., Diehl, A.M., Kalyanaraman, B., Chatterjee, S., 2015. NADPH Oxidase-Derived Peroxynitrite Drives Inflammation in Mice and Human Nonalcoholic Steatohepatitis via TLR4-Lipid Raft Recruitment. *Am. J. Pathol.* 185, 1944–1957. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.03.024>
- de Oliveira, S., Houseright, R.A., Graves, A.L., Golenberg, N., Korte, B.G., Miskolci, V., Huttenlocher, A., 2019. Metformin modulates innate immune inflammation and early progression of NAFLD-associated hepatocellular carcinoma in zebrafish. *J. Hepatol.* 70, 710–721. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.11.034>
- de Souza Anselmo, C., Sardela, V.F., de Sousa, V.P., Pereira, H.M.G., 2018. Zebrafish (*Danio rerio*): A valuable tool for predicting the metabolism of xenobiotics in humans? *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 212, 34–46. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.06.005>
- Deal, S., Wambaugh, J., Judson, R., Mosher, S., Radio, N., Houck, K., Padilla, S., 2016. Development of a quantitative morphological assessment of toxicant-treated zebrafish larvae using brightfield imaging and high-content analysis. *J. Appl. Toxicol.* 36, 1214–1222. <https://doi.org/10.1002/jat.3290>
- Deierlein, A.L., Rock, S., Park, S., 2017. Persistent Endocrine-Disrupting Chemicals and Fatty Liver Disease. *Curr. Environ. Health Rep.* 4, 439–449. <https://doi.org/10.1007/s40572-017-0166-8>
- Del Campo, J.A., Gallego-Durán, R., Gallego, P., Grande, L., 2018. Genetic and Epigenetic Regulation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Int. J. Mol. Sci.* 19, 911. <https://doi.org/10.3390/ijms19030911>
- Delfosse, V., Maire, A. le, Balaguer, P., Bourguet, W., 2015. A structural perspective on nuclear receptors as targets of environmental compounds. *Acta Pharmacol. Sin.* 36, 88–101. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.133>
- Den Broeder, M.J., Kopylova, V.A., Kamminga, L.M., Legler, J., 2015. Zebrafish as a Model to Study the Role of Peroxisome Proliferating-Activated Receptors in Adipogenesis and Obesity. *PPAR Res.* 2015, 358029. <https://doi.org/10.1155/2015/358029>
- Deng, K.-Q., Huang, X., Lei, F., Zhang, X.-J., Zhang, P., She, Z.-G., Cai, J., Ji, Y.-X., Li, H., 2022. Role of hepatic lipid species in the progression of nonalcoholic fatty liver disease. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 323, C630–C639. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00123.2022>
- Deniaud, A., Sharaf el dein, O., Maillier, E., Poncet, D., Kroemer, G., Lemaire, C., Brenner, C., 2008. Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Oncogene* 27, 285–299. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210638>
- Dentin, R., Benhamed, F., Hainault, I., Fauveau, V., Foufelle, F., Dyck, J.R.B., Girard, J., Postic, C., 2006. Liver-Specific Inhibition of ChREBP Improves Hepatic Steatosis and Insulin Resistance in ob/ob Mice. *Diabetes* 55, 2159–2170. <https://doi.org/10.2337/db06-0200>
- Deprince, A., Haas, J.T., Staels, B., 2020. Dysregulated lipid metabolism links NAFLD to cardiovascular disease. *Mol. Metab.* 42, 101092. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101092>
- DeRossi, C., Vacaru, A., Rafiq, R., Cinaroglu, A., Imrie, D., Nayar, S., Baryshnikova, A., Milev, M.P., Stanga, D., Kadakia, D., Gao, N., Chu, J., Freeze, H.H., Lehrman, M.A., Sacher, M., Sadler, K.C., 2016. trappc11 is required for protein glycosylation in zebrafish and humans. *Mol. Biol. Cell* 27, 1220–1234. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-08-0557>

- DiStefano, J.K., 2020. NAFLD and NASH in Postmenopausal Women: Implications for Diagnosis and Treatment. *Endocrinology* 161, bqaa134. <https://doi.org/10.1210/endo/bqaa134>
- Doerge, H., Baillie, R.A., Ortegon, A.M., Tsang, B., Wu, Q., Punreddy, S., Hirsch, D., Watson, N., Gimeno, R.E., Stahl, A., 2006. Targeted Deletion of FATP5 Reveals Multiple Functions in Liver Metabolism: Alterations in Hepatic Lipid Homeostasis. *Gastroenterology* 130, 1245–1258. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.02.006>
- Dominguez-Salas, P., Moore, S.E., Baker, M.S., Bergen, A.W., Cox, S.E., Dyer, R.A., Fulford, A.J., Guan, Y., Laritsky, E., Silver, M.J., Swan, G.E., Zeisel, S.H., Innis, S.M., Waterland, R.A., Prentice, A.M., Hennig, B.J., 2014. Maternal nutrition at conception modulates DNA methylation of human metastable epialleles. *Nat. Commun.* 5, 3746. <https://doi.org/10.1038/ncomms4746>
- Dong, B., Saha, P.K., Huang, W., Chen, W., Abu-Elheiga, L.A., Wakil, S.J., Stevens, R.D., Ilkayeva, O., Newgard, C.B., Chan, L., Moore, D.D., 2009. Activation of nuclear receptor CAR ameliorates diabetes and fatty liver disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 18831–18836. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909731106>
- Dong, G., Zhang, R., Huang, H., Lu, C., Xia, Y., Wang, X., Du, G., 2021. Exploration of the developmental toxicity of TCS and PFOS to zebrafish embryos by whole-genome gene expression analyses. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 28, 56032–56042. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14527-9>
- Donnelly, K.L., Smith, C.I., Schwarzenberg, S.J., Jessurun, J., Boldt, M.D., Parks, E.J., 2005. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest.* 115, 1343–1351. <https://doi.org/10.1172/JCI200523621>
- Dooley, S., ten Dijke, P., 2012. TGF- β in progression of liver disease. *Cell Tissue Res.* 347, 245–256. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1246-y>
- Driessen, M., Kienhuis, A.S., Pennings, J.L.A., Pronk, T.E., van de Brandhof, E.-J., Roodbergen, M., Spink, H.P., van de Water, B., van der Ven, L.T.M., 2013. Exploring the zebrafish embryo as an alternative model for the evaluation of liver toxicity by histopathology and expression profiling. *Arch. Toxicol.* 87, 807–823. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1039-z>
- Driessen, M., Kienhuis, A.S., Vitins, A.P., Pennings, J.L.A., Pronk, T.E., Brandhof, E.-J. van den, Roodbergen, M., Water, B. van de, Ven, L.T.M. van der, 2014. Gene expression markers in the zebrafish embryo reflect a hepatotoxic response in animal models and humans. *Toxicol. Lett.* 230, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.06.844>
- Driessen, M., Vitins, A.P., Pennings, J.L.A., Kienhuis, A.S., Water, B. van de, van der Ven, L.T.M., 2015. A transcriptomics-based hepatotoxicity comparison between the zebrafish embryo and established human and rodent in vitro and in vivo models using cyclosporine A, amiodarone and acetaminophen. *Toxicol. Lett.* 232, 403–412. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.11.020>
- du Plessis, J., van Pelt, J., Korf, H., Mathieu, C., van der Schueren, B., Lannoo, M., Oyen, T., Topal, B., Fetter, G., Nayler, S., van der Merwe, T., Windmolders, P., Van Gaal, L., Verrijken, A., Hubens, G., Gericke, M., Cassiman, D., Francque, S., Nevens, F., van der Merwe, S., 2015. Association of Adipose Tissue Inflammation With Histologic Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 149, 635–648.e14. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.05.044>
- Du, Y., Shi, X., Liu, C., Yu, K., Zhou, B., 2009. Chronic effects of water-borne PFOS exposure on growth, survival and hepatotoxicity in zebrafish: A partial life-cycle test. *Chemosphere* 74, 723–729. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.09.075>

- Ducheix, S., Montagner, A., Theodorou, V., Ferrier, L., Guillou, H., 2013a. The liver X receptor: A master regulator of the gut–liver axis and a target for non alcoholic fatty liver disease. *Biochem. Pharmacol., European Network for Oxysterol Research* 86, 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.03.016>
- Ducheix, S., Podechard, N., Lasserre, F., Polizzi, A., Pommier, A., Murzilli, S., Di Lisio, C., D'Amore, S., Bertrand-Michel, J., Montagner, A., Pineau, T., Loiseau, N., Lobaccaro, J.-M., Martin, P.G.P., Guillou, H., 2013b. A systems biology approach to the hepatic role of the oxysterol receptor LXR in the regulation of lipogenesis highlights a cross-talk with PPAR α . *Biochimie, Oxysterols and Related Sterols in Chemistry, Biology and Medicine* 95, 556–567. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.09.028>
- Ducheix, S., Vegliante, M.C., Villani, G., Napoli, N., Sabbà, C., Moschetta, A., 2016. Is hepatic lipogenesis fundamental for NAFLD/NASH? A focus on the nuclear receptor coactivator PGC-1 β . *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 73, 3809–3822. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2331-x>
- Dulai, P.S., Singh, S., Patel, J., Soni, M., Prokop, L.J., Younossi, Z., Sebastiani, G., Ekstedt, M., Hagstrom, H., Nasr, P., Stal, P., Wong, V.W.-S., Kechagias, S., Hultcrantz, R., Loomba, R., 2017. Increased risk of mortality by fibrosis stage in non-alcoholic fatty liver disease: Systematic Review and Meta-analysis. *Hepatol. Baltim. Md* 65, 1557–1565. <https://doi.org/10.1002/hep.29085>
- Duval, C., Teixeira-Clerc, F., Leblanc, A.F., Touch, S., Emond, C., Guerre-Millo, M., Lotersztajn, S., Barouki, R., Aggerbeck, M., Coumoul, X., 2017. Chronic Exposure to Low Doses of Dioxin Promotes Liver Fibrosis Development in the C57BL/6J Diet-Induced Obesity Mouse Model. *Environ. Health Perspect.* 125, 428–436. <https://doi.org/10.1289/EHP316>

E

- EASL–EASD–EASO Guidelines, 2016. EASL–EASD–EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* 64, 1388–1402. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.11.004>
- Egnatchik, R.A., Leamy, A.K., Noguchi, Y., Shiota, M., Young, J.D., 2014. Palmitate-induced Activation of Mitochondrial Metabolism Promotes Oxidative Stress and Apoptosis in H4IIEC3 Rat Hepatocytes. *Metabolism.* 63, 283–295. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2013.10.009>
- Eguchi, A., Feldstein, A.E., 2018. Extracellular vesicles in non-alcoholic and alcoholic fatty liver diseases. *Liver Res.* 2, 30–34. <https://doi.org/10.1016/j.livres.2018.01.001>
- ElGhandour, A.M., Awad, E.A., Abdel-Hamid, R.H.A., Mansour, A.M.F., 2021. Evaluation of the Role of Hyaluronic Acid as A potential Biomarker for Diagnosis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Egypt. J. Hosp. Med.* 83, 957–963. <https://doi.org/10.21608/ejhm.2021.158087>
- Ellett, F., Pase, L., Hayman, J.W., Andrianopoulos, A., Lieschke, G.J., 2011. mpeg1 promoter transgenes direct macrophage-lineage expression in zebrafish. *Blood* 117, e49–e56. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-314120>
- Elmore, S.E., La Merrill, M.A., 2019. Oxidative Phosphorylation Impairment by DDT and DDE. *Front. Endocrinol.* 10, 122. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00122>
- Eslam, M., Newsome, P.N., Sarin, S.K., Anstee, Q.M., Targher, G., Romero-Gomez, M., Zelber-Sagi, S., Wai-Sun Wong, V., Dufour, J.-F., Schattenberg, J.M., Kawaguchi, T., Arrese, M., Valenti, L., Shiha, G., Tiribelli, C., Yki-Järvinen, H., Fan, J.-G., Grønbaek, H., Yilmaz, Y., Cortez-Pinto, H., Oliveira, C.P., Bedossa, P., Adams, L.A., Zheng, M.-H., Fouad, Y., Chan, W.-K., Mendez-Sanchez, N., Ahn, S.H., Castera, L., Bugianesi, E., Ratziu, V., George, J., 2020. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. *J. Hepatol.* 73, 202–209. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.03.039>

- Eslam, M., Valenti, L., Romeo, S., 2018. Genetics and epigenetics of NAFLD and NASH: Clinical impact. *J. Hepatol.*, NAFLD: Emerging perspectives 68, 268–279. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.09.003>
- Esteban, J.P.G., Asgharpour, A., 2022. Evaluation of liver transplant candidates with non-alcoholic steatohepatitis. *Transl. Gastroenterol. Hepatol.* 7, 24. <https://doi.org/10.21037/tgh.2020.03.04>
- Estes, C., Razavi, H., Loomba, R., Younossi, Z., Sanyal, A.J., 2018. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatol. Baltim. Md* 67, 123–133. <https://doi.org/10.1002/hep.29466>
- Evans, R.M., Mangelsdorf, D.J., 2014. Nuclear Receptors, RXR & the Big Bang. *Cell* 157, 255–266. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.012>

F

- Fabbrini, E., Mohammed, B.S., Magkos, F., Korenblat, K.M., Patterson, B.W., Klein, S., 2008. Alterations in Adipose Tissue and Hepatic Lipid Kinetics in Obese Men and Women With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 134, 424–431. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.11.038>
- Fader, K.A., Nault, R., Kirby, M.P., Markous, G., Matthews, J., Zacharewski, T.R., 2017. Convergence of hepcidin deficiency, systemic iron overloading, heme accumulation, and REV-ERB α/β activation in aryl hydrocarbon receptor-elicited hepatotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 321, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.02.006>
- Fader, K.A., Zacharewski, T.R., 2017. Beyond the Aryl Hydrocarbon Receptor: Pathway Interactions in the Hepatotoxicity of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and Related Compounds. *Curr. Opin. Toxicol.* 2, 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2017.01.010>
- Fai Tse, W.K., Li, J.W., Kwan Tse, A.C., Chan, T.F., Hin Ho, J.C., Sun Wu, R.S., Chu Wong, C.K., Lai, K.P., 2016. Fatty liver disease induced by perfluorooctane sulfonate: Novel insight from transcriptome analysis. *Chemosphere* 159, 166–177. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.05.060>
- Faillaci, F., Milosa, F., Critelli, R.M., Turola, E., Schepis, F., Villa, E., 2018. Obese zebrafish: A small fish for a major human health condition. *Anim. Models Exp. Med.* 1, 255–265. <https://doi.org/10.1002/ame2.12042>
- Falcon, A., Doege, H., Fluitt, A., Tsang, B., Watson, N., Kay, M.A., Stahl, A., 2010. FATP2 is a hepatic fatty acid transporter and peroxisomal very long-chain acyl-CoA synthetase. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 299, E384–E393. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00226.2010>
- Fam, T., Klymchenko, A., Collot, M., 2018. Recent Advances in Fluorescent Probes for Lipid Droplets. *Materials* 11, 1768. <https://doi.org/10.3390/ma11091768>
- Fan, Q., Nørgaard, R.C., Bindsbøll, C., Lucas, C., Dalen, K.T., Babaie, E., Itkonen, H.M., Matthews, J., Nebb, H.I., Grønning-Wang, L.M., 2017. LXR α Regulates Hepatic ChREBP α Activity and Lipogenesis upon Glucose, but Not Fructose Feeding in Mice. *Nutrients* 9, 678. <https://doi.org/10.3390/nu9070678>
- Farhadi, A., Gundlapalli, S., Shaikh, M., Frantzides, C., Harrell, L., Kwasny, M.M., Keshavarzian, A., 2008. Susceptibility to gut leakiness: a possible mechanism for endotoxaemia in non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* 28, 1026–1033. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2008.01723.x>
- Feldstein, A.E., Canbay, A., Angulo, P., Taniai, M., Burgart, L.J., Lindor, K.D., Gores, G.J., 2003. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 125, 437–443. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(03\)00907-7](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(03)00907-7)

- Feng, D., Zhang, H., Jiang, X., Zou, J., Li, Q., Mai, H., Su, D., Ling, W., Feng, X., 2020. Bisphenol A exposure induces gut microbiota dysbiosis and consequent activation of gut-liver axis leading to hepatic steatosis in CD-1 mice. *Environ. Pollut.* 265, 114880. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114880>
- Ferrari, J.T., Ayres, R., Hammes, T.O., Silveira, T.R. da, Uribe-Cruz, C., 2018. Experimental model of hepatic steatosis by fructose in adult zebrafish: A pilot study. *Clin. Biomed. Res.* 38, 151–154. <https://doi.org/10.4322/2357-9730.77997>
- Ferré, P., Foufelle, F., 2010. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes Obes. Metab.* 12, 83–92. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2010.01275.x>
- Field, H.A., Ober, E.A., Roeser, T., Stainier, D.Y.R., 2003. Formation of the digestive system in zebrafish. I. liver morphogenesis. *Dev. Biol.* 253, 279–290. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(02\)00017-9](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(02)00017-9)
- Fillol, C., Oleko, A., Saoudi, A., Zeghnoun, A., Balicco, A., Gane, J., Rambaud, L., Leblanc, A., Gaudreau, É., Marchand, P., Le Bizec, B., Bouchart, V., Le Gléau, F., Durand, G., Denys, S., 2021. Exposure of the French population to bisphenols, phthalates, parabens, glycol ethers, brominated flame retardants, and perfluorinated compounds in 2014–2016: Results from the Esteban study. *Environ. Int.* 147, 106340. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106340>
- Fischer, S., Klüver, N., Burkhardt-Medicke, K., Pietsch, M., Schmidt, A.-M., Wellner, P., Schirmer, K., Luckenbach, T., 2013. Abcb4 acts as multixenobiotic transporter and active barrier against chemical uptake in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *BMC Biol.* 11, 69. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-11-69>
- Fisher, C.D., Lickteig, A.J., Augustine, L.M., Ranger-Moore, J., Jackson, J.P., Ferguson, S.S., Cherrington, N.J., 2009. Hepatic Cytochrome P450 Enzyme Alterations in Humans with Progressive Stages of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Drug Metab. Dispos.* 37, 2087–2094. <https://doi.org/10.1124/dmd.109.027466>
- Fleming, A., Alderton, W.K., 2013. Zebrafish in pharmaceutical industry research: finding the best fit. *Drug Discov. Today Dis. Models*, Zebrafish as a platform for in vivo drug discovery 10, e43–e50. <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2012.02.006>
- Flowers, M.T., Ntambi, J.M., 2008. Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in regulating lipid metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* 19, 248–256. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e3282f9b54d>
- Fontana, B.D., Mezzomo, N.J., Kalueff, A.V., Rosemberg, D.B., 2018. The developing utility of zebrafish models of neurological and neuropsychiatric disorders: A critical review. *Exp. Neurol.* 299, 157–171. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.10.004>
- Forner-Piquer, I., Santangeli, S., Maradonna, F., Verde, R., Piscitelli, F., di Marzo, V., Habibi, H.R., Carnevali, O., 2018. Role of Bisphenol A on the Endocannabinoid System at central and peripheral levels: Effects on adult female zebrafish. *Chemosphere* 205, 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.078>
- Foulds, C.E., Treviño, L.S., York, B., Walker, C.L., 2017. Endocrine-disrupting chemicals and fatty liver disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* 13, 445–457. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.42>
- Fracanzani, A.L., Valenti, L., Bugianesi, E., Vanni, E., Grieco, A., Miele, L., Consonni, D., Fatta, E., Lombardi, R., Marchesini, G., Fargion, S., 2011. Risk of nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease and low visceral adiposity. *J. Hepatol.* 54, 1244–1249. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.09.037>
- Fraher, D., Sanigorski, A., Mellett, N.A., Meikle, P.J., Sinclair, A.J., Gibert, Y., 2016. Zebrafish Embryonic Lipidomic Analysis Reveals that the Yolk Cell Is Metabolically Active in Processing Lipid. *Cell Rep.* 14, 1317–1329. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.016>

- Francque, S., Verrijken, A., Caron, S., Prawitt, J., Paumelle, R., Derudas, B., Lefebvre, P., Taskinen, M.-R., Van Hul, W., Mertens, I., Hubens, G., Van Marck, E., Michielsen, P., Van Gaal, L., Staels, B., 2015. PPAR α gene expression correlates with severity and histological treatment response in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *J. Hepatol.* 63, 164–173. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.02.019>
- Friedman, S.L., Neuschwander-Tetri, B.A., Rinella, M., Sanyal, A.J., 2018. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat. Med.* 24, 908–922. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0104-9>
- Fromenty, B., 2019. Inhibition of mitochondrial fatty acid oxidation in drug-induced hepatic steatosis. *Liver Res.* 3, 157–169. <https://doi.org/10.1016/j.livres.2019.06.001>
- Fromenty, B., Roden, M., 2022. Mitochondrial alterations in fatty liver diseases. *J. Hepatol.* <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.09.020>
- Fu, S., Watkins, S.M., Hotamisligil, G.S., 2012. The Role of Endoplasmic Reticulum in Hepatic Lipid Homeostasis and Stress Signaling. *Cell Metab.* 15, 623–634. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.03.007>
- Fu, Z., Xi, S., 2020. The effects of heavy metals on human metabolism. *Toxicol. Mech. Methods* 30, 167–176. <https://doi.org/10.1080/15376516.2019.1701594>
- Fucho, R., Casals, N., Serra, D., Herrero, L., 2017. Ceramides and mitochondrial fatty acid oxidation in obesity. *FASEB J.* 31, 1263–1272. <https://doi.org/10.1096/fj.201601156R>
- Fucho R, Martínez L, Baulies A, Torres S, Tarrats N, Fernandez A, Ribas V, Astudillo AM, Balsinde J, Garcia-Rovés P, Elena M, Bergheim I, Lotersztajn S, Trautwein C, Appelqvist H, Paton AW, Paton JC, Czaja MJ, Kaplowitz N, Fernandez-Checa JC, García-Ruiz C. ASMase regulates autophagy and lysosomal membrane permeabilization and its inhibition prevents early stage non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol.* 2014 Nov;61(5):1126-34. doi: 10.1016/j.jhep.2014.06.009. Epub 2014 Jun 16. PMID: 24946279; PMCID: PMC4203709.
- Fujii, J., Homma, T., Kobayashi, S., Seo, H.G., 2018. Mutual interaction between oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of diseases specifically focusing on non-alcoholic fatty liver disease. *World J. Biol. Chem.* 9, 1–15. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v9.i1.1>

G

- Galaris, D., Pantopoulos, K., 2008. Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 45, 1–23. <https://doi.org/10.1080/10408360701713104>
- Gao, J., He, J., Zhai, Y., Wada, T., Xie, W., 2009. The Constitutive Androstane Receptor Is an Anti-obesity Nuclear Receptor That Improves Insulin Sensitivity. *J. Biol. Chem.* 284, 25984–25992. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.016808>
- Garcia, G.R., Noyes, P.D., Tanguay, R.L., 2016. Advancements in zebrafish applications for 21st century toxicology. *Pharmacol. Ther.* 161, 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.03.009>
- García-Ruiz C, Colell A, Marí M, Morales A, Fernández-Checa JC. Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *J Biol Chem.* 1997 Apr 25;272(17):11369-77. doi: 10.1074/jbc.272.17.11369. PMID: 9111045.
- Gaul, S., Leszczynska, A., Alegre, F., Kaufmann, B., Johnson, C.D., Adams, L.A., Wree, A., Damm, G., Seehofer, D., Calvente, C.J., Povero, D., Kisseleva, T., Eguchi, A., McGeough, M.D., Hoffman, H.M., Pelegrin, P., Laufs, U., Feldstein, A.E., 2021. Hepatocyte pyroptosis and release of inflammasome particles induce stellate cell activation and liver fibrosis. *J. Hepatol.* 74, 156–167. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.07.041>

- Gautheron, J., Vucur, M., Reisinger, F., Cardenas, D.V., Roderburg, C., Koppe, C., Kreggenwinkel, K., Schneider, A.T., Bartneck, M., Neumann, U.P., Canbay, A., Reeves, H.L., Luedde, M., Tacke, F., Trautwein, C., Heikenwalder, M., Luedde, T., 2014. A positive feedback loop between RIP3 and JNK controls non-alcoholic steatohepatitis. *EMBO Mol. Med.* 6, 1062–1074. <https://doi.org/10.15252/emmm.201403856>
- Ge, J., Huang, Y., Lv, M., Zhang, C., Talukder, M., Li, JinYang, Li, JinLong, 2022. Cadmium induced Fak -mediated anoikis activation in kidney via nuclear receptors (AHR/CAR/PXR)-mediated xenobiotic detoxification pathway. *J. Inorg. Biochem.* 227, 111682. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111682>
- Geng, W., Zhang, Y., Yang, J., Zhang, J., Zhao, J., Wang, J., Jia, L., Wang, Y., 2022. Identification of a novel probiotic and its protective effects on NAFLD via modulating gut microbial community. *J. Sci. Food Agric.* 102, 4620–4628. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11820>
- Gianfrancesco, M.A., Paquot, N., Piette, J., Legrand-Poels, S., 2018. Lipid bilayer stress in obesity-linked inflammatory and metabolic disorders. *Biochem. Pharmacol.* 153, 168–183. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.02.022>
- Gjorgjieva, M., Sobolewski, C., Dolicka, D., Correia de Sousa, M., Foti, M., 2019. miRNAs and NAFLD: from pathophysiology to therapy. *Gut* 68, 2065–2079. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-318146>
- Gleason, J.A., Post, G.B., Fagliano, J.A., 2015. Associations of perfluorinated chemical serum concentrations and biomarkers of liver function and uric acid in the US population (NHANES), 2007-2010. *Environ. Res.* 136, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.10.004>
- Goedeke, L., Bates, J., Vatner, D.F., Perry, R.J., Wang, T., Ramirez, R., Li, L., Ellis, M.W., Zhang, D., Wong, K.E., Beysen, C., Cline, G.W., Ray, A.S., Shulman, G.I., 2018. Acetyl-CoA Carboxylase Inhibition Reverses NAFLD and Hepatic Insulin Resistance but Promotes Hypertriglyceridemia in Rodents. *Hepatology* 68, 2197–2211. <https://doi.org/10.1002/hep.30097>
- Goessling, W., Sadler, K.C., 2015. Zebrafish: An Important Tool for Liver Disease Research. *Gastroenterology* 149, 1361–1377. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.08.034>
- Goldsmith, J.R., Jobin, C., 2012. Think Small: Zebrafish as a Model System of Human Pathology. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, 817341. <https://doi.org/10.1155/2012/817341>
- Goldstone, J.V., McArthur, A.G., Kubota, A., Zanette, J., Parente, T., Jönsson, M.E., Nelson, D.R., Stegeman, J.J., 2010. Identification and developmental expression of the full complement of Cytochrome P450 genes in Zebrafish. *BMC Genomics* 11, 643. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-643>
- Gomez, M.V., Dutta, M., Suvorov, A., Shi, X., Gu, H., Mani, S., Yue Cui, J., 2020. Early Life Exposure to Environmental Contaminants (BDE-47, TBBPA, and BPS) Produced Persistent Alterations in Fecal Microbiome in Adult Male Mice. *Toxicol. Sci.* 179, 14–30. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfaa161>
- Gorden, D.L., Myers, D.S., Ivanova, P.T., Fahy, E., Maurya, M.R., Gupta, S., Min, J., Spann, N.J., McDonald, J.G., Kelly, S.L., Duan, J., Sullards, M.C., Leiker, T.J., Barkley, R.M., Quehenberger, O., Armando, A.M., Milne, S.B., Mathews, T.P., Armstrong, M.D., Li, C., Melvin, W.V., Clements, R.H., Washington, M.K., Mendonsa, A.M., Witztum, J.L., Guan, Z., Glass, C.K., Murphy, R.C., Dennis, E.A., Merrill, A.H., Russell, D.W., Subramaniam, S., Brown, H.A., 2015. Biomarkers of NAFLD progression: a lipidomics approach to an epidemic. *J. Lipid Res.* 56, 722–736. <https://doi.org/10.1194/jlr.P056002>
- Gore, A.C., Chappell, V.A., Fenton, S.E., Flaws, J.A., Nadal, A., Prins, G.S., Toppari, J., Zoeller, R.T., 2015. EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocr. Rev.* 36, E1–E150. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1010>
- Gorria, M., Tekpli, X., Sergent, O., Huc, L., Gaboriau, F., Rissel, M., Chevanne, M., Dimanche-Boitrel, M.-T., Lagadic-Gossman, D., 2006. Membrane fluidity changes are associated with benzo[a]pyrene-induced apoptosis

- in F258 cells: protection by exogenous cholesterol. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1090, 108–112. <https://doi.org/10.1196/annals.1378.011>
- Grasselli, E., Cortese, K., Voci, A., Vergani, L., Fabbri, R., Barmo, C., Gallo, G., Canesi, L., 2013. Direct effects of Bisphenol A on lipid homeostasis in rat hepatoma cells. *Chemosphere* 91, 1123–1129. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.016>
- Greco, D., Kotronen, A., Westerbacka, J., Puig, O., Arkkila, P., Kiviluoto, T., Laitinen, S., Kolak, M., Fisher, R.M., Hamsten, A., Auvinen, P., Yki-Järvinen, H., 2008. Gene expression in human NAFLD. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* 294, G1281–G1287. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00074.2008>
- Green, A.J., Hoyo, C., Mattingly, C.J., Luo, Y., Tzeng, J.-Y., Murphy, S.K., Buchwalter, D.B., Planchart, A., 2018. Cadmium exposure increases the risk of juvenile obesity: a human and zebrafish comparative study. *Int. J. Obes.* 42, 1285–1295. <https://doi.org/10.1038/s41366-018-0036-y>
- Greenspan, P., Fowler, S.D., 1985. Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red. *J. Lipid Res.* 26, 781–789. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)34307-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)34307-8)
- Griffin, M.D., Pereira, S.R., DeBari, M.K., Abbott, R.D., 2020. Mechanisms of action, chemical characteristics, and model systems of obesogens. *BMC Biomed. Eng.* 2, 6. <https://doi.org/10.1186/s42490-020-00040-6>
- Grün, F., Blumberg, B., 2007. Perturbed nuclear receptor signaling by environmental obesogens as emerging factors in the obesity crisis. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 8, 161–171. <https://doi.org/10.1007/s11154-007-9049-x>
- Grün, F., Watanabe, H., Zamanian, Z., Maeda, L., Arima, K., Cubacha, R., Gardiner, D.M., Kanno, J., Iguchi, T., Blumberg, B., 2006. Endocrine-Disrupting Organotin Compounds Are Potent Inducers of Adipogenesis in Vertebrates. *Mol. Endocrinol.* 20, 2141–2155. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0367>
- Gu, H., Liu, Y., Wang, W., Ding, L., Teng, W., Liu, L., 2016. In utero exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate induces metabolic disorder and increases fat accumulation in visceral depots of C57BL/6J mice offspring. *Exp. Ther. Med.* 12, 3806–3812. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3820>
- Gu, J., Zhang, J., Chen, Y., Wang, H., Guo, M., Wang, L., Wang, Z., Wu, S., Shi, L., Gu, A., Ji, G., 2019. Neurobehavioral effects of bisphenol S exposure in early life stages of zebrafish larvae (*Danio rerio*). *Chemosphere* 217, 629–635. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.218>
- Gu, Q., Yang, X., Lin, L., Li, S., Li, Q., Zhong, S., Peng, J., Cui, Z., 2014. Genetic ablation of solute carrier family 7a3a leads to hepatic steatosis in zebrafish during fasting. *Hepatology* 60, 1929–1941. <https://doi.org/10.1002/hep.27356>
- Guardiola, J.J., Beier, J.I., Falkner, K.C., Wheeler, B., McClain, C.J., Cave, M., 2016. Occupational exposures at a polyvinyl chloride production facility are associated with significant changes to the plasma metabolome. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 313, 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.10.001>
- Gueguen, Y., Mouzat, K., Ferrari, L., Tissandie, E., Lobaccaro, J.-M., Batt, A.-M., Paquet, F., Voisin, P., Aigueperse, J., Gourmelon, P., Souidi, M., 2006. Les cytochromes P450 : métabolisme des xénobiotiques, régulation et rôle en clinique. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 64. <https://doi.org/10.1684/abc.2006.0015>
- Guengerich, F.P., 2008. Cytochrome P450 and Chemical Toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* 21, 70–83. <https://doi.org/10.1021/tx700079z>
- Guicciardi, M.E., Gores, G.J., 2010. Apoptosis as a Mechanism for Liver Disease Progression. *Semin. Liver Dis.* 30, 402–410. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1267540>
- Guicciardi, M.E., Malhi, H., Mott, J.L., Gores, G.J., 2013. Apoptosis and Necrosis in the Liver. *Compr. Physiol.* 3, 10.1002/cphy.c120020. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120020>

- Guilherme, A., Virbasius, J.V., Puri, V., Czech, M.P., 2008. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 367–377. <https://doi.org/10.1038/nrm2391>
- Guirguis, E., Grace, Y., Bolson, A., DellaVecchia, M.J., Ruble, M., 2021. Emerging therapies for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis: A systematic review. *Pharmacother. J. Hum. Pharmacol. Drug Ther.* 41, 315–328. <https://doi.org/10.1002/phar.2489>
- Guo, Q., Furuta, K., Lucien, F., Gutierrez Sanchez, L.H., Hirsova, P., Krishnan, A., Kabashima, A., Pavelko, K.D., Madden, B., Alhuwaih, H., Gao, Y., Revzin, A., Ibrahim, S.H., 2019. Integrin β 1-enriched extracellular vesicles mediate monocyte adhesion and promote liver inflammation in murine NASH. *J. Hepatol.* 71, 1193–1205. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.07.019>
- Guo, Y., Cordes, K.R., Farese, R.V., Walther, T.C., 2009. Lipid droplets at a glance. *J. Cell Sci.* 122, 749–752. <https://doi.org/10.1242/jcs.037630>
- Guo, Y., Walther, T.C., Rao, M., Stuurman, N., Goshima, G., Terayama, K., Wong, J.S., Vale, R.D., Walter, P., Farese, R.V., 2008. Functional genomic screen reveals genes involved in lipid-droplet formation and utilization. *Nature* 453, 657–661. <https://doi.org/10.1038/nature06928>
- Gut, P., Baeza-Raja, B., Andersson, O., Hasenkamp, L., Hsiao, J., Hesselson, D., Akassoglou, K., Verdin, E., Hirschey, M.D., Stainier, D.Y.R., 2013. Whole-organism screening for gluconeogenesis identifies activators of fasting metabolism. *Nat. Chem. Biol.* 9, 97–104. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1136>
- Guzelian, P.S., Vranian, G., Boylan, J.J., Cohn, W.J., Blanke, R.V., 1980. Liver structure and function in patients poisoned with chlordecone (Kepone). *Gastroenterology* 78, 206–213.

H

- Hadi, H.E., Vettor, R., Rossato, M., 2018. Vitamin E as a Treatment for Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Reality or Myth? *Antioxidants* 7, 12. <https://doi.org/10.3390/antiox7010012>
- Hadizadeh, F., Faghihimani, E., Adibi, P., 2017. Nonalcoholic fatty liver disease: Diagnostic biomarkers. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* 8, 11–26. <https://doi.org/10.4291/wjgp.v8.i2.11>
- Hagenaars, A., Vergauwen, L., Benoot, D., Laukens, K., Knapen, D., 2013. Mechanistic toxicity study of perfluorooctanoic acid in zebrafish suggests mitochondrial dysfunction to play a key role in PFOA toxicity. *Chemosphere* 91, 844–856. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.056>
- Hajdich, E., Lachkar, F., Ferré, P., Foufelle, F., 2021. Roles of Ceramides in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *J. Clin. Med.* 10, 792. <https://doi.org/10.3390/jcm10040792>
- Hall, Z., Bond, N.J., Ashmore, T., Sanders, F., Ament, Z., Wang, X., Murray, A.J., Bellafante, E., Virtue, S., Vidal-Puig, A., Allison, M., Davies, S.E., Koulman, A., Vacca, M., Griffin, J.L., 2017. Lipid zonation and phospholipid remodeling in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol. Baltim. Md* 65, 1165–1180. <https://doi.org/10.1002/hep.28953>
- Hammerschmidt, P., Ostkotte, D., Nolte, H., Gerl, M.J., Jais, A., Brunner, H.L., Sprenger, H.-G., Awazawa, M., Nicholls, H.T., Turpin-Nolan, S.M., Langer, T., Krüger, M., Brügger, B., Brüning, J.C., 2019. CerS6-Derived Sphingolipids Interact with Mff and Promote Mitochondrial Fragmentation in Obesity. *Cell* 177, 1536–1552.e23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.008>
- Hammes, T.O., Pedroso, G.L., Hartmann, C.R., Escobar, T.D.C., Fracasso, L.B., da Rosa, D.P., Marroni, N.P., Porawski, M., da Silveira, T.R., 2012. The Effect of Taurine on Hepatic Steatosis Induced by Thioacetamide in Zebrafish (*Danio rerio*). *Dig. Dis. Sci.* 57, 675–682. <https://doi.org/10.1007/s10620-011-1931-4>

- Han, J.C., Park, S.Y., Hah, B.G., Choi, G.H., Kim, Y.K., Kwon, T.H., Kim, E.K., Lachaal, M., Jung, C.Y., Lee, W., 2003. Cadmium induces impaired glucose tolerance in rat by down-regulating GLUT4 expression in adipocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 413, 213–220. [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(03\)00120-6](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(03)00120-6)
- Han, M., Liu, X., Liu, S., Su, G., Fan, X., Chen, J., Yuan, Q., Xu, G., 2017. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces hepatic stellate cell (HSC) activation and liver fibrosis in C57BL6 mouse via activating Akt and NF- κ B signaling pathways. *Toxicol. Lett.* 273, 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.03.013>
- Han, R., Zhang, F., Wan, C., Liu, L., Zhong, Q., Ding, W., 2018. Effect of perfluorooctane sulphonate-induced Kupffer cell activation on hepatocyte proliferation through the NF- κ B/TNF- α /IL-6-dependent pathway. *Chemosphere* 200, 283–294. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.02.137>
- Han, S., Sung, G.-H., Lee, S., Han, K.J., Han, H.-J., 2022. Serum cadmium is associated with hepatic steatosis and fibrosis. *Medicine (Baltimore)* 101, e28559. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000028559>
- Han, Y., Liu, Y., Wang, M., Xue, Y., 2022. Effects of BPZ, BPC, BPF, and BPS Exposure on Adult Zebrafish (*Danio rerio*): Accumulation, Oxidative Stress, and Gene Expression. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 19, 15784. <https://doi.org/10.3390/ijerph192315784>
- Hashmi, S., Wang, Y., Parhar, R., Collison, K., Conca, W., Al-Mohanna, F., Gaugler, R., 2013. A *C. elegans* model to study human metabolic regulation. *Nutr. Metab.* 10, 31. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-10-31>
- Hatch, E.E., Nelson, J.W., Qureshi, M.M., Weinberg, J., Moore, L.L., Singer, M., Webster, T.F., 2008. Association of urinary phthalate metabolite concentrations with body mass index and waist circumference: a cross-sectional study of NHANES data, 1999–2002. *Environ. Health* 7, 27. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-7-27>
- He, J., Hu, B., Shi, X., Weidert, E.R., Lu, P., Xu, M., Huang, M., Kelley, E.E., Xie, W., 2013. Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor Sensitizes Mice to Nonalcoholic Steatohepatitis by Deactivating Mitochondrial Sirtuin Deacetylase Sirt3. *Mol. Cell. Biol.* 33, 2047–2055. <https://doi.org/10.1128/MCB.01658-12>
- He, J., Lee, J.H., Febbraio, M., Xie, W., 2011. The emerging roles of fatty acid translocase/CD36 and the aryl hydrocarbon receptor in fatty liver disease. *Exp. Biol. Med.* 236, 1116–1121. <https://doi.org/10.1258/ebm.2011.011128>
- He, J.-H., Guo, S.-Y., Zhu, F., Zhu, J.-J., Chen, Y.-X., Huang, C.-J., Gao, J.-M., Dong, Q.-X., Xuan, Y.-X., Li, C.-Q., 2012. A zebrafish phenotypic assay for assessing drug-induced hepatotoxicity. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 67, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2012.10.003>
- He, X., Gao, J., Hou, H., Qi, Z., Chen, H., Zhang, X.-X., 2019. Inhibition of Mitochondrial Fatty Acid Oxidation Contributes to Development of Nonalcoholic Fatty Liver Disease Induced by Environmental Cadmium Exposure. *Environ. Sci. Technol.* 53, 13992–14000. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b05131>
- Heeren, J., Scheja, L., 2021. Metabolic-associated fatty liver disease and lipoprotein metabolism. *Mol. Metab.* 50, 101238. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101238>
- Heindel, J.J., Blumberg, B., Cave, M., Machtinger, R., Mantovani, A., Mendez, M.A., Nadal, A., Palanza, P., Panzica, G., Sargis, R., Vandenberg, L.N., vom Saal, F., 2017. Metabolism disrupting chemicals and metabolic disorders. *Reprod. Toxicol.* 68, 3–33. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.10.001>
- Heindel, J.J., Howard, S., Agay-Shay, K., Arrebola, J.P., Audouze, K., Babin, P.J., Barouki, R., Bansal, A., Blanc, E., Cave, M.C., Chatterjee, S., Chevalier, N., Choudhury, M., Collier, D., Connolly, L., Coumoul, X., Garruti, G., Gilbertson, M., Hoepner, L.A., Holloway, A.C., Howell, G., Kassotis, C.D., Kay, M.K., Kim, M.J., Lagadic-Gossman, D., Langouet, S., Legrand, A., Li, Z., Le Mentec, H., Lind, L., Monica Lind, P., Lustig, R.H., Martin-Chouly, C., Munic Kos, V., Podechard, N., Roepke, T.A., Sargis, R.M., Starling, A., Tomlinson, C.R., Touma,

- C., Vondracek, J., vom Saal, F., Blumberg, B., 2022. Obesity II: Establishing causal links between chemical exposures and obesity. *Biochem. Pharmacol.* 199, 115015. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115015>
- Heindel, J.J., Newbold, R., Schug, T.T., 2015. Endocrine disruptors and obesity. *Nat. Rev. Endocrinol.* 11, 653–661. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.163>
- Her, G.M., Hsu, C.-C., Hong, J.-R., Lai, C.-Y., Hsu, M.-C., Pang, H.-W., Chan, S.-K., Pai, W.-Y., 2011. Overexpression of gankyrin induces liver steatosis in zebrafish (*Danio rerio*). *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1811, 536–548. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.06.011>
- Her, G.M., Pai, W.-Y., Lai, C.-Y., Hsieh, Y.-W., Pang, H.-W., 2013. Ubiquitous transcription factor YY1 promotes zebrafish liver steatosis and lipotoxicity by inhibiting CHOP-10 expression. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1831, 1037–1051. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.02.002>
- Her, G.M., Yeh, Y.-H., Wu, J.-L., 2003. 435-bp liver regulatory sequence in the liver fatty acid binding protein (L-FABP) gene is sufficient to modulate liver regional expression in transgenic zebrafish. *Dev. Dyn.* 227, 347–356. <https://doi.org/10.1002/dvdy.10324>
- Herbst, A.L., Ulfelder, H., Poskanzer, D.C., 1971. Adenocarcinoma of the Vagina. *N. Engl. J. Med.* 284, 878–881. <https://doi.org/10.1056/NEJM197104222841604>
- Hernaiz, R., Lazo, M., Bonekamp, S., Kamel, I., Brancati, F.L., Guallar, E., Clark, J.M., 2011. Diagnostic Accuracy and Reliability of Ultrasonography for the Detection of Fatty Liver: A Meta-Analysis. *Hepatol. Baltim. Md* 54, 1082–1090. <https://doi.org/10.1002/hep.24452>
- Hernández, A., Geng, Y., Sepúlveda, R., Solís, N., Torres, J., Arab, J.P., Barrera, F., Cabrera, D., Moshage, H., Arrese, M., 2020. Chemical hypoxia induces pro-inflammatory signals in fat-laden hepatocytes and contributes to cellular crosstalk with Kupffer cells through extracellular vesicles. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1866, 165753. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165753>
- Higuchi, A., Wakai, E., Tada, T., Koiwa, J., Adachi, Y., Shiromizu, T., Goto, H., Tanaka, T., Nishimura, Y., 2021. Generation of a Transgenic Zebrafish Line for In Vivo Assessment of Hepatic Apoptosis. *Pharmaceuticals* 14, 1117. <https://doi.org/10.3390/ph14111117>
- Higuchi, N., Kato, M., Shundo, Y., Tajiri, H., Tanaka, M., Yamashita, N., Kohjima, M., Kotoh, K., Nakamuta, M., Takayanagi, R., Enjoji, M., 2008. Liver X receptor in cooperation with SREBP-1c is a major lipid synthesis regulator in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol. Res.* 38, 1122–1129. <https://doi.org/10.1111/j.1872-034X.2008.00382.x>
- Higuchi N, Kato M, Tanaka M, Miyazaki M, Takao S, Kohjima M, Kotoh K, Enjoji M, Nakamuta M, Takayanagi R. Effects of insulin resistance and hepatic lipid accumulation on hepatic mRNA expression levels of apoB, MTP and L-FABP in non-alcoholic fatty liver disease. *Exp Ther Med.* 2011 Nov;2(6):1077-1081. doi: 10.3892/etm.2011.328. Epub 2011 Aug 9. PMID: 22977624; PMCID: PMC3440820.
- Hill, A., Mesens, N., Steemans, M., Xu, J.J., Aleo, M.D., 2012. Comparisons between in vitro whole cell imaging and in vivo zebrafish-based approaches for identifying potential human hepatotoxicants earlier in pharmaceutical development. *Drug Metab. Rev.* 44, 127–140. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.645578>
- Hirokane, H., Nakahara, M., Tachibana, S., Shimizu, M., Sato, R., 2004. Bile Acid Reduces the Secretion of Very Low Density Lipoprotein by Repressing Microsomal Triglyceride Transfer Protein Gene Expression Mediated by Hepatocyte Nuclear Factor-4*. *J. Biol. Chem.* 279, 45685–45692. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404255200>

- Hirsova, P., Ibrabim, S.H., Gores, G.J., Malhi, H., 2016a. Lipotoxic lethal and sublethal stress signaling in hepatocytes: relevance to NASH pathogenesis. *J. Lipid Res.* 57, 1758–1770. <https://doi.org/10.1194/jlr.R066357>
- Hirsova, P., Ibrahim, S.H., Krishnan, A., Verma, V.K., Bronk, S.F., Werneburg, N.W., Charlton, M.R., Shah, V.H., Malhi, H., Gores, G.J., 2016b. Lipid-Induced Signaling Causes Release of Inflammatory Extracellular Vesicles From Hepatocytes. *Gastroenterology* 150, 956–967. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.12.037>
- Hochreuter, M.Y., Dall, M., Treebak, J.T., Barrès, R., 2022. MicroRNAs in non-alcoholic fatty liver disease: Progress and perspectives. *Mol. Metab.* 65, 101581. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101581>
- Holland, W.L., Summers, S.A., 2008. Sphingolipids, Insulin Resistance, and Metabolic Disease: New Insights from in Vivo Manipulation of Sphingolipid Metabolism. *Endocr. Rev.* 29, 381–402. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0025>
- Holman, N.S., Church, R.J., Nautiyal, M., Rose, K.A., Thacker, S.E., Otieno, M.A., Wolf, K.K., LeCluyse, E., Watkins, P.B., Mosedale, M., 2019. Hepatocyte-Derived Exosomes Promote Liver Immune Tolerance: Possible Implications for Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 170, 499–508. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz112>
- Hölttä-Vuori, M., Salo, V.T.V., Nyberg, L., Brackmann, C., Enejder, A., Panula, P., Ikonen, E., 2010. Zebrafish: gaining popularity in lipid research. *Biochem. J.* 429, 235–242. <https://doi.org/10.1042/BJ20100293>
- Hong, C., Tontonoz, P., 2014. Liver X receptors in lipid metabolism: opportunities for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 13, 433–444. <https://doi.org/10.1038/nrd4280>
- Hong, H., Lin, X., Xu, Y., Tong, T., Zhang, J., He, H., Yang, L., Lu, Y., Zhou, Z., 2022. Cadmium induces ferroptosis mediated inflammation by activating Gpx4/Ager/p65 axis in pancreatic β -cells. *Sci. Total Environ.* 849, 157819. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157819>
- Horn, C.L., Morales, A.L., Savard, C., Farrell, G.C., Ioannou, G.N., 2021. Role of Cholesterol-Associated Steatohepatitis in the Development of NASH. *Hepatol. Commun.* 6, 12–35. <https://doi.org/10.1002/hep4.1801>
- Houten, S.M., Violante, S., Ventura, F.V., Wanders, R.J.A., 2016. The Biochemistry and Physiology of Mitochondrial Fatty Acid β -Oxidation and Its Genetic Disorders. *Annu. Rev. Physiol.* 78, 23–44. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105045>
- Houten, S.M., Wanders, R.J.A., Ranea-Robles, P., 2020. Metabolic interactions between peroxisomes and mitochondria with a special focus on acylcarnitine metabolism. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 1866, 165720. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165720>
- Howarth, D.L., Lindtner, C., Vacaru, A.M., Sachidanandam, R., Tsedensodnom, O., Vasilkova, T., Buettner, C., Sadler, K.C., 2014. Activating Transcription Factor 6 Is Necessary and Sufficient for Alcoholic Fatty Liver Disease in Zebrafish. *PLoS Genet.* 10, e1004335. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004335>
- Howarth, D.L., Yin, C., Yeh, K., Sadler, K.C., 2013. Defining Hepatic Dysfunction Parameters in Two Models of Fatty Liver Disease in Zebrafish Larvae. *Zebrafish* 10, 199–210. <https://doi.org/10.1089/zeb.2012.0821>
- Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J.E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J.C., Koch, R., Rauch, G.-J., White, S., Chow, W., Kilian, B., Quintais, L.T., Guerra-Assunção, J.A., Zhou, Y., Gu, Y., Yen, J., Vogel, J.-H., Eyre, T., Redmond, S., Banerjee, R., Chi, J., Fu, B., Langley, E., Maguire, S.F., Laird, G.K., Lloyd, D., Kenyon, E., Donaldson, S., Sehra, H., Almeida-King, J., Loveland, J., Trevanion, S., Jones, M., Quail, M., Willey, D., Hunt, A., Burton, J., Sims, S., McLay, K., Plumb, B., Davis, J., Clee, C., Oliver, K., Clark, R., Riddle, C., Elliott, D., Threadgold, G., Harden, G., Ware, D., Mortimer, B., Kerry, G., Heath, P., Phillimore, B., Tracey,

A., Corby, N., Dunn, M., Johnson, C., Wood, J., Clark, S., Pelan, S., Griffiths, G., Smith, M., Glithero, R., Howden, P., Barker, N., Stevens, C., Harley, J., Holt, K., Panagiotidis, G., Lovell, J., Beasley, H., Henderson, C., Gordon, D., Auger, K., Wright, D., Collins, J., Raisen, C., Dyer, L., Leung, K., Robertson, L., Ambridge, K., Leongamornlert, D., McGuire, S., Gilderthorp, R., Griffiths, C., Manthravadi, D., Nichol, S., Barker, G., Whitehead, S., Kay, M., Brown, J., Murnane, C., Gray, E., Humphries, M., Sycamore, N., Barker, D., Saunders, D., Wallis, J., Babbage, A., Hammond, S., Mashreghi-Mohammadi, M., Barr, L., Martin, S., Wray, P., Ellington, A., Matthews, N., Ellwood, M., Woodmansey, R., Clark, G., Cooper, J., Tromans, A., Grafham, D., Skuce, C., Pandian, R., Andrews, R., Harrison, E., Kimberley, A., Garnett, J., Fosker, N., Hall, R., Garner, P., Kelly, D., Bird, C., Palmer, S., Gehring, I., Berger, A., Dooley, C.M., Ersan-Ürün, Z., Eser, C., Geiger, H., Geisler, M., Karotki, L., Kirn, A., Konantz, J., Konantz, M., Oberländer, M., Rudolph-Geiger, S., Teucke, M., Osoegawa, K., Zhu, B., Rapp, A., Widaa, S., Langford, C., Yang, F., Carter, N.P., Harrow, J., Ning, Z., Herrero, J., Searle, S.M.J., Enright, A., Geisler, R., Plasterk, R.H.A., Lee, C., Westerfield, M., Jong, P.J. de, Zon, L.I., Postlethwait, J.H., Nüsslein-Volhard, C., Hubbard, T.J.P., Crollius, H.R., Rogers, J., Stemple, D.L., 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 498. <https://doi.org/10.1038/nature12111>

Hsu, C.-C., Lai, C.-Y., Lin, C.-Y., Yeh, K.-Y., Her, G.M., 2017. MicroRNA-27b Depletion Enhances Endothelial and Intravascular Lipid Accumulation and Induces Adipocyte Hyperplasia in Zebrafish. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 93. <https://doi.org/10.3390/ijms19010093>

Hsu, J.-W., Nien, C.-Y., Chen, H.-W., Tsai, F.-Y., Yeh, S.-C., Kao, Y.-H., Tsou, T.-C., 2021. Di(2-ethylhexyl)phthalate exposure exacerbates metabolic disorders in diet-induced obese mice. *Food Chem. Toxicol.* 156, 112439. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112439>

Hsu, S., Wang, B., Kota, J., Yu, J., Costinean, S., Kutay, H., Yu, L., Bai, S., La Perle, K., Chivukula, R.R., Mao, H., Wei, M., Clark, K.R., Mendell, J.R., Caligiuri, M.A., Jacob, S.T., Mendell, J.T., Ghoshal, K., 2012. Essential metabolic, anti-inflammatory, and anti-tumorigenic functions of miR-122 in liver. *J. Clin. Invest.* 122, 2871–2883. <https://doi.org/10.1172/JCI63539>

Hu, C., Sun, B., Tang, L., Liu, M., Huang, Z., Zhou, X., Chen, L., 2022. Hepatotoxicity caused by methylparaben in adult zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 250, 106255. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106255>

Hu, P., Kennedy, R.C., Chen, X., Zhang, J., Shen, C.-L., Chen, J., Zhao, L., 2016. Differential effects on adiposity and serum marker of bone formation by post-weaning exposure to methylparaben and butylparaben. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 21957–21968. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7452-0>

Hu, W., Zhu, Q.-L., Zheng, J.-L., Wen, Z.-Y., 2022. Cadmium induced oxidative stress, endoplasmic reticulum (ER) stress and apoptosis with compensative responses towards the up-regulation of ribosome, protein processing in the ER, and protein export pathways in the liver of zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 242, 106023. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.106023>

Hu, X., Tanaka, N., Guo, R., Lu, Y., Nakajima, T., Gonzalez, F.J., Aoyama, T., 2017. PPAR α protects against trans-fatty-acid-containing diet-induced steatohepatitis. *J. Nutr. Biochem.* 39, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.09.015>

Huang, D.Q., El-Serag, H.B., Loomba, R., 2021. Global epidemiology of NAFLD-related HCC: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 18, 223–238. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00381-6>

Huang, Sha, Zhou, C., Zeng, T., Li, Y., Lai, Y., Mo, C., Chen, Y., Huang, Shaohui, Lv, Z., Gao, L., 2020. P-Hydroxyacetophenone Ameliorates Alcohol-Induced Steatosis and Oxidative Stress via the NF- κ B Signaling Pathway in Zebrafish and Hepatocytes. *Front. Pharmacol.* 10.

- Huc, L., Lemarié, A., Guéraud, F., Héliers-Toussaint, C., 2012. Low concentrations of bisphenol A induce lipid accumulation mediated by the production of reactive oxygen species in the mitochondria of HepG2 cells. *Toxicol. In Vitro* 26, 709–717. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.03.017>
- Huff, M., da Silveira, W.A., Carnevali, O., Renaud, L., Hardiman, G., 2018. Systems Analysis of the Liver Transcriptome in Adult Male Zebrafish Exposed to the Plasticizer (2-Ethylhexyl) Phthalate (DEHP). *Sci. Rep.* 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20266-8>
- Hughey, C.C., Puchalska, P., Crawford, P.A., 2022. Integrating the contributions of mitochondrial oxidative metabolism to lipotoxicity and inflammation in NAFLD pathogenesis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1867, 159209. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2022.159209>
- Hugo, S.E., Cruz-Garcia, L., Karanth, S., Anderson, R.M., Stainier, D.Y.R., Schlegel, A., 2012. A monocarboxylate transporter required for hepatocyte secretion of ketone bodies during fasting. *Genes Dev.* 26, 282–293. <https://doi.org/10.1101/gad.180968.111>
- Hung, H., Katsoyiannis, A.A., Guardans, R., 2016. Ten years of global monitoring under the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs): Trends, sources and transport modelling. *Environ. Pollut., Persistent Organic Pollutants (POPs): Trends, Sources and Transport Modelling* 217, 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.035>
- Hurst, C.H., Waxman, D.J., 2003. Activation of PPAR α and PPAR γ by Environmental Phthalate Monoesters. *Toxicol. Sci.* 74, 297–308. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg145>
- Hussain, M.M., Shi, J., Dreizen, P., 2003. Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly. *J. Lipid Res.* 44, 22–32. <https://doi.org/10.1194/jlr.R200014-JLR200>
- Hyder, O., Chung, M., Cosgrove, D., Herman, J.M., Li, Z., Firoozmand, A., Gurakar, A., Koteish, A., Pawlik, T.M., 2013. Cadmium Exposure and Liver Disease among US Adults. *J. Gastrointest. Surg.* 17, 1265–1273. <https://doi.org/10.1007/s11605-013-2210-9>
- I
- Ibarra, M.S., Borini Etichetti, C., Di Benedetto, C., Rosano, G.L., Margarit, E., Del Sal, G., Mione, M., Girardini, J., 2017. Dynamic regulation of Pin1 expression and function during zebrafish development. *PLoS ONE* 12, e0175939. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175939>
- Ibrahim, S., Harris-Kawano, A., Haider, I., Mirmira, R.G., Sims, E.K., Anderson, R.M., 2020. A novel Cre-enabled tetracycline-inducible transgenic system for tissue-specific cytokine expression in the zebrafish: CETI-PIC3. *Dis. Model. Mech.* 13, dmm042556. <https://doi.org/10.1242/dmm.042556>
- Ibrahim, S.H., Hirsova, P., Tomita, K., Bronk, S.F., Werneburg, N.W., Harrison, S.A., Goodfellow, V.S., Malhi, H., Gores, G.J., 2016. Mixed lineage kinase 3 mediates release of C-X-C motif ligand 10-bearing chemotactic extracellular vesicles from lipotoxic hepatocytes. *Hepatology* 63, 731–744. <https://doi.org/10.1002/hep.28252>
- Imran, M., Chalmel, F., Sergent, O., Evrard, B., Le Mentec, H., Legrand, A., Dupont, A., Bescher, M., Bucher, S., Fromenty, B., Huc, L., Sparfel, L., Lagadic-Gossmann, D., Podechard, N., 2022. Transcriptomic analysis in zebrafish larvae identifies iron-dependent mitochondrial dysfunction as a possible key event of NAFLD progression induced by benzo[a]pyrene/ethanol co-exposure. *Cell Biol. Toxicol.* <https://doi.org/10.1007/s10565-022-09706-4>
- Imran, M., Sergent, O., Tête, A., Gallais, I., Chevanne, M., Lagadic-Gossmann, D., Podechard, N., 2018. Membrane Remodeling as a Key Player of the Hepatotoxicity Induced by Co-Exposure to Benzo[a]pyrene and Ethanol of Obese Zebrafish Larvae. *Biomolecules* 8, 26. <https://doi.org/10.3390/biom8020026>

- Imrie, D., Sadler, K.C., 2010. White adipose tissue development in zebrafish is regulated by both developmental time and fish size. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 239, 3013–3023. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22443>
- Inaba, T., Matsuda, M., Shimamura, M., Takei, N., Terasaka, N., Ando, Y., Yasumo, H., Koishi, R., Makishima, M., Shimomura, I., 2003. Angiopoietin-like Protein 3 Mediates Hypertriglyceridemia Induced by the Liver X Receptor*. *J. Biol. Chem.* 278, 21344–21351. <https://doi.org/10.1074/jbc.M213202200>
- Ioannou, G.N., 2016. The Role of Cholesterol in the Pathogenesis of NASH. *Trends Endocrinol. Metab.* 27, 84–95. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.11.008>
- Ioannou, G.N., Landis, C.S., Jin, G., Haigh, W.G., Farrell, G.C., Kuver, R., Lee, S.P., Savard, C., 2019. Cholesterol Crystals in Hepatocyte Lipid Droplets Are Strongly Associated With Human Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatol. Commun.* 3, 776–791. <https://doi.org/10.1002/hep4.1348>
- Ipsen, D.H., Lykkesfeldt, J., Tveden-Nyborg, P., 2018. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 75, 3313–3327. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2860-6>
- Itabe, H., Yamaguchi, T., Nimura, S., Sasabe, N., 2017. Perilipins: a diversity of intracellular lipid droplet proteins. *Lipids Health Dis.* 16, 83. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0473-y>
- Ito, A., Hong, C., Rong, X., Zhu, X., Tarling, E.J., Hedde, P.N., Gratton, E., Parks, J., Tontonoz, P., 2015. LXRs link metabolism to inflammation through Abca1-dependent regulation of membrane composition and TLR signaling. *eLife* 4, e08009. <https://doi.org/10.7554/eLife.08009>
- Itoh, M., Suganami, T., Nakagawa, N., Tanaka, M., Yamamoto, Y., Kamei, Y., Terai, S., Sakaida, I., Ogawa, Y., 2011. Melanocortin 4 Receptor–Deficient Mice as a Novel Mouse Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Am. J. Pathol.* 179, 2454–2463. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.07.014>

J

- Jackson, C.L., 2019. Lipid droplet biogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol., Membrane Trafficking* 59, 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.03.018>
- James-Todd, T., Meeker, J., Huang, T., Hauser, R., Ferguson, K., Rich-Edwards, J., McElrath, T., Seely, E., 2016. Pregnancy urinary phthalate metabolite concentrations and gestational diabetes risk factors. *Environ. Int.* 96, 118–126. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.09.009>
- Jansen, A., Aaseth, J.O., Lyche, J.L., Berg, J.P., Müller, M.H.B., Lydersen, S., Farup, P.G., 2022. Do changes in persistent organic pollutants after bariatric surgery cause endocrine disruption? *Chemosphere* 137461. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137461>
- Ji, Z., Liu, J., Sakkiah, S., Guo, W., Hong, H., 2021. BPA Replacement Compounds: Current Status and Perspectives. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 9, 2433–2446. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c09276>
- Jiang, G., Li, Z., Liu, F., Ellsworth, K., Dallas-Yang, Q., Wu, M., Ronan, J., Esau, C., Murphy, C., Szalkowski, D., Bergeron, R., Doebber, T., Zhang, B.B., 2005. Prevention of obesity in mice by antisense oligonucleotide inhibitors of stearoyl-CoA desaturase–1. *J. Clin. Invest.* 115, 1030–1038. <https://doi.org/10.1172/JCI200523962>
- Jiang, M., Li, C., Liu, Q., Wang, A., Lei, M., 2019. Inhibiting Ceramide Synthesis Attenuates Hepatic Steatosis and Fibrosis in Rats With Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Front. Endocrinol.* 10, 665. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00665>

- Jiang, Y., Xia, W., Zhu, Y., Li, X., Wang, D., Liu, J., Chang, H., Li, G., Xu, B., Chen, X., Li, Y., Xu, S., 2014. Mitochondrial dysfunction in early life resulted from perinatal bisphenol A exposure contributes to hepatic steatosis in rat offspring. *Toxicol. Lett.* 228, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.04.013>
- Jiao, N., Baker, S.S., Chapa-Rodriguez, A., Liu, W., Nugent, C.A., Tsompana, M., Mastrandrea, L., Buck, M.J., Baker, R.D., Genco, R.J., Zhu, R., Zhu, L., 2018. Suppressed hepatic bile acid signalling despite elevated production of primary and secondary bile acids in NAFLD. *Gut* 67, 1881–1891. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314307>
- Jin, Y., Zhang, S., Tao, R., Huang, J., He, X., Qu, L., Fu, Z., 2016. Oral exposure of mice to cadmium (II), chromium (VI) and their mixture induce oxidative- and endoplasmic reticulum-stress mediated apoptosis in the livers. *Environ. Toxicol.* 31, 693–705. <https://doi.org/10.1002/tox.22082>
- Jonas, W., Schürmann, A., 2020. Genetic and epigenetic factors determining NAFLD risk. *Mol. Metab.* 50, 101111. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101111>
- Joseph, S.B., Laffitte, B.A., Patel, P.H., Watson, M.A., Matsukuma, K.E., Walczak, R., Collins, J.L., Osborne, T.F., Tontonoz, P., 2002. Direct and Indirect Mechanisms for Regulation of Fatty Acid Synthase Gene Expression by Liver X Receptors*. *J. Biol. Chem.* 277, 11019–11025. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111041200>
- Joshi-Barve, S., Kirpich, I., Cave, M.C., Marsano, L.S., McClain, C.J., 2015. Alcoholic, Nonalcoholic, and Toxicant-Associated Steatohepatitis: Mechanistic Similarities and Differences. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 1, 356–367. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2015.05.006>
- Juanola, O., Martínez-López, S., Francés, R., Gómez-Hurtado, I., 2021. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Metabolic, Genetic, Epigenetic and Environmental Risk Factors. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 18, 5227. <https://doi.org/10.3390/ijerph18105227>
- Jung, Y.H., Wang, H.-L.V., Ruiz, D., Bixler, B.J., Linsenbaum, H., Xiang, J.-F., Forestier, S., Shafik, A.M., Jin, P., Corces, V.G., 2022. Recruitment of CTCF to an Fto enhancer is responsible for transgenerational inheritance of BPA-induced obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 119, e2214988119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2214988119>
- Jungermann, K., Sasse, D., 1978. Heterogeneity of liver parenchymal cells. *Trends Biochem. Sci.* 3, 5.

K

- Ka, J., Pak, B., Han, O., Lee, S., Jin, S.-W., 2020. Comparison of transcriptomic changes between zebrafish and mice upon high fat diet reveals evolutionary convergence in lipid metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 530, 638–643. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.07.042>
- Kabir, E.R., Rahman, M.S., Rahman, I., 2015. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 40, 241–258. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.06.009>
- Kagan, V.E., Mao, G., Qu, F., Angeli, J.P.F., Doll, S., Croix, C.S., Dar, H.H., Liu, B., Tyurin, V.A., Ritov, V.B., Kapralov, A.A., Amoscato, A.A., Jiang, J., Anthonyuthu, T., Mohammadyani, D., Yang, Q., Proneth, B., Klein-Seetharaman, J., Watkins, S., Bahar, I., Greenberger, J., Mallampalli, R.K., Stockwell, B.R., Tyurina, Y.Y., Conrad, M., Bayir, H., 2017. Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis. *Nat. Chem. Biol.* 13, 81–90. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2238>
- Kakazu, E., Mauer, A.S., Yin, M., Malhi, H., 2016. Hepatocytes release ceramide-enriched pro-inflammatory extracellular vesicles in an IRE1 α -dependent manner. *J. Lipid Res.* 57, 233–245. <https://doi.org/10.1194/jlr.M063412>
- Kanuri, G., Bergheim, I., 2013. In Vitro and in Vivo Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Int. J. Mol. Sci.* 14, 11963–11980. <https://doi.org/10.3390/ijms140611963>

- Karanth, S., Tran, V.M., Kuberan, B., Schlegel, A., 2013. Polyunsaturated fatty acyl-coenzyme As are inhibitors of cholesterol biosynthesis in zebrafish and mice. *Dis. Model. Mech.* 6, 1365–1377. <https://doi.org/10.1242/dmm.013425>
- Karchner, S.I., Franks, D.G., Hahn, M.E., 2005. AHR1B, a new functional aryl hydrocarbon receptor in zebrafish: tandem arrangement of *ahr1b* and *ahr2* genes. *Biochem. J.* 392, 153–161. <https://doi.org/10.1042/BJ20050713>
- Karmaus, W., Osuch, J.R., Eneli, I., Mudd, L.M., Zhang, J., Mikucki, D., Haan, P., Davis, S., 2009. Maternal levels of dichlorodiphenyl-dichloroethylene (DDE) may increase weight and body mass index in adult female offspring. *Occup. Environ. Med.* 66, 143–149. <https://doi.org/10.1136/oem.2008.041921>
- Kärman, A., Domingo, J.L., Llebaria, X., Nadal, M., Bigas, E., van Bavel, B., Lindström, G., 2010. Biomonitoring perfluorinated compounds in Catalonia, Spain: concentrations and trends in human liver and milk samples. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 17, 750–758. <https://doi.org/10.1007/s11356-009-0178-5>
- Kassotis, C.D., Vandenberg, L.N., Demeneix, B.A., Porta, M., Slama, R., Trasande, L., 2020. Endocrine-disrupting chemicals: economic, regulatory, and policy implications. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 8, 719–730. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(20\)30128-5](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(20)30128-5)
- Kassotis, C.D., vom Saal, F.S., Babin, P.J., Lagadic-Gossmann, D., Le Mentec, H., Blumberg, B., Mohajer, N., Legrand, A., Munic Kos, V., Martin-Chouly, C., Podechard, N., Langouët, S., Touma, C., Barouki, R., Kim, M.J., Audouze, K., Choudhury, M., Shree, N., Bansal, A., Howard, S., Heindel, J.J., 2022. Obesity III: Obesogen assays: Limitations, strengths, and new directions. *Biochem. Pharmacol.* 199, 115014. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115014>
- Katoch, S., Patial, V., 2021. Zebrafish: An emerging model system to study liver diseases and related drug discovery. *J. Appl. Toxicol.* 41, 33–51. <https://doi.org/10.1002/jat.4031>
- Kawano, Y., Cohen, D.E., 2013. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Gastroenterol.* 48, 434–441. <https://doi.org/10.1007/s00535-013-0758-5>
- Kazankov, K., Jørgensen, S.M.D., Thomsen, K.L., Møller, H.J., Vilstrup, H., George, J., Schuppan, D., Grønbaek, H., 2019. The role of macrophages in nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 16, 145–159. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0082-x>
- Ke, Z.-H., Pan, J.-X., Jin, L.-Y., Xu, H.-Y., Yu, T.-T., Ullah, K., Rahman, T.U., Ren, J., Cheng, Y., Dong, X.-Y., Sheng, J.-Z., Huang, H.-F., 2016. Bisphenol A Exposure May Induce Hepatic Lipid Accumulation via Reprogramming the DNA Methylation Patterns of Genes Involved in Lipid Metabolism. *Sci. Rep.* 6, 31331. <https://doi.org/10.1038/srep31331>
- Keinicke, H., Sun, G., Mentzel, C.M.J., Fredholm, M., John, L.M., Andersen, B., Raun, K., Kjaergaard, M., 2020. FGF21 regulates hepatic metabolic pathways to improve steatosis and inflammation. *Endocr. Connect.* 9, 755–768. <https://doi.org/10.1530/EC-20-0152>
- Khan, A., Ding, Z., Ishaq, M., Bacha, A.S., Khan, I., Hanif, A., Li, W., Guo, X., 2021. Understanding the Effects of Gut Microbiota Dysbiosis on Nonalcoholic Fatty Liver Disease and the Possible Probiotics Role: Recent Updates. *Int. J. Biol. Sci.* 17, 818–833. <https://doi.org/10.7150/ijbs.56214>
- Khan, S., Beigh, S., Chaudhari, B.P., Sharma, S., Aliul Hasan Abdi, S., Ahmad, S., Ahmad, F., Parvez, S., Raisuddin, S., 2016. Mitochondrial dysfunction induced by Bisphenol A is a factor of its hepatotoxicity in rats. *Environ. Toxicol.* 31, 1922–1934. <https://doi.org/10.1002/tox.22193>
- Kietzmann, T., 2017. Metabolic zonation of the liver: The oxygen gradient revisited. *Redox Biol.* 11, 622–630. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.01.012>

- Kim, D., Yoo, E.R., Li, A.A., Cholankeril, G., Tighe, S.P., Kim, W., Harrison, S.A., Ahmed, A., 2019. Elevated urinary bisphenol A levels are associated with non-alcoholic fatty liver disease among adults in the United States. *Liver Int.* 39, 1335–1342. <https://doi.org/10.1111/liv.14110>
- Kim, J.K., Fillmore, J.J., Chen, Y., Yu, C., Moore, I.K., Pypaert, M., Lutz, E.P., Kako, Y., Velez-Carrasco, W., Goldberg, I.J., Breslow, J.L., Shulman, G.I., 2001. Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 7522–7527. <https://doi.org/10.1073/pnas.121164498>
- Kim, J.-Y., Kim, S.-J., Bae, M.A., Kim, J.-R., Cho, K.-H., 2018. Cadmium exposure exacerbates severe hyperlipidemia and fatty liver changes in zebrafish via impairment of high-density lipoproteins functionality. *Toxicol. In Vitro* 47, 249–258. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.11.007>
- Kim, K., Lee, S.-E., 2021. Combined toxicity of dimethyl sulfoxide (DMSO) and vanadium towards zebrafish embryos (*Danio rerio*): Unexpected synergistic effect by DMSO. *Chemosphere* 270, 129405. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129405>
- Kim, S.Y., Jeong, J.-M., Kim, S.J., Seo, W., Kim, M.-H., Choi, W.-M., Yoo, W., Lee, J.-H., Shim, Y.-R., Yi, H.-S., Lee, Y.-S., Eun, H.S., Lee, B.S., Chun, K., Kang, S.-J., Kim, S.C., Gao, B., Kunos, G., Kim, H.M., Jeong, W.-I., 2017. Pro-inflammatory hepatic macrophages generate ROS through NADPH oxidase 2 via endocytosis of monomeric TLR4–MD2 complex. *Nat. Commun.* 8, 2247. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02325-2>
- Kim, T.H., Lee, Y., Lee, Y.-S., Gim, J.-A., Ko, E., Yim, S.Y., Jung, Y.K., Kang, S., Kim, M.Y., Kim, H., Kim, B., Kim, J.H., Seo, Y.S., Yim, H.J., Yeon, J.E., Um, S.H., Byun, K.S., 2021. Circulating miRNA is a useful diagnostic biomarker for nonalcoholic steatohepatitis in nonalcoholic fatty liver disease. *Sci. Rep.* 11, 14639. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94115-6>
- Kim, Y.-R., Lee, E.-J., Shin, K.-O., Kim, M.H., Pewzner-Jung, Y., Lee, Y.-M., Park, J.-W., Futerman, A.H., Park, W.-J., 2019. Hepatic triglyceride accumulation via endoplasmic reticulum stress-induced SREBP-1 activation is regulated by ceramide synthases. *Exp. Mol. Med.* 51, 129. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0340-1>
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203, 253–310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>
- King, S.E., McBirney, M., Beck, D., Sadler-Riggelman, I., Nilsson, E., Skinner, M.K., 2019. Sperm epimutation biomarkers of obesity and pathologies following DDT induced epigenetic transgenerational inheritance of disease. *Environ. Epigenetics* 5, dvz008. <https://doi.org/10.1093/eep/dvz008>
- Klaunig, J.E., Li, X., Wang, Z., 2018. Role of xenobiotics in the induction and progression of fatty liver disease. *Toxicol. Res.* 7, 664–680. <https://doi.org/10.1039/c7tx00326a>
- Koh, E.H., Yoon, J.E., Ko, M.S., Leem, J., Yun, J.-Y., Hong, C.H., Cho, Y.K., Lee, S.E., Jang, J.E., Baek, J.Y., Yoo, H.J., Kim, S.J., Sung, C.O., Lim, J.S., Jeong, W.-I., Back, S.H., Baek, I.-J., Torres, S., Solsona-Vilarrasa, E., Conde de la Rosa, L., Garcia-Ruiz, C., Feldstein, A.E., Fernandez-Checa, J.C., Lee, K.-U., 2021. Sphingomyelin synthase 1 mediates hepatocyte pyroptosis to trigger non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 70, 1954–1964. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-322509>
- Koliaki, C., Szendroedi, J., Kaul, K., Jelenik, T., Nowotny, P., Jankowiak, F., Herder, C., Carstensen, M., Krausch, M., Knoefel, W.T., Schlenzak, M., Roden, M., 2015. Adaptation of Hepatic Mitochondrial Function in Humans with Non-Alcoholic Fatty Liver Is Lost in Steatohepatitis. *Cell Metab.* 21, 739–746. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.04.004>
- Kolodziejczyk, A.A., Zheng, D., Shibolet, O., Elinav, E., 2019. The role of the microbiome in NAFLD and NASH. *EMBO Mol. Med.* 11, e9302. <https://doi.org/10.15252/emmm.201809302>

- Koo, S.-H., 2013. Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. *Clin. Mol. Hepatol.* 19, 210–215. <https://doi.org/10.3350/cmh.2013.19.3.210>
- Kopp, R., Martínez, I.O., Legradi, J., Legler, J., 2017. Exposure to endocrine disrupting chemicals perturbs lipid metabolism and circadian rhythms. *J. Environ. Sci.* 62, 133–137. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.10.013>
- Korbecki, J., Bobiński, R., Dutka, M., 2019. Self-regulation of the inflammatory response by peroxisome proliferator-activated receptors. *Inflamm. Res.* 68, 443–458. <https://doi.org/10.1007/s00011-019-01231-1>
- Korz, S., Pan, Xiufang, Garcia-Lecea, M., Winata, C., Pan, Xiaotao, Wohland, T., Korzh, V., Gong, Z., 2008. Requirement of vasculogenesis and blood circulation in late stages of liver growth in zebrafish. *BMC Dev. Biol.* 8, 84. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-8-84>
- Kruszewski, M., 2003. Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutat. Res.* 531, 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.08.004>
- Kubota, A., Bainy, A.C.D., Woodin, B.R., Goldstone, J.V., Stegeman, J.J., 2013. The cytochrome P450 2AA gene cluster in zebrafish (*Danio rerio*); expression of CYP2AA1 and CYP2AA2 and response to phenobarbital-type inducers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272, 10.1016/j.taap.2013.05.017. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.05.017>
- Kuchay, M.S., Choudhary, N.S., Mishra, S.K., 2020. Pathophysiological mechanisms underlying MAFLD. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* 14, 1875–1887. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2020.09.026>
- Kulkarni, A., Ibrahim, S., Haider, I., Basha, A., Montgomery, E., Ermis, E., Mirmira, R.G., Anderson, R.M., 2022. A Novel 2-Hit Zebrafish Model to Study Early Pathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Biomedicines* 10, 479. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020479>
- Kumar, J., Lind, L., Salihovic, S., van Bavel, B., Ingelsson, E., Lind, P.M., 2014. Persistent organic pollutants and liver dysfunction biomarkers in a population-based human sample of men and women. *Environ. Res.* 134, 251–256. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.07.023>
- Kuranchie-Mensah, H., Atiemo, S.M., Palm, L.M.N.-D., Blankson-Arthur, S., Tutu, A.O., Fosu, P., 2012. Determination of organochlorine pesticide residue in sediment and water from the Densu river basin, Ghana. *Chemosphere* 86, 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.10.031>

L

- La Merrill, M., Emond, C., Kim, M.J., Antignac, J.-P., Le Bizec, B., Clément, K., Birnbaum, L.S., Barouki, R., 2013. Toxicological Function of Adipose Tissue: Focus on Persistent Organic Pollutants. *Environ. Health Perspect.* 121, 162–169. <https://doi.org/10.1289/ehp.1205485>
- La Merrill, M.A., Vandenberg, L.N., Smith, M.T., Goodson, W., Browne, P., Patisaul, H.B., Guyton, K.Z., Kortenkamp, A., Cogliano, V.J., Woodruff, T.J., Rieswijk, L., Sone, H., Korach, K.S., Gore, A.C., Zeise, L., Zoeller, R.T., 2020. Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. *Nat. Rev. Endocrinol.* 16, 45–57. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0273-8>
- Labaronne, E., Pinteur, C., Vega, N., Pesenti, S., Julien, B., Meugnier-Fouilloux, E., Vidal, H., Naville, D., Le Magueresse-Battistoni, B., 2017. Low-dose pollutant mixture triggers metabolic disturbances in female mice leading to common and specific features as compared to a high-fat diet. *J. Nutr. Biochem.* 45, 83–93. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.04.001>

- Lambert, J.E., Ramos-Roman, M.A., Browning, J.D., Parks, E.J., 2014. Increased de novo Lipogenesis is a Distinct Characteristic of Individuals with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 146, 726–735. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.11.049>
- Landgraf, K., Schuster, S., Meusel, A., Garten, A., Riemer, T., Schleinitz, D., Kiess, W., Körner, A., 2017. Short-term overfeeding of zebrafish with normal or high-fat diet as a model for the development of metabolically healthy versus unhealthy obesity. *BMC Physiol.* 17, 4. <https://doi.org/10.1186/s12899-017-0031-x>
- Lang, I.A., Galloway, T.S., Scarlett, A., Henley, W.E., Depledge, M., Wallace, R.B., Melzer, D., 2008. Association of Urinary Bisphenol A Concentration With Medical Disorders and Laboratory Abnormalities in Adults. *JAMA* 300, 1303–1310. <https://doi.org/10.1001/jama.300.11.1303>
- Langheinrich, U., 2003. Zebrafish: A new model on the pharmaceutical catwalk. *BioEssays* 25, 904–912. <https://doi.org/10.1002/bies.10326>
- Langin, D., Arner, P., 2006. Importance of TNF α and neutral lipases in human adipose tissue lipolysis. *Trends Endocrinol. Metab.* 17, 314–320. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2006.08.003>
- Lanthier, N., 2020. Les nouveaux traitements de la stéatohépatite non-alcoolique. *Nutr. Clin. Métabolisme* 34, 216–222. <https://doi.org/10.1016/j.nupar.2020.04.003>
- Lassailly, G., Caiazzo, R., Buob, D., Pigeyre, M., Verkindt, H., Labreuche, J., Raverdy, V., Leteurtre, E., Dharancy, S., Louvet, A., Romon, M., Duhamel, A., Pattou, F., Mathurin, P., 2015. Bariatric Surgery Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis in Morbidly Obese Patients. *Gastroenterology* 149, 379–388. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.04.014>
- Latifkar, A., Hur, Y.H., Sanchez, J.C., Cerione, R.A., Antonyak, M.A., 2019. New insights into extracellular vesicle biogenesis and function. *J. Cell Sci.* 132, jcs222406. <https://doi.org/10.1242/jcs.222406>
- Le Magueresse-Battistoni, B., Labaronne, E., Vidal, H., Naville, D., 2017. Endocrine disrupting chemicals in mixture and obesity, diabetes and related metabolic disorders. *World J. Biol. Chem.* 8, 108–119. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v8.i2.108>
- Le Magueresse-Battistoni, B., Vidal, H., Naville, D., 2018. Environmental Pollutants and Metabolic Disorders: The Multi-Exposure Scenario of Life. *Front. Endocrinol.* 9, 582. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00582>
- Le Roy, T., Llopis, M., Lepage, P., Bruneau, A., Rabot, S., Bevilacqua, C., Martin, P., Philippe, C., Walker, F., Bado, A., Perlemuter, G., Cassard-Doulier, A.-M., Gérard, P., 2013. Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Gut* 62, 1787–1794. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303816>
- Lebeaupin, C., Vallée, D., Hazari, Y., Hetz, C., Chevet, E., Bailly-Maitre, B., 2018. Endoplasmic reticulum stress signalling and the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* 69, 927–947. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.06.008>
- Lee, C.-H., Olson, P., Hevener, A., Mehl, I., Chong, L.-W., Olefsky, J.M., Gonzalez, F.J., Ham, J., Kang, H., Peters, J.M., Evans, R.M., 2006. PPAR δ regulates glucose metabolism and insulin sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 3444–3449. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511253103>
- Lee, H.K., 2011. Mitochondrial Dysfunction and Insulin Resistance: The Contribution of Dioxin-Like Substances. *Diabetes Metab. J.* 35, 207–215. <https://doi.org/10.4093/dmj.2011.35.3.207>
- Lee, J., Kim, Y., Friso, S., Choi, S.-W., 2017. Epigenetics in non-alcoholic fatty liver disease. *Mol. Aspects Med., Epigenetics and metabolism* 54, 78–88. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.11.008>
- Lee, Kim, Jung, 2019. Potential Therapeutic Application of Estrogen in Gender Disparity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease/Nonalcoholic Steatohepatitis. *Cells* 8, 1259. <https://doi.org/10.3390/cells8101259>

- Lee, Ko, E.H., Kim, J.E., Kim, E., Lee, H., Choi, H., Yu, J.H., Kim, H.J., Seong, J.-K., Kim, K.-S., Kim, J., 2012. Nuclear receptor PPAR γ -regulated monoacylglycerol O-acyltransferase 1 (MGAT1) expression is responsible for the lipid accumulation in diet-induced hepatic steatosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 13656–13661. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203218109>
- Lee, Y.-M., Kim, K.-S., Jacobs Jr, D.R., Lee, D.-H., 2017. Persistent organic pollutants in adipose tissue should be considered in obesity research. *Obes. Rev.* 18, 129–139. <https://doi.org/10.1111/obr.12481>
- Lee, Y.-S., Kim, S.Y., Ko, E., Lee, J.-H., Yi, H.-S., Yoo, Y.J., Je, J., Suh, S.J., Jung, Y.K., Kim, J.H., Seo, Y.S., Yim, H.J., Jeong, W.-I., Yeon, J.E., Um, S.H., Byun, K.S., 2017. Exosomes derived from palmitic acid-treated hepatocytes induce fibrotic activation of hepatic stellate cells. *Sci. Rep.* 7, 3710. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03389-2>
- Leeming, D.J., Grove, J., Kaye, P., Hoad, C., Francis, S., Nielsen, M., Karsdal, M.A., Guha, I.N., Aithal, G., 2017. Estimation of serum “true collagen type III formation” (Pro-C3) levels as a marker of non-alcoholic steatohepatitis in a prospective cohort. *J. Hepatol.* 66, S154. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(17\)30582-2](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(17)30582-2)
- Lefere, S., Puengel, T., Hundertmark, J., Penners, C., Frank, A.K., Guillot, A., de Munnck, K., Heymann, F., Adarbes, V., Defrêne, E., Estivalet, C., Geerts, A., Devisscher, L., Wettstein, G., Tacke, F., 2020. Differential effects of selective- and pan-PPAR agonists on experimental steatohepatitis and hepatic macrophages☆. *J. Hepatol.* 73, 757–770. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.04.025>
- Lemieux, G.A., Liu, J., Mayer, N., Bainton, R.J., Ashrafi, K., Werb, Z., 2011. A whole organism screen identifies novel regulators of fat storage. *Nat. Chem. Biol.* 7, 206–213. <https://doi.org/10.1038/nchembio.534>
- Li, C.Y., Cheng, S.L., Bammler, T.K., Cui, J.Y., 2016. Editor’s Highlight: Neonatal Activation of the Xenobiotic-Sensors PXR and CAR Results in Acute and Persistent Down-regulation of PPAR α -Signaling in Mouse Liver. *Toxicol. Sci.* 153, 282–302. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw127>
- Li, H., Fang, Q., Gao, F., Fan, J., Zhou, J., Wang, X., Zhang, H., Pan, X., Bao, Y., Xiang, K., Xu, A., Jia, W., 2010. Fibroblast growth factor 21 levels are increased in nonalcoholic fatty liver disease patients and are correlated with hepatic triglyceride. *J. Hepatol.* 53, 934–940. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.05.018>
- Li, L., Chen, L., Hu, L., Liu, Y., Sun, H.-Y., Tang, J., Hou, Y.-J., Chang, Y.-X., Tu, Q.-Q., Feng, G.-S., Shen, F., Wu, M.-C., Wang, H.-Y., 2011. Nuclear factor high-mobility group box1 mediating the activation of toll-like receptor 4 signaling in hepatocytes in the early stage of nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Hepatology* 54, 1620–1630. <https://doi.org/10.1002/hep.24552>
- Li, L., Li, H., Garzel, B., Yang, H., Sueyoshi, T., Li, Q., Shu, Y., Zhang, J., Hu, B., Heyward, S., Moeller, T., Xie, W., Negishi, M., Wang, H., 2015. SLC13A5 Is a Novel Transcriptional Target of the Pregnane X Receptor and Sensitizes Drug-Induced Steatosis in Human Liver. *Mol. Pharmacol.* 87, 674–682. <https://doi.org/10.1124/mol.114.097287>
- Li, M., Chen, D., Huang, H., Wang, J., Wan, X., Xu, C., Li, C., Ma, H., Yu, C., Li, Y., 2017. Caveolin1 protects against diet induced hepatic lipid accumulation in mice. *PLoS ONE* 12, e0178748. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178748>
- Li, Wang, T.-X., Huang, X., Li, Y., Sun, T., Zang, S., Guan, K.-L., Xiong, Y., Liu, J., Yuan, H.-X., 2020. Targeting ferroptosis alleviates methionine-choline deficient (MCD)-diet induced NASH by suppressing liver lipotoxicity. *Liver Int.* 40, 1378–1394. <https://doi.org/10.1111/liv.14428>
- Li, Wang, Z., Klaunig, J.E., 2018. Modulation of xenobiotic nuclear receptors in high-fat diet induced non-alcoholic fatty liver disease. *Toxicology* 410, 199–213. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.08.007>

- Li, X., Li, H., Cai, D., Li, P., Jin, J., Jiang, X., Li, Z., Tian, L., Chen, G., Sun, J., Bai, W., 2021. Chronic oral exposure to cadmium causes liver inflammation by NLRP3 inflammasome activation in pubertal mice. *Food Chem. Toxicol.* 148, 111944. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111944>
- Li, Y., Jadhav, K., Zhang, Y., 2013. Bile Acid Receptors in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Biochem. Pharmacol.* 86, 1517–1524. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.08.015>
- Li, Y., Yang, M., Lin, H., Yan, W., Deng, G., Ye, H., Shi, H., Wu, C., Ma, G., Xu, S., Tan, Q., Gao, Z., Gao, L., 2022. Limonin Alleviates Non-alcoholic Fatty Liver Disease by Reducing Lipid Accumulation, Suppressing Inflammation and Oxidative Stress. *Front. Pharmacol.* 12, 801730. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.801730>
- Li, Y., Zalzal, M., Jadhav, K., Xu, Y., Kasumov, T., Yin, L., Zhang, Y., 2016. Carboxylesterase 2 Prevents Liver Steatosis by Modulating Lipolysis, ER stress and Lipogenesis and Is Regulated by HNF4 α . *Hepatology* 63, 1860–1874. <https://doi.org/10.1002/hep.28472>
- Li, Z., Li, Y., Zhang, H.-X., Guo, J.-R., Lam, C.W.K., Wang, C.-Y., Zhang, W., 2019. Mitochondria-Mediated Pathogenesis and Therapeutics for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Mol. Nutr. Food Res.* 63, 1900043. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201900043>
- Li, Z.Z., Berk, M., McIntyre, T.M., Feldstein, A.E., 2009. Hepatic Lipid Partitioning and Liver Damage in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J. Biol. Chem.* 284, 5637–5644. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807616200>
- Liang, G., Yang, J., Horton, J.D., Hammer, R.E., Goldstein, J.L., Brown, M.S., 2002. Diminished Hepatic Response to Fasting/Refeeding and Liver X Receptor Agonists in Mice with Selective Deficiency of Sterol Regulatory Element-binding Protein-1c*. *J. Biol. Chem.* 277, 9520–9528. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111421200>
- Liang, W.-C., Zhu, W., Mitsuhashi, S., Noguchi, S., Sacher, M., Ogawa, M., Shih, H.-H., Jong, Y.-J., Nishino, I., 2015. Congenital muscular dystrophy with fatty liver and infantile-onset cataract caused by TRAPPC11 mutations: broadening of the phenotype. *Skelet. Muscle* 5, 29. <https://doi.org/10.1186/s13395-015-0056-4>
- Liang, Y., Liu, D., Zhan, J., Luo, M., Han, J., Wang, P., Zhou, Z., 2020. New insight into the mechanism of POP-induced obesity: Evidence from DDE-altered microbiota. *Chemosphere* 244, 125123. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125123>
- Liao, C.-Y., Song, M.J., Gao, Y., Mauer, A.S., Revzin, A., Malhi, H., 2018. Hepatocyte-Derived Lipotoxic Extracellular Vesicle Sphingosine 1-Phosphate Induces Macrophage Chemotaxis. *Front. Immunol.* 9, 2980. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02980>
- Lin, C.-Y., Lin, L.-Y., Chiang, C.-K., Wang, W.-J., Su, Y.-N., Hung, K.-Y., Chen, P.-C., 2010. Investigation of the associations between low-dose serum perfluorinated chemicals and liver enzymes in US adults. *Am. J. Gastroenterol.* 105, 1354–1363. <https://doi.org/10.1038/ajg.2009.707>
- Lin, R., Wu, D., Wu, F.-J., Meng, Y., Zhang, J.-H., Wang, X.-G., Jia, L.-H., 2019. Non-alcoholic Fatty Liver Disease Induced by Perinatal Exposure to Bisphenol a Is Associated With Activated mTOR and TLR4/NF- κ B Signaling Pathways in Offspring Rats. *Front. Endocrinol.* 10, 620. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00620>
- Lin, Y., Ding, D., Huang, Q., Liu, Q., Lu, H., Lu, Y., Chi, Y., Sun, X., Ye, G., Zhu, H., Wei, J., Dong, S., 2017. Downregulation of miR-192 causes hepatic steatosis and lipid accumulation by inducing SREBF1: Novel mechanism for bisphenol A-triggered non-alcoholic fatty liver disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1862, 869–882. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2017.05.001>
- Listenberger, L.L., Ory, D.S., Schaffer, J.E., 2001. Palmitate-induced Apoptosis Can Occur through a Ceramide-independent Pathway*. *J. Biol. Chem.* 276, 14890–14895. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010286200>

- Liu, C.-H., Ampuero, J., Gil-Gómez, A., Montero-Vallejo, R., Rojas, Á., Muñoz-Hernández, R., Gallego-Durán, R., Romero-Gómez, M., 2018. miRNAs in patients with non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *J. Hepatol.* 69, 1335–1348. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.08.008>
- Liu, L.Y., Alexa, K., Cortes, M., Schatzman-Bone, S., Kim, A.J., Mukhopadhyay, B., Cinar, R., Kunos, G., North, T.E., Goessling, W., 2016. Cannabinoid receptor signaling regulates liver development and metabolism. *Dev. Camb. Engl.* 143, 609–622. <https://doi.org/10.1242/dev.121731>
- Liu, Q., Wang, Q., Xu, C., Shao, W., Zhang, C., Liu, H., Jiang, Z., Gu, A., 2017. Organochloride pesticides impaired mitochondrial function in hepatocytes and aggravated disorders of fatty acid metabolism. *Sci. Rep.* 7, 46339. <https://doi.org/10.1038/srep46339>
- Liu, W., Baker, R.D., Bhatia, T., Zhu, L., Baker, S.S., 2016. Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 1969–1987. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2161-x>
- Liu, W., Baker, S.S., Baker, R.D., Zhu, L., 2015. Antioxidant Mechanisms in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Curr. Drug Targets* 16, 1301–1314. <https://doi.org/10.2174/1389450116666150427155342>
- Liu, Y., Han, X., Bian, Z., Peng, Y., You, Z., Wang, Q., Chen, X., Qiu, D., Ma, X., 2012. Activation of Liver X Receptors Attenuates Endotoxin-Induced Liver Injury in Mice with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Dig. Dis. Sci.* 57, 390–398. <https://doi.org/10.1007/s10620-011-1902-9>
- Lomonaco, R., Ortiz-Lopez, C., Orsak, B., Webb, A., Hardies, J., Darland, C., Finch, J., Gastaldelli, A., Harrison, S., Tio, F., Cusi, K., 2012. Effect of adipose tissue insulin resistance on metabolic parameters and liver histology in obese patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 55, 1389–1397. <https://doi.org/10.1002/hep.25539>
- Lonardo, A., Nascimbeni, F., Ballestri, S., Fairweather, D., Win, S., Than, T.A., Abdelmalek, M.F., Suzuki, A., 2019. Sex Differences in NAFLD: State of the Art and Identification of Research Gaps. *Hepatol. Baltim. Md* 70, 1457–1469. <https://doi.org/10.1002/hep.30626>
- Longo, M., Meroni, M., Paolini, E., Erconi, V., Carli, F., Fortunato, F., Ronchi, D., Piciotti, R., Sabatini, S., Macchi, C., Alisi, A., Miele, L., Soardo, G., Comi, G.P., Valenti, L., Ruscica, M., Fracanzani, A.L., Gastaldelli, A., Dongiovanni, P., 2021a. TM6SF2/PNPLA3/MBOAT7 Loss-of-Function Genetic Variants Impact on NAFLD Development and Progression Both in Patients and in In Vitro Models. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 759–788. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2021.11.007>
- Longo, M., Paolini, E., Meroni, M., Dongiovanni, P., 2021b. Remodeling of Mitochondrial Plasticity: The Key Switch from NAFLD/NASH to HCC. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 4173. <https://doi.org/10.3390/ijms22084173>
- Longo, M., Zatterale, F., Naderi, J., Nigro, C., Oriente, F., Formisano, P., Miele, C., Beguinot, F., 2020. Low-dose Bisphenol-A Promotes Epigenetic Changes at Ppar γ Promoter in Adipose Precursor Cells. *Nutrients* 12, 3498. <https://doi.org/10.3390/nu12113498>
- Longo, V.D., Panda, S., 2016. Fasting, circadian rhythms, and time restricted feeding in healthy lifespan. *Cell Metab.* 23, 1048–1059. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.06.001>
- López Nadal, A., Ikeda-Ohtsubo, W., Sipkema, D., Peggs, D., McGurk, C., Forlenza, M., Wiegertjes, G.F., Brugman, S., 2020. Feed, Microbiota, and Gut Immunity: Using the Zebrafish Model to Understand Fish Health. *Front. Immunol.* 11, 114. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00114>
- López-Velázquez, J.A., Carrillo-Córdova, L.D., Chávez-Tapia, N.C., Uribe, M., Méndez-Sánchez, N., 2012. Nuclear Receptors in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J. Lipids* 2012, 139875. <https://doi.org/10.1155/2012/139875>

- Lorent, K., Moore, J.C., Siekmann, A.F., Lawson, N., Pack, M., 2010. Reiterative Use of the Notch Signal During Zebrafish Intrahepatic Biliary Development. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 239, 855–864. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22220>
- Loyer, X., Paradis, V., Hénique, C., Vion, A.-C., Colnot, N., Guerin, C.L., Devue, C., On, S., Scetbun, J., Romain, M., Paul, J.-L., Rothenberg, M.E., Marcellin, P., Durand, F., Bedossa, P., Prip-Buus, C., Baugé, E., Staels, B., Boulanger, C.M., Tedgui, A., Rautou, P.-E., 2016. Liver microRNA-21 is overexpressed in non-alcoholic steatohepatitis and contributes to the disease in experimental models by inhibiting PPAR α expression. *Gut* 65, 1882–1894. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308883>
- Lumaquin, D., Johns, E., Montal, E., Weiss, J.M., Ola, D., Abuhashem, A., White, R.M., 2021. An in vivo reporter for tracking lipid droplet dynamics in transparent zebrafish. *eLife* 10, e64744. <https://doi.org/10.7554/eLife.64744>
- Luo, W., Xu, Q., Wang, Q., Wu, H., Hua, J., 2017. Effect of modulation of PPAR- γ activity on Kupffer cells M1/M2 polarization in the development of non-alcoholic fatty liver disease. *Sci. Rep.* 7, 44612. <https://doi.org/10.1038/srep44612>
- Lustig, R.H., Collier, D., Kassotis, C., Roepke, T.A., Kim, M.J., Blanc, E., Barouki, R., Bansal, A., Cave, M.C., Chatterjee, S., Choudhury, M., Gilbertson, M., Lagadic-Gossmann, D., Howard, S., Lind, L., Tomlinson, C.R., Vondracek, J., Heindel, J.J., 2022. Obesity I: Overview and molecular and biochemical mechanisms. *Biochem. Pharmacol.* 199, 115012. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115012>
- Lutfi, E., Babin, P.J., Gutiérrez, J., Capilla, E., Navarro, I., 2017. Caffeic acid and hydroxytyrosol have anti-obesogenic properties in zebrafish and rainbow trout models. *PLOS ONE* 12, e0178833. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178833>
- Luther, J., Garber, J.J., Khalili, H., Dave, M., Bale, S.S., Jindal, R., Motola, D.L., Luther, S., Bohr, S., Jeoung, S.W., Deshpande, V., Singh, G., Turner, J.R., Yarmush, M.L., Chung, R.T., Patel, S.J., 2015. Hepatic Injury in Nonalcoholic Steatohepatitis Contributes to Altered Intestinal Permeability. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 1, 222-232.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2015.01.001>
- Lv, Q., Gao, R., Peng, C., Yi, J., Liu, L., Yang, S., Li, D., Hu, J., Luo, T., Mei, M., Song, Y., Wu, C., Xiao, X., Li, Q., 2017. Bisphenol A promotes hepatic lipid deposition involving Kupffer cells M1 polarization in male mice. *J. Endocrinol.* 234, 143–154. <https://doi.org/10.1530/JOE-17-0028>
- Lyssimachou, A., Santos, J.G., André, A., Soares, J., Lima, D., Guimarães, L., Almeida, C.M.R., Teixeira, C., Castro, L.F.C., Santos, M.M., 2015. The Mammalian “Obesogen” Tributyltin Targets Hepatic Triglyceride Accumulation and the Transcriptional Regulation of Lipid Metabolism in the Liver and Brain of Zebrafish. *PLOS ONE* 10, e0143911. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143911>

M

- Ma, C., Kesarwala, A.H., Eggert, T., Medina-Echeverz, J., Kleiner, D.E., Jin, P., Stroncek, D.F., Terabe, M., Kapoor, V., ElGindi, M., Han, M., Thornton, A.M., Zhang, H., Egger, M., Luo, J., Felsner, D.W., McVicar, D.W., Weber, A., Heikenwalder, M., Greten, T.F., 2016. NAFLD causes selective CD4⁺ T lymphocyte loss and promotes hepatocarcinogenesis. *Nature* 531, 253–257. <https://doi.org/10.1038/nature16969>
- Ma, J., Yin, H., Li, M., Deng, Y., Ahmad, O., Qin, G., He, Q., Li, J., Gao, K., Zhu, J., Wang, B., Wu, S., Wang, T., Shang, J., 2019. A Comprehensive Study of High Cholesterol Diet-Induced Larval Zebrafish Model: A Short-Time *In Vivo* Screening Method for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Drugs. *Int. J. Biol. Sci.* 15, 973–983. <https://doi.org/10.7150/ijbs.30013>

- Ma, X., Liu, S., Zhang, J., Dong, M., Wang, Y., Wang, M., Xin, Y., 2020. Proportion of NAFLD patients with normal ALT value in overall NAFLD patients: a systematic review and meta-analysis. *BMC Gastroenterol.* 20, 10. <https://doi.org/10.1186/s12876-020-1165-z>
- Macaluso, F.S., Maida, M., Petta, S., 2015. Genetic background in nonalcoholic fatty liver disease: A comprehensive review. *World J. Gastroenterol. WJG* 21, 11088–11111. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i39.11088>
- Mahboobifard, F., Pourgholami, M.H., Jorjani, M., Dargahi, L., Amiri, M., Sadeghi, S., Tehrani, F.R., 2022. Estrogen as a key regulator of energy homeostasis and metabolic health. *Biomed. Pharmacother.* 156, 113808. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113808>
- Mailloux, R.J., Florian, M., Chen, Q., Yan, J., Petrov, I., Coughlan, M.C., Laziyan, M., Caldwell, D., Lalande, M., Patry, D., Gagnon, C., Sarafin, K., Truong, J., Chan, H.M., Ratnayake, N., Li, N., Willmore, W.G., Jin, X., 2014. Exposure to a Northern Contaminant Mixture (NCM) Alters Hepatic Energy and Lipid Metabolism Exacerbating Hepatic Steatosis in Obese JCR Rats. *PLoS ONE* 9, e106832. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106832>
- Makri, E., Goulas, A., Polyzos, S.A., 2021. Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis and Emerging Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Arch. Med. Res.* 52, 25–37. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.11.010>
- Malhi, H., Bronk, S.F., Werneburg, N.W., Gores, G.J., 2006. Free Fatty Acids Induce JNK-dependent Hepatocyte Lipoapoptosis*. *J. Biol. Chem.* 281, 12093–12101. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510660200>
- Malik, R., Chang, M., Bhaskar, K., Nasser, I., Curry, M., Schuppan, D., Byrnes, V., Afdhal, N., 2009. The clinical utility of biomarkers and the nonalcoholic steatohepatitis CRN liver biopsy scoring system in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 24, 564–568. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2008.05731.x>
- Mamsen, L.S., Jönsson, B.A.G., Lindh, C.H., Olesen, R.H., Larsen, A., Ernst, E., Kelsey, T.W., Andersen, C.Y., 2017. Concentration of perfluorinated compounds and cotinine in human foetal organs, placenta, and maternal plasma. *Sci. Total Environ.* 596–597, 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.058>
- Manikkam, M., Tracey, R., Guerrero-Bosagna, C., Skinner, M.K., 2013. Plastics Derived Endocrine Disruptors (BPA, DEHP and DBP) Induce Epigenetic Transgenerational Inheritance of Obesity, Reproductive Disease and Sperm Epimutations. *PLoS ONE* 8, e55387. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055387>
- Mann, J., Valenti, L., Scorletti, E., Byrne, C., Nobili, V., 2018. Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children. *Semin. Liver Dis.* 38, 001–013. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1627456>
- Maradonna, F., Carnevali, O., 2018. Lipid Metabolism Alteration by Endocrine Disruptors in Animal Models: An Overview. *Front. Endocrinol.* 9, 654. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00654>
- Marchesi, J.R., Adams, D.H., Fava, F., Hermes, G.D.A., Hirschfield, G.M., Hold, G., Quraishi, M.N., Kinross, J., Smidt, H., Tuohy, K.M., Thomas, L.V., Zoetendal, E.G., Hart, A., 2016. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut* 65, 330–339. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309990>
- Marchesini, G., Brizi, M., Bianchi, G., Tomassetti, S., Bugianesi, E., Lenzi, M., McCullough, A.J., Natale, S., Forlani, G., Melchionda, N., 2001. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Feature of the Metabolic Syndrome. *Diabetes* 50, 1844–1850. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.8.1844>
- Marchisello, S., Di Pino, A., Scicali, R., Urbano, F., Piro, S., Purrello, F., Rabuazzo, A.M., 2019. Pathophysiological, Molecular and Therapeutic Issues of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: An Overview. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 1948. <https://doi.org/10.3390/ijms20081948>

- Marí, M., Caballero, F., Colell, A., Morales, A., Caballeria, J., Fernandez, A., Enrich, C., Fernandez-Checa, J.C., García-Ruiz, C., 2006. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metab.* 4, 185–198. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.07.006>
- Marmugi, A., Ducheix, S., Lasserre, F., Polizzi, A., Paris, A., Priymenko, N., Bertrand-Michel, J., Pineau, T., Guillou, H., Martin, P.G.P., Mselli-Lakhal, L., 2012. Low doses of bisphenol a induce gene expression related to lipid synthesis and trigger triglyceride accumulation in adult mouse liver. *Hepatology* 55, 395–407. <https://doi.org/10.1002/hep.24685>
- Marqueño, A., Pérez-Albaladejo, E., Denslow, N.D., Bowden, J.A., Porte, C., 2021. Untargeted lipidomics reveals the toxicity of bisphenol A bis(3-chloro-2-hydroxypropyl) ether and bisphenols A and F in zebrafish liver cells. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 219, 112311. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112311>
- Marra, F., Svegliati-Baroni, G., 2018. Lipotoxicity and the gut-liver axis in NASH pathogenesis. *J. Hepatol., NAFLD: Emerging perspectives* 68, 280–295. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.11.014>
- Martella, A., Silvestri, C., Maradonna, F., Gioacchini, G., Allarà, M., Radaelli, G., Overby, D.R., Di Marzo, V., Carnevali, O., 2016. Bisphenol A Induces Fatty Liver by an Endocannabinoid-Mediated Positive Feedback Loop. *Endocrinology* 157, 1751–1763. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1384>
- Martinelli, M.I., Mocchiutti, N.O., Bernal, C.A., 2006. Dietary di(2-ethylhexyl)phthalate-impaired glucose metabolism in experimental animals. *Hum. Exp. Toxicol.* 25, 531–538. <https://doi.org/10.1191/0960327106het651oa>
- Martínez, R., Herrero-Nogareda, L., Van Antro, M., Campos, M.P., Casado, M., Barata, C., Piña, B., Navarro-Martín, L., 2019a. Morphometric signatures of exposure to endocrine disrupting chemicals in zebrafish eleutheroembryos. *Aquat. Toxicol.* 214, 105232. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105232>
- Martínez, R., Navarro-Martín, L., Luccarelli, C., Codina, A.E., Raldúa, D., Barata, C., Tauler, R., Piña, B., 2019b. Unravelling the mechanisms of PFOS toxicity by combining morphological and transcriptomic analyses in zebrafish embryos. *Sci. Total Environ.* 674, 462–471. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.200>
- Martínez, R., Navarro-Martín, L., van Antro, M., Fuertes, I., Casado, M., Barata, C., Piña, B., 2020a. Changes in lipid profiles induced by bisphenol A (BPA) in zebrafish eleutheroembryos during the yolk sac absorption stage. *Chemosphere* 246, 125704. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125704>
- Martínez, R., Tu, W., Eng, T., Allaire-Leung, M., Piña, B., Navarro-Martín, L., Mennigen, J.A., 2020b. Acute and long-term metabolic consequences of early developmental Bisphenol A exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 256, 127080. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127080>
- Martins, R.R., Ellis, P.S., MacDonald, R.B., Richardson, R.J., Henriques, C.M., 2019. Resident Immunity in Tissue Repair and Maintenance: The Zebrafish Model Coming of Age. *Front. Cell Dev. Biol.* 7, 12. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00012>
- Martorell, P., Llopis, S., González, N., Montón, F., Ortiz, P., Genovés, S., Ramón, D., 2012. *Caenorhabditis elegans* as a Model To Study the Effectiveness and Metabolic Targets of Dietary Supplements Used for Obesity Treatment: The Specific Case of a Conjugated Linoleic Acid Mixture (Tonalin). *J. Agric. Food Chem.* 60, 11071–11079. <https://doi.org/10.1021/jf3031138>
- Masarone, M., Rosato, V., Dallio, M., Gravina, A.G., Aglitti, A., Loguercio, C., Federico, A., Persico, M., 2018. Role of Oxidative Stress in Pathophysiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018, 9547613. <https://doi.org/10.1155/2018/9547613>
- Matthews, R.P., Lorent, K., Mañoral-Mobias, R., Huang, Y., Gong, W., Murray, I.V.J., Blair, I.A., Pack, M., 2009. TNF α -dependent hepatic steatosis and liver degeneration caused by mutation of zebrafish s-adenosylhomocysteine hydrolase. *Dev. Camb. Engl.* 136, 865–875. <https://doi.org/10.1242/dev.027565>

- McKay, R.M., McKay, J.P., Avery, L., Graff, J.M., 2003. *C. elegans*: A Model for Exploring the Genetics of Fat Storage. *Dev. Cell* 4, 131–142.
- Meeker, N.D., Trede, N.S., 2008. Immunology and zebrafish: Spawning new models of human disease. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 745–757. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2007.11.011>
- Mellor, C.L., Steinmetz, F.P., Cronin, M.T.D., 2016. The identification of nuclear receptors associated with hepatic steatosis to develop and extend adverse outcome pathways. *Crit. Rev. Toxicol.* 46, 138–152. <https://doi.org/10.3109/10408444.2015.1089471>
- Menke, A.L., Spitsbergen, J.M., Wolterbeek, A.P.M., Woutersen, R.A., 2011. Normal Anatomy and Histology of the Adult Zebrafish. *Toxicol. Pathol.* 39, 759–775. <https://doi.org/10.1177/0192623311409597>
- Mentor, A., Brunström, B., Mattsson, A., Jönsson, M., 2020. Developmental exposure to a human relevant mixture of endocrine disruptors alters metabolism and adipogenesis in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 238, 124584. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124584>
- Merrell, M.D., Cherrington, N.J., 2011. Drug metabolism alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Drug Metab. Rev.* 43, 317–334. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.577781>
- Michail, S., Lin, M., Frey, M.R., Fanter, R., Paliy, O., Hilbush, B., Reo, N.V., 2015. Altered gut microbial energy and metabolism in children with non-alcoholic fatty liver disease. *FEMS Microbiol. Ecol.* 91, 1–9. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiu002>
- Michaud, A., Boulet, M.M., Veilleux, A., Noël, S., Paris, G., Tchernof, A., 2014. Abdominal subcutaneous and omental adipocyte morphology and its relation to gene expression, lipolysis and adipocytokine levels in women. *Metabolism* 63, 372–381. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2013.11.007>
- Michelotti, G.A., Machado, M.V., Diehl, A.M., 2013. NAFLD, NASH and liver cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 10, 656–665. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.183>
- Migliaccio, V., Scudiero, R., Sica, R., Lionetti, L., Putti, R., 2019. Oxidative stress and mitochondrial uncoupling protein 2 expression in hepatic steatosis induced by exposure to xenobiotic DDE and high fat diet in male Wistar rats. *PLoS ONE* 14, e0215955. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215955>
- Migliarini, B., Piccinetti, C.C., Martella, A., Maradonna, F., Gioacchini, G., Carnevali, O., 2011. Perspectives on endocrine disruptor effects on metabolic sensors. *Gen. Comp. Endocrinol.* 170, 416–423. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.11.025>
- Mihm, S., 2018. Danger-Associated Molecular Patterns (DAMPs): Molecular Triggers for Sterile Inflammation in the Liver. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 3104. <https://doi.org/10.3390/ijms19103104>
- Miksztoicz, V., Lucero, D., Zago, V., Cacciagiú, L., Lopez, G., Gonzalez Ballerga, E., Sordá, J., Fassio, E., Schreier, L., Berg, G., 2012. Hepatic lipase activity is increased in non-alcoholic fatty liver disease beyond insulin resistance. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 28, 535–541. <https://doi.org/10.1002/dmrr.2312>
- Mimoto, M.S., Nadal, A., Sargis, R.M., 2017. Polluted Pathways: Mechanisms of Metabolic Disruption by Endocrine Disrupting Chemicals. *Curr. Environ. Health Rep.* 4, 208–222. <https://doi.org/10.1007/s40572-017-0137-0>
- Min HK, Kapoor A, Fuchs M, Mirshahi F, Zhou H, Maher J, Kellum J, Warnick R, Contos MJ, Sanyal AJ. Increased hepatic synthesis and dysregulation of cholesterol metabolism is associated with the severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Metab.* 2012 May 2;15(5):665-74. doi: 10.1016/j.cmet.2012.04.004. PMID: 22560219; PMCID: PMC3361911.
- Miquilena-Colina, M.E., Lima-Cabello, E., Sánchez-Campos, S., García-Mediavilla, M.V., Fernández-Bermejo, M., Lozano-Rodríguez, T., Vargas-Castrillón, J., Buqué, X., Ochoa, B., Aspichueta, P., González-Gallego, J., García-Monzón, C., 2011. Hepatic fatty acid translocase CD36 upregulation is associated with insulin

- resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *Gut* 60, 1394–1402. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.222844>
- Mir, H., Meena, A.S., Chaudhry, K.K., Shukla, P.K., Gangwar, R., Manda, B., Padala, M.K., Shen, L., Turner, J.R., Dietrich, P., Dragatsis, I., Rao, R., 2016. Occludin Deficiency Promotes Ethanol-Induced Disruption of Colonic Epithelial Junctions, Gut Barrier Dysfunction and Liver Damage in Mice. *Biochim. Biophys. Acta* 1860, 765–774. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.12.013>
- Miura, K., Yang, L., van Rooijen, N., Brenner, D.A., Ohnishi, H., Seki, E., 2013. TLR2 and palmitic acid cooperatively contribute to the development of nonalcoholic steatohepatitis through inflammasome activation. *Hepatology* 57, 577–589. <https://doi.org/10.1002/hep.26081>
- Miyares, R.L., de Rezende, V.B., Farber, S.A., 2014. Zebrafish yolk lipid processing: a tractable tool for the study of vertebrate lipid transport and metabolism. *Dis. Model. Mech.* 7, 915–927. <https://doi.org/10.1242/dmm.015800>
- Mohajer, N., Joloya, E.M., Seo, J., Shioda, T., Blumberg, B., 2021. Epigenetic Transgenerational Inheritance of the Effects of Obesogen Exposure. *Front. Endocrinol.* 12, 787580. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.787580>
- Mohammed, S., Nicklas, E.H., Thadathil, N., Selvarani, R., Royce, G.H., Kinter, M., Richardson, A., Deepa, S.S., 2021. Role of necroptosis in chronic hepatic inflammation and fibrosis in a mouse model of increased oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 164, 315–328. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.12.449>
- Monaco, A., Capriello, T., Grimaldi, M.C., Schiano, V., Ferrandino, I., 2017. Neurodegeneration in zebrafish embryos and adults after cadmium exposure. *Eur. J. Histochem. EJM* 61, 2833. <https://doi.org/10.4081/ejm.2017.2833>
- Monga, S. (Paul) S., 2014. Role and Regulation of β -Catenin Signaling During Physiological Liver Growth. *Gene Expr.* 16, 51–62. <https://doi.org/10.3727/105221614X13919976902138>
- Montagner, A., Polizzi, A., Fouché, E., Ducheix, S., Lippi, Y., Lasserre, F., Barquissau, V., Régnier, M., Lukowicz, C., Benhamed, F., Iroz, A., Bertrand-Michel, J., Al Saati, T., Cano, P., Mselli-Lakhal, L., Mithieux, G., Rajas, F., Lagarrigue, S., Pineau, T., Loiseau, N., Postic, C., Langin, D., Wahli, W., Guillou, H., 2016. Liver PPAR α is crucial for whole-body fatty acid homeostasis and is protective against NAFLD. *Gut* 65, 1202–1214. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310798>
- Montandon, S.A., Somm, E., Loizides-Mangold, U., de Vito, C., Dibner, C., Jornayvaz, F.R., 2019. Multi-technique comparison of atherogenic and MCD NASH models highlights changes in sphingolipid metabolism. *Sci. Rep.* 9, 16810. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53346-4>
- Morales-Prieto, N., Ruiz-Laguna, J., Sheehan, D., Abril, N., 2018. Transcriptome signatures of p,p'-DDE-induced liver damage in *Mus spretus* mice. *Environ. Pollut.* 238, 150–167. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.03.005>
- Moreman, J., Lee, O., Trznadel, M., David, A., Kudoh, T., Tyler, C.R., 2017. Acute Toxicity, Teratogenic, and Estrogenic Effects of Bisphenol A and Its Alternative Replacements Bisphenol S, Bisphenol F, and Bisphenol AF in Zebrafish Embryo-Larvae. *Environ. Sci. Technol.* 51, 12796–12805. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03283>
- Mortensen, A.S., Arukwe, A., 2006. Dimethyl sulfoxide is a potent modulator of estrogen receptor isoforms and xenoestrogen biomarker responses in primary culture of salmon hepatocytes. *Aquat. Toxicol.* 79, 99–103. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.05.009>
- Moschen, A.R., Kaser, S., Tilg, H., 2013. Non-alcoholic steatohepatitis: a microbiota-driven disease. *Trends Endocrinol. Metab.* 24, 537–545. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.05.009>

- Mota, M., Banini, B.A., Cazanave, S.C., Sanyal, A.J., 2016. Molecular Mechanisms of Lipotoxicity and Glucotoxicity in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Metabolism*. 65, 1049–1061. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2016.02.014>
- Moyer, B.J., Rojas, I.Y., Kerley-Hamilton, J.S., Hazlett, H.F., Nemani, K.V., Trask, H.W., West, R.J., Lupien, L.E., Collins, A.J., Ringelberg, C.S., Gimi, B., Kinlaw, W.B., Tomlinson, C.R., 2016. Inhibition of the Aryl Hydrocarbon Receptor Prevents Western Diet-Induced Obesity. Model for AHR Activation by Kynurenine via Oxidized-LDL, TLR2/4, TGF β , and IDO1. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 300, 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.03.011>
- Mozzicafreddo, M., Cuccioloni, M., Bonfili, L., Cecarini, V., Palermo, F.A., Cocci, P., Mosconi, G., Capone, A., Ricci, I., Eleuteri, A.M., Angeletti, M., 2015. Environmental pollutants directly affect the liver X receptor alpha activity: Kinetic and thermodynamic characterization of binding. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 152, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.04.011>
- Mridha, A.R., Wree, A., Robertson, A.A.B., Yeh, M.M., Johnson, C.D., Van Rooyen, D.M., Haczeyni, F., Teoh, N.C.-H., Savard, C., Ioannou, G.N., Masters, S.L., Schroder, K., Cooper, M.A., Feldstein, A.E., Farrell, G.C., 2017. NLRP3 inflammasome blockade reduces liver inflammation and fibrosis in experimental NASH in mice. *J. Hepatol.* 66, 1037–1046. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.01.022>
- Mu, X., Qi, S., Wang, H., Yuan, L., Wang, C., Li, Y., Qiu, J., 2022. Bisphenol analogues induced metabolic effects through eliciting intestinal cell heterogeneous response. *Environ. Int.* 165, 107287. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107287>
- Mullaney, B.C., Ashrafi, K., 2009. C. elegans Fat Storage and Metabolic Regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 474–478. <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2008.12.013>
- Mulligan, C., Kondakala, S., Yang, E.-J., Stokes, J.V., Stewart, J.A., Kaplan, B.L.F., Howell III, G.E., 2017. Exposure to an environmentally relevant mixture of organochlorine compounds and polychlorinated biphenyls Promotes hepatic steatosis in male Ob/Ob mice. *Environ. Toxicol.* 32, 1399–1411. <https://doi.org/10.1002/tox.22334>
- Musso, G., Cassader, M., Paschetta, E., Gambino, R., 2018. Bioactive Lipid Species and Metabolic Pathways in Progression and Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* 155, 282-302.e8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.06.031>
- Musso, G., Cassader, M., Rosina, F., Gambino, R., 2012. Impact of current treatments on liver disease, glucose metabolism and cardiovascular risk in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a systematic review and meta-analysis of randomised trials. *Diabetologia* 55, 885–904. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2446-4>
- Mutoh, S., Osabe, M., Inoue, K., Moore, R., Pedersen, L., Perera, L., Reboloso, Y., Sueyoshi, T., Negishi, M., 2009. Dephosphorylation of Threonine 38 Is Required for Nuclear Translocation and Activation of Human Xenobiotic Receptor CAR (NR113). *J. Biol. Chem.* 284, 34785–34792. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.048108>

N

- Nabi, O., Lacombe, K., Boursier, J., Mathurin, P., Zins, M., Serfaty, L., 2020. Prevalence and Risk Factors of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Advanced Fibrosis in General Population: the French Nationwide NASH-CO Study. *Gastroenterology* 159, 791-793.e2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.04.048>

- Nagarajan, P., Mahesh Kumar, M.J., Venkatesan, R., Majundar, S.S., Juyal, R.C., 2012. Genetically modified mouse models for the study of nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* *WJG* 18, 1141–1153. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i11.1141>
- Nassir, F., Adewole, O.L., Brunt, E.M., Abumrad, N.A., 2013. CD36 deletion reduces VLDL secretion, modulates liver prostaglandins, and exacerbates hepatic steatosis in ob/ob mice. *J. Lipid Res.* 54, 2988–2997. <https://doi.org/10.1194/jlr.M037812>
- Natividad, J.M., Agus, A., Planchais, J., Lamas, B., Jarry, A.C., Martin, R., Michel, M.-L., Chong-Nguyen, C., Roussel, R., Straube, M., Jegou, S., McQuitty, C., Le Gall, M., da Costa, G., Lecornet, E., Michaudel, C., Modoux, M., Glodt, J., Bridonneau, C., Sovran, B., Dupraz, L., Bado, A., Richard, M.L., Langella, P., Hansel, B., Launay, J.-M., Xavier, R.J., Duboc, H., Sokol, H., 2018. Impaired Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand Production by the Gut Microbiota Is a Key Factor in Metabolic Syndrome. *Cell Metab.* 28, 737-749.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.07.001>
- Naville, D., Gaillard, G., Julien, B., Vega, N., Pinteur, C., Chanon, S., Vidal, H., Le Magueresse-Battistoni, B., 2019. Chronic exposure to a pollutant mixture at low doses led to tissue-specific metabolic alterations in male mice fed standard and high-fat high-sucrose diet. *Chemosphere* 220, 1187–1199. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.177>
- Naville, D., Pinteur, C., Vega, N., Menade, Y., Vigier, M., Le Bourdais, A., Labaronne, E., Debard, C., Luquain-Costaz, C., Bégeot, M., Vidal, H., Le Magueresse-Battistoni, B., 2013. Low-dose food contaminants trigger sex-specific, hepatic metabolic changes in the progeny of obese mice. *FASEB J.* 27, 3860–3870. <https://doi.org/10.1096/fj.13-231670>
- Neale, P.A., Grimaldi, M., Boulahtouf, A., Leusch, F.D.L., Balaguer, P., 2020. Assessing species-specific differences for nuclear receptor activation for environmental water extracts. *Water Res.* 185, 116247. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116247>
- Negi, C.K., Bajard, L., Kohoutek, J., Blaha, L., 2021. An adverse outcome pathway based in vitro characterization of novel flame retardants-induced hepatic steatosis. *Environ. Pollut.* 289, 117855. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117855>
- Nelson, J.E., Wilson, L., Brunt, E.M., Yeh, M.M., Kleiner, D.E., Unalp-Arida, A., Kowdley, K.V., 2011. Relationship between the pattern of hepatic iron deposition and histological severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 53, 448–457. <https://doi.org/10.1002/hep.24038>
- Nemeth, E., Baird, A.W., O’Farrelly, C., 2009. Microanatomy of the liver immune system. *Semin. Immunopathol.* 31, 333. <https://doi.org/10.1007/s00281-009-0173-4>
- Neuschäfer-Rube, F., Schraplau, A., Schewe, B., Lieske, S., Krützfeldt, J.-M., Ringel, S., Henkel, J., Birkenfeld, A.L., Püschel, G.P., 2015. Arylhydrocarbon receptor-dependent mIndy (Slc13a5) induction as possible contributor to benzo[a]pyrene-induced lipid accumulation in hepatocytes. *Toxicology* 337, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2015.08.007>
- Neuschwander-Tetri, B.A., 2010. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: The central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology* 52, 774–788. <https://doi.org/10.1002/hep.23719>
- Neuschwander-Tetri, B.A., Loomba, R., Sanyal, A.J., Lavine, J.E., Van Natta, M.L., Abdelmalek, M.F., Chalasani, N., Dasarathy, S., Diehl, A.M., Hameed, B., Kowdley, K.V., McCullough, A., Terrault, N., Clark, J.M., Tonascia, J., Brunt, E.M., Kleiner, D.E., Doo, E., 2015. Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 385, 956–965. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61933-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61933-4)

- Nguyen-Chi, M., Laplace-Builhe, B., Travnickova, J., Luz-Crawford, P., Tejedor, G., Phan, Q.T., Duroux-Richard, I., Levraud, J.-P., Kissa, K., Lutfalla, G., Jorgensen, C., Djouad, F., 2015. Identification of polarized macrophage subsets in zebrafish. *eLife* 4, e07288. <https://doi.org/10.7554/eLife.07288>
- Nicolopoulou-Stamati, P., Hens, L., Sasco, A.J., 2015. Cosmetics as endocrine disruptors: are they a health risk? *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 16, 373–383. <https://doi.org/10.1007/s11154-016-9329-4>
- Nishimura, M., Naito, S., Yokoi, T., 2004. Tissue-specific mRNA Expression Profiles of Human Nuclear Receptor Subfamilies. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 19, 135–149. <https://doi.org/10.2133/dmpk.19.135>
- Nishimura, Y., Murakami, S., Ashikawa, Y., Sasagawa, S., Umemoto, N., Shimada, Y., Tanaka, T., 2015. Zebrafish as a systems toxicology model for developmental neurotoxicity testing. *Congenit. Anom.* 55, 1–16. <https://doi.org/10.1111/cga.12079>
- Nishio, S.-I., Gibert, Y., Bernard, L., Brunet, F., Triqueneaux, G., Laudet, V., 2008. Adiponectin and adiponectin receptor genes are coexpressed during zebrafish embryogenesis and regulated by food deprivation. *Dev. Dyn.* 237, 1682–1690. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21559>
- Nojima, H., Freeman, C.M., Schuster, R.M., Japtok, L., Kleuser, B., Edwards, M.J., Gulbins, E., Lentsch, A.B., 2016. Hepatocyte exosomes mediate liver repair and regeneration via sphingosine-1-phosphate. *J. Hepatol.* 64, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.07.030>
- Noureddin, M., Sanyal, A.J., 2018. Pathogenesis of NASH: The Impact of Multiple Pathways. *Curr. Hepatol. Rep.* 17, 350–360. <https://doi.org/10.1007/s11901-018-0425-7>
- Nourissat, P., Travert, M., Chevanne, M., Tekpli, X., Rebillard, A., Moigne-Müller, G.L., Rissel, M., Cillard, J., Dimanche-Boitrel, M.-T., Lagadic-Gossmann, D., Sergent, O., 2008. Ethanol induces oxidative stress in primary rat hepatocytes through the early involvement of lipid raft clustering. *Hepatology* 47, 59–70. <https://doi.org/10.1002/hep.21958>
- Nowak, C., Jost, D., Vogt, C., Oetken, M., Schwenk, K., Oehlmann, J., 2007. Consequences of inbreeding and reduced genetic variation on tolerance to cadmium stress in the midge *Chironomus riparius*. *Aquat. Toxicol.* 85, 278–284. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.04.015>
- Nussbaum, J.M., Liu, L.J., Hasan, S.A., Schaub, M., McClendon, A., Stainier, D.Y.R., Sakaguchi, T.F., 2013. Homeostatic generation of reactive oxygen species protects the zebrafish liver from steatosis. *Hepatol. Baltim. Md* 58, 1326–1338. <https://doi.org/10.1002/hep.26551>

O

- OECD Test No. 210, 2013. Test No. 210: Fish, Early-Life Stage Toxicity Test. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD Test No. 212, 1998. Test No. 212: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD Test No. 229, 2012. OECD- Test No. 229: Fish Short Term Reproduction Assay [WWW Document]. URL <https://www-oecd-org.passerelle.univ-rennes1.fr/env/test-no-229-fish-short-term-reproduction-assay-9789264185265-en.htm> (accessed 11.28.22).
- OECD Test No. 234, 2011. Test No. 234: Fish Sexual Development Test. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD Test No. 236, 2013. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test [WWW Document]. [Oecd-ilibrary.org. URL https://read.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-236-fish-embryo-acute-toxicity-fet-test_9789264203709-en](https://read.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-236-fish-embryo-acute-toxicity-fet-test_9789264203709-en) (accessed 10.11.22).

- OECD Test No. 250, 2021. Test No. 250: EASZY assay - Detection of Endocrine Active Substances, acting through estrogen receptors, using transgenic tg(cyp19a1b:GFP) Zebrafish embryos. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- Ogawa, Y., Imajo, K., Honda, Y., Kessoku, T., Tomeno, W., Kato, S., Fujita, K., Yoneda, M., Saito, S., Saigusa, Y., Hyogo, H., Sumida, Y., Itoh, Y., Eguchi, K., Yamanaka, T., Wada, K., Nakajima, A., 2018. Palmitate-induced lipotoxicity is crucial for the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease in cooperation with gut-derived endotoxin. *Sci. Rep.* 8, 11365. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29735-6>
- Oka, T., Nishimura, Y., Zang, L., Hirano, M., Shimada, Y., Wang, Z., Umemoto, N., Kuroyanagi, J., Nishimura, N., Tanaka, T., 2010. Diet-induced obesity in zebrafish shares common pathophysiological pathways with mammalian obesity. *BMC Physiol.* 10, 21. <https://doi.org/10.1186/1472-6793-10-21>
- Oladimeji, P.O., Chen, T., 2018. PXR: More Than Just a Master Xenobiotic Receptor. *Mol. Pharmacol.* 93, 119–127. <https://doi.org/10.1124/mol.117.110155>
- Olsvik, P.A., Sjøfteland, L., 2018. Metabolic effects of p,p'-DDE on Atlantic salmon hepatocytes. *J. Appl. Toxicol.* 38, 489–503. <https://doi.org/10.1002/jat.3556>
- Ong, J.P., Elariny, H., Collantes, R., Younoszai, A., Chandhoke, V., Reines, H.D., Goodman, Z., Younossi, Z.M., 2005. Predictors of Nonalcoholic Steatohepatitis and Advanced Fibrosis in Morbidly Obese Patients. *Obes. Surg.* 15, 310–315. <https://doi.org/10.1381/0960892053576820>
- Oosterveer, M.H., Grefhorst, A., Groen, A.K., Kuipers, F., 2010. The liver X receptor: Control of cellular lipid homeostasis and beyond: Implications for drug design. *Prog. Lipid Res.* 49, 343–352. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2010.03.002>
- Ore, A., Akinloye, O.A., 2019. Oxidative Stress and Antioxidant Biomarkers in Clinical and Experimental Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Medicina (Mex.)* 55, 26. <https://doi.org/10.3390/medicina55020026>
- Oshida, K., Vasani, N., Thomas, R.S., Applegate, D., Gonzalez, F.J., Aleksunes, L.M., Klaassen, C.D., Corton, J.C., 2015. Screening a mouse liver gene expression compendium identifies modulators of the aryl hydrocarbon receptor (AhR). *Toxicology* 336, 99–112. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2015.07.005>
- Ota, T., Gayet, C., Ginsberg, H.N., 2008. Inhibition of apolipoprotein B100 secretion by lipid-induced hepatic endoplasmic reticulum stress in rodents. *J. Clin. Invest.* 118, 316–332. <https://doi.org/10.1172/JCI32752>
- Ouah-Boussouf, N., Babin, P.J., 2016. Pharmacological evaluation of the mechanisms involved in increased adiposity in zebrafish triggered by the environmental contaminant tributyltin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 294, 32–42. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.01.014>

P

- Padovani, B.N., Abrantes do Amaral, M., Fénero, C.M., Paredes, L.C., Boturra de Barros, G.J., Xavier, I.K., Hiyane, M.I., Ghirrotto, B., Feijóo, C.G., Saraiva Câmara, N.O., Takiishi, T., 2022. Different wild type strains of zebrafish show divergent susceptibility to TNBS-induced intestinal inflammation displaying distinct immune cell profiles. *Curr. Res. Immunol.* 3, 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.crimmu.2021.12.003>
- Pagadala, M., Kasumov, T., McCullough, A.J., Zein, N.N., Kirwan, J.P., 2012. Role of Ceramides in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 23, 365–371. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.04.005>
- Pagano, C., Rossato, M., Vettor, R., 2008. Endocannabinoids, Adipose Tissue and Lipid Metabolism. *J. Neuroendocrinol.* 20, 124–129. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01690.x>

- Pai, W.-Y., Hsu, C.-C., Lai, C.-Y., Chang, T.-Z., Tsai, Y.-L., Her, G.M., 2013. Cannabinoid receptor 1 promotes hepatic lipid accumulation and lipotoxicity through the induction of SREBP-1c expression in zebrafish. *Transgenic Res.* 22, 823–838. <https://doi.org/10.1007/s11248-012-9685-0>
- Pal, D., Dasgupta, S., Kundu, R., Maitra, S., Das, G., Mukhopadhyay, S., Ray, S., Majumdar, S.S., Bhattacharya, S., 2012. Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. *Nat. Med.* 18, 1279–1285. <https://doi.org/10.1038/nm.2851>
- Palmisano, B.T., Zhu, L., Stafford, J.M., 2017. Estrogens in the Regulation of Liver Lipid Metabolism. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1043, 227–256. https://doi.org/10.1007/978-3-319-70178-3_12
- Pan, Y.-X., Luo, Z., Zhuo, M.-Q., Wei, C.-C., Chen, G.-H., Song, Y.-F., 2018. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction mediated Cd-induced hepatic lipid accumulation in zebrafish *Danio rerio*. *Aquat. Toxicol.* 199, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.03.017>
- Panchal, S.K., Brown, L., 2011. Rodent Models for Metabolic Syndrome Research. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 351982. <https://doi.org/10.1155/2011/351982>
- Pannevis, M.C., Earle, K.E., 1994. Maintenance Energy Requirement of Five Popular Species of Ornamental Fish. *J. Nutr.* 124, 2616S-2618S. https://doi.org/10.1093/jn/124.suppl_12.2616S
- Pannia, E., Tran, S., Rampersad, M., Gerlai, R., 2014. Acute ethanol exposure induces behavioural differences in two zebrafish (*Danio rerio*) strains: A time course analysis. *Behav. Brain Res.* 259, 174–185. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.11.006>
- Papatheodoridi, M., Cholongitas, E., 2018. Diagnosis of Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD): Current Concepts. *Curr. Pharm. Des.* 24, 4574–4586.
- Pardina, E., Baena-Fustegueras, J.A., Llamas, R., Catalán, R., Galard, R., Lecube, A., Fort, J.M., Llobera, M., Allende, H., Vargas, V., Peinado-Onsurbe, J., 2009. Lipoprotein Lipase Expression in Livers of Morbidly Obese Patients Could be Responsible for Liver Steatosis. *Obes. Surg.* 19, 608–616. <https://doi.org/10.1007/s11695-009-9827-5>
- Pardo, V., González-Rodríguez, Á., Muntané, J., Kozma, S.C., Valverde, Á.M., 2015. Role of hepatocyte S6K1 in palmitic acid-induced endoplasmic reticulum stress, lipotoxicity, insulin resistance and in oleic acid-induced protection. *Food Chem. Toxicol.* 80, 298–309. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.03.029>
- Paredes, A.D., Benavidez, D., Cheng, J., Mangos, S., Donoghue, M., Bartholomew, A., 2018. An automated quantitative image analysis pipeline of in vivo oxidative stress and macrophage kinetics. *J. Biol. Methods* 5, e101. <https://doi.org/10.14440/jbm.2018.259>
- Park, C.G., Sung, B., Ryu, C.S., Kim, Y.J., 2020. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate induces oxidative stress and lipid accumulation in zebrafish liver cells. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 230, 108704. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108704>
- Park, E., Kim, J., Kim, B., Park, E.Y., 2021. Association between environmental exposure to cadmium and risk of suspected non-alcoholic fatty liver disease. *Chemosphere* 266, 128947. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128947>
- Park, K.-H., Ye, Z., Zhang, J., Hammad, S.M., Townsend, D.M., Rockey, D.C., Kim, S.-H., 2019a. 3-ketodihydrospingosine reductase mutation induces steatosis and hepatic injury in zebrafish. *Sci. Rep.* 9, 1138. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37946-0>
- Park, K.-H., Ye, Z.-W., Zhang, J., Kim, S.-H., 2019b. Palmitic Acid-Enriched Diet Induces Hepatic Steatosis and Injury in Adult Zebrafish. *Zebrafish* 16, 497–504. <https://doi.org/10.1089/zeb.2019.1758>

- Parker, R., 2018. The role of adipose tissue in fatty liver diseases. *Liver Res., Fatty Liver Diseases* 2, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.livres.2018.02.002>
- Parsons, M.J., Pisharath, H., Yusuff, S., Moore, J.C., Siekmann, A.F., Lawson, N., Leach, S.D., 2009. Notch-responsive cells initiate the secondary transition in larval zebrafish pancreas. *Mech. Dev.* 126, 898–912. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2009.07.002>
- Parthasarathy, G., Revelo, X., Malhi, H., 2020. Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis: An Overview. *Hepatol. Commun.* 4, 478–492. <https://doi.org/10.1002/hep4.1479>
- Passeri, M.J., Cinaroglu, A., Gao, C., Sadler, K.C., 2009. Hepatic steatosis in response to acute alcohol exposure in zebrafish requires sterol regulatory element binding protein activation. *Hepatology* 49, 443–452. <https://doi.org/10.1002/hep.22667>
- Patel, J., Bettencourt, R., Cui, J., Salotti, J., Hooker, J., Bhatt, A., Hernandez, C., Nguyen, P., Aryafar, H., Valasek, M., Haufe, W., Hooker, C., Richards, L., Sirlin, C.B., Loomba, R., 2016. Association of noninvasive quantitative decline in liver fat content on MRI with histologic response in nonalcoholic steatohepatitis. *Ther. Adv. Gastroenterol.* 9, 692–701. <https://doi.org/10.1177/1756283X16656735>
- Pavanello, S., Bonzini, M., Angelici, L., Motta, V., Pergoli, L., Hoxha, M., Cantone, L., Cecilia, P.A., Pietro, A., Armando, T., Andrea, B., Bollati, V., 2016. Extracellular vesicle-driven information mediates the long-term effects of particulate matter exposure on coagulation and inflammation pathways. *Toxicol. Lett.* 259, 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.08.002>
- Pawlak, M., Lefebvre, P., Staels, B., 2015. Molecular mechanism of PPAR α action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* 62, 720–733. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.10.039>
- Perazzo, H., Dufour, J.-F., 2017. The therapeutic landscape of non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int.* 37, 634–647. <https://doi.org/10.1111/liv.13270>
- Perla, F.M., Prelati, M., Lavorato, M., Visicchio, D., Anania, C., 2017. The Role of Lipid and Lipoprotein Metabolism in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Children* 4, 46. <https://doi.org/10.3390/children4060046>
- Perugini, M., Merola, C., Amorena, M., D'Angelo, M., Cimini, A., Benedetti, E., 2020. Sublethal exposure to propylparaben leads to lipid metabolism impairment in zebrafish early-life stages. *J. Appl. Toxicol.* 40, 493–503. <https://doi.org/10.1002/jat.3921>
- Perumpail, B.J., Khan, M.A., Yoo, E.R., Cholankeril, G., Kim, D., Ahmed, A., 2017. Clinical epidemiology and disease burden of nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* 23, 8263–8276. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i47.8263>
- Pestana, D., Teixeira, D., Meireles, M., Marques, C., Norberto, S., Sá, C., Fernandes, V.C., Correia-Sá, L., Faria, A., Guardão, L., Guimarães, J.T., Cooper, W.N., Sandovici, I., Domingues, V.F., Delerue-Matos, C., Monteiro, R., Constância, M., Calhau, C., 2017. Adipose tissue dysfunction as a central mechanism leading to dysmetabolic obesity triggered by chronic exposure to p,p'-DDE. *Sci. Rep.* 7, 2738. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02885-9>
- Petriello, M.C., Hoffman, J., Vsevolozhskaya, O., Morris, A.J., Hennig, B., 2018. Dioxin-like PCB 126 increases intestinal inflammation and disrupts gut microbiota and metabolic homeostasis. *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987 242, 1022–1032. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.039>
- Peverill, W., Powell, L.W., Skoien, R., 2014. Evolving Concepts in the Pathogenesis of NASH: Beyond Steatosis and Inflammation. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 8591–8638. <https://doi.org/10.3390/ijms15058591>

- Pham, D.-H., Zhang, C., Yin, C., 2017. Using Zebrafish to Model Liver Diseases-Where Do We Stand? *Curr. Pathobiol. Rep.* 5, 207–221. <https://doi.org/10.1007/s40139-017-0141-y>
- Pham, L.N., Kanther, M., Semova, I., Rawls, J.F., 2008. Methods for generating and colonizing gnotobiotic zebrafish. *Nat. Protoc.* 3, 1862–1875. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.186>
- Piazzolla, V.A., Mangia, A., 2020. Noninvasive Diagnosis of NAFLD and NASH. *Cells* 9, 1005. <https://doi.org/10.3390/cells9041005>
- Pierantonelli, I., Svegliati-Baroni, G., 2019. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Basic Pathogenetic Mechanisms in the Progression From NAFLD to NASH. *Transplantation* 103, e1. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000002480>
- Pilarczyk, M., Mateuszuk, L., Rygula, A., Kepczynski, M., Chlopicki, S., Baranska, M., Kaczor, A., 2014. Endothelium in spots—high-content imaging of lipid rafts clusters in db/db mice. *PLoS One* 9, e106065. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106065>
- Pineda Torra, I., Claudel, T., Duval, C., Kosykh, V., Fruchart, J.-C., Staels, B., 2003. Bile Acids Induce the Expression of the Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Gene via Activation of the Farnesoid X Receptor. *Mol. Endocrinol.* 17, 259–272. <https://doi.org/10.1210/me.2002-0120>
- Pinyopornpanish, Kanokwan, Khoudari, G., Saleh, M.A., Angkurawaranon, C., Pinyopornpanish, Kanokporn, Mansoor, E., Dasarathy, S., McCullough, A., 2021. Hepatocellular carcinoma in nonalcoholic fatty liver disease with or without cirrhosis: a population-based study. *BMC Gastroenterol.* 21, 394. <https://doi.org/10.1186/s12876-021-01978-0>
- Pirola, C.J., Gianotti, T.F., Burgueño, A.L., Rey-Funes, M., Loidl, C.F., Mallardi, P., Martino, J.S., Castaño, G.O., Sookoian, S., 2013. Epigenetic modification of liver mitochondrial DNA is associated with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Gut* 62, 1356–1363. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302962>
- Pirola, C.J., Gianotti, T.F., Castaño, G.O., Mallardi, P., Martino, J.S., Ledesma, M.M.G.L., Flichman, D., Mirshahi, F., Sanyal, A.J., Sookoian, S., 2015. Circulating microRNA signature in non-alcoholic fatty liver disease: from serum non-coding RNAs to liver histology and disease pathogenesis. *Gut* 64, 800–812. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-306996>
- Podechard, N., Chevanne, M., Fernier, M., Tête, A., Collin, A., Cassio, D., Kah, O., Lagadic-Gossmann, D., Sergent, O., 2017. Zebrafish larva as a reliable model for in vivo assessment of membrane remodeling involvement in the hepatotoxicity of chemical agents. *J. Appl. Toxicol.* 37, 732–746. <https://doi.org/10.1002/jat.3421>
- Podechard, N., Lecureur, V., Le Ferrec, E., Guenon, I., Sparfel, L., Gilot, D., Gordon, J.R., Lagente, V., Fardel, O., 2008. Interleukin-8 induction by the environmental contaminant benzo(a)pyrene is aryl hydrocarbon receptor-dependent and leads to lung inflammation. *Toxicol. Lett.* 177, 130–137. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.01.006>
- Podrini, C., Borghesan, M., Greco, A., Paziienza, V., Mazzoccoli, G., Vinciguerra, M., 2013. Redox Homeostasis and Epigenetics in Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Curr. Pharm. Des.* 19, 2737–2746.
- Polyzos, S.A., Kountouras, J., Deretzi, G., Zavos, C., Mantzoros, C.S., 2012. The emerging role of endocrine disruptors in pathogenesis of insulin resistance: a concept implicating nonalcoholic fatty liver disease. *Curr. Mol. Med.* 12, 68–82. <https://doi.org/10.2174/156652412798376161>
- Polyzos, S.A., Kountouras, J., Mantzoros, C.S., 2019. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. *Metabolism, Obesity: the 21st century epidemic* 92, 82–97. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.11.014>

- Polyzos, S.A., Mantzoros, C.S., 2016. Nonalcoholic fatty future disease. *Metabolism, Nonalcoholic Fatty Liver Disease: From Epidemiology to Emerging Treatment(s)* 65, 1007–1016. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.12.009>
- Poon, K.L., Wang, X., Lee, S.G.P., Ng, A.S., Goh, W.H., Zhao, Z., Al-Haddawi, M., Wang, H., Mathavan, S., Ingham, P.W., McGinnis, C., Carney, T.J., 2017. Editor's Highlight: Transgenic Zebrafish Reporter Lines as Alternative In Vivo Organ Toxicity Models. *Toxicol. Sci.* 156, 133–148. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw250>
- Porras, D., Nistal, E., Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., García-Mediavilla, M.V., Sánchez-Campos, S., 2018. Intestinal Microbiota Modulation in Obesity-Related Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Front. Physiol.* 9, 1813. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01813>
- Postic, C., Girard, J., 2008. The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis. *Diabetes Metab., Liver and diabetes* 34, 643–648. [https://doi.org/10.1016/S1262-3636\(08\)74599-3](https://doi.org/10.1016/S1262-3636(08)74599-3)
- Postlethwait, J.H., Yan, Y.-L., Gates, M.A., Horne, S., Amores, A., Brownlie, A., Donovan, A., Egan, E.S., Force, A., Gong, Z., Goutel, C., Fritz, A., Kelsh, R., Knapik, E., Liao, E., Paw, B., Ransom, D., Singer, A., Thomson, M., Abduljabbar, T.S., Yelick, P., Beier, D., Joly, J.-S., Larhammar, D., Rosa, F., Westerfield, M., Zon, L.I., Johnson, S.L., Talbot, W.S., 1998. Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map. *Nat. Genet.* 18, 345–349. <https://doi.org/10.1038/ng0498-345>
- Potthoff, M.J., Inagaki, T., Satapati, S., Ding, X., He, T., Goetz, R., Mohammadi, M., Finck, B.N., Mangelsdorf, D.J., Kliewer, S.A., Burgess, S.C., 2009. FGF21 induces PGC-1 α and regulates carbohydrate and fatty acid metabolism during the adaptive starvation response. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 10853–10858. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904187106>
- Powell, E.E., Wong, V.W.-S., Rinella, M., 2021. Non-alcoholic fatty liver disease. *The Lancet* 397, 2212–2224. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32511-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32511-3)
- Preda, C., Ungureanu, M.C., Vulpoi, C., 2012. ENDOCRINE DISRUPTORS IN THE ENVIRONMENT AND THEIR IMPACT ON HUMAN HEALTH. *Environ. Eng. Manag. J.* 11, 1697–1706. <https://doi.org/10.30638/eemj.2012.210>
- Puengel, T., Liu, H., Guillot, A., Heymann, F., Tacke, F., Peiseler, M., 2022. Nuclear Receptors Linking Metabolism, Inflammation, and Fibrosis in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 2668. <https://doi.org/10.3390/ijms23052668>
- Puri, P., Baillie, R.A., Wiest, M.M., Mirshahi, F., Choudhury, J., Cheung, O., Sargeant, C., Contos, M.J., Sanyal, A.J., 2007. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 46, 1081–1090. <https://doi.org/10.1002/hep.21763>
- Puri, P., Mirshahi, F., Cheung, O., Natarajan, R., Maher, J.W., Kellum, J.M., Sanyal, A.J., 2008. Activation and Dysregulation of the Unfolded Protein Response in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 134, 568–576. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.10.039>

Q

- Qi, J., Kim, J.-W., Zhou, Z., Lim, C.-W., Kim, B., 2020. Ferroptosis Affects the Progression of Nonalcoholic Steatohepatitis via the Modulation of Lipid Peroxidation–Mediated Cell Death in Mice. *Am. J. Pathol.* 190, 68–81. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2019.09.011>
- Qi, W., Clark, J.M., Timme-Laragy, A.R., Park, Y., 2020. Per- and Polyfluoroalkyl Substances and Obesity, Type 2 Diabetes and Non-alcoholic Fatty Liver Disease: A Review of Epidemiologic Findings. *Toxicol. Environ. Chem.* 102, 1–36. <https://doi.org/10.1080/02772248.2020.1763997>

- Qin, J., Ru, S., Wang, W., Hao, L., Ru, Y., Wang, J., Zhang, X., 2020. Long-term bisphenol S exposure aggravates non-alcoholic fatty liver by regulating lipid metabolism and inducing endoplasmic reticulum stress response with activation of unfolded protein response in male zebrafish. *Environ. Pollut.* 263, 114535. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114535>
- Qin, T., Zhang, X., Guo, T., Yang, T., Gao, Y., Hao, W., Xiao, X., 2021. Epigenetic Alteration Shaped by the Environmental Chemical Bisphenol A. *Front. Genet.* 11, 618966. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.618966>
- Qin, X., Xie, X., Fan, Y., Tian, J., Guan, Y., Wang, X., Zhu, Y., Wang, N., 2008. Peroxisome proliferator-activated receptor- δ induces insulin-induced gene-1 and suppresses hepatic lipogenesis in obese diabetic mice. *Hepatology* 48, 432–441. <https://doi.org/10.1002/hep.22334>
- Qiu, W., Liu, S., Yang, F., Dong, P., Yang, M., Wong, M., Zheng, C., 2019. Metabolism disruption analysis of zebrafish larvae in response to BPA and BPA analogs based on RNA-Seq technique. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 174, 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.126>
- Qiu, Y., Liu, S., Chen, H.-T., Yu, C.-H., Teng, X.-D., Yao, H.-T., Xu, G.-Q., 2013. Upregulation of caveolin-1 and SR-B1 in mice with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* 12, 630–636. [https://doi.org/10.1016/S1499-3872\(13\)60099-5](https://doi.org/10.1016/S1499-3872(13)60099-5)
- Quinlivan, V.H., Farber, S.A., 2017. Lipid Uptake, Metabolism, and Transport in the Larval Zebrafish. *Front. Endocrinol.* 8, 319. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00319>
- Quist, E.M., Filgo, A.J., Cummings, C.A., Kissling, G.E., Hoenerhoff, M.J., Fenton, S.E., 2015. Hepatic Mitochondrial Alteration in CD-1 Mice Associated with Prenatal Exposures to Low Doses of Perfluorooctanoic Acid (PFOA). *Toxicol. Pathol.* 43, 546–557. <https://doi.org/10.1177/0192623314551841>
- Qureshi, K., Abrams, G.A., 2007. Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol. WJG* 13, 3540–3553. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i26.3540>

R

- Rabot, S., Membrez, M., Bruneau, A., Gérard, P., Harach, T., Moser, M., Raymond, F., Mansourian, R., Chou, C.J., 2010. Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 24, 4948–4959. <https://doi.org/10.1096/fj.10-164921>
- Rada, P., González-Rodríguez, Á., García-Monzón, C., Valverde, Á.M., 2020. Understanding lipotoxicity in NAFLD pathogenesis: is CD36 a key driver? *Cell Death Dis.* 11, 802. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03003-w>
- Rahman, K., Desai, C., Iyer, S.S., Thorn, N.E., Kumar, P., Liu, Y., Smith, T., Neish, A.S., Li, H., Tan, S., Wu, P., Liu, X., Yu, Y., Farris, A.B., Nusrat, A., Parkos, C.A., Anania, F.A., 2016. Loss of Junctional Adhesion Molecule A Promotes Severe Steatohepatitis in Mice on a Diet High in Saturated Fat, Fructose, and Cholesterol. *Gastroenterology* 151, 733-746.e12. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.06.022>
- Raichur, S., Wang, S.T., Chan, P.W., Li, Y., Ching, J., Chaurasia, B., Dogra, S., Öhman, M.K., Takeda, K., Sugii, S., Pewzner-Jung, Y., Futerman, A.H., Summers, S.A., 2014. CerS2 Haploinsufficiency Inhibits β -Oxidation and Confers Susceptibility to Diet-Induced Steatohepatitis and Insulin Resistance. *Cell Metab.* 20, 687–695. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.09.015>
- Rajesh, P., Balasubramanian, K., 2014. Di(2-ethylhexyl)phthalate exposure impairs insulin receptor and glucose transporter 4 gene expression in L6 myotubes. *Hum. Exp. Toxicol.* 33, 685–700. <https://doi.org/10.1177/0960327113506238>

- Rantakokko, P., Männistö, V., Airaksinen, R., Koponen, J., Viluksela, M., Kiviranta, H., Pihlajamäki, J., 2015. Persistent organic pollutants and non-alcoholic fatty liver disease in morbidly obese patients: a cohort study. *Environ. Health* 14. <https://doi.org/10.1186/s12940-015-0066-z>
- Ratzl, V., de Guevara, L., Safadi, R., Poordad, F., Fuster, F., Flores-Figueroa, J., Arrese, M., Fracanzani, A.L., Ben Bashat, D., Lackner, K., Gorfine, T., Kadosh, S., Oren, R., Halperin, M., Hayardeny, L., Loomba, R., Friedman, S., Sanyal, A.J., 2021. Aramchol in patients with nonalcoholic steatohepatitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2b trial. *Nat. Med.* 27, 1825–1835. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01495-3>
- Rebillard, A., Tekpli, X., Meurette, O., Sergent, O., LeMoigne-Muller, G., Vernhet, L., Gorria, M., Chevanne, M., Christmann, M., Kaina, B., Counillon, L., Gulbins, E., Lagadic-Gossman, D., Dimanche-Boitrel, M.-T., 2007. Cisplatin-Induced Apoptosis Involves Membrane Fluidification via Inhibition of NHE1 in Human Colon Cancer Cells. *Cancer Res.* 67, 7865–7874. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0353>
- Régnier, M., Polizzi, A., Guillou, H., Loiseau, N., 2019. Sphingolipid metabolism in non-alcoholic fatty liver diseases. *Biochimie, Fatty acids and lipopolysaccharides from health to disease* 159, 9–22. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.07.021>
- Reinehr, R., Sommerfeld, A., Keitel, V., Grether-Beck, S., Häussinger, D., 2008. Amplification of CD95 Activation by Caspase 8-induced Endosomal Acidification in Rat Hepatocytes*. *J. Biol. Chem.* 283, 2211–2222. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706853200>
- Renaud, L., Silveira, W.A. da, Hazard, E.S., Simpson, J., Falcinelli, S., Chung, D., Carnevali, O., Hardiman, G., 2017. The Plasticizer Bisphenol A Perturbs the Hepatic Epigenome: A Systems Level Analysis of the miRNome. *Genes* 8, 269. <https://doi.org/10.3390/genes8100269>
- Rendic, S., Guengerich, F.P., 2015. Survey of Human Oxidoreductases and Cytochrome P450 Enzymes Involved in the Metabolism of Xenobiotic and Natural Chemicals. *Chem. Res. Toxicol.* 28, 38–42. <https://doi.org/10.1021/tx500444e>
- Rensen, S.S., Slaats, Y., Nijhuis, J., Jans, A., Bieghs, V., Driessen, A., Malle, E., Greve, J.W., Buurman, W.A., 2009. Increased Hepatic Myeloperoxidase Activity in Obese Subjects with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Am. J. Pathol.* 175, 1473–1482. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080999>
- Rhee, J.-S., Kim, B.-M., Lee, B.-Y., Hwang, U.-K., Lee, Y.S., Lee, J.-S., 2014. Cloning of circadian rhythmic pathway genes and perturbation of oscillation patterns in endocrine disrupting chemicals (EDCs)-exposed mangrove killifish *Kryptolebias marmoratus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 164, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.04.001>
- Rijk, I., van Duursen, M., van den BM, 2016. Health Cost that May be Associated with Endocrine Disrupting Chemicals, Utrecht: Universiteit Utrecht, Institute for Risk Assessment Sciences [WWW Document]. URL https://www.uu.nl/sites/default/files/rijk_et_al_2016_-_report_iras_-_health_cost_associated_with_edcs_3.pdf (accessed 11.24.22).
- Riu, A., Grimaldi, M., le Maire, A., Bey, G., Phillips, K., Boulahtouf, A., Perdu, E., Zalko, D., Bourguet, W., Balaguer, P., 2011. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Is a Target for Halogenated Analogs of Bisphenol A. *Environ. Health Perspect.* 119, 1227–1232. <https://doi.org/10.1289/ehp.1003328>
- Rivera, C.A., Adegboyega, P., van Rooijen, N., Tagalicud, A., Allman, M., Wallace, M., 2007. Toll-like receptor-4 signaling and Kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *J. Hepatol.* 47, 571–579. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.04.019>
- Rodosthenous, R.S., Baccarelli, A.A., Mansour, A., Adir, M., Israel, A., Racowsky, C., Hauser, R., Bollati, V., Machtinger, R., 2019. Supraphysiological Concentrations of Bisphenol A Alter the Expression of

Extracellular Vesicle-Enriched miRNAs From Human Primary Granulosa Cells. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 169, 5–13. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz020>

Rodríguez-Alcalá, L.M., Sá, C., Pimentel, L.L., Pestana, D., Teixeira, D., Faria, A., Calhau, C., Gomes, A., 2015. Endocrine Disruptor DDE Associated with a High-Fat Diet Enhances the Impairment of Liver Fatty Acid Composition in Rats. *J. Agric. Food Chem.* 63, 9341–9348. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03274>

Roeselers, G., Mittge, E.K., Stephens, W.Z., Parichy, D.M., Cavanaugh, C.M., Guillemin, K., Rawls, J.F., 2011. Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish. *ISME J.* 5, 1595–1608. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.38>

Roh, Y.-S., Seki, E., 2013. Toll-Like Receptors in Alcoholic Liver Disease, Non-Alcoholic Steatohepatitis and Carcinogenesis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 28, 38–42. <https://doi.org/10.1111/jgh.12019>

Roh, Y.S., Zhang, B., Loomba, R., Seki, E., 2015. TLR2 and TLR9 contribute to alcohol-mediated liver injury through induction of CXCL1 and neutrophil infiltration. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 309, G30–G41. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00031.2015>

Romeo, S., Kozlitina, J., Xing, C., Pertsemlidis, A., Cox, D., Pennacchio, L.A., Boerwinkle, E., Cohen, J.C., Hobbs, H.H., 2008. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Genet.* 40, 1461–1465. <https://doi.org/10.1038/ng.257>

Rong, X., Albert, C.J., Hong, C., Duerr, M.A., Chamberlain, B.T., Tarling, E.J., Ito, A., Gao, J., Wang, B., Edwards, P.A., Jung, M.E., Ford, D.A., Tontonoz, P., 2013. LXRs regulate ER stress and inflammation through dynamic modulation of membrane phospholipid composition. *Cell Metab.* 18, 685–697. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.10.002>

Roth, A., Looser, R., Kaufmann, M., Blättler, S.M., Rencurel, F., Huang, W., Moore, D.D., Meyer, U.A., 2008. Regulatory Cross-Talk between Drug Metabolism and Lipid Homeostasis: Constitutive Androstane Receptor and Pregnane X Receptor Increase Insig-1 Expression. *Mol. Pharmacol.* 73, 1282–1289. <https://doi.org/10.1124/mol.107.041012>

Roumans, K.H.M., Lindeboom, L., Veeraiyah, P., Remie, C.M.E., Phielix, E., Havekes, B., Bruls, Y.M.H., Brouwers, M.C.G.J., Ståhlman, M., Alsema, M., Peters, H.P.F., de Mutsert, R., Staels, B., Taskinen, M.-R., Borén, J., Schrauwen, P., Schrauwen-Hinderling, V.B., 2020. Hepatic saturated fatty acid fraction is associated with de novo lipogenesis and hepatic insulin resistance. *Nat. Commun.* 11, 1891. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15684-0>

Rui, L., 2014. Energy Metabolism in the Liver. *Compr. Physiol.* 4, 177–197. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130024>

Rutkowski, D.T., Wu, J., Back, S.-H., Callaghan, M.U., Ferris, S.P., Iqbal, J., Clark, R., Miao, H., Fornek, J., Katze, M.G., Hussain, M.M., Song, B., Swathirajan, J., Wang, J., Yau, G.D.-Y., Kaufman, R.J., 2008. UPR pathways combine to prevent hepatic steatosis caused by ER stress-mediated suppression of transcriptional master regulators. *Dev. Cell* 15, 829–840. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.10.015>

S

Saad, M., Cavanaugh, K., Verbueken, E., Pype, C., Casteleyn, C., Ginneken, C.V., Cruchten, S.V., 2016. Xenobiotic metabolism in the zebrafish: a review of the spatiotemporal distribution, modulation and activity of Cytochrome P450 families 1 to 3. *J. Toxicol. Sci.* 41, 1–11. <https://doi.org/10.2131/jts.41.1>

Sadler, K.C., Amsterdam, A., Soroka, C., Boyer, J., Hopkins, N., 2005. A genetic screen in zebrafish identifies the mutants *vps18*, *nf2* and *foie gras* as models of liver disease. *Development* 132, 3561–3572. <https://doi.org/10.1242/dev.01918>

- Sadler, K.C., Krahn, K.N., Gaur, N.A., Ukomadu, C., 2007. Liver growth in the embryo and during liver regeneration in zebrafish requires the cell cycle regulator, *uhrf1*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 1570–1575. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610774104>
- Safadi, R., Konikoff, F.M., Mahamid, M., Zelber-Sagi, S., Halpern, M., Gilat, T., Oren, R., Safadi, R., Konikoff, F.M., Hershkovitz, A., Gilat, T., Halpern, M., Rosenthal-Galili, Z., Zuckerman, E., Abu-Mouch, S., Fich, A., Sikuler, E., Issachar, A., Assy, N., Baruch, Y., Lurie, Y., Graif, M., Stern, N., Yaron, M., Blank, A., Ben Bashat, D., Zelber-Sagi, S., Mahamid, M., Mizrahi, M., Oren, R., 2014. The Fatty Acid–Bile Acid Conjugate Aramchol Reduces Liver Fat Content in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 12, 2085–2091.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2014.04.038>
- Sakaguchi, T.F., Sadler, K.C., Crosnier, C., Stainier, D.Y.R., 2008. Endothelial Signals Modulate Hepatocyte Apicobasal Polarization in Zebrafish. *Curr. Biol. CB* 18, 1565–1571. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.08.065>
- Salmerón, C., 2018. Adipogenesis in fish. *J. Exp. Biol.* 221, jeb161588. <https://doi.org/10.1242/jeb.161588>
- Salmi, T.M., Tan, V.W.T., Cox, A.G., 2019. Dissecting metabolism using zebrafish models of disease. *Biochem. Soc. Trans.* 47, 305–315. <https://doi.org/10.1042/BST20180335>
- Saltzman, E.T., Palacios, T., Thomsen, M., Vitetta, L., 2018. Intestinal Microbiome Shifts, Dysbiosis, Inflammation, and Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Front. Microbiol.* 9, 61. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00061>
- Sanders, F.W.B., Griffin, J.L., 2016. De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 91, 452–468. <https://doi.org/10.1111/brv.12178>
- Sang, H., Lee, K.-N., Jung, C.H., Han, K., Koh, E.H., 2022. Association between organochlorine pesticides and nonalcoholic fatty liver disease in the National Health and Nutrition Examination Survey 2003–2004. *Sci. Rep.* 12, 11590. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15741-2>
- Sant, K.E., Annunziato, K., Conlin, S., Teicher, G., Chen, P., Venezia, O., Downes, G.B., Park, Y., Timme-Laragy, A.R., 2021a. Development exposures to perfluorooctanesulfonic acid (PFOS) impact embryonic nutrition, pancreatic morphology, and adiposity in the zebrafish, *Danio rerio*. *Environ. Pollut. Barking Essex 1987* 275, 116644. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116644>
- Sant, K.E., Jacobs, H.M., Borofski, K.A., Moss, J.B., Timme-Laragy, A.R., 2017. Embryonic exposures to perfluorooctanesulfonic acid (PFOS) disrupt pancreatic organogenesis in the zebrafish, *Danio rerio*. *Environ. Pollut. Barking Essex 1987* 220, 807–817. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.057>
- Sant, K.E., Moreau, H.M., Williams, L.M., Jacobs, H.M., Bowsher, A.M., Boisvert, J.D., Smolowitz, R.M., Pantazis, J., Annunziato, K., Nguyen, M., Timme-Laragy, A., 2021b. Embryonic exposures to mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP) induce larval steatosis in zebrafish independent of Nrf2a signaling. *J. Dev. Orig. Health Dis.* 12, 132–140. <https://doi.org/10.1017/S2040174420000057>
- Santangeli, S., Notarstefano, V., Maradonna, F., Giorgini, E., Gioacchini, G., Forner-Piquer, I., Habibi, H.R., Carnevali, O., 2018. Effects of diethylene glycol dibenzoate and Bisphenol A on the lipid metabolism of *Danio rerio*. *Sci. Total Environ.* 636, 641–655. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.291>
- Santos, D., Luzio, A., Coimbra, A.M., 2017. Zebrafish sex differentiation and gonad development: A review on the impact of environmental factors. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 191, 141–163. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.08.005>
- Sanyal, A.J., Chalasani, N., Kowdley, K.V., McCullough, A., Diehl, A.M., Bass, N.M., Neuschwander-Tetri, B.A., Lavine, J.E., Tonascia, J., Unalp, A., Natta, M.V., Clark, J., Brunt, E.M., Kleiner, D.E., Hoofnagle, J.H., Robuck, P.R., 2010. Pioglitazone, Vitamin E, or Placebo for Nonalcoholic Steatohepatitis. *N. Engl. J. Med.* 362, 1675–1685. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0907929>

- Sapp, V., Gaffney, L., EauClaire, S.F., Matthews, R.P., 2014. Fructose leads to hepatic steatosis in zebrafish that is reversed by mechanistic target of rapamycin (mTOR) inhibition. *Hepatology*. Baltimore, Md 60, 1581–1592. <https://doi.org/10.1002/hep.27284>
- Sato, F., Kohsaka, A., Bhawal, U.K., Muragaki, Y., 2018. Potential Roles of Dec and Bmal1 Genes in Interconnecting Circadian Clock and Energy Metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 781. <https://doi.org/10.3390/ijms19030781>
- Sato, S., Shirakawa, H., Tomita, S., Ohsaki, Y., Haketa, K., Tooi, O., Santo, N., Tohkin, M., Furukawa, Y., Gonzalez, F.J., Komai, M., 2008. Low-dose dioxins alter gene expression related to cholesterol biosynthesis, lipogenesis, and glucose metabolism through the aryl hydrocarbon receptor-mediated pathway in mouse liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 229, 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.12.029>
- Savard, C., Tartaglione, E.V., Kuver, R., Haigh, W.G., Farrell, G.C., Subramanian, S., Chait, A., Yeh, M.M., Quinn, L.S., Ioannou, G.N., 2013. Synergistic Interaction of Dietary Cholesterol and Dietary Fat in Inducing Experimental Steatohepatitis. *Hepatology*. Baltimore, Md 57, 81–92. <https://doi.org/10.1002/hep.25789>
- Savic, D., Hodson, L., Neubauer, S., Pavlides, M., 2020. The Importance of the Fatty Acid Transporter L-Carnitine in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Nutrients* 12, 2178. <https://doi.org/10.3390/nu12082178>
- Sayaf, K., Zanutto, I., Russo, F.P., Gabbia, D., De Martin, S., 2021. The Nuclear Receptor PXR in Chronic Liver Disease. *Cells* 11, 61. <https://doi.org/10.3390/cells11010061>
- Sberna, A.-L., Assem, M., Xiao, R., Ayers, S., Gautier, T., Guiu, B., Deckert, V., Chevriaux, A., Grober, J., Guern, N.L., Pais de Barros, J.-P., Moore, D.D., Lagrost, L., Masson, D., 2011. Constitutive Androstane Receptor Activation Decreases Plasma Apolipoprotein B-Containing Lipoproteins and Atherosclerosis in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 2232–2239. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.222497>
- Schaaf, M.J.M., 2017. Nuclear receptor research in zebrafish. *J. Mol. Endocrinol.* 59, R65–R76. <https://doi.org/10.1530/JME-17-0031>
- Schlegel, A., 2012. Studying non-alcoholic fatty liver disease with zebrafish: a confluence of optics, genetics, and physiology. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 3953–3961. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1037-y>
- Schlegel, A., Gut, P., 2015. Metabolic insights from zebrafish genetics, physiology, and chemical biology. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 2249–2260. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1816-8>
- Schlegel, A., Stainier, D.Y.R., 2007. Lessons from “Lower” Organisms: What Worms, Flies, and Zebrafish Can Teach Us about Human Energy Metabolism. *PLoS Genet.* 3, e199. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030199>
- Schlegel, A., Stainier, D.Y.R., 2006. Microsomal Triglyceride Transfer Protein Is Required for Yolk Lipid Utilization and Absorption of Dietary Lipids in Zebrafish Larvae [†]. *Biochemistry* 45, 15179–15187. <https://doi.org/10.1021/bi0619268>
- Schneider, K.M., Bieghs, V., Heymann, F., Hu, W., Dreymueller, D., Liao, L., Frissen, M., Ludwig, A., Gassler, N., Pabst, O., Latz, E., Sellge, G., Penders, J., Tacke, F., Trautwein, C., 2015. CX3CR1 is a gatekeeper for intestinal barrier integrity in mice: Limiting steatohepatitis by maintaining intestinal homeostasis. *Hepatology* 62, 1405–1416. <https://doi.org/10.1002/hep.27982>
- Schroder, K., Tschopp, J., 2010. The Inflammasomes. *Cell* 140, 821–832. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.040>
- Schwabe, R.F., Luedde, T., 2018. APOPTOSIS AND NECROPTOSIS IN THE LIVER: A MATTER OF LIFE AND DEATH. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 15, 738–752. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0065-y>
- Scorletti, E., Carr, R.M., 2022. A new perspective on NAFLD: Focusing on lipid droplets. *J. Hepatol.* 76, 934–945. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2021.11.009>

- Seki, E., De Minicis, S., Osterreicher, C.H., Kluwe, J., Osawa, Y., Brenner, D.A., Schwabe, R.F., 2007. TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat. Med.* 13, 1324–1332. <https://doi.org/10.1038/nm1663>
- Sen, P., Qadri, S., Luukkonen, P.K., Ragnarsdottir, O., McGlinchey, A., Jäntti, S., Juuti, A., Arola, J., Schlezinger, J.J., Webster, T.F., Orešič, M., Yki-Järvinen, H., Hyötyläinen, T., 2022. Exposure to environmental contaminants is associated with altered hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* 76, 283–293. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2021.09.039>
- Senkal, C.E., Salama, M.F., Snider, A.J., Allopenna, J.J., Rana, N.A., Koller, A., Hannun, Y.A., Obeid, L.M., 2017. CERAMIDE IS METABOLIZED TO ACYLCERAMIDE AND STORED IN LIPID DROPLETS. *Cell Metab.* 25, 686–697. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.02.010>
- Serdar, B., LeBlanc, W.G., Norris, J.M., Dickinson, L.M., 2014. Potential effects of polychlorinated biphenyls (PCBs) and selected organochlorine pesticides (OCPs) on immune cells and blood biochemistry measures: a cross-sectional assessment of the NHANES 2003–2004 data. *Environ. Health* 13, 114. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-13-114>
- Sergent, O., Griffon, B., Morel, I., Chevanne, M., Dubos, M., Cillard, P., Cillard, J., 1997. Effect of nitric oxide on iron-mediated oxidative stress in primary rat hepatocyte culture. *Hepatology* 25, 122–127. <https://doi.org/10.1002/hep.510250123>
- 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, 104–111. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.078634>
- Seth, A., Stemple, D.L., Barroso, I., 2013. The emerging use of zebrafish to model metabolic disease. *Dis. Model. Mech.* 6, 1080–1088. <https://doi.org/10.1242/dmm.011346>
- Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S., Eggeling, C., 2017. The mystery of membrane organization: composition, regulation and physiological relevance of lipid rafts. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 361–374. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.16>
- Shan, Q., Huang, F., Wang, J., Du, Y., 2015. Effects of co-exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and polychlorinated biphenyls on nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Environ. Toxicol.* 30, 1364–1374. <https://doi.org/10.1002/tox.22006>
- Shan, Q., Li, H., Chen, N., Qu, F., Guo, J., 2020. Understanding the Multiple Effects of PCBs on Lipid Metabolism. *Diabetes Metab. Syndr. Obes. Targets Ther.* 13, 3691–3702. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S264851>
- Shen, C., Ma, W., Ding, L., Li, S., Dou, X., Song, Z., 2018. The TLR4-IRE1 α pathway activation contributes to palmitate-elicited lipotoxicity in hepatocytes. *J. Cell. Mol. Med.* 22, 3572–3581. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13636>
- Shen, J., Chan, H.L.-Y., Wong, G.L.-H., Chan, A.W.-H., Choi, P.C.-L., Chan, H.-Y., Chim, A.M.-L., Yeung, D.K.-W., Yu, J., Chu, W.C.-W., Wong, V.W.-S., 2012. Assessment of non-alcoholic fatty liver disease using serum total cell death and apoptosis markers. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 36, 1057–1066. <https://doi.org/10.1111/apt.12091>
- Shen, Jiayun, Chan, H.L.-Y., Wong, G.L.-H., Choi, P.C.-L., Chan, A.W.-H., Chan, H.-Y., Chim, A.M.-L., Yeung, D.K.-W., Chan, F.K.-L., Woo, J., Yu, J., Chu, W.C.-W., Wong, V.W.-S., 2012. Non-invasive diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis by combined serum biomarkers. *J. Hepatol.* 56, 1363–1370. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.12.025>
- Shen, L.-L., Liu, H., peng, J., Gan, L., Lu, L., Zhang, Q., Li, L., He, F., Jiang, Y., 2011. Effects of farnesoid X receptor on the expression of the fatty acid synthetase and hepatic lipase. *Mol. Biol. Rep.* 38, 553–559. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0140-0>

- Shen, P., Yue, Y., Zheng, J., Park, Y., 2018. *Caenorhabditis elegans*: A Convenient In Vivo Model for Assessing the Impact of Food Bioactive Compounds on Obesity, Aging, and Alzheimer's Disease. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 9, 1–22. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030117-012709>
- Shi, X., Yeung, L.W.Y., Lam, P.K.S., Wu, R.S.S., Zhou, B., 2009. Protein Profiles in Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos Exposed to Perfluorooctane Sulfonate. *Toxicol. Sci.* 110, 334–340. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp111>
- Shieh, Y.-S., Chang, Y.-S., Hong, J.-R., Chen, L.-J., Jou, L.-K., Hsu, C.-C., Her, G.M., 2010. Increase of hepatic fat accumulation by liver specific expression of Hepatitis B virus X protein in zebrafish. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1801, 721–730. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2010.04.008>
- Shimano, H., Horton, J.D., Hammer, R.E., Shimomura, I., Brown, M.S., Goldstein, J.L., 1996. Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a. *J. Clin. Invest.* 98, 1575–1584.
- Shmarakov, I.O., Jiang, H., Liu, J., Fernandez, E.J., Blaner, W.S., 2019. Hepatic Stellate Cell Activation: A Source for Bioactive Lipids. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 1864, 629–642. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.02.004>
- Shoelson, S.E., Lee, J., Goldfine, A.B., 2006. Inflammation and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 116, 1793–1801. <https://doi.org/10.1172/JCI29069>
- Shojaie, L., Iorga, A., Dara, L., 2020. Cell Death in Liver Diseases: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 9682. <https://doi.org/10.3390/ijms21249682>
- Shoucri, B.M., Hung, V.T., Chamorro-García, R., Shioda, T., Blumberg, B., 2018. Retinoid X Receptor Activation During Adipogenesis of Female Mesenchymal Stem Cells Programs a Dysfunctional Adipocyte. *Endocrinology* 159, 2863–2883. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00056>
- Shwartz, A., Goessling, W., Yin, C., 2019. Macrophages in Zebrafish Models of Liver Diseases. *Front. Immunol.* 10, 2840. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02840>
- Simões, I.C.M., Fontes, A., Pinton, P., Zischka, H., Wieckowski, M.R., 2018. Mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 95, 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.12.019>
- Simon, J., Ouro, A., Ala-Ibanibo, L., Presa, N., Delgado, T.C., Martínez-Chantar, M.L., 2019. Sphingolipids in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma: Ceramide Turnover. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 40. <https://doi.org/10.3390/ijms21010040>
- Singh, A.B., Liu, J., 2017. Identification of Hepatic Lysophosphatidylcholine Acyltransferase 3 as a Novel Target Gene Regulated by Peroxisome Proliferator-activated Receptor δ . *J. Biol. Chem.* 292, 884–897. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.743575>
- Singh, S., Khera, R., Allen, A.M., Murad, M.H., Loomba, R., 2015. Comparative effectiveness of pharmacological interventions for nonalcoholic steatohepatitis: A systematic review and network meta-analysis. *Hepatology* 62, 1417–1432. <https://doi.org/10.1002/hep.27999>
- Skelly, M.M., James, P.D., Ryder, S.D., 2001. Findings on liver biopsy to investigate abnormal liver function tests in the absence of diagnostic serology. *J. Hepatol.* 35, 195–199. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(01\)00094-0](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(01)00094-0)
- Skinner, M.K., 2008. What is an epigenetic transgenerational phenotype? F3 or F2. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 25, 2–6. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.09.001>
- Skinner, M.K., Manikkam, M., Tracey, R., Guerrero-Bosagna, C., Haque, M., Nilsson, E.E., 2013. Ancestral dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) exposure promotes epigenetic transgenerational inheritance of obesity. *BMC Med.* 11, 228. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-228>

- Smolková, K., Mikó, E., Kovács, T., Leguina-Ruzzi, A., Sipos, A., Bai, P., 2020. Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 in Regulating Cancer Metabolism. *Antioxid. Redox Signal.* 33, 966–997. <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8024>
- Sookoian, S., Castaño, G.O., Burgueño, A.L., Gianotti, T.F., Rosselli, M.S., Pirola, C.J., 2010. The nuclear receptor PXR gene variants are associated with liver injury in nonalcoholic fatty liver disease. *Pharmacogenet. Genomics* 20, 1–8. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e328333a1dd>
- Spahis, S., Delvin, E., Borys, J.-M., Levy, E., 2017. Oxidative Stress as a Critical Factor in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Pathogenesis. *Antioxid. Redox Signal.* 26, 519–541. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6776>
- Spruiell, K., Richardson, R.M., Cullen, J.M., Awumey, E.M., Gonzalez, F.J., Gyamfi, M.A., 2014. Role of Pregnane X Receptor in Obesity and Glucose Homeostasis in Male Mice. *J. Biol. Chem.* 289, 3244–3261. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.494575>
- Stahlhut, R.W., van Wijngaarden, E., Dye, T.D., Cook, S., Swan, S.H., 2007. Concentrations of Urinary Phthalate Metabolites Are Associated with Increased Waist Circumference and Insulin Resistance in Adult U.S. Males. *Environ. Health Perspect.* 115, 876–882. <https://doi.org/10.1289/ehp.9882>
- Stel, J., Legler, J., 2015. The Role of Epigenetics in the Latent Effects of Early Life Exposure to Obesogenic Endocrine Disrupting Chemicals. *Endocrinology* 156, 3466–3472. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1434>
- Stoddard, M., Huang, C., Enyedi, B., Niethammer, P., 2019. Live imaging of leukocyte recruitment in a zebrafish model of chemical liver injury. *Sci. Rep.* 9, 28. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36771-9>
- Stojanoska, M.M., Milosevic, N., Milic, N., Abenavoli, L., 2017. The influence of phthalates and bisphenol A on the obesity development and glucose metabolism disorders. *Endocrine* 55, 666–681. <https://doi.org/10.1007/s12020-016-1158-4>
- Strähle, U., Scholz, S., Geisler, R., Greiner, P., Hollert, H., Rastegar, S., Schumacher, A., Selderslaghs, I., Weiss, C., Witters, H., Braunbeck, T., 2012. Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments—A commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Reprod. Toxicol., Zebrafish Teratogenesis* 33, 128–132. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.06.121>
- Strakovsky, R.S., Wang, H., Engeseth, N.J., Flaws, J.A., Helferich, W.G., Pan, Y.-X., Lezmi, S., 2015. Developmental bisphenol A (BPA) exposure leads to sex-specific modification of hepatic gene expression and epigenome at birth that may exacerbate high-fat diet-induced hepatic steatosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 284, 101–112. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.02.021>
- Strissel, K.J., Stancheva, Z., Miyoshi, H., Perfield, J.W., II, DeFuria, J., Jick, Z., Greenberg, A.S., Obin, M.S., 2007. Adipocyte Death, Adipose Tissue Remodeling, and Obesity Complications. *Diabetes* 56, 2910–2918. <https://doi.org/10.2337/db07-0767>
- Subramanian, S., Goodspeed, L., Wang, S., Kim, J., Zeng, L., Ioannou, G.N., Haigh, W.G., Yeh, M.M., Kowdley, K.V., O'Brien, K.D., Pennathur, S., Chait, A., 2011. Dietary cholesterol exacerbates hepatic steatosis and inflammation in obese LDL receptor-deficient mice. *J. Lipid Res.* 52, 1626–1635. <https://doi.org/10.1194/jlr.M016246>
- Sukardi, H., Zhang, X., Lui, E.Y., Ung, C.Y., Mathavan, S., Gong, Z., Lam, S.H., 2012. Liver X receptor agonist T0901317 induced liver perturbation in zebrafish: Histological, gene set enrichment and expression analyses. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1820, 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.10.009>
- Sullivan, S., 2010. Implications of Diet on Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 26, 160–164. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e32833358a58>

- Sumida, Y., Niki, E., Naito, Y., Yoshikawa, T., 2013. Involvement of free radicals and oxidative stress in NAFLD/NASH. *Free Radic. Res.* 47, 869–880. <https://doi.org/10.3109/10715762.2013.837577>
- Summers, S.A., 2006. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog. Lipid Res.* 45, 42–72. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2005.11.002>
- Sun, L., Ling, Y., Jiang, J., Wang, D., Wang, J., Li, J., Wang, X., Wang, H., 2020. Differential mechanisms regarding triclosan vs. bisphenol A and fluorene-9-bisphenol induced zebrafish lipid-metabolism disorders by RNA-Seq. *Chemosphere* 251, 126318. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126318>
- Sun, M., Cui, W., Woody, S.K., Staudinger, J.L., 2015. Pregnane X Receptor Modulates the Inflammatory Response in Primary Cultures of Hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* 43, 335–343. <https://doi.org/10.1124/dmd.114.062307>
- Sun, S.-X., Zhang, Y.-N., Lu, D.-L., Wang, W.-L., Limbu, S.M., Chen, L.-Q., Zhang, M.-L., Du, Z.-Y., 2019. Concentration-dependent effects of 17 β -estradiol and bisphenol A on lipid deposition, inflammation and antioxidant response in male zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 237, 124422. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124422>
- Sun, X., Seidman, J.S., Zhao, P., Troutman, T.D., Spann, N.J., Que, X., Zhou, F., Liao, Z., Pasillas, M., Yang, X., Magida, J.A., Kisseleva, T., Brenner, D.A., Downes, M., Evans, R.M., Saltiel, A.R., Tsimikas, S., Glass, C.K., Witztum, J.L., 2020. Neutralization of Oxidized Phospholipids Ameliorates Non-alcoholic Steatohepatitis. *Cell Metab.* 31, 189-206.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.10.014>
- Sunny, N.E., Bril, F., Cusi, K., 2017. Mitochondrial Adaptation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Novel Mechanisms and Treatment Strategies. *Trends Endocrinol. Metab.* 28, 250–260. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.11.006>
- Sunyer, J., Alvarez-Pedrerol, M., To-Figueras, J., Ribas-Fitó, N., Grimalt, J.O., Herrero, C., 2008. Urinary Porphyrin Excretion in Children is Associated with Exposure to Organochlorine Compounds. *Environ. Health Perspect.* 116, 1407–1410. <https://doi.org/10.1289/ehp.11354>
- Suzuki, A., Angulo, P., Lymp, J., Li, D., Satomura, S., Lindor, K., 2005. Hyaluronic acid, an accurate serum marker for severe hepatic fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* 25, 779–786. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2005.01064.x>
- Svegliati-Baroni, G., Pierantonelli, I., Torquato, P., Marinelli, R., Ferreri, C., Chatgililoglu, C., Bartolini, D., Galli, F., 2019. Lipidomic biomarkers and mechanisms of lipotoxicity in non-alcoholic fatty liver disease. *Free Radic. Biol. Med.*, Redox lipidomics and adductomics Advanced analytical strategies to study oxidized lipids and lipid-protein adducts 144, 293–309. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.029>
- Svegliati-Baroni, G., Saccomanno, S., Van Goor, H., Jansen, P., Benedetti, A., Moshage, H., 2001. Involvement of reactive oxygen species and nitric oxide radicals in activation and proliferation of rat hepatic stellate cells. *Liver* 21, 1–12. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0676.2001.210101.x>
- Szabo, G., Petrasek, J., 2015. Inflammasome activation and function in liver disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 12, 387–400. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.94>
- Szondy, Z., Sarang, Z., Kiss, B., Garabuczi, É., Köröskényi, K., 2017. Anti-inflammatory Mechanisms Triggered by Apoptotic Cells during Their Clearance. *Front. Immunol.* 8, 909. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00909>
- Sztalryd, C., Brasaemle, D.L., 2017. The perilipin family of lipid droplet proteins: Gatekeepers of intracellular lipolysis. *Biochim. Biophys. Acta* 1862, 1221–1232. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2017.07.009>

T

- Tainaka, T., Shimada, Y., Kuroyanagi, J., Zang, L., Oka, T., Nishimura, Y., Nishimura, N., Tanaka, T., 2011. Transcriptome analysis of anti-fatty liver action by Campari tomato using a zebrafish diet-induced obesity model. *Nutr. Metab.* 8, 88. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-8-88>
- Takahashi, Y., Fukusato, T., 2014. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J. Gastroenterol. WJG* 20, 15539–15548. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i42.15539>
- Takeuchi, S., Matsuda, T., Kobayashi, S., Takahashi, T., Kojima, H., 2006. In vitro screening of 200 pesticides for agonistic activity via mouse peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α and PPAR γ and quantitative analysis of in vivo induction pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 217, 235–244. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.08.011>
- Talukdar, S., Hillgartner, F.B., 2006. The mechanism mediating the activation of acetyl-coenzyme A carboxylase- α gene transcription by the liver X receptor agonist T0-901317. *J. Lipid Res.* 47, 2451–2461. <https://doi.org/10.1194/jlr.M600276-JLR200>
- Tan, X., Xie, G., Sun, Xiuhua, Li, Q., Zhong, W., Qiao, P., Sun, Xinguo, Jia, W., Zhou, Z., 2013. High Fat Diet Feeding Exaggerates Perfluorooctanoic Acid-Induced Liver Injury in Mice via Modulating Multiple Metabolic Pathways. *PLoS ONE* 8, e61409. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061409>
- Tanaka, N., Aoyama, T., Kimura, S., Gonzalez, F.J., 2017. Targeting nuclear receptors for the treatment of fatty liver disease. *Pharmacol. Ther.* 179, 142–157. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.05.011>
- Tanase, D.M., Gosav, E.M., Costea, C.F., Ciocoiu, M., Lacatusu, C.M., Maranduca, M.A., Ouatu, A., Floria, M., 2020. The Intricate Relationship between Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM), Insulin Resistance (IR), and Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *J. Diabetes Res.* 2020, 3920196. <https://doi.org/10.1155/2020/3920196>
- Tandra, S., Yeh, M.M., Brunt, E.M., Vuppalanchi, R., Cummings, O.W., Ünalp-Arida, A., Wilson, L.A., Chalasani, N., 2011. Presence and Significance of Microvesicular Steatosis in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J. Hepatol.* 55, 654–659. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.11.021>
- Tang, A., Tan, J., Sun, M., Hamilton, G., Bydder, M., Wolfson, T., Gamst, A.C., Middleton, M., Brunt, E.M., Lomba, R., Lavine, J.E., Schwimmer, J.B., Sirlin, C.B., 2013. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: MR Imaging of Liver Proton Density Fat Fraction to Assess Hepatic Steatosis. *Radiology* 267, 422–431. <https://doi.org/10.1148/radiol.12120896>
- Tang, T., Sui, Y., Lian, M., Li, Z., Hua, J., 2013. Pro-Inflammatory Activated Kupffer Cells by Lipids Induce Hepatic NKT Cells Deficiency through Activation-Induced Cell Death. *PLoS ONE* 8, e81949. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081949>
- Tanoli, T., Yue, P., Yablonskiy, D., Schonfeld, G., 2004. Fatty liver in familial hypobetalipoproteinemia: roles of the APOB defects, intra-abdominal adipose tissue, and insulin sensitivity. *J. Lipid Res.* 45, 941–947. <https://doi.org/10.1194/jlr.M300508-JLR200>
- Tao, T., Peng, J., 2009. Liver development in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Genet. Genomics* 36, 325–334. [https://doi.org/10.1016/S1673-8527\(08\)60121-6](https://doi.org/10.1016/S1673-8527(08)60121-6)
- Tarao, K., Nozaki, A., Ikeda, T., Sato, A., Komatsu, H., Komatsu, T., Taguri, M., Tanaka, K., 2019. Real impact of liver cirrhosis on the development of hepatocellular carcinoma in various liver diseases—meta-analytic assessment. *Cancer Med.* 8, 1054–1065. <https://doi.org/10.1002/cam4.1998>

- Teame, T., Zhang, Z., Ran, C., Zhang, H., Yang, Y., Ding, Q., Xie, M., Gao, C., Ye, Y., Duan, M., Zhou, Z., 2019. The use of zebrafish (*Danio rerio*) as biomedical models. *Anim. Front. Rev. Mag. Anim. Agric.* 9, 68–77. <https://doi.org/10.1093/af/vfz020>
- Tekpli, X., Huc, L., Sergent, O., Dendelé, B., Dimanche-Boitrel, M.-T., Holme, J.A., Lagadic-Gossman, D., 2012. NHE-1 Relocation Outside Cholesterol-rich Membrane Microdomains is Associated with its Benzo[a]pyrene-related Apoptotic Function. *Cell. Physiol. Biochem.* 29, 657–666. <https://doi.org/10.1159/000171027>
- Tekpli, X., Rissel, M., Huc, L., Catheline, D., Sergent, O., Rioux, V., Legrand, P., Holme, J.A., Dimanche-Boitrel, M.-T., Lagadic-Gossman, D., 2010. Membrane remodeling, an early event in benzo[α]pyrene-induced apoptosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 243, 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.11.014>
- Teratani, T., Tomita, K., Suzuki, T., Oshikawa, T., Yokoyama, H., Shimamura, K., Tominaga, S., Hiroi, S., Irie, R., Okada, Y., Kurihara, C., Ebinuma, H., Saito, H., Hokari, R., Sugiyama, K., Kanai, T., Miura, S., Hibi, T., 2012. A High-Cholesterol Diet Exacerbates Liver Fibrosis in Mice via Accumulation of Free Cholesterol in Hepatic Stellate Cells. *Gastroenterology* 142, 152-164.e10. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.09.049>
- Test No. 230, 2009. Test No. 230: 21-day Fish Assay. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- Tête, A., Gallais, I., Imran, M., Chevanne, M., Lamin, M., Sparfel, L., Bucher, S., Burel, A., Podechard, N., Appenzeller, B.M.R., Fromenty, B., Grova, N., Sergent, O., Lagadic-Gossman, D., 2018. Mechanisms involved in the death of steatotic WIF-B9 hepatocytes co-exposed to benzo[a]pyrene and ethanol: a possible key role for xenobiotic metabolism and nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* 129, 323–337. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.042>
- Tête, A., Gallais, I., Imran, M., Legoff, L., Martin-Chouly, C., Sparfel, L., Bescher, M., Sergent, O., Podechard, N., Lagadic-Gossman, D., 2020. MEHP/ethanol co-exposure favors the death of steatotic hepatocytes, possibly through CYP4A and ADH involvement. *Food Chem. Toxicol.* 146, 111798. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111798>
- Thakur, P.C., Stuckenholz, C., Rivera, M.R., Davison, J.M., Yao, J.K., Amsterdam, A., Sadler, K.C., Bahary, N., 2011. Lack of de novo Phosphatidylinositol Synthesis Leads to Endoplasmic Reticulum Stress and Hepatic Steatosis in *cdipt*-Deficient Zebrafish. *Hepatology* 54, 452–462. <https://doi.org/10.1002/hep.24349>
- Thietart, S., Rautou, P.-E., 2020. Extracellular vesicles as biomarkers in liver diseases: A clinician's point of view. *J. Hepatology* 73, 1507–1525. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.07.014>
- Tian, S., Yan, S., Meng, Z., Huang, S., Sun, W., Jia, M., Teng, M., Zhou, Z., Zhu, W., 2021. New insights into bisphenols induced obesity in zebrafish (*Danio rerio*): Activation of cannabinoid receptor CB1. *J. Hazard. Mater.* 418, 126100. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126100>
- Tilg, H., 2010. The Role of Cytokines in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Dig. Dis.* 28, 179–185. <https://doi.org/10.1159/000282083>
- Tingaud-Sequeira, A., Ouadah, N., Babin, P.J., 2011. Zebrafish obesogenic test: a tool for screening molecules that target adiposity. *J. Lipid Res.* 52, 1765–1772. <https://doi.org/10.1194/jlr.D017012>
- Titchenell, P.M., Lazar, M.A., Birnbaum, M.J., 2017. Unraveling the Regulation of Hepatic Metabolism by Insulin. *Trends Endocrinol. Metab.* 28, 497–505. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.03.003>
- Tomaszewski, K.E., Montgomery, C.A., Melnick, R.L., 1988. Modulation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin toxicity in F344 rats by di(2-ethylhexyl)phthalate. *Chem. Biol. Interact.* 65, 205–222. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(88\)90107-X](https://doi.org/10.1016/0009-2797(88)90107-X)

- Torraca, V., Masud, S., Spaink, H.P., Meijer, A.H., 2014. Macrophage-pathogen interactions in infectious diseases: new therapeutic insights from the zebrafish host model. *Dis. Model. Mech.* 7, 785–797. <https://doi.org/10.1242/dmm.015594>
- Torres, J.-L., Novo-Veleiro, I., Manzanedo, L., Alvela-Suárez, L., Macías, R., Laso, F.-J., Marcos, M., 2018. Role of microRNAs in alcohol-induced liver disorders and non-alcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* 24, 4104–4118. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i36.4104>
- Traver, D., Herbomel, P., Patton, E.E., Murphey, R.D., Yoder, J.A., Litman, G.W., Catic, A., Amemiya, C.T., Zon, L.I., Trede, N.S., 2003. The zebrafish as a model organism to study development of the immune system. *Adv. Immunol.* 81, 253–330.
- Trede, N.S., Langenau, D.M., Traver, D., Look, A.T., Zon, L.I., 2004. The Use of Zebrafish to Understand Immunity. *Immunity* 20, 367–379. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(04\)00084-6](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(04)00084-6)
- Treviño, L.S., Katz, T.A., 2018. Endocrine Disruptors and Developmental Origins of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Endocrinology* 159, 20–31. <https://doi.org/10.1210/en.2017-00887>
- Tsai, E., Lee, T.-P., 2018. Diagnosis and Evaluation of Nonalcoholic Fatty Liver Disease/Nonalcoholic Steatohepatitis, Including Noninvasive Biomarkers and Transient Elastography. *Clin. Liver Dis., NASH and NAFLD* 22, 73–92. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2017.08.004>
- Tsai, S.-M., Liu, D.-W., Wang, W.-P., 2013. Fibroblast growth factor (Fgf) signaling pathway regulates liver homeostasis in zebrafish. *Transgenic Res.* 22, 301–314. <https://doi.org/10.1007/s11248-012-9636-9>
- Tsedensodnom, O., Vacaru, A.M., Howarth, D.L., Yin, C., Sadler, K.C., 2013. Ethanol metabolism and oxidative stress are required for unfolded protein response activation and steatosis in zebrafish with alcoholic liver disease. *Dis. Model. Mech.* 6, 1213–1226. <https://doi.org/10.1242/dmm.012195>
- Tsugane, K., Tamiya-Koizumi, K., Nagino, M., Nimura, Y., Yoshida, S., 1999. A possible role of nuclear ceramide and sphingosine in hepatocyte apoptosis in rat liver. *J. Hepatol.* 31, 8–17. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(99\)80158-5](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(99)80158-5)
- Tsurusaki, S., Tsuchiya, Y., Koumura, T., Nakasone, M., Sakamoto, T., Matsuoka, M., Imai, H., Yuet-Yin Kok, C., Okochi, H., Nakano, H., Miyajima, A., Tanaka, M., 2019. Hepatic ferroptosis plays an important role as the trigger for initiating inflammation in nonalcoholic steatohepatitis. *Cell Death Dis.* 10, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1678-y>
- Tucker, B., Lardelli, M., 2007. A rapid apoptosis assay measuring relative acridine orange fluorescence in zebrafish embryos. *Zebrafish* 4, 113–116. <https://doi.org/10.1089/zeb.2007.0508>
- Turner, C., Sawle, A., Fenske, M., Cossins, A., 2012. Implications of the solvent vehicles dimethylformamide and dimethylsulfoxide for establishing transcriptomic endpoints in the zebrafish embryo toxicity test. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 593–604. <https://doi.org/10.1002/etc.1718>
- Turola, E., Petta, S., Vanni, E., Milosa, F., Valenti, L., Critelli, R., Miele, L., Maccio, L., Calvaruso, V., Fracanzani, A.L., Bianchini, M., Raos, N., Bugianesi, E., Mercorella, S., Di Giovanni, M., Craxì, A., Fargion, S., Grieco, A., Cammà, C., Cotelli, F., Villa, E., 2015. Ovarian senescence increases liver fibrosis in humans and zebrafish with steatosis. *Dis. Model. Mech.* 8, 1037–1046. <https://doi.org/10.1242/dmm.019950>
- Turpin, S.M., Nicholls, H.T., Willmes, D.M., Mourier, A., Brodesser, S., Wunderlich, C.M., Mauer, J., Xu, E., Hammerschmidt, P., Brönneke, H.S., Trifunovic, A., LoSasso, G., Wunderlich, F.T., Kornfeld, J.-W., Blüher, M., Krönke, M., Brüning, J.C., 2014. Obesity-Induced CerS6-Dependent C16:0 Ceramide Production Promotes Weight Gain and Glucose Intolerance. *Cell Metab.* 20, 678–686. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.08.002>

U

Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P., Ron, D., 2000. Coupling of Stress in the ER to Activation of JNK Protein Kinases by Transmembrane Protein Kinase IRE1. *Science* 287, 664–666. <https://doi.org/10.1126/science.287.5453.664>

US EPA, 2017. US EPA National center for environmental assessment- Exposure Factors Handbook Chapter 5 (Update): Soil and Dust Ingestion [WWW Document]. URL <https://cfpub.epa.gov/ncea/risk/recordisplay.cfm?deid=337521> (accessed 11.24.22).

V

Vacaru, A.M., Di Narzo, A.F., Howarth, D.L., Tsedensodnom, O., Imrie, D., Cinaroglu, A., Amin, S., Hao, K., Sadler, K.C., 2014. Molecularly defined unfolded protein response subclasses have distinct correlations with fatty liver disease in zebrafish. *Dis. Model. Mech.* 7, 823–835. <https://doi.org/10.1242/dmm.014472>

Valenti, L., Bugianesi, E., Pajvani, U., Targher, G., 2016. Nonalcoholic fatty liver disease: cause or consequence of type 2 diabetes? *Liver Int.* 36, 1563–1579. <https://doi.org/10.1111/liv.13185>

Valvi, D., Casas, M., Mendez, M.A., Ballesteros-Gómez, A., Luque, N., Rubio, S., Sunyer, J., Vrijheid, M., 2013. Prenatal Bisphenol A Urine Concentrations and Early Rapid Growth and Overweight Risk in the Offspring. *Epidemiology* 24, 791–799. <https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e3182a67822>

van Ham, T.J., Mapes, J., Kokel, D., Peterson, R.T., 2010. Live imaging of apoptotic cells in zebrafish. *FASEB J.* 24, 4336–4342. <https://doi.org/10.1096/fj.10-161018>

van Meteren, N., Lagadic-Gossmann, D., Chevanne, M., Gallais, I., Gobart, D., Burel, A., Bucher, S., Grova, N., Fromenty, B., Appenzeller, B.M.R., Chevance, S., Gauffre, F., Le Ferrec, E., Sergent, O., 2019. Polycyclic aromatic hydrocarbons can trigger hepatocyte release of extracellular vesicles by various mechanisms of action depending on their affinity for the aryl hydrocarbon receptor. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* kfz157. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz157>

van Pomeran, M., Brun, N.R., Peijnenburg, W.J.G.M., Vijver, M.G., 2017. Exploring uptake and biodistribution of polystyrene (nano)particles in zebrafish embryos at different developmental stages. *Aquat. Toxicol.* 190, 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.06.017>

van Wijk, R.C., Krekels, E.H.J., Hankemeier, T., Spaink, H.P., van der Graaf, P.H., 2016. Systems pharmacology of hepatic metabolism in zebrafish larvae. *Drug Discov. Today Dis. Models, Computational Models of Liver Disease* 2016 22, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2017.04.003>

Vandanmagsar, B., Youm, Y.-H., Ravussin, A., Galgani, J.E., Stadler, K., Mynatt, R.L., Ravussin, E., Stephens, J.M., Dixit, V.D., 2011. The NALP3/NLRP3 Inflammasome Instigates Obesity-Induced Autoinflammation and Insulin Resistance. *Nat. Med.* 17, 179–188. <https://doi.org/10.1038/nm.2279>

Vandenberg, L.N., Colborn, T., Hayes, T.B., Heindel, J.J., Jacobs, D.R., Lee, D.-H., Shioda, T., Soto, A.M., vom Saal, F.S., Welshons, W.V., Zoeller, R.T., Myers, J.P., 2012. Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocr. Rev.* 33, 378–455. <https://doi.org/10.1210/er.2011-1050>

Varga, T., Czimmerer, Z., Nagy, L., 2011. PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. *Biochim. Biophys. Acta* 1812, 1007–1022. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.02.014>

- Venteclef, N., Jakobsson, T., Ehrlund, A., Damdimopoulos, A., Mikkonen, L., Ellis, E., Nilsson, L.-M., Parini, P., Jänne, O.A., Gustafsson, J.-Å., Steffensen, K.R., Treuter, E., 2010. GPS2-dependent corepressor/SUMO pathways govern anti-inflammatory actions of LRH-1 and LXR β in the hepatic acute phase response. *Genes Dev.* 24, 381–395. <https://doi.org/10.1101/gad.545110>
- Verbueken, E., Bars, C., Ball, J.S., Periz-Stanacev, J., Marei, W.F.A., Tochwin, A., Gabriëls, I.J., Michiels, E.D.G., Stinckens, E., Vergauwen, L., Knapen, D., Van Ginneken, C.J., Van Cruchten, S.J., 2018. From mRNA Expression of Drug Disposition Genes to In Vivo Assessment of CYP-Mediated Biotransformation during Zebrafish Embryonic and Larval Development. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 3976. <https://doi.org/10.3390/ijms19123976>
- Vernetti, L.A., Vogt, A., Gough, A., Taylor, D.L., 2017. Evolution of Experimental Models of the Liver to Predict Human Drug Hepatotoxicity and Efficacy. *Clin. Liver Dis.* 21, 197–214. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2016.08.013>
- Verstraelen, S., Peers, B., Maho, W., Hollanders, K., Remy, S., Berckmans, P., Covaci, A., Witters, H., 2016. Phenotypic and biomarker evaluation of zebrafish larvae as an alternative model to predict mammalian hepatotoxicity. *J. Appl. Toxicol.* 36, 1194–1206. <https://doi.org/10.1002/jat.3288>
- Verstraete, S.G., Wojcicki, J.M., Perito, E.R., Rosenthal, P., 2018. Bisphenol a increases risk for presumed non-alcoholic fatty liver disease in Hispanic adolescents in NHANES 2003–2010. *Environ. Health* 17. <https://doi.org/10.1186/s12940-018-0356-3>
- Verweij, F.J., Hyenne, V., Van Niel, G., Goetz, J.G., 2019. Extracellular Vesicles: Catching the Light in Zebrafish. *Trends Cell Biol.* 29, 770–776. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.07.007>
- Videla, L.A., RODRIGO, R., ORELLANA, M., FERNANDEZ, V., TAPIA, G., QUIÑONES, L., VARELA, N., CONTRERAS, J., LAZARTE, R., CSENDES, A., ROJAS, J., MALUENDA, F., BURDILES, P., DIAZ, J.C., SMOK, G., THIELEMANN, L., PONIACHIK, J., 2004. Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. *Clin. Sci.* 106, 261–268. <https://doi.org/10.1042/CS20030285>
- Vienberg, S., Geiger, J., Madsen, S., Dalgaard, L.T., 2017. MicroRNAs in metabolism. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* 219, 346–361. <https://doi.org/10.1111/apha.12681>
- Vilar-Gomez, E., Martinez-Perez, Y., Calzadilla-Bertot, L., Torres-Gonzalez, A., Gra-Oramas, B., Gonzalez-Fabian, L., Friedman, S.L., Diago, M., Romero-Gomez, M., 2015. Weight Loss Through Lifestyle Modification Significantly Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* 149, 367-378.e5. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.04.005>
- Vittorio, J., Lavine, J.E., 2020. Recent advances in understanding and managing pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *F1000Research* 9, F1000 Faculty Rev-377. <https://doi.org/10.12688/f1000research.24198.1>
- Vliegenthart, A.D.B., Tucker, C.S., Del Pozo, J., Dear, J.W., 2014. Zebrafish as model organisms for studying drug-induced liver injury. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 78, 1217–1227. <https://doi.org/10.1111/bcp.12408>
- Volkoff, H., 2019. Fish as models for understanding the vertebrate endocrine regulation of feeding and weight. *Mol. Cell. Endocrinol., Endocrinology and Environment in Eating Disorders: From Basic to Applied Research* 497, 110437. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.04.017>
- Volynets, V., Küper, M.A., Strahl, S., Maier, I.B., Spruss, A., Wagnerberger, S., Königsrainer, A., Bischoff, S.C., Bergheim, I., 2012. Nutrition, Intestinal Permeability, and Blood Ethanol Levels Are Altered in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Dig. Dis. Sci.* 57, 1932–1941. <https://doi.org/10.1007/s10620-012-2112-9>
- VoPham, T., 2019. Environmental risk factors for liver cancer and nonalcoholic fatty liver disease. *Curr. Epidemiol. Rep.* 6, 50–66. <https://doi.org/10.1007/s40471-019-0183-2>

W

- Wahlang, B., Appana, S., Falkner, K.C., McClain, C.J., Brock, G., Cave, M.C., 2020. Insecticide and Metal Exposures are Associated with a Surrogate Biomarker for Non-alcoholic Fatty Liver Disease in the National Health and Nutrition Examination Survey 2003–2004. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 27, 6476–6487. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-07066-x>
- Wahlang, B., Beier, J.I., Clair, H.B., Bellis-Jones, H.J., Falkner, K.C., McClain, C.J., Cave, M.C., 2013. Toxicant-associated Steatohepatitis. *Toxicol. Pathol.* 41, 343–360. <https://doi.org/10.1177/0192623312468517>
- Wahlang, B., Falkner, K.C., Clair, H.B., Al-Eryani, L., Prough, R.A., States, J.C., Coslo, D.M., Omiecinski, C.J., Cave, M.C., 2014. Human Receptor Activation by Aroclor 1260, a Polychlorinated Biphenyl Mixture. *Toxicol. Sci.* 140, 283–297. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu083>
- Wahlang, B., Jin, J., Beier, J.I., Hardesty, J.E., Daly, E.F., Schnegelberger, R.D., Falkner, K.C., Prough, R.A., Kirpich, I.A., Cave, M.C., 2019. Mechanisms of Environmental Contributions to Fatty Liver Disease. *Curr. Environ. Health Rep.* <https://doi.org/10.1007/s40572-019-00232-w>
- Wahlang, B., Perkins, J.T., Petriello, M.C., Hoffman, J.B., Stromberg, A.J., Hennig, B., 2017. A Compromised Liver Alters Polychlorinated Biphenyl-Mediated Toxicity. *Toxicology* 380, 11–22. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.02.001>
- Wahlang, B., Prough, R.A., Falkner, K.C., Hardesty, J.E., Song, M., Clair, H.B., Clark, B.J., States, J.C., Arteel, G.E., Cave, M.C., 2016. Polychlorinated Biphenyl-Xenobiotic Nuclear Receptor Interactions Regulate Energy Metabolism, Behavior, and Inflammation in Non-alcoholic-Steatohepatitis. *Toxicol. Sci.* 149, 396–410. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv250>
- Wahli, W., Michalik, L., 2012. PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation. *Trends Endocrinol. Metab., Special Focus: Mammalian circadian rhythms and metabolism* 23, 351–363. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.05.001>
- Wan, H.T., Zhao, Y.G., Wei, X., Hui, K.Y., Giesy, J.P., Wong, C.K.C., 2012. PFOS-induced hepatic steatosis, the mechanistic actions on β -oxidation and lipid transport. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1820, 1092–1101. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.03.010>
- Wang, A.Y., Dhaliwal, J., Mouzaki, M., 2019. Lean non-alcoholic fatty liver disease. *Clin. Nutr.* 38, 975–981. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.08.008>
- Wang, B., Tontonoz, P., 2019. Phospholipid Remodeling in Physiology and Disease. *Annu. Rev. Physiol.* 81, 165–188. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020518-114444>
- Wang, G., Bonkovsky, H.L., de Lemos, A., Burczynski, F.J., 2015. Recent insights into the biological functions of liver fatty acid binding protein 1. *J. Lipid Res.* 56, 2238–2247. <https://doi.org/10.1194/jlr.R056705>
- Wang, M., Han, J., Xing, H., Zhang, H., Li, Z., Liang, L., Li, C., Dai, S., Wu, M., Shen, F., Yang, T., 2016. Dysregulated fatty acid metabolism in hepatocellular carcinoma. *Hepatic Oncol.* 3, 241–251. <https://doi.org/10.2217/hep-2016-0012>
- Wang, N., Chen, Yi, Ning, Z., Li, Q., Han, B., Zhu, C., Chen, Yingchao, Xia, F., Jiang, B., Wang, B., Wang, X., Jensen, M.D., Lu, Y., 2016. Exposure to Famine in Early Life and Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Adulthood. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101, 2218–2225. <https://doi.org/10.1210/jc.2016-1076>
- Wang, Nakajima, T., Gonzalez, F.J., Tanaka, N., 2020. PPARs as Metabolic Regulators in the Liver: Lessons from Liver-Specific PPAR-Null Mice. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 2061. <https://doi.org/10.3390/ijms21062061>

- Wang, Q., Huang, J., Liu, S., Wang, C., Jin, Y., Lai, H., Tu, W., 2022. Aberrant hepatic lipid metabolism associated with gut microbiota dysbiosis triggers hepatotoxicity of novel PFOS alternatives in adult zebrafish. *Environ. Int.* 166, 107351. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107351>
- Wang, T., Li, M., Chen, B., Xu, M., Xu, Y., Huang, Y., Lu, J., Chen, Y., Wang, W., Li, X., Liu, Y., Bi, Y., Lai, S., Ning, G., 2012. Urinary Bisphenol A (BPA) Concentration Associates with Obesity and Insulin Resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, E223–E227. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-1989>
- Wang, W., Zhang, J., Li, Z., Gu, J., Qin, J., Li, J., Zhang, X., Ru, S., 2022. Bisphenol S exposure accelerates the progression of atherosclerosis in zebrafish embryo-larvae. *J. Hazard. Mater.* 426, 128042. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.128042>
- Wang, W., Zhang, X., Qin, J., Wei, P., Jia, Y., Wang, J., Ru, S., 2019. Long-term bisphenol S exposure induces fat accumulation in liver of adult male zebrafish (*Danio rerio*) and slows yolk lipid consumption in F1 offspring. *Chemosphere* 221, 500–510. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.020>
- Wang, Weiwei, Zhang, X., Wang, Z., Qin, J., Wang, Wei, Tian, H., Ru, S., 2018. Bisphenol S induces obesogenic effects through deregulating lipid metabolism in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Chemosphere* 199, 286–296. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.163>
- Wang, Y., Viscarra, J., Kim, S.-J., Sul, H.S., 2015. Transcriptional Regulation of Hepatic Lipogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 678–689. <https://doi.org/10.1038/nrm4074>
- Warr, C.G., Shaw, K.H., Azim, A., Piper, M.D.W., Parsons, L.M., 2018. Using Mouse and Drosophila Models to Investigate the Mechanistic Links between Diet, Obesity, Type II Diabetes, and Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 4110. <https://doi.org/10.3390/ijms19124110>
- Watanabe, M., Houten, S.M., Wang, L., Moschetta, A., Mangelsdorf, D.J., Heyman, R.A., Moore, D.D., Auwerx, J., 2004. Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *J. Clin. Invest.* 113, 1408–1418. <https://doi.org/10.1172/JCI200421025>
- Watt, M.J., Miotto, P.M., De Nardo, W., Montgomery, M.K., 2019. The Liver as an Endocrine Organ—Linking NAFLD and Insulin Resistance. *Endocr. Rev.* 40, 1367–1393. <https://doi.org/10.1210/er.2019-00034>
- Watts, J.L., 2009. Fat synthesis and adiposity regulation in *Caenorhabditis elegans*. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 20, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2008.11.002>
- Wei, J., Sun, X., Chen, Y., Li, Y., Song, L., Zhou, Z., Xu, B., Lin, Y., Xu, S., 2014. Perinatal exposure to bisphenol A exacerbates nonalcoholic steatohepatitis-like phenotype in male rat offspring fed on a high-fat diet. *J. Endocrinol.* 222, 313–325. <https://doi.org/10.1530/JOE-14-0356>
- Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., Ferrante, A.W., 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 112, 1796–1808. <https://doi.org/10.1172/JCI200319246>
- Wenfeng, Z., Yakun, W., Di, M., Jianping, G., Chuanxin, W., Chun, H., 2014. Kupffer cells: increasingly significant role in nonalcoholic fatty liver disease. *Ann. Hepatol.* 13, 489–495. [https://doi.org/10.1016/S1665-2681\(19\)31247-5](https://doi.org/10.1016/S1665-2681(19)31247-5)
- Weng, Z., Xu, C., Zhang, X., Pang, L., Xu, J., Liu, Q., Zhang, L., Xu, S., Gu, A., 2020. Autophagy mediates perfluorooctanoic acid-induced lipid metabolism disorder and NLRP3 inflammasome activation in hepatocytes. *Environ. Pollut.* 267, 115655. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115655>
- Wesolowski, S.R., El Kasmi, K.C., Jonscher, K.R., Friedman, J.E., 2017. Developmental origins of NAFLD: a womb with a clue. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 14, 81–96. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.160>

- Wettstein, G., Luccarini, J., Poekes, L., Faye, P., Kupkowski, F., Adarbes, V., Defrêne, E., Estivalet, C., Gawronski, X., Jantzen, I., Philippot, A., Tessier, J., Tuyaa-Boustugue, P., Oakley, F., Mann, D.A., Leclercq, I., Francque, S., Konstantinova, I., Broqua, P., Junien, J., 2017. The new-generation pan-peroxisome proliferator-activated receptor agonist IVA337 protects the liver from metabolic disorders and fibrosis. *Hepatol. Commun.* 1, 524–537. <https://doi.org/10.1002/hep4.1057>
- White, D.L., Kanwal, F., El-Serag, H.B., 2012. Association Between Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Risk for Hepatocellular Cancer, Based on Systematic Review. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 10, 1342-1359.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2012.10.001>
- Wilkins, B.J., Gong, W., Pack, M., 2014. A novel keratin18 promoter that drives reporter gene expression in the intrahepatic and extrahepatic biliary system allows isolation of cell-type specific transcripts from zebrafish liver. *Gene Expr. Patterns* 14, 62–68. <https://doi.org/10.1016/j.gep.2013.12.002>
- Willebrords, J., Pereira, I.V.A., Maes, M., Crespo Yanguas, S., Colle, I., Van Den Bossche, B., Da Silva, T.C., de Oliveira, C.P.M.S., Andraus, W., Alves, V.A., Cogliati, B., Vinken, M., 2015. Strategies, models and biomarkers in experimental non-alcoholic fatty liver disease research. *Prog. Lipid Res.* 59, 106–125. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.05.002>
- Willy, J.A., Young, S.K., Stevens, J.L., Masuoka, H.C., Wek, R.C., 2015. CHOP links endoplasmic reticulum stress to NF- κ B activation in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Mol. Biol. Cell* 26, 2190–2204. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-01-0036>
- Wilson, C.G., Tran, J.L., Erion, D.M., Vera, N.B., Febbraio, M., Weiss, E.J., 2016. Hepatocyte-Specific Disruption of CD36 Attenuates Fatty Liver and Improves Insulin Sensitivity in HFD-Fed Mice. *Endocrinology* 157, 570–585. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1866>
- Wilson, M.H., Ekker, S.C., Farber, S.A., 2021. Imaging cytoplasmic lipid droplets in vivo with fluorescent perilipin 2 and perilipin 3 knock-in zebrafish. *eLife* 10, e66393. <https://doi.org/10.7554/eLife.66393>
- Wolf, J.C., Wheeler, J.R., 2018. A critical review of histopathological findings associated with endocrine and non-endocrine hepatic toxicity in fish models. *Aquat. Toxicol.* 197, 60–78. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.01.013>
- Wolf, M.J., Adili, A., Piotrowitz, K., Abdullah, Z., Boege, Y., Stemmer, K., Ringelhan, M., Simonavicius, N., Egger, M., Wohlleber, D., Lorentzen, A., Einer, C., Schulz, S., Clavel, T., Protzer, U., Thiele, C., Zischka, H., Moch, H., Tschöp, M., Tumanov, A.V., Haller, D., Unger, K., Karin, M., Kopf, M., Knolle, P., Weber, A., Heikenwalder, M., 2014. Metabolic Activation of Intrahepatic CD8⁺ T Cells and NKT Cells Causes Nonalcoholic Steatohepatitis and Liver Cancer via Cross-Talk with Hepatocytes. *Cancer Cell* 26, 549–564. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.09.003>
- Wree, A., Eguchi, A., McGeough, M.D., Pena, C.A., Johnson, C.D., Canbay, A., Hoffman, H.M., Feldstein, A.E., 2014a. NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation and fibrosis. *Hepatol. Baltim. Md* 59, 898–910. <https://doi.org/10.1002/hep.26592>
- Wree, A., McGeough, M.D., Peña, C.A., Schlattjan, M., Li, H., Inzaugarat, M.E., Messer, K., Canbay, A., Hoffman, H.M., Feldstein, A.E., 2014b. NLRP3 inflammasome activation is required for fibrosis development in NAFLD. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 92, 1069–1082. <https://doi.org/10.1007/s00109-014-1170-1>
- Wu, H., Ng, R., Chen, X., Steer, C.J., Song, G., 2016. MicroRNA-21 is a potential link between non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma via modulation of the HBP1-p53-Srebp1c pathway. *Gut* 65, 1850–1860. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308430>
- Wu, H.-M., Ni, X.-X., Xu, Q.-Y., Wang, Q., Li, X.-Y., Hua, J., 2020. Regulation of lipid-induced macrophage polarization through modulating peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity affects hepatic lipid

metabolism via a Toll-like receptor 4/NF- κ B signaling pathway. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 35, 1998–2008. <https://doi.org/10.1111/jgh.15025>

Wu, L., Ru, H., Ni, Z., Zhang, X., Xie, H., Yao, F., Zhang, H., Li, Y., Zhong, L., 2019. Comparative thyroid disruption by o,p'-DDT and p,p'-DDE in zebrafish embryos/larvae. *Aquat. Toxicol.* 216, 105280. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105280>

Wu, M., Xu, H., Shen, Y., Qiu, W., Yang, M., 2011. Oxidative stress in zebrafish embryos induced by short-term exposure to bisphenol A, nonylphenol, and their mixture. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 2335–2341. <https://doi.org/10.1002/etc.634>

Wu, S.M., Shu, L.-H., Liu, J.-H., Chen, C.H., 2017. Anti-oxidative Responses on Hepatic Tissue of Zebrafish (*Danio rerio*) in a Short Duration of Sub-lethal Concentrations of Cadmium Exposure. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 98, 612–618. <https://doi.org/10.1007/s00128-017-2063-0>

X

Xi, Y., Li, H., 2020. Role of farnesoid X receptor in hepatic steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Biomed. Pharmacother.* 121, 109609. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109609>

Xia, J.Y., Holland, W.L., Kusminski, C.M., Sun, K., Sharma, A.X., Pearson, M.J., Sifuentes, A.J., McDonald, J.G., Gordillo, R., Scherer, P.E., 2015. Targeted Induction of Ceramide Degradation Leads to Improved Systemic Metabolism and Reduced Hepatic Steatosis. *Cell Metab.* 22, 266–278. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.06.007>

Xian, Y.-X., Weng, J.-P., Xu, F., 2021. MAFLD vs. NAFLD: shared features and potential changes in epidemiology, pathophysiology, diagnosis, and pharmacotherapy. *Chin. Med. J. (Engl.)* 134, 8–19. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000001263>

Xiao, B., Chen, T.-M., Zhong, Y., 2016. Possible molecular mechanism underlying cadmium-induced circadian rhythms disruption in zebrafish. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 481, 201–205. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.081>

Xiao, X., Zhang, X., Bai, J., Li, J., Zhang, C., Zhao, Y., Zhu, Y., Zhang, J., Zhou, X., 2021. Bisphenol S increases the obesogenic effects of a high-glucose diet through regulating lipid metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *Food Chem.* 339, 127813. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127813>

Xiao, Y., Kim, M., Lazar, M.A., 2020. Nuclear receptors and transcriptional regulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Mol. Metab.* 50, 101119. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101119>

Xiong, X., Wang, X., Lu, Y., Wang, E., Zhang, Z., Yang, J., Zhang, H., Li, X., 2014. Hepatic steatosis exacerbated by endoplasmic reticulum stress-mediated downregulation of FXR in aging mice. *J. Hepatol.* 60, 847–854. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.12.003>

Xu, B., Jiang, M., Chu, Y., Wang, W., Chen, D., Li, X., Zhang, Z., Zhang, D., Fan, D., Nie, Y., Shao, F., Wu, K., Liang, J., 2018. Gasdermin D plays a key role as a pyroptosis executor of non-alcoholic steatohepatitis in humans and mice. *J. Hepatol.* 68, 773–782. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.11.040>

Xu, C.-X., Wang, C., Zhang, Z.-M., Jaeger, C.D., Krager, S.L., Bottum, K.M., Liu, J., Liao, D.-F., Tischkau, S.A., 2015. ARYL HYDROCARBON RECEPTOR DEFICIENCY PROTECTS MICE FROM DIET-INDUCED ADIPOSITY AND METABOLIC DISORDERS THROUGH INCREASED ENERGY EXPENDITURE. *Int. J. Obes.* 2005 39, 1300–1309. <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.63>

- Xu, H., Shao, X., Zhang, Z., Zou, Y., Wu, X., Yang, L., 2013. Oxidative stress and immune related gene expression following exposure to di-n-butyl phthalate and diethyl phthalate in zebrafish embryos. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 93, 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.03.038>
- Xu, P., Liu, A., Li, F., Tinkov, A.A., Liu, L., Zhou, J.-C., 2021. Associations between metabolic syndrome and four heavy metals: A systematic review and meta-analysis. *Environ. Pollut.* 273, 116480. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116480>
- Xu, R., Tao, A., Zhang, S., Deng, Y., Chen, G., 2015. Association Between Patatin-Like Phospholipase Domain Containing 3 Gene (PNPLA3) Polymorphisms and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A HuGE Review and Meta-Analysis. *Sci. Rep.* 5, 9284. <https://doi.org/10.1038/srep09284>
- Xu, Y., Zalzal, M., Xu, J., Li, Y., Yin, L., Zhang, Y., 2015. A Metabolic Stress-inducible miR-34a-HNF4 α Pathway Regulates Lipid and Lipoprotein Metabolism. *Nat. Commun.* 6, 7466. <https://doi.org/10.1038/ncomms8466>

Y

- Yabu, T., Kishi, S., Okazaki, T., Yamashita, M., 2001. Characterization of zebrafish caspase-3 and induction of apoptosis through ceramide generation in fish fathead minnow tailbud cells and zebrafish embryo. *Biochem. J.* 360, 39–47.
- Yamaguchi, K., Yang, L., McCall, S., Huang, J., Yu, X.X., Pandey, S.K., Bhanot, S., Monia, B.P., Li, Y.-X., Diehl, A.M., 2007. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 45, 1366–1374. <https://doi.org/10.1002/hep.21655>
- Yamamoto, Y., Moore, R., Flavell, R.A., Lu, B., Negishi, M., 2010. Nuclear Receptor CAR Represses TNF α -Induced Cell Death by Interacting with the Anti-Apoptotic GADD45B. *PLoS ONE* 5, e10121. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010121>
- Yamazaki, Y., Kakizaki, S., Horiguchi, N., Sohara, N., Sato, K., Takagi, H., Mori, M., Negishi, M., 2007. The role of the nuclear receptor constitutive androstane receptor in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 56, 565–574. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.093260>
- Yan, C., Yang, Q., Gong, Z., 2018. Activation of Hepatic Stellate Cells During Liver Carcinogenesis Requires Fibrinogen/Integrin $\alpha\beta 5$ in Zebrafish. *Neoplasia* 20, 533–542. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2018.02.002>
- Yan, J., Chen, B., Lu, J., Xie, W., 2015. Deciphering the roles of the constitutive androstane receptor in energy metabolism. *Acta Pharmacol. Sin.* 36, 62–70. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.102>
- Yan, S., Wang, J., Dai, J., 2015. Activation of sterol regulatory element-binding proteins in mice exposed to perfluorooctanoic acid for 28 days. *Arch. Toxicol.* 89, 1569–1578. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1322-7>
- Yang, B., Zou, W., Hu, Z., Liu, F., Zhou, L., Yang, S., Kuang, H., Wu, L., Wei, J., Wang, J., Zou, T., Zhang, D., 2014. Involvement of Oxidative Stress and Inflammation in Liver Injury Caused by Perfluorooctanoic Acid Exposure in Mice. *BioMed Res. Int.* 2014, 409837. <https://doi.org/10.1155/2014/409837>
- Yang, O., Kim, H.L., Weon, J.-I., Seo, Y.R., 2015. Endocrine-disrupting Chemicals: Review of Toxicological Mechanisms Using Molecular Pathway Analysis. *J. Cancer Prev.* 20, 12–24. <https://doi.org/10.15430/JCP.2015.20.1.12>
- Yang, W.S., Stockwell, B.R., 2016. Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation. *Trends Cell Biol.* 26, 165–176. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.10.014>

- Yang, Z.-X., Shen, W., Sun, H., 2010. Effects of nuclear receptor FXR on the regulation of liver lipid metabolism in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 4, 741–748. <https://doi.org/10.1007/s12072-010-9202-6>
- Ye, J., Rawson, R.B., Komuro, R., Chen, X., Davé, U.P., Prywes, R., Brown, M.S., Goldstein, J.L., 2000. ER Stress Induces Cleavage of Membrane-Bound ATF6 by the Same Proteases that Process SREBPs. *Mol. Cell* 6, 1355–1364. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00133-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00133-7)
- Yeh, M.M., Brunt, E.M., 2014. Pathological Features of Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 147, 754–764. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.07.056>
- Yesilova, Z., Yaman, H., Oktenli, C., Ozcan, A., Uygun, A., Cakir, E., Sanisoglu, S.Y., Erdil, A., Ates, Y., Aslan, M., Musabak, U., Erbil, M.K., Karaeren, N., Dagalp, K., 2005. Systemic markers of lipid peroxidation and antioxidants in patients with nonalcoholic Fatty liver disease. *Am. J. Gastroenterol.* 100, 850–855. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2005.41500.x>
- Yi, S., Chen, P., Yang, L., Zhu, L., 2019. Probing the hepatotoxicity mechanisms of novel chlorinated polyfluoroalkyl sulfonates to zebrafish larvae: Implication of structural specificity. *Environ. Int.* 133, 105262. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105262>
- Yin, C., Evason, K.J., Maher, J.J., Stainier, D.Y.R., 2012. The bHLH Transcription Factor Hand2 Marks Hepatic Stellate Cells in Zebrafish: Analysis of Stellate Cell Entry into the Developing Liver. *Hepatology* 56, 1958–1970. <https://doi.org/10.1002/hep.25757>
- Yin, X., Zeb, R., Wei, H., Cai, L., 2021. Acute exposure of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) induces immune signal regulation and ferroptosis in oryzias melastigma. *Chemosphere* 265, 129053. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129053>
- Yorita Christensen, K.L., Carr, C., Sanyal, A.J., Gennings, C., 2013. Multiple classes of environmental chemicals are associated with liver disease: NHANES 2003–2004. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 216, 703–709. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2013.01.005>
- Yoshikawa, T., Shimano, H., Amemiya-Kudo, M., Yahagi, N., Hasty, A.H., Matsuzaka, T., Okazaki, H., Tamura, Y., Iizuka, Y., Ohashi, K., Osuga, J.-I., Harada, K., Gotoda, T., Kimura, S., Ishibashi, S., Yamada, N., 2001. Identification of Liver X Receptor-Retinoid X Receptor as an Activator of the Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c Gene Promoter. *Mol. Cell. Biol.* 21, 2991–3000. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.9.2991-3000.2001>
- Younossi, 2019. Non-alcoholic fatty liver disease – A global public health perspective. *J. Hepatology* 70, 531–544. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.10.033>
- Younossi, Z., Henry, L., 2016. Contribution of Alcoholic and Nonalcoholic Fatty Liver Disease to the Burden of Liver-Related Morbidity and Mortality. *Gastroenterology, Commonalities and Distinctions Between Alcoholic and Nonalcoholic Fatty Liver Disease* 150, 1778–1785. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.03.005>
- Younossi, Z.M., 2018. The epidemiology of nonalcoholic steatohepatitis. *Clin. Liver Dis.* 11, 92–94. <https://doi.org/10.1002/cld.710>
- Younossi, Zobair M., Golabi, P., de Avila, L., Paik, J.M., Srishord, M., Fukui, N., Qiu, Y., Burns, L., Afendy, A., Nader, F., 2019. The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *J. Hepatology* 71, 793–801. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.06.021>
- Younossi, Z.M., Koenig, A.B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L., Wymer, M., 2016. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 64, 73–84. <https://doi.org/10.1002/hep.28431>

Younossi ZM, Ratziu V, Loomba R, Rinella M, Anstee QM, Goodman Z, Bedossa P, Geier A, Beckebaum S, Newsome PN, Sheridan D, Sheikh MY, Trotter J, Knapple W, Lawitz E, Abdelmalek MF, Kowdley KV, Montano-Loza AJ, Boursier J, Mathurin P, Bugianesi E, Mazzella G, Olveira A, Cortez-Pinto H, Graupera I, Orr D, Gluud LL, Dufour JF, Shapiro D, Campagna J, Zaru L, MacConell L, Shringarpure R, Harrison S, Sanyal AJ; REGENERATE Study Investigators. Obeticholic acid for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: interim analysis from a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet*. 2019 Dec 14;394(10215):2184-2196. doi: 10.1016/S0140-6736(19)33041-7. Epub 2019 Dec 5. Erratum in: *Lancet*. 2020 Aug 1;396(10247):312. Erratum in: *Lancet*. 2021 Jun 19;397(10292):2336. PMID: 31813633.

Yu, Matsusue, K., Kashireddy, P., Cao, W.-Q., Yeldandi, V., Yeldandi, A.V., Rao, M.S., Gonzalez, F.J., Reddy, J.K., 2003. Adipocyte-specific Gene Expression and Adipogenic Steatosis in the Mouse Liver Due to Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ 1 (PPAR γ 1) Overexpression*. *J. Biol. Chem.* 278, 498–505. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210062200>

Yu, X.-D., Wang, J.-W., 2022. Ceramide de novo synthesis in non-alcoholic fatty liver disease: Pathogenic mechanisms and therapeutic perspectives. *Biochem. Pharmacol.* 202, 115157. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115157>

Yu, Y., Cai, J., She, Z., Li, H., 2018. Insights into the Epidemiology, Pathogenesis, and Therapeutics of Nonalcoholic Fatty Liver Diseases. *Adv. Sci.* 6, 1801585. <https://doi.org/10.1002/advs.201801585>

Zang, L., Maddison, L.A., Chen, W., 2018. Zebrafish as a Model for Obesity and Diabetes. *Front. Cell Dev. Biol.* 6, 91. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00091>

Zarei, M., Barroso, E., Palomer, X., Dai, J., Rada, P., Quesada-López, T., Escolà-Gil, J.C., Cedó, L., Zali, M.R., Molaei, M., Dabiri, R., Vázquez, S., Pujol, E., Valverde, Á.M., Villarroya, F., Liu, Y., Wahli, W., Vázquez-Carrera, M., 2017. Hepatic regulation of VLDL receptor by PPAR β/δ and FGF21 modulates non-alcoholic fatty liver disease. *Mol. Metab.* 8, 117–131. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.12.008>

Z

Zeng, X., Zhu, M., Liu, X., Chen, X., Yuan, Y., Li, L., Liu, J., Lu, Y., Cheng, J., Chen, Y., 2020. Oleic acid ameliorates palmitic acid induced hepatocellular lipotoxicity by inhibition of ER stress and pyroptosis. *Nutr. Metab.* 17, 11. <https://doi.org/10.1186/s12986-020-0434-8>

Zhang, D., Tong, X., VanDommelen, K., Gupta, N., Stamper, K., Brady, G.F., Meng, Z., Lin, J., Rui, L., Omary, M.B., Yin, L., 2017. Lipogenic transcription factor ChREBP mediates fructose-induced metabolic adaptations to prevent hepatotoxicity. *J. Clin. Invest.* 127, 2855–2867. <https://doi.org/10.1172/JCI89934>

Zhang, H., He, J., Li, N., Gao, N., Du, Q., Chen, B., Chen, F., Shan, X., Ding, Y., Zhu, W., Wu, Y., Tang, J., Jia, X., 2019. Lipid accumulation responses in the liver of *Rana nigromaculata* induced by perfluorooctanoic acid (PFOA). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 167, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.120>

Zhang, J., Sun, P., Kong, T., Yang, F., Guan, W., 2016. Tributyltin promoted hepatic steatosis in zebrafish (*Danio rerio*) and the molecular pathogenesis involved. *Aquat. Toxicol.* 170, 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.11.028>

Zhang, W., Li, J., Wei, X., Wang, Q., Yang, J., Hou, H., Du, Z., Wu, X., 2021. Effects of dibutyl phthalate on lipid metabolism in liver and hepatocytes based on PPAR α /SREBP-1c/FAS/GPAT/AMPK signal pathway. *Food Chem. Toxicol.* 149, 112029. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112029>

Zhang, W., Shen, X., -yue, Zhang, Wen-wen, Chen, H., Xu, W., Wei, W., 2017. Di-(2-ethylhexyl) phthalate could disrupt the insulin signaling pathway in liver of SD rats and L02 cells via PPAR γ . *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 316, 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.12.010>

- Zhang, X., Li, C., Gong, Z., 2014. Development of a Convenient In Vivo Hepatotoxin Assay Using a Transgenic Zebrafish Line with Liver-Specific DsRed Expression. *PLoS ONE* 9, e91874. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091874>
- Zhang, Y., Breevoort, S.R., Angdisen, J., Fu, M., Schmidt, D.R., Holmstrom, S.R., Kliewer, S.A., Mangelsdorf, D.J., Schulman, I.G., 2012. Liver LXR α expression is crucial for whole body cholesterol homeostasis and reverse cholesterol transport in mice. *J. Clin. Invest.* 122, 1688–1699. <https://doi.org/10.1172/JCI59817>
- Zhang, Y., Han, L., He, Q., Chen, W., Sun, C., Wang, X., Chen, X., Wang, R., Hsiao, C.-D., Liu, K., 2017. A rapid assessment for predicting drug-induced hepatotoxicity using zebrafish. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 84, 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2016.12.002>
- Zhang, Y., Repa, J.J., Gauthier, K., Mangelsdorf, D.J., 2001. Regulation of Lipoprotein Lipase by the Oxysterol Receptors, LXR α and LXR β *. *J. Biol. Chem.* 276, 43018–43024. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107823200>
- Zhang, Y., Wang, S., Zhao, T., Yang, L., Guo, S., Shi, Y., Zhang, X., Zhou, L., Ye, L., 2019. Mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP) promoted lipid accumulation via JAK2/STAT5 and aggravated oxidative stress in BRL-3A cells. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 184, 109611. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109611>
- Zhao, F., Wang, H., Wei, P., Jiang, G., Wang, W., Zhang, X., Ru, S., 2018. Impairment of bisphenol F on the glucose metabolism of zebrafish larvae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 165, 386–392. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.017>
- Zhao, Y., Zhang, K., Giesy, J.P., Hu, J., 2015. Families of Nuclear Receptors in Vertebrate Models: Characteristic and Comparative Toxicological Perspective. *Sci. Rep.* 5, 8554. <https://doi.org/10.1038/srep08554>
- Zhao, Z., Ji, K., Shen, X., Zhang, W., Wang, R., Xu, W., Wei, W., 2019. Di(2-ethylhexyl) phthalate promotes hepatic fibrosis by regulation of oxidative stress and inflammation responses in rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 68, 109–119. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.03.008>
- Zheng, Q., Martin, R.C., Shi, X., Pandit, H., Yu, Y., Liu, X., Guo, W., Tan, M., Bai, O., Meng, X., Li, Y., 2020. Lack of FGF21 promotes NASH-HCC transition via hepatocyte-TLR4-IL-17A signaling. *Theranostics* 10, 9923–9936. <https://doi.org/10.7150/thno.45988>
- Zheng, X., Dai, W., Chen, X., Wang, K., Zhang, W., Liu, L., Hou, J., 2015. Caffeine reduces hepatic lipid accumulation through regulation of lipogenesis and ER stress in zebrafish larvae. *J. Biomed. Sci.* 22. <https://doi.org/10.1186/s12929-015-0206-3>
- Zheng, Z., Zhang, C., Zhang, K., 2010. Role of unfolded protein response in lipogenesis. *World J. Hepatol.* 2, 203–207. <https://doi.org/10.4254/wjh.v2.i6.203>
- Zhou, D., Chen, Y.-W., Zhao, Z.-H., Yang, R.-X., Xin, F.-Z., Liu, X.-L., Pan, Q., Zhou, H., Fan, J.-G., 2018. Sodium butyrate reduces high-fat diet-induced non-alcoholic steatohepatitis through upregulation of hepatic GLP-1R expression. *Exp. Mol. Med.* 50, 157. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0183-1>
- Zhou, J., Febbraio, M., Wada, T., Zhai, Y., Kuruba, R., He, J., Lee, J.H., Khadem, S., Ren, S., Li, S., Silverstein, R.L., Xie, W., 2008. Hepatic Fatty Acid Transporter Cd36 Is a Common Target of LXR, PXR, and PPAR γ in Promoting Steatosis. *Gastroenterology* 134, 556-567.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.11.037>
- Zhou, J., Xu, Y.-Q., Guo, S.-Y., Li, C.-Q., 2015. Rapid analysis of hypolipidemic drugs in a live zebrafish assay. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 72, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2014.12.002>
- Zhou, J., Zhai, Y., Mu, Y., Gong, H., Uppal, H., Toma, D., Ren, S., Evans, R.M., Xie, W., 2006. A Novel Pregnane X Receptor-mediated and Sterol Regulatory Element-binding Protein-independent Lipogenic Pathway. *J. Biol. Chem.* 281, 15013–15020. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511116200>

- Zhu, L., Baker, R.D., Baker, S.S., 2015. Gut microbiome and nonalcoholic fatty liver diseases. *Pediatr. Res.* 77, 245–251. <https://doi.org/10.1038/pr.2014.157>
- Zhu, L., Baker, S.S., Gill, C., Liu, W., Alkhoury, R., Baker, R.D., Gill, S.R., 2013. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: A connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology* 57, 601–609. <https://doi.org/10.1002/hep.26093>
- Zhu, Q.-L., Li, W.-Y., Zheng, J.-L., 2018. Life-cycle exposure to cadmium induced compensatory responses towards oxidative stress in the liver of female zebrafish. *Chemosphere* 210, 949–957. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.095>
- Zhu, X., Owen, J.S., Wilson, M.D., Li, H., Griffiths, G.L., Thomas, M.J., Hiltbold, E.M., Fessler, M.B., Parks, J.S., 2010. Macrophage ABCA1 reduces MyD88-dependent Toll-like receptor trafficking to lipid rafts by reduction of lipid raft cholesterol. *J. Lipid Res.* 51, 3196–3206. <https://doi.org/10.1194/jlr.M006486>
- Zhu, X.-Y., Xia, H.-G., Wang, Z.-H., Li, B., Jiang, H.-Y., Li, D.-L., Jin, R., Jin, Y., 2020. In vitro and in vivo approaches for identifying the role of aryl hydrocarbon receptor in the development of nonalcoholic fatty liver disease. *Toxicol. Lett.* 319, 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.10.010>
- Zhu, Y., Yang, D., Duan, X., Zhang, Y., Chen, D., Gong, Z., Liu, C., 2021. Perfluorooctane sulfonate promotes doxycycline-induced liver tumor progression in male Krasv12 transgenic zebrafish. *Environ. Res.* 196, 110962. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.110962>
- Zhu, Y., Zhao, Yuanyuan, Chai, X.-X., Zhou, J., Shi, M.-J., Zhao, Yurong, Tian, Y., Wang, X.-M., Ying, T.-X., Feng, Q., Sheng, J., Luo, C., 2022. Chronic exposure to low-dose cadmium facilitated nonalcoholic steatohepatitis in mice by suppressing fatty acid desaturation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 233, 113306. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113306>
- Zon, L.I., Peterson, R.T., 2005. In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 35–44. <https://doi.org/10.1038/nrd1606>

ANNEXE

Tableau S1 : Modèles NAFLD de poisson-zèbre induits par l'alimentation

<p>Suralimentation/régime hypercalorique (150 calories/jour) (Oka et al., 2010; Tainaka et al., 2011)</p>	<p>Augmentation d'IMC, hypertriglycémie, stéatose, dérégulation des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique tels que SREBP1c, PPARα/γ, LXRα et leptine. A long terme, mise en évidence que les femelles en âge de reproduction sont protégées du développement de la fibrose induite par ce régime, comparées aux femelles âgées et aux mâles (Turola et al., 2015). De manière comparable aux observations chez l'homme, le statut reproducteur et le taux d'oestrogènes sont associés à un niveau d'inflammation plus faible.</p>
<p>Régime HFD (59% matière grasse à base de jaune d'œuf) (Dai et al., 2015; Imran et al., 2018; Landgraf et al., 2017)</p>	<p>Accumulation des TG hépatiques et du cholestérol, dérégulation du métabolisme des lipides associée à la lipolyse, à l'inflammation et au stress du RE.</p>
<p>Régime riche en cholestérol (Régime normal + 2,5/5% de cholestérol) (Dai et al., 2015; Ma et al., 2019)</p>	<p>Accumulation de TG hépatiques et de cholestérol, stéatose macrovésiculaire associée à l'augmentation des gènes de la LDN (sreb1, fasn). Progression vers des stades NASH de par l'induction d'un stress oxydant (production d'ERO, diminution de l'activité de SOD et augmentation du MDA), d'un stress du RE, d'une inflammation (expressions élevées des cytokines tnfa, il1-β, il6) et du déclenchement de la fibrose</p>
<p>Régime riche en AGS (palmitate) (Régime normal + 8% de palmitate → 33% matière grasse) (Park et al., 2019b)</p>	<p>Stéatose hépatique associée à l'activation du stress du RE et du stress oxydant</p>
<p>Régime riche en AGPI ω6 / faible en AGPI ω3 (Riche en acide arachidonique) (Adam et al., 2019, 2017)</p>	<p>Stéatose hépatique induite par des modifications épigénétiques (méthylation de l'ADN) chez les parents et la descendance, dérégulation des gènes du métabolisme lipidique chez la progéniture, induction de stress oxydant et de peroxydation lipidique</p>
<p>Régime riche en Fructose (régime normal + 2/4% de fructose) (Ferrari et al., 2018; Sapp et al., 2014)</p>	<p>Stéatose hépatique associée au développement de l'inflammation, du stress du RE, de perturbations mitochondriales, médié par l'activation de la voie mTOR</p>

Tableau S2 : Modèles mutants et transgéniques développés pour l'étude des NAFLD

Modèles mutants				
Nom	Gène muté et fonction	Phénotype	Mécanismes	Références
Mutant foie gras	Mutation <i>trpc11</i> - Impliqué dans le trafic vésiculaire entre le RE et l'appareil de Golgi	Stéatose hépatique Stress du RE	Mutant présentant des hépatocytes hypertrophiés et une dégénérescence nucléaire des hépatocytes et qui développe une stéatose et une hépatomégalie. L'utilisation de ce mutant foigr a permis de mettre en évidence un stress du RE en raison d'une réponse UPR sur-activée impliquée dans la pathogénèse des NAFLD Les poissons foigr présentent la plupart des caractéristiques de la NASH des mammifères, à l'exception de l'inflammation.	(Cinaroglu et al., 2011; Howarth et al., 2014; Sadler et al., 2005; Vacaru et al., 2014)
Mutant gonzo	Mutation <i>mbtps1</i> (<i>membrane bound transcription factor protease 1</i>) – impliqué dans le clivage et l'activation de SREBP au niveau de l'appareil de Golgi	Stéatose hépatique Stress du RE	Mutant résistant à la stéatose. L'utilisation de ce mutant a permis d'identifier que l'activation SREBP et l'induction du stress du RE étaient des mécanismes impliqués dans le développement de la stéatose	(Passeri et al., 2009)
Mutant hi559	Mutation <i>cditp</i> (<i>CDP-diacylglycerol-inositol 3-phosphatidyltransferase</i>) – Impliqué dans la synthèse du phosphatidylinositol	Stéatose hépatique Stress du RE Mort cellulaire	L'utilisation de ce mutant a permis de faire le lien entre le défaut de synthèse de phospholipide (phosphatidylinositol) et le stress du RE dans la promotion de la stéatose. Les mutants hi559 présentent une stéatose macrovésiculaire, un ballonnement des hépatocytes et une nécroapoptose. La morphologie des mitochondries apparaît anormale	(Thakur et al., 2011)
Mutant red moon (rmn)	Mutation <i>slc16a6a</i> – Transporteur nécessaire à la sécrétion du β -hydroxybutyrate (corps cétonique) pendant le jeûne	Stéatose hépatique induite par le jeûne	Cette mutation entraîne une augmentation des TG hépatiques, mais pas du cholestérol. L'utilisation de ce modèle a été utile pour identifier les AGPI comme potentiels inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase, étape limitante de la biosynthèse de cholestérol	(Hugo et al., 2012; Karanth et al., 2013)
Mutant <i>slc7a3a</i>	Mutation <i>slc7a3a</i> – Transporteur d'arginine impliqué dans la	Stéatose hépatique	Cette mutation induit une stéatose par diminution de la synthèse d'oxide nitrique et diminution de la voie de	(Gu et al., 2014)

	synthèse de monoxyde d'azote et la biogénèse mitochondriale	induite par le jeûne	signalisation AMPK-PPAR α régulant l'oxydation mitochondriale des AG	
Mutant gmps	Mutation gmps (<i>guanosine monophosphate synthase</i>) – Impliqué dans la synthèse de GTP et GDP et l'activité de Rac1 (régulateur des NADPH oxydases)	Stéatose hépatique Diminution des ERO	Mutation gmps entraîne une diminution des ROS via l'inhibition de l'activité de Rac1 et l'accumulation de GL hépatiques. L'identification de ce mutant a mis en évidence que l'augmentation de la production d'ERO entraînait une protection contre la stéatose.	(Nussbaum et al., 2013)
Mutants ducttrip	Mutation ahcy (<i>S-adenosylhomocystéine hydrolase</i>) – impliqué dans le métabolisme de la méthionine	Stéatose hépatique Inflammation	Cette mutation induit une stéatose hépatique associée à un dysfonctionnement mitochondrial. Le mutant induit une expression augmentée des gènes TNF α et PPAR γ via un mécanisme épigénétique (défaut de méthylation)	(Matthews et al., 2009)
Mutants cnr1 / cnr2	Mutation cnr1/cnr2 – récepteurs des cannabinoïdes impliqués dans la régulation de l'appétit et le métabolisme des lipides	Stéatose hépatique	Ces mutants ont permis d'identifier des rôles distincts des cnr dans la pathogénèse des NAFLD (mutants cnr2 sensibles à la stéatose / mutants cnr1 protégés de la stéatose). L'utilisation de ces mutants a permis d'identifier que la dérégulation de la signalisation endocanninoïde entraîne des altérations du métabolisme de la méthionine et du métabolisme des lipides responsables de la stéatose.	(Liu et al., 2016)
Mutant kdsr	Mutation kdsr (<i>3-ketodihydrosphingosine reductase</i>) – Enzyme clé de la synthèse <i>de novo</i> des sphingolipides	Stéatose Stress du RE Stress oxydant	La mutation kdsr entraîne un stress du RE et un stress oxydant médiés par l'accumulation de sphingolipides (S1P) induit par la surexpression compensatoire de la sphingosine kinase 2 (sphk2). Cette étude a été l'une des premières à mettre en évidence le métabolisme des sphingolipides et le développement de dommages hépatiques	(Park et al., 2019a)
Modèles transgéniques				
Transgène	Lignée transgénique	Phénotype	Mécanisme	
gankyrin	<i>tg(fabp10a:GFP-gank)</i> Protéine gankyrin hépatique (impliquée dans la prolifération et la tumorigénèse du CHC), couplée au fluorochrome GFP	Stéatose Apoptose Stress oxydant	La protéine gankyrine induit une stéatose hépatique caractérisée par l'augmentation d'expression des gènes lipogénique (<i>srebp-1c</i> , <i>ppary</i> et <i>c/ebpα</i>), l'augmentation de la synthèse d'AGL ainsi que l'initiation de l'apoptose et du stress oxydant (peroxydation lipidique,	(Her et al., 2011)

			production d'ERO). Les mécanismes révèlent l'augmentation de l'expression de miRs hépatiques impliqués dans le métabolisme des lipides (miR-16, miR-27b, miR122 et miR126)	
miR27b	<i>tg(-2.8fabp10a:mCherry-miR-27b-SP)</i> miR27b hépatique, couplé au fluorochrome mCherry	Stéatose	La déplétion en miR27b l'accumulation de lipides hépatiques <i>via</i> l'augmentation des gènes lipogéniques (pparg, srebp-1c)	(Hsu et al., 2017)
HBx	<i>tg(-2.8fabp10a:HBV.HBx-GFP)</i> Protéine hépatique du virus de l'hépatite B, couplée au fluorochrome GFP	Stéatose Inflammation	L'expression de la protéine HBx induit l'accumulation de lipides hépatiques en augmentant la LDN (via l'augmentation de C/EBP- α , SREBP1 et ChREBP) ainsi qu'une inflammation lobulaire	(Shieh et al., 2010)
Yin yang 1 (YY1)	<i>tg(fabp10a:EGFP-YY1)</i> Facteur de transcription à doigt de zinc hépatique, couplé au fluorochrome GFP	Stéatose Stress oxydant	La surexpression de YY1 induit l'accumulation de lipides hépatiques par l'augmentation d'expression des gènes lipogénique (C/EBP- α , PPAR γ , SREBP-1c) et l'inhibition de CHOP-10, dérégulant la différenciation des adipocytes Augmentation du stress oxydant et de la lipotoxicité hépatique	(Her et al., 2013)
LXR	<i>tg(actb2:EGFP-nr1h3)</i> Récepteur LXR, couplé au fluorochrome GFP	Stéatose	La surexpression globale de lxr induit la stéatose, mais la surexpression de lxr intestinal supprime la stéatose causée par un régime HFD en perturbant le transport des lipides vers le foie	(Cruz-Garcia and Schlegel, 2014)
FGFR	<i>tg(lfabp:dnfgfr1-egfp)</i> Récepteur du facteur de croissance des fibroblastes hépatique, couplé au fluorochrome GFP	Stéatose Cholestase	La répression du récepteur de fgf entraîne un gonflement des hépatocytes au stade larvaire et une stéatose hépatique et cholestase au stade adulte. Cette étude confirme l'importance de la signalisation de fgf dans l'homéostasie hépatique	(Tsai et al., 2013)
CBR1	<i>tg(-2.8fabp10a:Tet^{off}-CB1R:2A:eGFP)</i> Récepteur des cannabinoïdes 1 hépatique, couplé au fluorochrome GFP	Stéatose	La régulation positive du récepteur cannabinoïde spécifique du foie (cbr1) induit l'accumulation de lipides hépatiques par l'induction de la LDN <i>via</i> la régulation de srebp-1c	(Pai et al., 2013)
bHLH	<i>tg(hand2:GFP)</i> Facteur de transcription bHLH (Hand2) marqueur des cellules étoilées, couplé au fluorochrome GFP	Fibrose	Mise en évidence que les cellules étoilées hépatiques s'activent et sécrètent de la matrice extracellulaire à l'origine du développement de la fibrose dans la NAFLD	(Howarth et al., 2013; Yin et al., 2012)

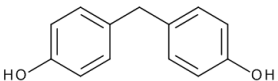
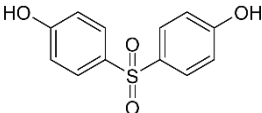
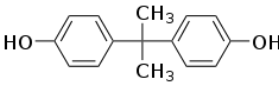
Tableau S3 : Etudes de l'impact des PE dans les NAFLD portant sur le modèle du poisson-zèbre.

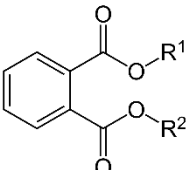
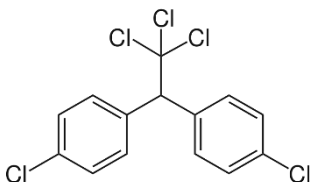
PE	Stade du poisson-zèbre	Concentration Durée d'exposition	Phénotype	Accumulation de GL/TG	Mécanisme d'action dans la NAFLD	Références
TBT	Adulte	10-50ng/L 20jpf-9mpf	Stéatose	x	↗ adipogénèse (ppary) ; ↗ lipogénèse hépatique (srebp-1c, acc, fasn)	(Lyssimachou et al., 2015)
	Larve	1nM 9-14jpf	Stéatose	x	Perturbation métabolisme lipidique <i>via</i> une altération du rythme circadien	(Kopp et al., 2017)
PFOS	Adulte	0.5µM 8hpf-150jpf	Stéatose	Oui (histologie)	dysfonctions mitochondriales (↘ taux ATP hépatique) ; ↘ puis ↗ β-oxydation (mécanisme compensatoire) ; ↘ export des AG <i>via</i> les VLDL Mécanismes médiés par l'activation des récepteurs nucléaires (lxr, rara, rxrgb, nr1/2)	(Cheng et al., 2016)
	Adulte	0.5µM 8hpf-180jpf	Stéatose	Oui (dosage)	Altération du métabolisme lipidique chez le mâle et la descendance (↗ LXR, insr, lepa ; ↘ dgat1b, apoA1)	(Cui et al., 2017)
	Adulte	1µM Pendant 21 jours	Stéatose	Oui (histologie)	↘ export, effets médiés par inhibition de PPARγ ; altération du microbiote intestinal	(Wang et al., 2022)
	Adulte	500µg/L 90jpf-100jpf	CHC	x	Progression tumorale hépatique	(Zhu et al., 2021)
	Embryon/Larve	500µg/L 4hpf-120hpf	Stéatose	x	Perturbation métabolisme lipidique	(Dong et al., 2021)
	Embryon/Larve	16-64µM 3hpf-168hpf	Diabète	x	Dysfonctions pancréatiques	(Sant et al., 2017)
	Larve	0.5mg/L 4hpf-192hpf	Stéatose	x	Altération protéines de transport des lipides	(Shi et al., 2009)
	Larve	0.5µg/L 0hpf – 6jpf	NASH	Oui (coloration)	Inflammation ; fibrose ; cirrhose ; médié par stress du RE	(Fai Tse et al., 2016)
	Larve	1µM 6hpf- 7jpf	Stéatose	Oui (histologie+ dosage)	↗ synthèse (acc) ; ↗ β-oxydation (acox1, acadm) ; mécanismes <i>via</i> activation PPARα	(Yi et al., 2019)
	Larve/juvénile	250µg/L 14jpf-84jpf	Stéatose	Oui (histologie)		(Du et al., 2009)
Larve	1mg/L 48hpf-120hpf	Stéatose	x	Perturbation métabolisme lipidique et du système immunitaire	(Martínez et al., 2019b)	
PFOA	Adulte	0.1-1mg/L 28 jours		x	Dysfonctions mitochondriales (↗ perméabilité de la membrane mitochondriale, ↘ OXPPOS, ↘ taux ATP hépatique, ↗ production ERO)	(Hagenaars et al., 2013)
BPA	Embryon/larve	0.1-4mg/L 2-5jpf	Obésité Stéatose	X	Perturbation métabolisme des lipides/du glucose	(Martínez et al., 2020b)
	Embryon	4-8mg/L 2-6jpf	Stéatose	x	Rétention du sac vitellin	(Martínez et al., 2020a)
	Embryon/Larve	0.1-100µg/L 4hpf-168hpf	NASH	x	Stress oxydant (↗ production ERO, peroxydation lipidique) ; ↘ enzymes antioxydantes	(Wu et al., 2011)
	Larve	200µg/L (876nM) 6-120hpf	Stéatose NASH	Oui (coloration + dosage)	↗ PPARg et CEBPα ; ↗ lipogénèse ; ↗ transport des lipides ; ↘ β-oxydation	(Sun et al., 2020)

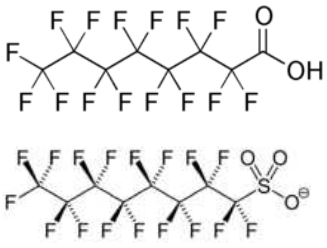
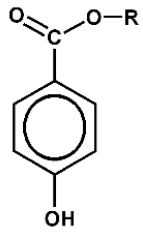
					Inflammation et stress du RE	
	Adulte	100µg/L = 438.6nM 6 mois pendant 48h	Stéatose	Oui (histologie)	↗ synthèse lipides hépatiques <i>via</i> perturbation du système endocannabinoïde	(Martella et al., 2016)
	Adulte	100nM- Pendant 3 semaines	Stéatose	x	Dysfonctions mitochondriales ; Modification épigénétique <i>via</i> dérégulation des miR	(Renaud et al., 2017)
	Adulte	200µg/L 120hpf-90jpf	Obésité Stéatose	Oui (histologie + dosage)		(Sun et al., 2020)
	Adulte	100µg/L-2000µg/L	Stéatose NASH	Oui (histologie + dosage)	↗ lipogénèse (fas, srebp1c, dgat2, fatp1, cd36, fabp1a); inflammation (il1, il6, nfkb) ; stress oxydant (↘ SOD, ↗ MDA, ↗ peroxydation lipidique)	(Sun et al., 2019)
	Adulte	5-20µg/L Pendant 21 jours	Stéatose	x	Faibles doses : stockage des TG et favorise la synthèse d'AG (↗ srebp1c, acat2, cebpa, fabp11a, ↘ ppara et dgat2, ↘ synthèse de TG) Fortes doses : ↗ la LDN et la synthèse de cholestérol (↗ asn, srebf2, apoA4b, ApoA1, fabp11a, ↘ srebf1, acat2, cebpa, dgat2)	(Santangeli et al., 2018)
	Lignée cellulaire hépatique de poisson-zèbre	20-500µM pendant 24h	Stéatose NASH	Oui (dosage)	Stress oxydant (↗ production ERO) ; ↗ AGS lipotoxique, ↘ AGI	(Marqueño et al., 2021)
	Adulte	20µg/L Pendant 21 jours	Stéatose	Oui (histologie)	Perturbation du système endocannabinoïde	(Forner-Piquer et al., 2018)
	Adulte	20-500µg/L Pendant 28 jours	Obésité Stéatose	Oui (histologie et dosage)	Perturbation du système endocannabinoïde (activation cb1)	(Tian et al., 2021)
	Adulte	1-10µM Pendant 30jours	NASH	x	↘ tolérance au glucose ; stress oxydant ; inflammation (il1β, tnfa, il6, lepa, fgf21)	(Belser et al., 2022)
BPS	Larve	1-100µg/L 2hpf-15jpf	Obésité Stéatose	Oui (coloration + dosage)	Activation PPARg/RXRα ; ↗ LDN hépatique (acc, fasn, agpat4) ; ↘ export des AG	(Wang et al., 2018)
	Embryon/Larve	1-100µg/L Pendant 5hpf-15jpf	Athero- sclerose	x	Inflammation (recrutement des macrophages) ; ↗ oxLDL (lipoprotéines oxydés) ; Activation des PPARs	(Wang et al., 2022)
	Larve mais effet à l'âge adulte	1-1000µg/L 2hpf-120jpf	Stéatose	Oui (histologie + dosage)	↘ srebp1 et ppara ; ↘ synthèse AG ; ↘ β-oxydation ; ↗ synthèse TG (agpat4, dgat2)	(Wang et al., 2019)
	Larve mais effet à l'âge adulte	1-100µg/L 2hpf-120jpf	Stéatose NASH Fibrose	Oui (histologie + dosage)	↗ lipogénèse hépatique ; activation réponse UPR, stress du RE ; inflammation ; apoptose ; fibrose	(Qin et al., 2020)
BPF	Embryon/ Juvénile	0.5µg/L 2hpf- 60jpf	Stéatose	Oui (histologie + dosage)	Perturbation du métabolisme intestinal (inflammation, activation transport des lipides et absorption, réponse immunitaire)	(Mu et al., 2022)
	Larve	10, 100µg/L 96hpf-144hpf	Insullino- résistance Hyper- glycémie	x		(Zhao et al., 2018)
DBP	Embryon/Larve	5-500µg/L 4hpf-96hpf	NASH	x	Stress oxydant (↗ production ERO, peroxydation lipidique) ;	(Xu et al., 2013)

					↑ réponse immunitaire (infy, il1β, tnfa)	
DEHP	Adulte	0.02, 0.2, 2µg/L Pendant 7jours	Stéatose	x	↑ PPARα, SREBP et CB1	(Migliarini et al., 2011)
	Adulte	5.8nM Pendant 21jours	Stéatose	x	Perturbations facteurs de transcriptions FOXA2, FOXA3, métabolisme des acides aminés, métabolisme des lipides et lipoprotéines, métabolisme des AG, TG et corps cétoniques	(Huff et al., 2018)
	Adulte	HFD + DEHP 3g/kg pendant 60jours	Obésité	x	Activation de ppara	(Buerger et al., 2019)
MEHP	Larve	200µg/L 6hpf – 96hpf - 120hpf	Stéatose	Oui (histologie+ coloration)	Perturbation de la voie de signalisation nrf2 (diminution gstp)	(Sant et al., 2021b)
	Lignée cellulaire hépatique de poisson-zèbre	14.37-125mg/L Pendant 24h	NASH	Oui (coloration)	Stress oxydant (↑ production ERO, ↑ enzymes antioxydantes : SOD, GPx, GST) ; Stress du RE	(Park et al., 2020)
Cd	Embryon/ Juvénile	2.5-5µg/L 1jpf-105jpf	Stéatose	Oui (histologie)	Absence de stress oxydant	(Zhu et al., 2018)
	Embryon	12-24µM 4hpf – 4 semaines	Stéatose	Oui (histologie+ dosage)	Stress oxydant (↑ production d'ERO, peroxydation lipidique) ; Inflammation (↑ Infiltration de cellules inflammatoires)	(Kim et al., 2018)
	Adulte	5-25µg/L Pendant 30 jours	Stéatose	Oui (histologie+ coloration)	↑ Lipogénèse (fasn g6pd, me, acaca); stress oxydant (↑ production d'ERO, ↓ enzymes antioxydantes : SOD, GPx, COX, ↑ peroxydation lipidique) ; dysfonctions mitochondriales (↓ activité mitochondriale, ↓ synthèse d'ATP) ; mitophagie	(Pan et al., 2018)
	Adulte	5-20µg/L Pendant 48jours	NASH	x	Stress oxydant (↑ production ERO, peroxydation lipidique) ; stress du RE ; apoptose hépatique	(Hu et al., 2022)
	Adulte	1.78µM pendant 6h	NASH	x	Stress oxydant (↑ production ERO, peroxydation lipidique) ; ↑ compensatoire des enzymes antioxydantes (gpx, sod, cat) ; ↑ caspase 3	(Wu et al., 2017)
	Adulte	5ppm 72hpf-96hpf	Perturbation métabolique	x	Perturbation du rythme circadien	(Xiao et al., 2016)
Methylparaben	Embryon	50mg/L 4hpf-120hpf	NASH	x	Stress oxydant (↑ peroxydation lipidique, ↓ activité GST et des niveaux d'oxyde nitrique) ; apoptose	(Ateş et al., 2018)
	Adulte	1-10µg/L pendant 28jours	Stéatose NASH	Oui (coloration)	↑ Lipogénèse hépatique (ppara, srebp1c) Stress oxydant (↑ production ERO, ↓ enzymes antioxydantes CAT, GSH, LPO)	(Hu et al., 2022)
Propylparaben	Embryon/Larve	1-2mg/L 3hpf-96hpf	Obésité	Oui (histologie)	Rétention du sac vitellin, ↓ phospholipase A2	(Perugini et al., 2020)

Tableau S4 : Liste et caractéristique des 10 PE utilisés dans le projet Oberon

	Substances chimiques	Source d'exposition	Exposition humaine (Concentration urinaire)	Mode d'exposition	Métabolisme
Agents plastifiants	Bisphénols (BPA, BPS, BPF)	<ul style="list-style-type: none"> Utilisés à très grande échelle comme monomères des polycarbonates et des résines époxydes, dans les plastiques et en particulier les revêtements en contact avec des aliments (boîtes de conserves, canettes, bouteilles, Tupperware) Utilisés sous forme de monomère libre comme agent révélateur d'impression des papiers thermiques (tickets de caisse, billet d'avion) <p>BPA Interdit par l'UE dans la fabrication des biberons (2013) et de revêtement de denrées alimentaires (2015) → BPS et BPF utilisés en remplacement du BPA BPA : Classé réprotoxique classe 1B (CIRC)</p> <div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: center;">    </div>	<p><i>Données issues de la cohorte ESTEBAN-2019</i></p> <p>BPA Adulte : 1.97µg/L (max 105.45µg/L) Enfant : 2.26µg/L</p> <p>BPS Adulte : 0.384µg/L (max 332.62µg/L) Enfant : 0.444µg/L - (max 125.4µg/L)</p> <p>BPF Adulte : 0.230µg/L (max 34.71µg/L) Enfant : 0.263µg/L (max 23.63µg/L)</p>	<p>Par ingestion principalement (80% par voie orale) <i>via</i> l'alimentation en raison de la migration des bisphénols provenant des contenants alimentaires</p> <p>Par voie cutanée <i>via</i> papiers thermiques, cosmétiques</p>	<p>Rapidement métabolisé et éliminé (temps de ½ vie : 5,3h) par voie urinaire mais exposition quotidienne provoque une imprégnation constante dans les liquides et tissus humains (urines, sang, plasma, lait maternel, bioaccumulation dans le foie, le pancréas et le tissu adipeux)</p> <p>Métabolisé par glucuronidation</p>

	<p>Phtalates (DEHP, DBP)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Plastifiants, additifs ajoutés aux matières plastiques pour améliorer leur souplesse, élasticité, résistance aux chocs. Particulièrement intégrés dans les PVC (polychlorure de vinyle) • Présent dans les cosmétiques (fabrication shampoings, parfums, déodorants, vernis à ongles) • Jouets en plastiques, Revêtements de denrées alimentaires et de boissons, Poches de perfusion • Forte imprégnation dans l'environnement <p>DEHP et DBP interdits dans les emballages plastiques en contact avec l'alimentation et dans la fabrication des jouets (2014-2015)</p> <p>Classés réprotoxique classe 1B (CIRC)</p> 	<p><i>Données issues de la cohorte ESTEBAN-2019</i></p> <p>DEHP : Adulte : 17.6µg/L Enfant: 27.2µg/L</p>	<p>Par Ingestion : <i>via</i> l'alimentation en raison de la migration des phtalates dans les denrées alimentaires riche en graisse, <i>via</i> jouets des jeunes enfants</p> <p>Par voie cutanée : <i>via</i> les cosmétiques, jouets</p> <p>Par inhalation dans une moindre mesure</p>	<p>Rapidement métabolisé par le foie et éliminé (temps de ½ vie : de 24h à 3/5jours), mais bioaccumulation dans le foie, et imprégnation constante dans les liquides et tissus humains (urines, sang, plasma, lait maternel)</p> <p>Métabolisé par glucuronidation. Principaux métabolites du DEHP est le MEHP et du DBP est le MBP</p>
<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">Insecticide organochlorés</p>	<p>DDT (métabolite DDE)</p>	<p>DDT insecticide interdit mais continue d'être utilisé dans les pays tropicaux pour lutter contre le paludisme, persistant dans l'environnement</p> <p>DDE principal métabolite du DDT, possède les mêmes propriétés chimiques et physiques</p> <p>DDT classé cancérigène classe 2A (CIRC)</p> 	<p><i>Données issues de la cohorte ESTEBAN-2019</i></p> <p>Enfants : 129.3ng/L-104.6ng/L pour le DDE (dans le sérum)</p> <p>Adulte : 908.4ng/L-181.9ng/L (dans le sérum)</p>	<p>Par ingestion <i>via</i> alimentation contaminée principalement aliments riches en graisses (viande, poisson, produits laitiers)</p> <p>Par inhalation dans les zones d'utilisation du DDT et les poussières domestiques</p>	<p>Composé persistant (DDT : temps de ½ vie 2 à 15 ans dans les sols, 4 à 6 ans chez l'Homme ; DDE : Temps de ½ vie: 7 à 8 ans)</p> <p>Lentement métabolisé et lipophile. Accumulation dans le tissu adipeux, passage de la barrière placentaire, présence dans le lait maternel</p> <p>DDT métabolisé en DDE par CYP450, photolyse ou biodégradation bactérienne</p>

Composés perfluorés	PFOA, PFOS	<p>Principalement utilisés dans les revêtements, les textiles, les emballages alimentaires, cosmétiques ; composés amphiphiles, stabilité chimique et thermique</p> <p>Utilisation réglementée mais persistante</p> <p>Classés cancérigènes du groupe 2B (CIRC)</p> 	<p><i>Données issues de la cohorte ESTEBAN-2019</i></p> <p>PFOA Adultes : 2.08µg/L Enfants : 1.56µg/L</p> <p>PFOS Adultes : 4.03µg/L Enfants : 2.22µg/L</p>	<p>Par ingestion via l'alimentation (poissons) et eau contaminée, ou <i>via</i> matériaux de cuisson en Téflon</p> <p>Par inhalation d'air pollué, d'incinération des déchets industriels ou de poussières domestiques</p>	<p>Composés persistants (Temps de ½ vie : entre 2 et 8 ans)</p> <p>Accumulation dans les organes, principalement dans le foie, mais aussi dans le cerveau, rein, poumons, et dans les fluides biologiques (sang, lait maternel) ; passage de la barrière placentaire</p>
Cosmétiques	Parabène (Méthyl-parabène, Ethyl-parabène, Butyl-Parabène, Propyl-Parabène, Benzyl-Parabène)	<p>Utilisé en tant qu'antibactérien synthétique dans les cosmétiques, shampoings, dentifrices, et savons</p> <p>Règlementation européenne interdit l'utilisation de 5 parabènes et abaisse les seuils de concentrations des butyl- et propyl-parabènes à 0.14% du produit final.</p> 	<p><i>Données issues de la cohorte ESTEBAN-2019</i></p> <p>Butyl-parabène: 0.5µg/L Méthyl-parabène : 43.9µg/L</p>	<p>Par voie cutanée via les cosmétiques</p> <p>Par inhalation : <i>via</i> émission de vapeurs de vernis, colle</p> <p>Par ingestion</p>	<p>Rapidement métabolisé et éliminé par les urines (temps de ½ vie d'environ 12h) Retrouvé dans les fluides biologiques (sérum, urine liquide séminale)</p> <p>Métabolite principale : acide p-hydroxybenzoïque (Abbas et al., 2010; Darbre and Harvey, 2008)</p>
Métaux lourds	Cadmium,	<p>Utilisé comme agent anti-corrosion et dans l'industrie (alliages écrans de TV, piles, électrodes, pigments pour peintures, constituants de matériels électriques, batteries, semi-conducteurs) ainsi que dans l'agriculture (engrais phosphatés). Relargué dans l'environnement lors des processus de traitements des déchets, de métallurgie, et dans l'agriculture</p> <p>Polluant ubiquitaire retrouvé dans tous les écosystèmes (sols, végétaux, animaux, eaux)</p> <p>Chlorure de cadmium classé en tant que cancérigène catégorie 1B (CIRC)</p>	<p><i>Données issues de la cohorte ESTEBAN-2019</i></p> <p>Adulte : 0.43µg/L (0.54µg/ fumeurs / 0.37µg/L non-fumeurs) Enfants : 0.28µg/L - 1.53µg/L</p>	<p>Par ingestion via l'alimentation (légumes, fruits de mers, poissons, céréales) et l'eau contaminée</p> <p>Par inhalation <i>via</i> le tabagisme ou via la pollution aérienne des industries</p>	<p>Composés persistants : (Temps de ½ vie : 10 à 20 ans) excrétion très lente via les urines</p> <p>Bioaccumulation dans le foie et les reins (par ingestion), rétention pulmonaire (par inhalation)</p>

Liste des publications et des communications

Publications :

- **Le Mentec H**, Monnier E, Legrand A, Monvoisin C, Lagadic-Gossmann D, Podechard N
A new in-vivo zebrafish bioassay evaluating liver steatosis identifies DDE as a steatogenic endocrine disruptor, partly through SCD1 regulation. En revision dans *International Journal of Molecular Sciences*

- Bernal K, Touma C, Erradhouani C, Boronat-Belda T, Gaillard L, Al Kassir S, **Le Mentec H**, Martin-Chouly C, Podechard N, Lagadic-Gossmann D, Langouet S, Brion F, Knoll-Gellida A, Babin PJ, Sovadinova I, Babica P, Andreau K, Barouki R, Vondracek J, Alonso-Magdalena P, Blanc E, Kim MJ, Coumoul X.

Combinatorial pathway disruption is a powerful approach to delineate metabolic impacts of endocrine disruptors. *FEBS Lett.* 2022

- Heindel JJ, Howard S, Agay-Shay K, Arrebola JP, Audouze K, Babin PJ, Barouki R, Bansal A, Blanc E, Cave MC, Chatterjee S, Chevalier N, Choudhury M, Collier D, Connolly L, Coumoul X, Garruti G, Gilbertson M, Hoepner LA, Holloway AC, Howell G 3rd, Kassotis CD, Kay MK, Kim MJ, Lagadic-Gossmann D, Langouet S, Legrand A, Li Z, **Le Mentec H**, Lind L, Monica Lind P, Lustig RH, Martin-Chouly C, Munic Kos V, Podechard N, Roepke TA, Sargis RM, Starling A, Tomlinson CR, Touma C, Vondracek J, Vom Saal F, Blumberg B.

Obesity II: Establishing causal links between chemical exposures and obesity. *Biochemical Pharmacology*, 2022

- Kassotis CD, Vom Saal FS, Babin PJ, Lagadic-Gossmann D, **Le Mentec H**, Blumberg B, Mohajer N, Legrand A, Munic Kos V, Martin-Chouly C, Podechard N, Langouët S, Touma C, Barouki R, Kim MJ, Audouze K, Choudhury M, Shree N, Bansal A, Howard S, Heindel JJ.

Obesity III: Obesogen assays: Limitations, strengths, and new directions. *Biochemical Pharmacology*, 2022

- Imran M, Chalmel F, Sergent O, Evrard B, **Le Mentec H**, Legrand A, Dupont A, Bescher M, Bucher S, Fromenty B, Huc L, Sparfel L, Lagadic-Gossmann D, Podechard N.

Transcriptomic analysis in zebrafish larvae identifies iron-dependent mitochondrial dysfunction as a possible key event of NAFLD progression induced by benzo[a]pyrene/ethanol co-exposure. *Cell Biology and Toxicology*, 2022.

Communications :

Orales

- Congrès STCM 2021 – Vivre ou mourir : Quelle fin choisir – Septembre 2021 -Webinar
Hélène Le Mentec, Emmanuelle Monniez, Antoine Legrand, Maëlle Bescher, Dominique Lagadic-Gossmann et Normand Podechard

La larve de poisson zèbre comme modèle pour cribler de potentiels perturbateurs endocriniens impliqués dans l'initiation et la progression pathologique des maladies non alcooliques du foie.

- Congrès STCM 2022 – Jeunes Toxicologues– Mars 2022 - Webinar

Hélène Le Mentec, Emmanuelle Monniez, Antoine Legrand, Maëlle Bescher, Dominique Lagadic-Gossmann et Normand Podechard

La larve de poisson zèbre comme modèle pour cribler de potentiels perturbateurs endocriniens impliqués dans l'initiation et la progression pathologique des maladies non alcooliques du foie

- Meeting annuel Obéron – Mai 2022 – Barcelone

Présentation des résultats au consortium du projet Obéron

Posters

- International Congress of Toxicology (ICT 2022) – 18-21 Septembre 2022 – Maastricht

Hélène Le Mentec, Emmanuelle Monniez, Antoine Legrand, Maëlle Bescher, Dominique Lagadic-Gossmann and Normand Podechard,

Development of bioassays using the zebrafish larva model to screen endocrine disruptors for their involvement in the pathological progression of NAFLD (DOI : 10.1016/j.toxlet.2022.07.645)

- VIIIème Colloque de génomique fonctionnelle du foie (GFF) 2020 – Liver Week 2020 – Rennes

Hélène Le Mentec, Maëlle Bescher, Rémy Le Guevel, Dominique Lagadic-Gossmann and Normand Podechard

Zebrafish larva-based bioassays to screen the involvement of endocrine disruptors in NAFLD

- Meeting cluster EURION – Janvier 2021- Webinar

Hélène Le Mentec, Maëlle Bescher, Rémy Le Guevel, Dominique Lagadic-Gossmann and Normand Podechard

Zebrafish larva-based bioassays to screen the involvement of endocrine disruptors in NAFLD

- 11ème journée Recherche – Janvier 2022 – webinar

Hélène Le Mentec, Emmanuelle Monniez, Antoine Legrand, Maëlle Bescher, Dominique Lagadic-Gossmann and Normand Podechard

Zebrafish larva-based bioassays to screen the involvement of endocrine disruptors in non-alcoholic fatty liver diseases

- Journées Scientifique 2021– Décembre 2021 – Brest

Hélène Le Mentec, Emmanuelle Monniez, Antoine Legrand, Maëlle Bescher, Dominique Lagadic-Gossmann and Normand Podechard

Development of bioassays using the zebrafish larva model to screen endocrine disruptors for their involvement in pathological progression of non-alcoholic fatty liver diseases

Titre : Impact des perturbateurs endocriniens sur la stéatose hépatique et sa progression pathologique

Mots clés : maladies non alcooliques du foie, perturbateurs endocriniens, poisson-zèbre, bio-essais

Résumé : Les maladies non alcooliques du foie (NAFLD) sont les pathologies hépatiques les plus répandues dans le monde, touchant environ 25% de la population générale. Le premier stade des NAFLD est la stéatose hépatique, un état bénin défini par l'accumulation de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes. Cependant, environ 20% des personnes atteintes de stéatose développent un stade pathologique, la stéatohépatite, caractérisée par la mort cellulaire des hépatocytes associée à une inflammation du foie. Récemment, l'exposition aux perturbateurs endocriniens (PE), auxquels l'homme est continuellement exposé, a été décrite pour avoir un impact sur ces maladies. Dans ce contexte, le but de cette thèse a été de développer deux tests biologiques, basés sur la microscopie à fluorescence et utilisant le modèle *in vivo* de la larve de poisson-zèbre, permettant d'estimer l'impact des PE sur le développement (1^{er} test,

"Steatosis Assay on Zebrafish" – StAZ) et la progression des NAFLD (2^{ème} test, "Steatohepatitis Assay on Zebrafish" – ShAZ). Le StAZ, nous a permis d'identifier le DDE, comme puissant stéatogène. D'un point de vue mécanistique, il a été mis en évidence que l'induction de la désaturase *scd1* par le DDE était en partie responsable de la stéatose et d'un remodelage membranaire (fluidification des membranes hépatiques). Le ShAZ vise à identifier les PE capables de favoriser l'évolution vers la stéatohépatite en mesurant des marqueurs caractéristiques de cette pathologie par microscopie (*i.e.* mort cellulaire, stress oxydant et inflammation). Au total, ces études devraient permettre d'identifier les PE impliqués dans l'initiation et la progression pathologique des NAFLD, ainsi que de mieux comprendre leurs modes d'action, et ce, afin de permettre une meilleure réglementation des PE.

Title : Impact of endocrine disruptors on hepatic steatosis and its pathological progression

Keywords : non-alcoholic fatty liver diseases, endocrine disruptors, zebrafish model, bioassay

Abstract : Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) are the most common form of liver diseases in the world, affecting around 25% of the general population. The first stage of NAFLD is the steatosis, a benign condition defined by the accumulation of lipid droplets in liver. Around 20% of people with steatosis develop the pathological stage, steatohepatitis, characterized by cell death of hepatocytes associated with hepatic inflammation. Recently, exposure to endocrine disruptors (EDs), to which humans are continuously exposed, has been described to impact these diseases. In this context, the aim of this thesis was to develop two biological tests, based on fluorescence microscopy and using the *in vivo* model of the zebrafish larva, thereby allowing to estimate the impact of EDs on the induction (1st test, "Steatosis Assay on

Zebrafish" - StAZ) and progression of NAFLD (2nd test, "Steatohepatitis Assay on Zebrafish" - ShAZ).

The StAZ allowed us to identify DDE as a potent steatogenic compound. Looking for underlying mechanisms, it has been shown that *scd1* desaturase induction by DDE was partly responsible for steatosis and membrane remodeling (fluidization of hepatic cell membranes). The ShAZ, aims at identifying EDs capable of promoting the progression to steatohepatitis by measuring characteristic markers of this pathology by microscopy (*i.e.* cell death, oxidative stress and inflammation). Overall, these studies should allow the identification of EDs involved in the initiation and pathological progression of NAFLD, as well as a better understanding of their modes of action, in order to allow a better regulation of EDs.