

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

---

**Présentée et soutenue par :**  
**Céline LUKOWICZ**

le jeudi 19 juillet 2018

**Titre :**

Rôle dimorphique du récepteur nucléaire CAR dans la régulation de l'homéostasie énergétique et des perturbations métaboliques induites par un mélange de pesticides

---

**École doctorale et discipline ou spécialité :**

ED BSB : Pharmacologie

**Unité de recherche :**

INRA Toulouse - Centre de recherche en Toxicologie Alimentaire (ToxAlim) - UMR 1331

**Directeur/trice(s) de Thèse :**

Laïla LAKHAL & Nicolas LOISEAU

**Jury :**

Professeur Philippe VALET - Président du jury

Professeur Béatrice DESVERGNE - Rapporteur

Professeur Xavier COUMOUL - Rapporteur

Docteur Dominique LAGADIC - Examineur

## REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier la **Région Occitanie**, l'**École d'Ingénieurs de Purpan** et le département de **Santé Animale** de l'**Institut National de Recherche Agronomique** pour avoir assuré le financement de mes trois années de thèse et sans qui ce travail n'aurait pu aboutir.

J'adresse toute ma reconnaissance à l'ensemble des membres du jury :

Je remercie le **Professeur Philippe Valet**, directeur de l'École Doctorale Biologie Santé Biotechnologies de Toulouse, pour avoir accepté de présider le jury de soutenance de ce travail de thèse et pour l'intérêt témoigné pour ces travaux.

J'adresse ma profonde reconnaissance au **Professeur Béatrice Desvergne**, de l'Université de Lausanne et au **Professeur Xavier Coumoul**, de l'Université de Paris Descartes, pour avoir accepté de relire mes travaux de thèse en qualité de rapporteurs et pour la participation à mon jury de soutenance. J'adresse mes sincères remerciements pour leurs investissements, leurs attentions ainsi que leurs bienveillances dans l'appréciation de ces travaux.

J'exprime toute ma gratitude au **Docteur Dominique Lagadic-Gossman**, de l'Institut de recherche en santé, environnement et travail de Rennes, pour avoir accepté d'être présente en qualité d'examinatrice lors de ma soutenance de thèse, merci pour l'intérêt témoigné pour ce travail de thèse.

J'adresse ma profonde gratitude à mes directeurs de thèse, le **Docteur Laila Mselli-Lakhal** et le **Docteur Nicolas Loiseau**. Merci d'avoir encadré ces travaux avec bienveillance et de m'avoir fait pleinement confiance.

Je tiens à remercier grandement le **Docteur Hervé Guillou** et les **Docteurs Laurence Payrastra et Sandrine Ellero-Simatos**, pour leurs investissements, leurs bienveillances, tout ce qu'ils m'ont transmis, leurs discussions scientifiques, leurs encouragements et leurs amitiés. Vous allez me manquer.

Je remercie l'ensemble des membres passés et actuels de l'équipe de Toxicologie Intégrative et Métabolisme de l'INRA Toxalim à Toulouse pour leur aide, leurs échanges et leurs conseils ainsi que tous les bons moments passés ensemble et sans qui ces travaux n'auraient pu être réalisés. Merci les filles: **Alexandra Montagner, Marion Régnier, Sarra Smati** et **Anne Fougerat** pour votre soutien dans les moments difficiles, pour votre aide, vos conseils et votre amitié très importante pour moi. Un merci



tout particulier à Marion ma compagne d'infortune dans les moments difficiles, binôme de bureau et durant toute cette thèse, merci pour tout, notre aventure scientifique à Toxalim s'arrête mais pas notre amitié.

Un merci particulier à **Arnaud Polizzi** et **Frédéric Lasserre** pour vos conseils, votre bienveillance et pour tous les bons moments passés ensemble que je n'oublierai pas. Un grand merci également à **Anaïs Jankoviac, Thibault Cot, Edwin Fouché, Géraldine Michel, Manon Nevès, Amaury Di Angelo, Séverine Sudre, Lorraine Smith, Sharon Barretto, Tiffany Fougeray, Alain Marrot, Fabiana Oliviero, Quentin Ponchon, Léonie Dopavogui.**

Merci également à **Colette Bétoulières** et **Caroline Sommer** pour leurs soutiens sans faille et indispensable à l'animalerie.

J'exprime mes sincères remerciements et ma reconnaissance aux collaborateurs de l'équipe, avec qui j'ai eu l'occasion d'échanger et d'interagir scientifiquement: Professeur **Walter Wahli** de l'Université de Lausanne, **Pierre Gourdy** et **Françoise Lenfant** de l'Institut des maladies métaboliques et cardiovasculaires (INSERM)-U 1048 à Toulouse, **Isabelle Castan** de l'Institut des maladies métaboliques et cardiovasculaires (INSERM)-U 1048 à Toulouse, **Jean-Marc Pascussi** de l'Institut de Génomique Fonctionnelle à Montpellier, **Talal Al Saati** de la Plateforme d'histopathologie expérimentale (INSERM-US006) du Centre régional d'exploration fonctionnelle et ressources expérimentales à Toulouse, **Yannick Lippi** et **Claire Naylies** du Plateau de Transcriptomique à Toulouse, **Justine Bertrand-Michel** du Plateau de Lipidomique Metatoul à Toulouse, **Laurent Debrauwer** de la Plateforme d'analyse de xénobiotiques, identification et métabolisme à Toulouse.

Mes remerciements vont également aux collègues de l'unité Toxalim: Vincent, Selma, Hervé R, Jeannette, Mélanie, Joëlle, Philippe, Christine, Aurélia, Sylvain, Emilien J. A ceux qui ont été oublié de cette liste veuillez bien m'en excuser.

Enfin, un grand merci aux membres de ma famille pour leur soutien sans faille et leur affection, merci à ma petite sœur Claire, mon grand frère Vincent et à mes parents Christian et Sylvie qui ont contribué à faire qui je suis aujourd'hui, merci je vous aime.

Un grand merci à vous tous !



# Table des matières

PUBLICATIONS .....	5
PUBLICATIONS ASSOCIEES.....	6
COMMUNICATIONS ORALES .....	7
COMMUNICATIONS AFFICHEES.....	8
LISTE DES ABREVIATIONS .....	9
LISTE DES ILLUSTRATIONS .....	14
AVANT-PROPOS .....	17
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	19
Chapitre I : Généralités sur le foie .....	19
I.    Organisation structurelle et fonctionnelle du foie.....	19
I.1.    Anatomie.....	19
I.2.    Circulation sanguine et biliaire .....	19
I.3.    Le lobule hépatique: unité fonctionnelle du foie .....	21
I.4.    Types cellulaires.....	21
II.    Les grandes fonctions hépatiques.....	25
II.1.    Maintien de l'homéostasie énergétique.....	25
II.1.1.    Période postprandiale.....	25
II.1.1.1.    La glycogénogenèse .....	26
II.1.1.2.    La glycolyse .....	26
II.1.1.3.    La voie des pentoses phosphates.....	26
II.1.1.4.    La lipogenèse <i>de novo</i> .....	27
II.1.1.5.    La synthèse des triglycérides .....	27
II.1.1.6.    La cholestérogenèse.....	28
II.1.2.    Période de jeûne.....	29
II.1.2.1.    La glycogénolyse .....	29
II.1.2.2.    La néoglucogenèse .....	29
II.1.2.3.    La $\beta$ -oxydation mitochondriale .....	30
II.1.2.4.    La cétogenèse .....	30
II.1.3.    Principales régulations transcriptionnelles du métabolisme énergétique hépatique....	31
II.1.3.1.    Régulateurs de la glycolyse et de la lipogenèse <i>de novo</i> .....	31
II.1.3.2.    Régulateurs principaux de la néoglucogenèse et $\beta$ -oxydation .....	34
II.1.4.    Régulations hormonales du métabolisme énergétique hépatique .....	35
II.1.4.1.    Les hormones thyroïdiennes.....	35
II.1.4.2.    Les hormones glucocorticoïdes.....	35
II.1.4.3.    Les hormones sexuelles.....	36

## Table des matières

II.2.	Détoxification .....	37
II.2.1.	Les cytochromes P450, principales enzymes de phase I.....	39
II.2.2.	Les enzymes de phase II .....	41
II.2.3.	Dimorphisme sexuel dans l'expression des enzymes de détoxification .....	43
II.3.	Autres fonctions hépatiques .....	44
II.3.1.	Fonction endocrine, synthèse protéique .....	44
II.3.2.	Fonction exocrine, synthèse des acides biliaires.....	45
II.4.	Zonation du métabolisme énergétique et de la détoxification.....	45
III.	Physiopathologie hépatique : la stéatose hépatique non alcoolique.....	48
III.1.	Physiopathogénèse de la stéatose hépatique non alcoolique.....	49
III.1.1.	L'apport exogène <i>via</i> les chylomicrons .....	51
III.1.2.	La lipolyse adipocytaire .....	51
III.1.3.	La lipogenèse <i>de novo</i> .....	53
III.1.4.	L'intestin.....	53
III.2.	Prédisposition génétique .....	54
III.3.	Dimorphisme sexuel .....	55
Chapitre II : Le récepteur nucléaire constitutif aux androstanes: CAR .....		57
I.	Généralités sur les récepteurs nucléaires.....	57
I.1.	Classification et nomenclature .....	57
I.2.	Fonctionnement des récepteurs nucléaires.....	59
I.3.	Rôles physiologiques hépatiques majeurs .....	60
I.3.1.	Maintien de l'homéostasie énergétique .....	60
I.3.2.	Détoxification .....	61
II.	Principales caractéristiques structurales et fonctionnelles du récepteur CAR.....	62
II.1.	Découverte, caractérisation et expression tissulaire.....	62
II.2.	Mécanismes d'activation .....	65
II.2.1.	Activation directe.....	65
II.2.2.	Activation indirecte.....	66
II.3.	Modulations de l'activité de CAR en situation physiologique et physiopathologique .....	67
II.4.	Dimorphisme sexuel dans l'activité de CAR .....	69
II.5.	Dialogue entre CAR et les différents récepteurs nucléaires .....	70
II.5.1.	Dialogue entre CAR et LXR.....	71
II.5.2.	Dialogue entre CAR et PPAR $\alpha$ .....	71
II.5.3.	Dialogue entre CAR et ER .....	71
II.5.4.	Dialogue entre CAR et GR.....	73

## Table des matières

III.	Régulation de la détoxification hépatique par le récepteur nucléaire CAR.....	73
III.1.	Détoxification des xénobiotiques .....	73
III.1.1.	Polluants environnementaux .....	74
III.1.2.	Médicaments .....	76
III.2.	Détoxification des composés endogènes.....	76
III.2.1.	Hormones stéroïdiennes .....	76
III.2.2.	Hormones thyroïdiennes.....	78
III.2.3.	Bilirubine et hème.....	78
III.2.4.	Acides biliaires .....	79
IV.	Régulation du métabolisme énergétique hépatique.....	79
IV.1.	Métabolisme du glucose .....	81
IV.2.	Métabolisme des lipides .....	82
IV.2.1.	Répression du catabolisme des acides gras .....	83
IV.2.2.	Régulation de la lipogenèse <i>de novo</i> hépatique.....	83
IV.3.	Métabolisme du cholestérol et des acides biliaires.....	84
Chapitre III: Les pesticides.....		86
I.	Généralités sur les pesticides.....	86
I.1.	Définitions .....	86
I.1.1.	Les produits phytosanitaires.....	86
I.1.2.	Les biocides.....	87
I.1.3.	Les médicaments vétérinaires .....	87
I.1.4.	Les médicaments à usage humain .....	87
I.2.	Classification des produits phytosanitaires.....	88
I.3.	Autorisation de Mise sur le Marché.....	89
I.3.1.	Tests de toxicité .....	90
I.3.2.	Tests de génotoxicité .....	90
I.3.3.	Tests de cancérogénèse .....	91
I.3.4.	Tests de reprotoxicité et effet sur le développement .....	91
I.4.	Exemple de protocole standardisé pour évaluer la toxicité chronique d'un produit phytosanitaire.....	91
I.5.	Les valeurs toxiques de référence .....	92
I.6.	Utilisations en France.....	93
I.7.	Modes d'expositions de l'Homme aux pesticides .....	94
I.7.1.	Voies d'expositions .....	94
I.7.1.1.	Voie d'exposition cutanée .....	94
I.7.1.2.	Voie d'exposition respiratoire .....	95

## Table des matières

I.7.1.3. Voie d'exposition orale.....	95
I.7.2. Effets des mélanges de pesticides .....	96
II. Pesticides et syndrome métabolique .....	102
II.1. Etudes épidémiologiques .....	102
II.2. Etudes expérimentales.....	104
II.3. Mécanismes d'action des pesticides.....	107
II.3.1. Les récepteurs nucléaires cibles potentiels des pesticides .....	107
II.3.2. Action sur la sécrétion et la réponse à l'insuline .....	108
II.3.3. Action sur la différenciation adipocytaire .....	110
II.3.4. Action sur la fonction thyroïdienne .....	110
II.3.5. Action sur le microbiote intestinal.....	111
ETUDES EXPERIMENTALES.....	113
Chapitre I .....	113
Chapitre II .....	127
Chapitre III .....	169
DISCUSSION .....	213

## PUBLICATIONS

- Activation of the Constitutive Androstane Receptor induces hepatic lipogenesis and regulates Pnpla3 gene expression in a LXR-independent way. Toxicology Applied Pharmacology 2016.  
Marmugi A, **Lukowicz C**, Lasserre F, Montagner A, Polizzi A, Ducheix S, Goron A, Gamet-Payrastre L, Gerbal-Chaloin S, Pascussi JM, Moldes M, Pineau T, Guillou H, Mselli-Lakhal L.
- Metabolic effects of a chronic dietary exposure to a low-dose pesticide cocktail in mice: sexual dimorphism and role of the Constitutive Androstane Receptor. Environmental Health Perspectives 2018.  
**Lukowicz C**, Ellero-Simatos S, Régnier M, Polizzi A, Lasserre F, Montagner A, Lippi Y, Jamin L. E, Martin JF, Naylies C, Canlet C, Debrauwer L, Bertrand-Michel J, Al Saati T, Théodorou V, Loiseau N, Mselli-Lakhal L, Guillou H, Gamet-Payrastre L.
- Constitutive Androstane Receptor deficiency leads to sexually dimorphic disruption of metabolic homeostasis. **Lukowicz C**, et al., article en preparation.
- Impact of pesticides mixtures. Cahiers de nutrition et diététique 2017.  
Gamet-payrastre L, **Lukowicz C**.

## PUBLICATIONS ASSOCIEES

- Liver PPAR $\alpha$  is crucial for whole-body fatty acid homeostasis and is protective against NAFLD. Gut 2016.  
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.
- Insights into the role of hepatocyte PPAR $\alpha$  activity in response to fasting. Molecular Cellular Endocrinology 2017.  
Régnier M, Polizzi A, Lippi Y, Fouché E, Michel G, **Lukowicz C**, Smati S, Marrot A, Lasserre F, Naylies C, Batut A, Viars F, Bertrand-Michel J, Postic C, Loiseau N, Wahli W, Guillou H, Montagner A.
- A Specific ChREBP and PPAR $\alpha$  Cross-Talk Is Required for the Glucose-Mediated FGF21 Response. Cell report 2017.  
Iroz A, Montagner A, Benhamed F, Levavasseur F, Polizzi A, Anthony E, Régnier M, Fouché E, **Lukowicz C**, Cauzac M, Tournier E, Do-Cruzeiro M, Daujat-Chavanieu M, Gerbal-Chalouin S, Fauveau V, Marmier S, Burnol AF, Guilmeau S, Lippi Y, Girard J, Wahli W, Dentin R, Guillou H, Postic C.

## COMMUNICATIONS ORALES

- Congrès de la Société Française d'Endocrinologie, Angers 2015:

Le récepteur nucléaire constitutif aux androstanes (CAR): acteur clé du métabolisme glucido-lipidique.

**Lukowicz C**, Marmugi A, Lasserre F, Montagner A, Polizzi A, Ducheix S, Goron A, Gamet-Payrastre L, Gerbal-Chaloin S, Pascussi JM, Moldes M, Pineau T, Guillou H, Mselli-Lakhal L. \*Prix de la meilleure communication orale

- Congrès de la Société Francophone du Diabète, Lyon 2016:

Le récepteur nucléaire constitutif aux androstanes (CAR): acteur clé du métabolisme glucido-lipidique.

**Lukowicz C**, Marmugi A, Lasserre F, Montagner A, Polizzi A, Ducheix S, Goron A, Gamet-Payrastre L, Gerbal-Chaloin S, Pascussi JM, Moldes M, Pineau T, Guillou H, Mselli-Lakhal L.

- 7th Meeting on Nuclear Receptors, Montpellier 2017:

Constitutive Androstane Receptor deficiency leads to sexually dimorphic obesity, diabetes and hepatic steatosis in aging.

**Lukowicz C**, Régnier M, Lasserre F, Polizzi A, Montagner A, Ellero-Simatos S, Theodorou V, Gamet-Payrastre L, Loiseau N, Guillou H, Mselli-Lakhal L.

-Journées Francophones de Nutrition, Nantes 2017:

La délétion du récepteur nucléaire CAR induit une obésité et un diabète uniquement chez les mâles.

**Lukowicz C**, Régnier M, Lasserre F, Polizzi A, Montagner A, Ellero-Simatos S, Theodorou V, Gamet-Payrastre L, Loiseau N, Guillou H, Mselli-Lakhal L.

## COMMUNICATIONS AFFICHEES

-Journées Francophones de la Nutrition, Montpellier 2017:

L'absence du récepteur CAR induit une obésité et un diabète qui dépendent du genre.

**Lukowicz C**, Régnier M, Lasserre F, Polizzi A, Montagner A, Ellero-Simatos S, Theodorou V, Gamet-Payrastre L, Loiseau N, Guillou H, Mselli-Lakhal L.

- Congrès la Société Francophone du Diabète, Lille 2017:

L'exposition à un mélange de pesticides à faible dose induit obésité et intolérance au glucose in vivo.

**Lukowicz C**, Ellero-Simatos S, Mselli-Lakhal L. Régnier M, Lasserre F, Polizzi A, Montagner A, Lippi Y, Debrauwer L, Theodorou V, Loiseau N, Guillou H, Gamet-Payrastre L.

- Congrès la Société Francophone du Diabète, Lille 2017:

L'absence du récepteur CAR induit une obésité et un diabète qui dépendent du genre.

**Lukowicz C**, Régnier M, Lasserre F, Polizzi A, Montagner A, Ellero-Simatos S, Theodorou V, Gamet-Payrastre L, Loiseau N, Guillou H, Mselli-Lakhal L.

- EMBO workshop, Metabolic disorders and liver cancer, Palma de Mallorca 2017:

Constitutive Androstane Receptor deficiency leads to sexually dimorphic obesity, diabetes and hepatic steatosis in aging.

**Lukowicz C**, Régnier M, Lasserre F, Polizzi A, Montagner A, Ellero-Simatos S, Theodorou V, Gamet-Payrastre L, Loiseau N, Guillou H, Mselli-Lakhal L.

-Congrès de la Fédération Hospitalo-Universitaire impact, Toulouse, 2017:

Constitutive Androstane Receptor deficiency leads to sexually dimorphic obesity, diabetes and hepatic steatosis in aging.

**Lukowicz C**, Régnier M, Lasserre F, Polizzi A, Montagner A, Ellero-Simatos S, Theodorou V, Gamet-Payrastre L, Loiseau N, Guillou H, Mselli-Lakhal L. \* Prix du meilleur poster

- Keystone symposia, Organ crosstalk in obesity and NAFLD, Keystone Colorado USA, 2018:

Constitutive Androstane Receptor deficiency leads to sexually dimorphic obesity, diabetes and hepatic steatosis in aging.

**Lukowicz C**, Régnier M, Lasserre F, Polizzi A, Montagner A, Ellero-Simatos S, Theodorou V, Gamet-Payrastre L, Loiseau N, Guillou H, Mselli-Lakhal L.

## LISTE DES ABREVIATIONS

6-PGL	6-Phosphogluconase
ABCG	ATP-binding cassette sub-family G member
ACAT	Acetyl Coenzyme A acetyltransférase
ACC	Acetyl CoA Carboxylase
ACOX1	Acyl-CoA Oxidase 1
ADI	Admissible Daily Intake
ADME	Absorption, distribution, métabolisme et excrétion
ADN	Acide désoxyribonucléique
AG	Acides Gras
AGPAT	Lysophospholipides acyltransférases
AhR	Aryl hydrocarbon receptor
AKT	Protéine kinase B
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
AMPK	Protéine kinase activée par l'AMP
ANGPTL4	Angopietin-like Protein 4
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire
AR	Androgen receptor
ARfD	Acute Reference Dose
Arnt	Acide ribonucléique de transfert
ASC	Apoptosis-Associated Speck-like protein
ATP	Adénosine Triphosphate
bHLH/LZ	Basic Helix Loop Helix/Leucine Zipper
BPA	Bisphenol A
PBREM	Phenobarbital Response Element Module
C/EBPa	CAAT enhancer binding protein $\alpha$
CA	Acide Cholique
CACT	Carnitine Acylcarnitine Translocase
CAR	Constitutive Androstane Receptor
CBP	cAMP Response element binding Protein
CCRP	Cytoplasmic CAR Retaining Protein
CDCA	Acide Chenodeoxycholique
ChORE	Carbohydrate Response Element
ChREBP	Carbohydrate Response Element Binding Protein
CITCO	6-(4-chlorophenyl)imidazo[2,1-b][1,3]thiazole-5-carbaldehydeO-(3,4-dichlorobenzyl)oxime
CMR	Cancerigène, mutagène, reprotoxique
CPT1a	Carnitine Palmitoyltransferase 1A
CREB	cAMP responsive element binding protein
CYP	Cytochromes P450
DAG	Diacylglycérol
DDE	Dichlorodiphenyldichloroethylene
DDT	Dichlorodiphenyltrichloroethane
DEHP	Diethylhexylphthalate
DGAT	Diacylglycérol acyltransférase

## LISTE DES ABREVIATIONS

DHEA	Déhydroépiandrostérone
DJA	Dose journalière admissible
DJT	Dose journalière tolérable
DR4	Direct Répétitive séquence séparée de 4 nucléotides
DTT	Dithiothréitol
EC	Esters de Cholestérol
EFSA	European Food Safety Authority
EFSA	Autorité européenne de sécurité des aliments
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
Elk1	ETS transcription factor
ELOVL	Elongation of very long chain fatty acids protein
EMX	Enzymes du Métabolisme des Xénobiotiques
EPO	Erythropoietin
ER	Estrogen receptor
EST	Estrogen Sulfotransférase
EXPOPE	Evaluation de l'exposition aux pesticides organophosphorés dans la population générale
F6P	Fructose 6 Phosphate
FADS	Fatty Acid Désaturase
FAO	Food Agriculture Organisation
FAS	Fatty Acid Synthase
FATPs	Fatty Acid transport protein-1
FBPase	Fructose 1,6 phosphatase
FDFT1	Farnesyl Diphosphate Farnesyl Transférase 1
FDPS	Farnesyl Diphosphate Synthase
FGF21	Fibroblast Growth Factor 21
FOXO	Forkhead box transcription factor O1
FXR	Farnesoyl x receptor
G1P	Glucose 1 Phosphate
G6P	Glucose 6 Phosphate
G6PDH	Glucose 6 Phosphate Deshydrogenase
GC	Glucocorticoïde
GCK	Glucokinase
GLUT2	Glucose Transporter 2
GPAT	Glycérol 3 Phosphate Acyltransférase
GR	Glucocorticoid receptor
GRIP1	Glucocorticoid Receptor Interacting Protein-1
GSH	Glutathion
GSK3	Glycogen synthase kinase 3
GST	Glutathion-S-Transférases
HDL	High Density Lipoprotein
HIF1	Hypoxia Inductible Factor
HMG	Hydroxy Methylglutaryl
HMGCR	HMG-CoA reductase
HMGCS	HMG-CoA synthase
HNF4 $\alpha$	Hepatocyte nuclear factor-4

## LISTE DES ABREVIATIONS

Hsp	Heat Shock Protein
IGF1	Insuline-like growth factor
IL6	Interleukin 6
IMC	Indice de masse corporelle
Insig-1	Insulin-induced gene 1
INSIG2A	Insulin Induced Gene
INVS	Institut de veille sanitaire
IRS	Insulin receptor substrate
LBD	Ligand Binding Domain
LCA	Acide Lithocolique
LCAD	Acyl-CoA déshydrogénase à longue chaîne
LD50	Dose létale médiane
LDB	DNA Binding Domain DBD
LDL	Low Density Lipoprotein
LECT2	Leukocyte cell-derived Chemotaxin-2
LHS	Lipase Hormono Sensible
LMR	Limites Maximales de résidus
LOAEL	Lowest Observed Adverse Effect Level
LPA	Acide lysophosphatidique
LPK	Liver Pyruvate Kinase
LPL	Lipoprotein lipase
LPS	Lipopolysaccharides
LSS	Lanosterol synthase
LXR	Liver X receptor
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCA	Acide Muricholique
MCPA	Acide 2-méthyl-4-chlorophénoxyacétique
MDR	Multi Drug Resistance
MEHP	Mono Ethyl Hexil Phthalate
MR	Récepteurs aux Minéralocorticoïdes
Mtorc1	Mammalian Target Of Rapamycin
MTP	Mitochondriale Trifunctional Protein
MVD	Mévalonate diphospho Decarboxylase
MVK	Mévalonate Kinase
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NAFLD	Non Alcoholic Fatty Liver Diseases
NASH	Non Alcoholic Steato Hepatitis
NCoR	Nuclear receptor co repressor
NF-kB	Nuclear factor-kappa B
NK	Natural Killer
NKT	Natural Killer T cell
NOAEL	No Observable Adverse Effect Level
OAT	Organic Anion Transporter
OC	Organochlorés
OCDE	Organisation de coopération et de développement économique
OCT	Organic Cation Transporter

## LISTE DES ABREVIATIONS

OGlcNAc	O-linked B-N-Acetylglucosamine
OGT	O-GlcNAc Transférase
OMS	Organisation mondiale de la santé
OP	Organophosphorés
Ost $\beta$	Organic Solute Transporter
PA	Acide phosphatidique
PC	Poids corporel
PDH	Pyruvate Déshydrogénase
PEP	Phosphoénolpyruvate
PEPCK	Phosphoénolpyruvate carboxykinase
PFK1	Phosphofructokinase
PGC1 $\alpha$	Proliferator Activated Receptor Coactivator 1 $\alpha$
PKA	Protéine kinase A
PL	Phospholipides
PML	Promyelocytic leukemia protein
PNPLA3	Patatin-like Phospholipase domain-containing Protein 3
PP	Périportale
PP	Produits Phytosanitaires
PP2A	Protéine Phosphatase 2A
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptors
PPP1R16A	The membrane subunit of protein phosphatase 1 $\beta$
PV	Périveineuse
PXR	Pregnane X Receptor
RACK1	Receptor For Activated C Kinase 1
RARE	Eléments de Réponse de l'Acide Rétinoïque
RBP4	Retinol Binding Protein 4
RE	Réticule Endoplasmique
RN	Récepteur Nucléaire
Ru5P	Ribose 5 Phosphate
RXR	Retinoid X Receptor
S6K	Ribosomal protein S6 kinase
SAPK	Stress Activated Protein Kinase
SCAP	SREBP Cleavage Activating Protein
SCD	Stéaroyl CoA désaturase
SHBG	Sex Hormone Binding Protein
SHP	Small Heterodimer Partner
SLC	Solute Carriers
SM	Syndrome Métabolique
SMILE	Small Heterodimer Partner Interacting Leucine Zipper Protein
SMRT	Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid Receptor
SOD	Superoxyde Dismutase-3
SQLE	Squalène Epoxidase
SRC1	Steroid Receptor Co-activator 1
SREBP-1C	Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c
SREBP-2	Sterol Regulatory Element Binding Protein 2
STAT5b	Signal Transducer and Activator of Transcription 5B

## LISTE DES ABREVIATIONS

SULT	Sulfotransférases
T3	Triiodothyronine
T4	Thyroxine
TAG	Triacylglycérol
TCPOBOP	1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene
TCPy	3,5,6-trichloro-2-pyridinol
TDI	Tolerable daily intake
TG	Triglycérides
TLR4	Toll Like Receptor 4
TM6SF2	Transmembrane 6 Superfamily 2
TR	Thyroid Receptor
TSH	Thyréostimuline
UDP	Uridine Diphosphate
UE	Union Européenne
UF	Uncertainly Factor
UGTs	UDP-Glucuronyl-Transférases
VDR	Vitamin D receptor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VLDL	Very low density lipoprotein
VTR	Valeurs toxiques de référence
X5P	Xylulose 5 Phosphate

## LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Vascularisation du foie et du lobule hépatique.....	20
Figure 2 : L'unité fonctionnelle du foie, le lobule hépatique.....	22
Figure 3 : Voies métaboliques hépatique contrôlant l'homéostasie glucido-lipidique en période postprandiale ou en période de jeûne.....	24
Figure 4 : Régulation transcriptionnelle en période postprandiale du métabolisme énergétique hépatique.....	32
Figure 5 : Métabolisme des xénobiotiques hépatiques.....	38
Figure 6 : Régulation par l'hormone de croissance de l'expression des gènes hépatiques dépendants du sexe.....	42
Figure 7 : Zonation du métabolisme énergétique et de la détoxification le long de l'axe portal-veineux du lobule hépatique.....	46
Figure 8 : Etiologie de la NAFLD.....	48
Figure 9 : Origines de la stéatose hépatique.....	50
Figure 10 : Action de l'insuline au niveau hépatique et sur les tissus périphériques et mécanismes d'insulino-résistance au cours de la NAFLD.....	52
Figure 11 : Structure commune des récepteurs nucléaires et classification en fonction de leurs capacités à fixer des ligands.....	58
Figure 12 : Activation directe et indirecte du récepteur nucléaire CAR.....	64
Figure 13 : Modulations de l'activité de CAR en condition physiologique et physiopathologique.....	68
Figure 14 : Schéma simplifié du dialogue existant entre CAR et différents récepteurs nucléaires.....	72
Figure 15 : Répression des gènes de la néoglucogenèse par le récepteur nucléaire CAR.....	80
Figure 16 : Implication du récepteur nucléaire CAR dans la régulation du métabolisme lipidique.....	82
Figure 17 : Mécanismes d'action des pesticides favorisant l'apparition de perturbations métaboliques sur différents organes cibles.....	106
Figure 18: Exemple de gènes hépatiques différenciellement exprimés entre mâles et femelles déficients pour le récepteur CAR.....	215
Figure 19: Etude de la réponse immunologique systémique des souris WT et CAR <sup>-/-</sup> .....	216
Figure 20: Dérégulation des gènes et des protéines LC3 en réponse à un jeûne chez les souris mâles CAR <sup>-/-</sup> .....	218
Figure 21: Effet des pesticides seuls ou en mélange sur l'expression des gènes du métabolisme et la voie de signalisation de l'insuline.....	220

## LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 22: Mécanismes possibles de l'effet du mélange de pesticides sur le métabolisme général chez les souris femelles.....	222
Figure 23: Mécanismes possibles de l'effet du mélange de pesticides sur le métabolisme général chez les souris mâles.....	222

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Répartition des 57 Cytochromes P450 en fonction de l'origine de leurs substrats.....	40
Tableau 2 : Gènes spécifiques de chaque sexe classés suivant leurs dépendances pour leurs régulations aux facteurs de transcription STAT5b et HNF4 $\alpha$ .....	44
Tableau 3 : Gènes cibles du récepteur nucléaire CAR impliqués dans les phases de détoxification...	74
Tableau 4 : Polluants environnementaux identifiés comme activateur du récepteur nucléaire CAR.	75
Tableau 5 : Médicaments exerçant une action activatrice ou inhibitrice sur le récepteur nucléaire CAR.....	76
Tableau 6 : Exemple de mode d'action des pesticides suivant leurs cibles biologiques.....	88
Tableau 7 : Principales familles chimiques des pesticides et exemples de molécules associées.....	89

## AVANT-PROPOS

Le syndrome métabolique (SM) est fortement lié à l'obésité et est associé à une augmentation de la morbidité cardiovasculaire. Sa prévalence est en constante augmentation dans les pays industrialisés, elle a augmenté de 32,9% à 34,7% dans la population américaine entre 2004 et 2012 (Aguilar et al., 2015). En France, sa prévalence varie entre 14,6% et 21,1% entre les années 2006 et 2007 (Vernay et al., 2013). Par sa forte prévalence et son évolution, ce syndrome constitue un problème majeur de santé publique. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, le SM se caractérise par la présence d'au moins trois des cinq signes cliniques suivants: une dyslipidémie caractérisée soit par une hypertriglycéridémie soit par des niveaux diminués de HDL-cholestérol, une hypertension, une obésité viscérale et une hyperglycémie à jeun (Huang, 2009; Lam and LeRoith, 2000). Les maladies non alcooliques du foie gras ou « Non Alcoholic Fatty Liver Diseases » (NAFLD) sont considérées comme la composante hépatique du SM et affectent 25 à 30% de la population mondiale (Bellentani, 2017). Les NAFLDs représentent un ensemble de pathologies allant de la simple accumulation de lipides, connue sous le nom de stéatose, à une inflammation en présence ou non de fibrose dite stéatohépatite non alcoolique (également nommée Non Alcoholic Steato-Hepatitis ou NASH), pouvant évoluer en cirrhose et en carcinome hépatocellulaire. Il existe une disparité liée au sexe dans l'apparition de ces maladies. La prévalence du SM est estimée en France à 22,5% chez les hommes et à 18,5% chez les femmes (Junquero and Rival, 2005). La prévalence de la NAFLD est nettement plus importante chez les hommes par rapport aux femmes pré-ménopausées (Ballestri et al., 2017).

L'étiologie de ces pathologies est multifactorielle, le manque d'activité physique et une alimentation trop riche en graisses et en sucres sont les causes majeures. Les facteurs génétiques et environnementaux jouent également un rôle dans le développement de ces troubles métaboliques. En effet, de nombreuses données à la fois épidémiologiques et expérimentales mettent en évidence un rôle des substances chimiques, notamment celles de type perturbateurs endocriniens dans la survenue de ces pathologies (Casals-Casas and Desvergne, 2011; Grün and Blumberg, 2009; Hong et al., 2012; Neel and Sargis, 2011). Ces substances sont qualifiées d'obésogènes environnementaux.

Les mécanismes par lesquels les contaminants contribuent au développement de ces troubles métaboliques sont complexes et restent insuffisamment explorés. L'implication des récepteurs nucléaires dans cet effet obésogène des contaminants environnementaux a été suggérée dans plusieurs études (Chen et al., 2018; Grün and Blumberg, 2009; Li et al., 2012b; Schug et al., 2011). L'activité des 3 isotypes du récepteur PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors) capable de lier des molécules exogènes lipophiles, est modulée par exemple par le Mono-ethyl-hexyl-phthalate (MEHP), un métabolite issu du plastifiant largement répandu, le di-ethyl-hexyl-phthalate (DEHP)

## AVANT-PROPOS

(Desvergne et al., 2009). De nombreux polluants environnementaux (BPA, DDE, chlordecone) ont également été identifiés comme étant des xénoœstrogènes en raison de leur capacité à se lier aux récepteurs aux œstrogènes ( $Er\alpha$  et  $Er\beta$ ) (Delfosse et al., 2014). L'utilisation d'un mélange de contaminants a récemment permis de mettre en évidence une activation synergique du récepteur nucléaire PXR (Pregnane X Receptor) par un mélange binaire comportant un œstrogène de synthèse, le 17- $\alpha$ -éthinyloestradiol et un pesticide de la famille chimique des organochlorés, le trans-nonaclore (Delfosse et al., 2015).

Au niveau hépatique, le récepteur nucléaire Constitutive Androstane Receptor (CAR) présente un intérêt particulier de par son implication à la fois dans la détoxification des xénobiotiques et dans le métabolisme énergétique. Initialement considéré comme un récepteur clé du système de détoxification (Moore et al., 2000a), il est désormais clairement établi comme un acteur de la régulation du métabolisme énergétique (Dong et al., 2009a; Gao et al., 2009; Wada et al., 2009).

Dans le cadre de mes travaux de thèse, nous nous sommes intéressés dans un premier temps aux effets d'une activation pharmacologique du récepteur CAR. Puis nous avons étudié son rôle dans l'homéostasie énergétique au cours du vieillissement de souris déficientes pour le récepteur CAR sur les deux sexes. Enfin, nous avons évalué l'effet obésogène et diabétogène d'un mélange de pesticides et l'implication du récepteur nucléaire CAR dans ces effets.

# ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

## Chapitre I : Généralités sur le foie

Le foie est impliqué dans la plupart des mécanismes vitaux à travers son rôle dans la détoxification et le métabolisme énergétique. Il participe au stockage et à l'utilisation des nutriments, à la synthèse de la plupart des protéines du sang, à la production de la bile ainsi qu'au métabolisme et à l'élimination des polluants environnementaux et des médicaments.

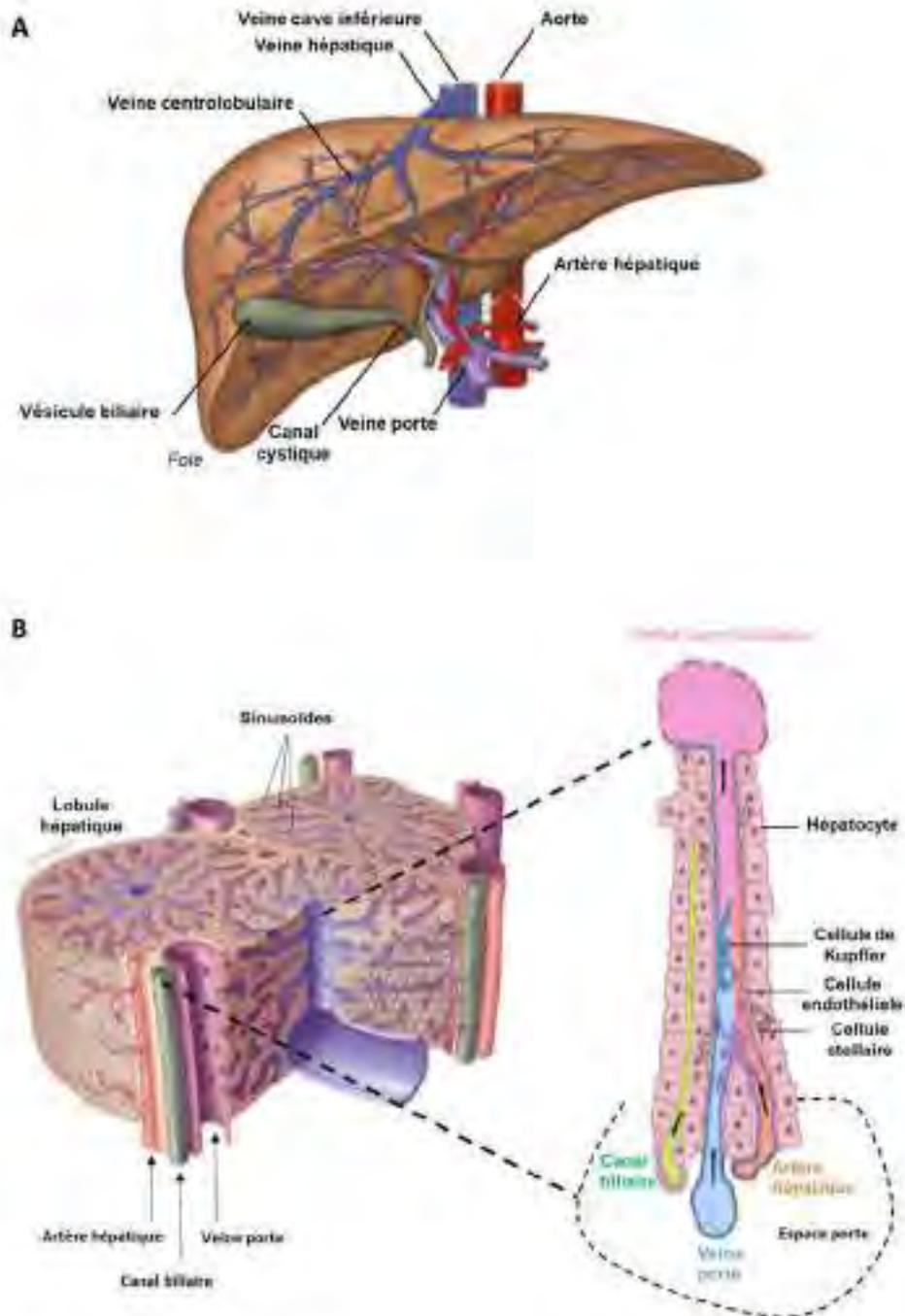
### I. Organisation structurelle et fonctionnelle du foie

#### I.1. Anatomie

Chez l'Homme, le foie pèse environ 1,5kg et représente approximativement 2% du poids de l'organisme, de ce fait c'est le viscère le plus volumineux du corps humain. C'est aussi l'organe le plus densément vascularisé, 1,4 litres de sang le traverse toutes les minutes. La veine porte assure 70 à 80% du débit sanguin hépatique et apporte du sang provenant de la totalité du tube digestif sous-diaphragmatique, du pancréas et de la rate. Les artères hépatiques apportent un sang oxygéné représentant 20 à 30 % du débit total et assurent la vascularisation des voies biliaires. Le foie se compose de 4 lobes: le lobe hépatique droit le plus volumineux, le lobe hépatique gauche, le lobe carré et le lobe caudé situé entre les lobes gauche et droit. Un sillon appelé hile hépatique se situe entre les lobes carré et caudé et permet la communication entre le foie, la veine porte, l'artère hépatique et les voies biliaires. La vésicule biliaire est liée aux lobes hépatiques droit et caudé. Le foie des souris est également composé de 4 lobes: médian, droit, gauche et caudé. Cependant chez cette espèce les lobes sont subdivisés en deux à l'exception du lobe gauche (Malarkey et al., 2005).

#### I.2. Circulation sanguine et biliaire

Le foie est vascularisé par deux vaisseaux sanguins majeurs: la veine porte et l'artère hépatique. Le sang riche en nutriments et en toxines provenant de l'intestin parvient au foie *via* la veine porte. L'artère hépatique provient du cœur et apporte au foie du sang riche en oxygène. Ces deux vaisseaux se divisent ensuite en plusieurs branches pour alimenter les différentes régions hépatiques. Après



**Figure 1: Vascularisation du foie et du lobule hépatique.** A. Le foie est vascularisé par deux vaisseaux sanguins majeurs, la veine porte (provenant de l'intestin) et l'artère hépatique (provenant du cœur). Après avoir irrigué l'ensemble du foie, le sang est évacué par la veine hépatique qui se jette dans la veine cave inférieure. La bile produite par les hépatocytes rejoint la vésicule biliaire via le canal cystique. B. L'espace porte du lobule hépatique est composé d'un canal biliaire, d'une veine porte et de l'artère hépatique rejoignant la veine centrolobulaire.

avoir irrigué l'ensemble des cellules du foie, le sang est évacué par la veine hépatique qui se jette ensuite dans la veine cave inférieure pour retourner au cœur (**Figure 1A**).

La bile produite par les hépatocytes est sécrétée dans les canalicules biliaires pour pouvoir ensuite être collectée et concentrée au niveau de la vésicule biliaire. La bile circule dans le sens opposé à celle du sang, c'est-à-dire de la veine centrolobulaire vers l'espace porte. Des canalicules biliaires, la bile passe dans les canaux de Hering puis dans les canaux biliaires. Les canaux biliaires convergent pour former les canaux extra-hépatiques puis le canal hépatique commun qui rejoint la vésicule biliaire *via* le canal cystique, lieu de stockage de la bile entre les repas. Pendant le repas la bile va être déversée dans le duodénum *via* le canal cholédoque pour permettre la solubilisation et l'absorption des lipides et vitamines sous l'effet de la cholécystokinine, hormone sécrétée par la muqueuse du duodénum (**Figure 1B**).

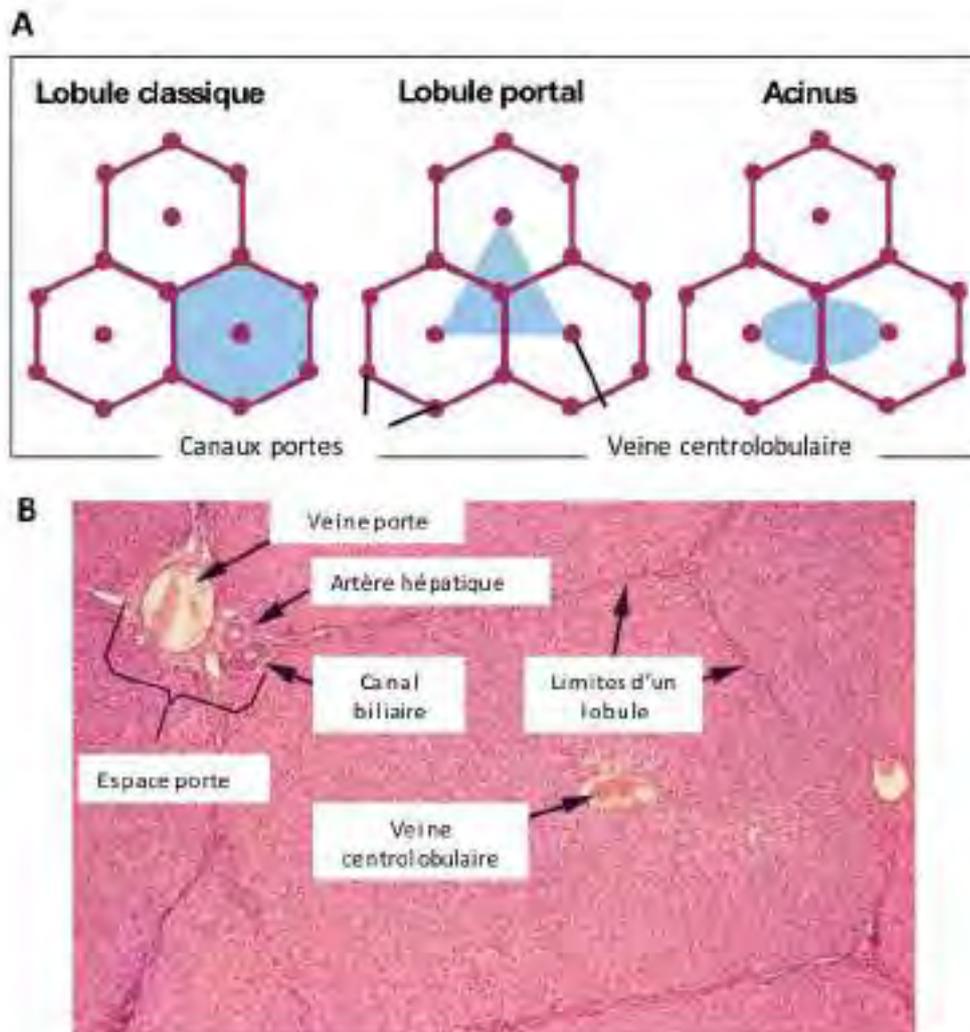
Environ 90% des acides biliaires sont réabsorbés au niveau intestinal et regagnent le foie *via* la veine porte pour être de nouveau déversés dans l'intestin. Cette voie constitue le cycle entéro-hépatique (Zwicker and Agellon, 2013).

### **I.3. Le lobule hépatique: unité fonctionnelle du foie**

Trois types d'unités fonctionnelles du foie ont été décrites: i) le lobule hépatique classique ii) le lobule portal et iii) l'acinus hépatique. Le lobule hépatique classique est l'unité fonctionnelle la plus utilisée et correspond à une structure hexagonale centrée sur une veine centrolobulaire entourée d'environ 6 espaces portes. Les espaces portes sont constitués par une veine porte, l'artère hépatique et un canal biliaire (Kiernan, 1833). Le lobule portal est une unité fonctionnelle centrée sur l'espace porte et entourée de 3 veines centrolobulaires (Mall, 1906). Enfin le concept d'acinus hépatique se base sur le gradient d'oxygène. C'est une structure en losange entre 2 veines centrolobulaires et deux espaces portes (Rappaport et al. 1954) (**Figure 2**).

### **I.4. Types cellulaires**

Le foie est constitué de plusieurs types cellulaires: les hépatocytes, les cellules endothéliales (cellules sinusoidales), les cellules biliaires (ou cholangiocytes), les cellules de Kupffer, les cellules stellaires (ou cellules de Ito) et les cellules lymphocytaires.



**Figure 2: L'unité fonctionnelle du foie, le lobule hépatique. A.** Trois types d'unités fonctionnelles du foie ont été décrites : le lobule classique comportant 6 espaces portes autour de la veine centrolobulaire, le lobule portal centré autour de l'espace porte et entouré de 3 veines centrolobulaires et l'acinus formant une ellipse entre 2 veines centrolobulaires et 2 espaces portes. **B.** Coupe histologique de foie colorée à l'hématoxyline éosine

Les hépatocytes sont le type cellulaire le plus représenté: 60% des cellules totales et 80% de la masse du foie. Ce sont des cellules polygonales, polarisées et organisées en travées. 15% du volume des hépatocytes est occupé par le réticulum endoplasmique lisse et rugueux contenant environ 30 lysosomes et 500 peroxisomes par cellule (Macswen et al., 2003). Une des fonctions de l'hépatocyte est la production de bile, avec une capacité de 15mL/kg/jour pour l'homme (Jones and Deppen, 2018). Avec l'âge la quantité d'hépatocytes diminue et ces hépatocytes présentent également une hypertrophie (Jones and Deppen, 2018).

Les cellules endothéliales constituent la première barrière entre le sang et les hépatocytes. Elles représentent 20% des cellules hépatiques et possèdent des fenestrations permettant d'agir comme un filtre entre le sang et les hépatocytes. Il a été démontré que des altérations de la taille des fenestrations peuvent jouer un rôle dans le développement de la cirrhose (Braet and Wisse, 2002; Elvevold et al., 2004). Ainsi par exemple, si la taille des fenestrations diminue le cholestérol s'accumule dans la circulation sanguine et augmente le risque de développer de l'athérosclérose.

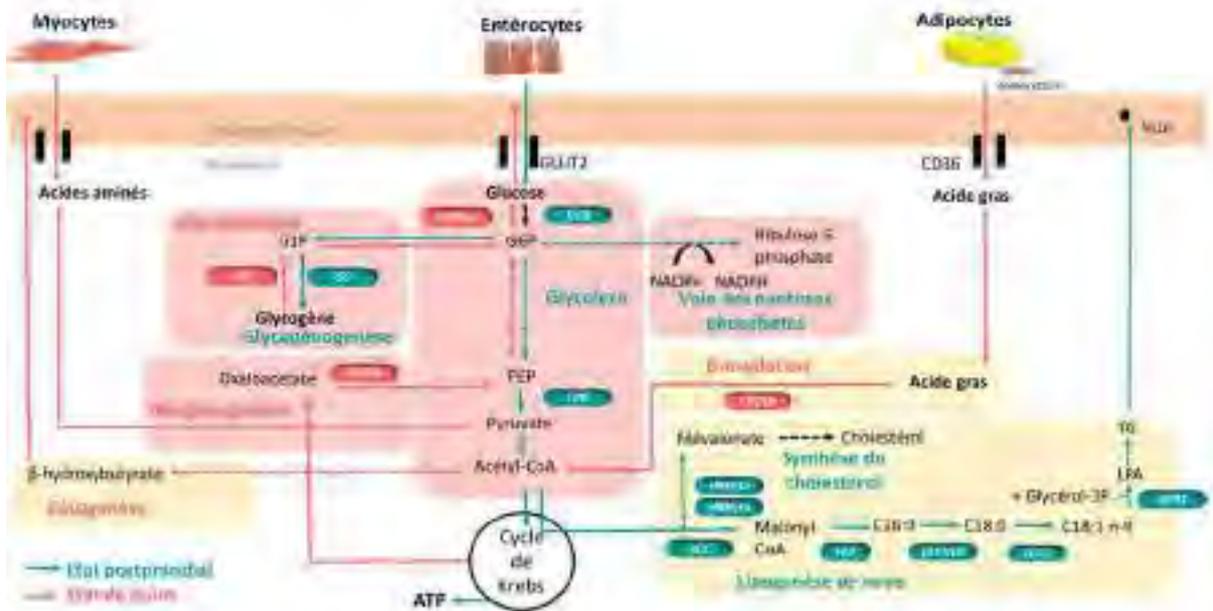
Les cellules biliaires sont des cellules épithéliales rondes formant les canaux biliaires intrahépatiques qui transportent la bile. Les cellules biliaires participent à la formation de la bile dérivée des hépatocytes *via* des régulations hormonales complexes (corticostérone, somatostatine) (Tabibian et al., 2013).

Les cellules de Kupffer sont les macrophages résidents du foie et représentent 15% des cellules hépatiques. Elles sont localisées au niveau des sinusoides, ce qui leur permet de phagocyter efficacement les pathogènes provenant de la circulation portale ou artérielle. Elles jouent un rôle important dans la réponse immunitaire innée. Elles peuvent proliférer localement et assurent principalement la production de cytokines. Elles assurent également l'élimination des érythrocytes vieillissants (Dixon et al., 2013).

Les cellules stellaires, anciennement appelées cellules de Ito, représentent 5% des cellules hépatiques. Elles stockent la vitamine A et produisent les composants de la matrice extracellulaire. Elles sont connues pour jouer un rôle majeur dans la régénération et la fibrogénèse (Mabuchi et al. 2004).

Les cellules lymphocytaires sont représentées par une majorité de NK « Natural Killer » et de NKT « Natural Killer T cell ». Les lymphocytes B et T sont en plus faible proportion (Racanelli and Rehermann, 2006).

La matrice extracellulaire hépatique est constituée de 5 à 10% de collagène. Elle comprend de nombreux composés notamment les métalloprotéases, les glycoprotéines (laminine, fibronectine, vitronectine) et les protéoglycanes comme le sulfate heparane (Macswen et al., 2003).



**Figure 3: Voies métaboliques hépatiques contrôlant l'homéostasie glucido-lipidique en période postprandiale ou en période de jeûne.** En période postprandiale (en bleu vert), le glucose est capté pour être stocké sous forme de glycogène via la glycogénogenèse. La glycolyse, la lipogénèse de novo permettent la formation de triglycérides qui seront exportés via les VLDL. En période de jeûne (en rose), il y a production de glucose via la néoglucogénèse à partir du pyruvate ou à partir du glycogène via la glycogénolyse. Les acides gras provenant de la lipolyse adipocytaire servent de substrats à la β-oxydation et à la cétogenèse.

ACC: acétylCoA carboxylase, C16 :0 : palmitate, C18 :0 : stéarate, C18 :1 : oléate, CD36: cluster of differentiation 36, CPT1α: Carnitine Palmitoyl Transferase 1α, ELOVL6: Elongation of very long chain fatty acids protein 6, FAS: Fatty Acid Synthase, G6Pase: Glucose-6-phosphatase, GCK: Glucokinase, GLUT2: glucose transporter 2, GP: Glycogen Phosphorylase, GPAT: Glycerol-3-phosphate acyltransferase, GS: Glycogen Synthase Kinase, HMGCoA: 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase, HMGCS: hydroxyméthylglutaryl-CoA synthase, LPA: lysophosphatidic acid, LPK: Liver Pyruvate Kinase, PEP: Phosphoenolpyruvate, PEPCK: Phosphoenolpyruvate Carboxykinase, SCD1 : Stearoyl CoA desaturase 1, TG: Triglycérides, VLDL: Very Low Density Lipoprotein

## II. Les grandes fonctions hépatiques

Le foie est impliqué dans de nombreuses fonctions vitales pour l'organisme. Il participe au maintien de l'homéostasie énergétique, à l'élimination des xénobiotiques et des composés endogènes toxiques pour l'organisme, à la synthèse et sécrétion des acides biliaires ainsi qu'à la synthèse de protéines plasmatiques comprenant les facteurs de coagulation et les lipoprotéines plasmatiques. Dans cette partie, j'aborderai en détail l'implication du foie dans le métabolisme énergétique et dans la détoxification, deux fonctions hépatiques majeures.

### II.1. Maintien de l'homéostasie énergétique

Le foie joue un rôle central dans le maintien de l'homéostasie glucido-lipidique. C'est un acteur de connexion entre les différents organes impliqués dans le métabolisme. En période postprandiale qui correspond aux quatre premières heures après un repas, la nourriture est digérée par le tractus digestif ce qui conduit à une élévation transitoire en glucides, en acides aminés et en lipides (chylomicrons) dans la circulation sanguine. Ces différents nutriments affluent au niveau de différents tissus: les chylomicrons sont captés par le tissu adipeux blanc, les acides aminés et le glucose sont eux captés par le foie, les muscles et le tissu adipeux blanc. La libération d'insuline par les cellules  $\beta$ -pancréatiques va permettre d'orienter le métabolisme vers des voies permettant l'utilisation du glucose: la glycogénogénèse, la glycolyse, la lipogénèse *de novo*, la synthèse des triglycérides et du cholestérol et la voie des pentoses-phosphates vont être activées au niveau hépatique (**Figure 3**).

En période de jeûne, soit 12 à 14h après un repas, ou lors d'un exercice physique, les niveaux sanguins de glucagon sécrété par les cellules  $\alpha$ -pancréatiques vont augmenter et le métabolisme va s'orienter vers l'activation de voies métaboliques afin de maintenir une glycémie à 5,5mM. La glycogénolyse, la néoglucogénèse, la  $\beta$ -oxydation et la cétogénèse sont les principales voies activées au niveau hépatique (Galgani and Ravussin, 2008; Rui, 2014).

La transition entre la période postprandiale et la période de jeûne est finement régulée par une balance hormonale insuline/glucagon contrôlant les voies métaboliques *via* de nombreux facteurs de transcription (Desvergne et al., 2006).

#### II.1.1. Période postprandiale

Le foie limite l'hyperglycémie postprandiale en augmentant le captage du glucose. Le captage du glucose est permis par les hépatocytes *via* le transporteur GLUT2 (Mueckler and Thorens, 2013). Une fois dans le cytoplasme, le glucose est phosphorylé en glucose-6-phosphate (G6P) par la glucokinase

(GCK) aussi connue sous le nom de l'hexokinase IV. Le G6P est un métabolite au carrefour entre différentes voies métaboliques. Il est utilisé pour la synthèse de glycogène (glycogénogenèse), par la glycolyse et par la voie des pentoses phosphates (**Figure 3**).

### II.1.1.1. La glycogénogenèse

La majeure partie du glucose est mise en réserve sous forme de glycogène (environ 100g/jour, à partir du G6P). Le G6P est isomérisé en glucose-1-phosphate (G1P) par la phosphoglucomutase 1. L'uridine 5'-diphosphate (UDP)-glucose pyrophosphorylase catalyse la formation de l'UDP-glucose à partir du G1P. L'UDP-glucose est la forme active du glucose et le substrat des glucosyl-transférases. La glycogénine initie la synthèse du glycogène par autoglycosylation de l'UDP-glucose. La glycogène synthase (GS) catalyse l'élongation: elle transfère le résidu glycosyl de l'UDP glucose à l'extrémité d'une branche de glycogène. Après la fixation d'un certain nombre de résidus glycosyles, la glucosyl-4,6-transférase transfère un oligoside de 5 à 8 résidus glycosyles en C6 d'un résidu d'au moins 11 résidus glycosyles entraînant la formation d'une ramification; la synthèse reprend ensuite jusqu'à l'obtention du polysaccharide (Adeva-Andany et al., 2016). L'enzyme limitante de la glycogénogenèse est la glycogène synthase (Agius, 2008; Ozen, 2007; Petersen et al., 2017).

### II.1.1.2. La glycolyse

La glycolyse consiste en la dégradation du glucose en pyruvate. Les enzymes limitantes de la glycolyse sont la glucokinase (GCK), la phosphofructokinase (PFK1) et la liver pyruvate kinase (LPK). Le G6P est isomérisé puis phosphorylé pour former le fructose-1,6-bisphosphate par la PFK1. Le fructose-1,6-bisphosphate est ensuite clivé par l'aldolase pour aboutir à la formation du glycéraldéhyde-3-phosphate et du dihydroacétone-phosphate. Après plusieurs réactions de phosphorylation, isomérisation et déshydratation, le glycéraldéhyde-3-phosphate forme le phosphoénolpyruvate (PEP). Celui-ci est phosphorylé par la LPK afin de former le pyruvate. Ce pyruvate est transporté dans la mitochondrie où il va être décarboxylé en acetyl-coenzyme A (Acétyl-CoA) par la pyruvate déshydrogénase (PDH). L'acétyl-CoA peut être métabolisé dans le cycle de Krebs (Lenzen, 2014).

### II.1.1.3. La voie des pentoses phosphates

Le G6P entre dans la voie des pentoses phosphates afin d'assurer la production du cofacteur NADPH et du Ribose-5-phosphate (Ru5P). Le co-facteur NADPH est indispensable à la synthèse des acides gras et à la détoxification des espèces réactives de l'oxygène *via* la production du glutathion réduit (GSH). Le ribose-5-phosphate est indispensable pour la biosynthèse des acides nucléiques. Le G6P issu de la glycolyse est oxydé deux fois par la Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase (G6PDH) et la 6-

phosphogluconolactonase (6PGL) pour donner le ribose-5-phosphate. Les deux oxydations libèrent chacune du NADPH, H<sup>+</sup>. Le Ru5P peut alors servir de substrat pour la phase non-oxydative qui consiste en des réactions réversibles recrutant le fructose-6-phosphate et le glyceraldehyde-3-phosphate pouvant alors être convertis en pentose phosphate. Seule la partie oxydative de la voie des pentoses phosphates est régulée par l'enzyme limitante la G6PDH (Patra and Hay, 2014).

### II.1.1.4. La lipogénèse *de novo*

La lipogénèse *de novo* est la voie de synthèse des acides gras à partir d'un excès de carbohydrates. Ces acides gras sont ensuite utilisés pour la formation des triglycérides.

L'acétyl-CoA est la source de carbone et le métabolite précurseur de la synthèse des acides gras. Fourni par le cycle de Krebs, l'acétylCoA est carboxylé par l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) pour former le malonyl-CoA. Il existe deux isoformes de l'ACC, au niveau hépatique c'est l'ACC1 qui est exprimée dans le cytosol (Brownsey et al., 2006). La forme active de l'ACC est la forme non phosphorylée, en présence d'insuline. Le malonyl-CoA et le NADPH sont utilisés comme précurseur à la formation de l'acide palmitique (acide gras saturé à 16 carbones (C16:0)) par la fatty acid synthase (FAS). L'expression des deux enzymes, ACC1 et FAS est régulée par le statut nutritionnel (Foufelle et al., 1996).

L'acide palmitique peut être allongé par des enzymes de la famille des élongases (ELOVL) afin de générer des acides gras à longues chaînes (> 16 carbones) comme le stéarate (C18 :0). Les acides gras peuvent être désaturés par les stéaroyl-CoA-désaturase (SCD) et les fatty acid desaturases (FADS), enzymes situées dans les membranes du réticulum endoplasmique, pour former des acides gras mono- et polyinsaturés (Ducheix et al., 2011).

### II.1.1.5. La synthèse des triglycérides

Les acides gras à longues chaînes ainsi synthétisés vont rentrer dans la composition de nombreuses classes de lipides comme les triglycérides (TG), les phospholipides (PL) et les esters de cholestérol (EC). La synthèse de TG débute par l'estérification des acides gras avec le glycérol-3-phosphate issu de la glycolyse par la glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT) afin de générer l'acide lysophosphatidique (LPA), ceci est l'étape limitante. Celui-ci va être estérifié par les lysophospholipides acyltransférases (AGPAT) pour former l'acide phosphatidique (PA). Grâce aux lipines, le PA va être déphosphorylé pour former le diacylglycérol (DAG) (Csaki and Reue, 2010). Enfin, la formation du triacylglycérol (TAG) est assurée par la diacylglycérol acyltransférase (DGAT) qui catalyse le transfert d'un troisième acyl-CoA sur un DAG. Les acides gras mono-insaturés sont les constituants majoritaires des triglycérides. Les triglycérides sont soit stockés momentanément dans les gouttelettes lipidiques soit exportés dans la

circulation sanguine *via* les VLDL (Very Low Density Lipoprotein). Les gouttelettes lipidiques sont composées d'une couche de phospholipides à l'intérieur de laquelle on trouve les triglycérides et les esters de cholestérol (Martin and Parton, 2006). Les esters de cholestérol sont synthétisés à partir des acides gras par la cholestérol acyltransférase (ACAT) et les phospholipides ont pour précurseur le DAG.

### II.1.1.6. La cholestérogenèse

Le cholestérol est indispensable à la synthèse des acides biliaires, des hormones stéroïdiennes, des glucocorticoïdes, des oxystérols et de la vitamine D. Il est aussi indispensable au maintien de l'intégrité membranaire (Rezen et al., 2011). La synthèse endogène de cholestérol est majoritairement réalisée par le foie (80%), l'intestin et les organes génitaux y participent dans une moindre mesure.

L'acétyl-CoA est le précurseur pour la synthèse du mévalonate. Trois enzymes sont impliquées dans cette première étape. L'acetyl-Coenzyme A acetyltransférase (ACAT) permet la condensation de 2 acétyl-CoA en acétoacétyl-CoA. Puis l'HMG-CoA synthase (HMGCS) permet la condensation d'un troisième acétyl-CoA pour former l'HMG-CoA. Enfin, l'HMG-CoA réductase (HMGR) permet l'hydrolyse et la réduction de l'HMG-CoA en présence de 2 NADPH,H<sup>+</sup> pour donner du mévalonate. L'HMGR est l'enzyme limitante de la synthèse de cholestérol. La transformation du mévalonate en isoprène actif (IsopentenylPyroPhosphate) à 5 carbones, implique la phospho-mévalonate kinase (MVK) et la mévalonate-diphospho-decarboxylase (MVD). La polymérisation de six isoprènes actifs par la farnésyl diphosphate synthase (FDPS) et la farnésyl diphosphate farnésyl transférase 1 (FDFT1) conduit à la formation du squalène à 30 carbones. Le squalène est cyclisé en présence d'oxygène et de NADPH,H<sup>+</sup> par la squalène époxidase (SQLE) et la lanosterol synthase (LSS) pour donner le lanostérol (Sakakura et al., 2001). Il s'en suivra une vingtaine de réactions pour supprimer les trois groupements méthyles, introduire un groupement hydroxyle et réarranger les doubles liaisons. Le cholestérol ainsi synthétisé sera incorporé aux VLDL sous forme de cholestérol estérifié en vue d'être transporté.

L'HMGR est activée par l'insuline et implique également le facteur de transcription SREBP2 (Sterol Regulatory Element Binding Protein 2).

### II.1.2. Période de jeûne

En période de jeûne, l'organisme va puiser dans ses réserves énergétiques afin de maintenir la glycémie et de fournir de l'énergie en activant différentes voies métaboliques comme la glycogénolyse, la néoglucogenèse, la  $\beta$ -oxydation et la cétogénèse (**Figure 3**).

#### II.1.2.1. La glycogénolyse

La glycogénolyse permet une libération rapide de glucose qui sera ensuite exporté vers les tissus consommateurs de glucose. La glycogène phosphorylase (GP) est l'enzyme limitante et catalyse la première réaction de cette voie qui consiste en l'hydrolyse de la liaison  $\alpha$ -1,4 du glycogène et la production du glucose-1-phosphate (G1P). Le G1P est converti en G6P via la phosphoglucomutase. Finalement, le G6P est transformé en glucose par la glucose-6-phosphatase exclusivement hépatique (Dashty, 2013; Petersen et al., 2017).

#### II.1.2.2. La néoglucogenèse

La néoglucogenèse contribue à la moitié de la production hépatique de glucose après un jeûne d'une nuit chez l'Homme (Rothman et al., 1991). Durant un jeûne de courte durée, le foie libère le glucose *via* la glycogénolyse et durant un jeûne prolongé, les stocks de glycogène sont épuisés c'est la néoglucogenèse qui prend le relais. Les précurseurs majeurs de cette voie sont des précurseurs non glucidiques tels que le lactate, le pyruvate, le glycérol, et les acides aminés. Le lactate est oxydé par la lactate déshydrogénase afin de générer le pyruvate qui est transporté dans la mitochondrie et converti en oxaloacétate par la pyruvate carboxylase. L'oxaloacétate est réduit en malate par la malate déshydrogénase mitochondriale et exporté dans le cytoplasme pour être oxydé par la malate déshydrogénase afin de régénérer l'oxaloacétate. L'oxaloacétate cytoplasmique est converti en phosphoenolpyruvate (PEP) par la phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPCK), enzyme clé de la néoglucogenèse. Chez les souris, la délétion spécifique de la PEPCK dans le foie entraîne une stéatose due à une accumulation des métabolites issus du cycle de Krebs, ces souris sont capables de maintenir une glycémie stable grâce à la production de glucose à partir du glycérol (Burgess et al., 2004). Après de multiples réactions biochimiques, le PEP est converti en fructose 1,6 biphosphate (F1,6P) qui sera ensuite déphosphorylé en fructose 6 phosphate (F6P) par la fructose 1,6 phosphatase (FBPase). Le F6P est converti en G6P et la glucose 6 phosphatase (G6Pase) permet la conversion du G6P en glucose. La G6Pase est l'enzyme limitante à la fois de la néoglucogenèse et de la glycogénolyse. La délétion de cette enzyme dans le foie chez la souris induit une hépatomégalie avec une stéatose et une accumulation de glycogène (Mutel et al., 2011).

Le glycérol est un substrat précurseur de la néoglucogenèse à condition qu'il soit phosphorylé par la glycérol kinase afin de générer le glycerol-3-phosphate. Les acides aminés sont convertis en céto-acides par la glutaminase par exemple, puis ces céto-acides seront convertis en métabolite intermédiaire du cycle de Krebs (pyruvate, oxaloacétate, fumarate, succinyl-CoA, ou  $\alpha$ -cétoglutarate) qui serviront de précurseur à la néoglucogenèse.

### II.1.2.3. La $\beta$ -oxydation mitochondriale

Au niveau du tissu adipeux, les triglycérides de réserve constituent également une source importante d'énergie et peuvent être mobilisés en période de jeûne. Ils sont dégradés en acide gras non estérifiés et glycérol *via* la lipolyse. L'oxydation des acides gras et la production de corps cétoniques tels que le  $\beta$ -hydroxybutyrate, l'acétoacétate et l'acétone constituent une source d'énergie importante pour le foie. Selon leur nature (longueur de la chaîne et saturations), les acides gras sont catabolisés par la  $\beta$ -oxydation mitochondriale, la  $\beta$ -oxydation peroxysomale (C20-C26) et l' $\omega$ -hydroxylation microsomale. La voie majeure de dégradation des acides gras est la  $\beta$ -oxydation mitochondriale qui utilise les acides gras saturés et à chaînes courtes (C<4), moyennes (C4-C12), et longues (C12-C20). Tout d'abord les AG sont convertis en intermédiaires actifs, les acyl-CoA (FA-CoA) à longues chaînes par l'acyl-CoA synthétase. La translocation à l'intérieur de l'espace inter-membranaire de la mitochondrie de ces acides gras actifs est effectuée par la carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1), l'enzyme limitante de cette voie. L'activité de la CPT1 est inhibée par le malonyl-CoA (métabolite issu de la première étape de la lipogenèse) (Abu-Elheiga et al., 2000). La carnitine acylcarnitine translocase (CACT), localisée au niveau de la membrane interne transporte l'acylcarnitine (acyl-CoA transféré sur la carnitine) dans la mitochondrie. L'acylcarnitine sera retransformé en acyl-CoA *via* la CPT2 pour être oxydé. La première étape de l'oxydation s'effectue grâce à des déshydrogénases différentes suivant la nature de l'acide gras (à chaîne courte, moyenne, longue). Les étapes suivantes impliquent des réactions de type hydratation, oxydation, hydrolyse et l'intervention du complexe enzymatique multifonctionnel nommé mitochondriale trifunctional protein (MTP). La délétion de l'acyl-CoA déshydrogénase à longue chaîne (LCAD) induit une stéatose et une résistance à l'insuline (Zhang et al., 2007).

### II.1.2.4. La cétogenèse

Les corps cétoniques tels que l'acétoacétate, le  $\beta$ -hydroxybutyrate et l'acétone sont produits à partir de l'acétyl-CoA issu dans la grande majorité de la  $\beta$ -oxydation. Ils sont libérés dans la circulation sanguine afin d'alimenter en énergie le cerveau et les reins en cas de déplétion en carbohydrate. Lorsque les niveaux en acétyl-CoA s'élèvent au sein de la mitochondrie il y a un transfert entre leur oxydation et leurs utilisation pour la production en corps cétoniques. Deux acétyl-CoA sont condensés

grâce à une thiolase, l'HMGCS2 ( $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylglutaryl-CoA synthase) intervient pour former l'HMG-CoA ( $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylglutaryl-CoA). Enfin le CoA est retiré de l'HMG-CoA *via* une lyase afin de générer l'acétoactétate. La majorité de l'acétoactétate est réduit en  $\beta$ -hydroxybutyrate. Les souris déficientes pour la production de corps cétoniques présentent une augmentation de la lipogenèse *de novo* et de la néoglucogenèse (Cotter et al., 2014).

Le maintien de l'homéostasie glucido-lipidique et l'équilibre entre les différentes voies métaboliques évoquées ci-dessus sont rendus possibles par l'existence de régulations fines et complexes au niveau transcriptionnel impliquant plusieurs signaux incluant des métabolites circulants, des hormones et des signaux nerveux. Nous nous limiterons à l'évocation des principales régulations transcriptionnelles et hormonales.

### **II.1.3. Principales régulations transcriptionnelles du métabolisme énergétique hépatique**

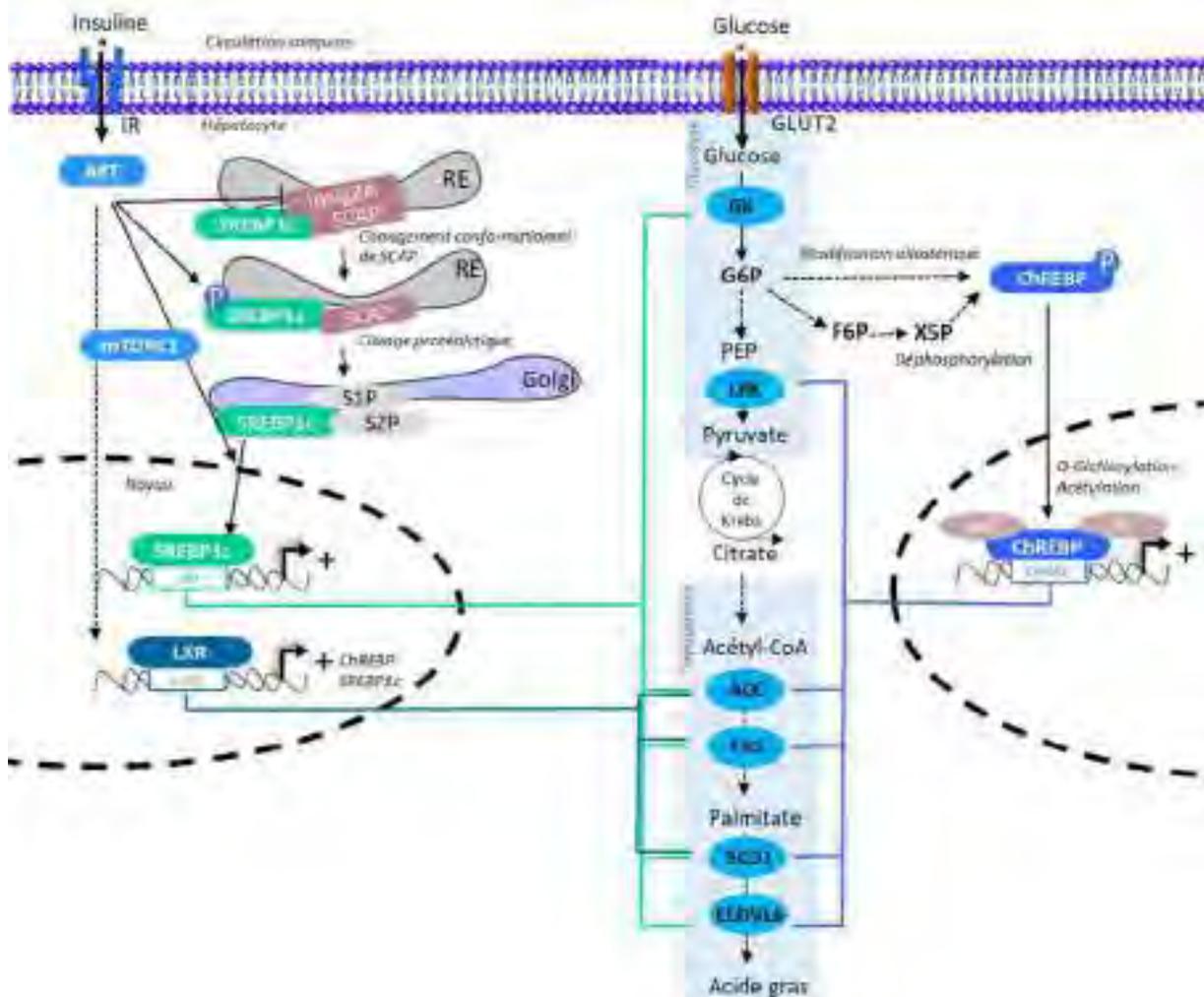
Le foie peut exprimer différents programmes transcriptionnels lui permettant de faire face à l'apport discontinu en substrats énergétiques afin de maintenir l'homéostasie énergétique. Nous nous limiterons à l'évocation des principales voies de régulation intervenant en période postprandiale ou en période de jeune.

#### **II.1.3.1. Régulateurs de la glycolyse et de la lipogenèse *de novo***

Deux principaux facteurs de transcription sont impliqués dans les mécanismes moléculaires du contrôle de la glycolyse et de la lipogenèse *de novo* dans le foie. ChREBP (Carbohydrate Response Element Binding Protein) médie l'effet du glucose alors que SREBP-1c (Sterol Regulatory Element Binding Protein) médie l'effet de l'insuline (Postic et al., 2007; Uyeda et al., 2002; Wang et al., 2015) (**Figure 4**).

- Le facteur de transcription ChREBP, médiateur du glucose

Le facteur de transcription ChREBP appartient à la famille des protéines bHLH/LZ (basic-helix-loop-helix/leucine zipper). L'activité transactivatrice de ChREBP est contrôlée par le statut nutritionnel. Ainsi, en présence de fortes concentrations de glucose, l'expression de ChREBP est augmentée, il migre vers le noyau pour y induire la transcription de ses gènes cibles (Postic et al., 2007). Le mode exact d'activation de ChREBP en réponse au glucose est complexe et reste partiellement élucidé. Un des mécanismes d'action proposé impliquerait une déphosphorylation du résidu Ser196 (Denechaud et al., 2008). Dans une étude, il a été montré que cette déphosphorylation impliquerait le xylulose-5-phosphate (X5P), un intermédiaire de la voie des pentoses phosphates capable d'activer la protéine



**Figure 4: Régulation transcriptionnelle en période postprandiale du métabolisme énergétique hépatique.** Un intermédiaire de la glycolyse, le glucose-6-phosphate (G6P) conduit à l'activation de ChREBP. Le glucose induit une augmentation de la sécrétion d'insuline par le pancréas. Au niveau de l'hépatocyte, l'insuline se fixe sur son récepteur (IR), ce qui conduit à la phosphorylation d'AKT et à la maturation de SREBP-1c via l'inhibition de l'expression de l'insig2a, la phosphorylation de SREBP-1c et l'activation de mTORC1. Des SRE et des ChoRE ont été respectivement décrits dans les promoteurs de Gk, Acc, Fas, Elovl6, Scd1 et de Acc, Fas, Lpk. Le récepteur nucléaire LXR est activé en réponse à l'insuline et induit l'expression des facteurs de transcription ChREBP et SREBP1c ainsi que l'expression de gènes de la lipogenèse.

Ac: Acétylation, AKT: protéine kinase B, ChREBP: Carbohydre-responsive element-binding protein, Elovl6: Elongation of long chain fatty acids family member 6, F6P: Fructose-6-Phosphate, GK: Glucokinase, Insig2A: Insulin induced gene 2, LXR: Liver X receptor, mTORc1: mammalian target of rapamycin complex 1, OGl: O-GlcNAcylation, RE: Réticulum endoplasmique, SCAP: SREBP cleavage activating protein, SCD1: Stearoyl-CoA desaturase 1, S1P: Site 1 protéase, S2P: Site 2 protéase, SREBP1c: Sterol regulatory element-binding transcription factor 1

phosphatase 2A (PP2A) responsable de la déphosphorylation de ChREBP sur le résidu Ser196 (Kabashima et al., 2003). Cependant, d'autres études montrent que le G6P, intermédiaire du glucose serait responsable de la translocation de ChREBP et donc de sa déphosphorylation (Dentin et al., 2012; Li et al., 2010). Une fois dans le noyau, ChREBP va de nouveau subir des déphosphorylations afin de pouvoir s'hétérodimériser avec son partenaire Mlx (Max like protein x) et se lier à ses éléments de réponses : ChORE (Carbohydrate Response Element) (Kawaguchi et al., 2001). En période de déplétion énergétique et en présence de glucagon ChREBP va subir des phosphorylations par la protéine kinase A (PKA) ou l'AMPK sur différents résidus entraînant son export vers le cytoplasme (Dentin et al., 2012; Kawaguchi et al., 2001; Yamashita et al., 2001). ChREBP sera ainsi séquestré dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3 (Merla et al., 2004). L'activité transcriptionnelle de ChREBP peut être modifiée au niveau post-traductionnel comme la O-GlcNAc glycosylation ou l'acétylation (Filhoulaud et al., 2013). Ainsi la protéine histone acétyltransférase p300 peut acétyler ChREBP en réponse au glucose et augmenter son activité transcriptionnelle en améliorant la fixation de celui-ci sur son élément de réponse (Bricambert et al., 2010). L'OGT (O-GlcNAc transférase) permet de glycosyler ChREBP en lui ajoutant un résidu O-GlcNAc (O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosamine). Ceci permet de le stabiliser et de bloquer sa dégradation par le protéasome (Guinez et al., 2011). Des éléments de réponse ChORE ont été identifiés sur les gènes de la LPK, FAS, SCD1 et GPAT1 (Ma et al., 2005; Rufo et al., 2001; Yamashita et al., 2001).

### - Le facteur de transcription SREBP-1c, médiateur de l'insuline

Le facteur de transcription SREBP appartient à la famille des protéines à motif bHLH/LZ. Trois isoformes de SREBP ont été identifiées : SREBP-1a, SREBP-1c et SREBP-2. Les facteurs SREBP-1a et SREBP-2 sont impliqués dans la synthèse du cholestérol. SREBP-1c est exprimé dans les tissus lipogéniques tels que le tissu adipeux, le foie et les muscles (Ferré and Foufelle, 2007). Au niveau hépatique, l'expression de SREBP-1c est forte. Sous l'action de l'insuline il stimule la lipogénèse (Eberlé et al., 2004; Shimomura et al., 1998). À l'état nourri, l'insuline contrôle positivement la maturation et l'activité de SREBP-1c *via* de nombreux mécanismes de régulation.

La protéine SREBP-1c est séquestrée dans le réticulum endoplasmique (RE) sous forme de précurseur inactif avec les protéines SCAP (SREBP Cleavage-Activating Protein) et INSIG2A (Insulin-Induced gene). Afin d'être actif et migrer au niveau nucléaire ce précurseur doit subir un clivage protéolytique, contrôlé par l'insuline *via* l'action des protéines AKT et mTORC1 (Yellaturu et al., 2009). AKT phosphoryle directement SREBP-1c, ce qui va faciliter sa maturation. mTORC1 permet la diminution du pool de INSIG2A, libérant ainsi le complexe SCAP/SREBP-1c (Yecies et al., 2011). L'AMPK induite en situation de jeûne phosphoryle SREBP-1C et ainsi empêche sa maturation et donc son action transcriptionnelle (Li et al., 2011).

Au niveau hépatique, SREBP-1c contrôle l'expression de la GK, des gènes de la lipogenèse *Acc*, *Fas* impliqués dans l'élongation et l'estérification des acides gras (SCD1, FADS1 et 2, Elovl5 et 6 et la lipine-1) (Amemiya-Kudo et al., 2002; Foretz et al., 1999; Fofelle and Ferré, 2002; Ishimoto et al., 2009; Matsuzaka et al., 2002; Qin et al., 2009; Wang et al., 2006).

Le récepteur nucléaire LXR (Liver X Receptor) régule l'expression des facteurs de transcription ChREBP et SREBP-1c (Quinet et al., 2004) et stimule l'expression des gènes de la lipogenèse (FASN et SCD1) (Calkin and Tontonoz, 2012).

### II.1.3.2. Régulateurs principaux de la néoglucogenèse et $\beta$ -oxydation

- Les facteurs de transcription CREB, FOXO, C/EBP $\alpha$ , HNF4 $\alpha$  et PPAR $\alpha$

Les facteurs de transcription CREB, FOXO, C/EBP $\alpha$ , HNF4 $\alpha$  et PPAR $\alpha$  sont les principaux régulateurs de la néoglucogenèse et de la  $\beta$ -oxydation en période de jeûne. En effet, le facteur de transcription CREB (cAMP Responsive Element Binding protein), médiateur de l'effet du glucagon est le premier à répondre durant le jeûne en activant l'expression des gènes de la néoglucogenèse (Rui, 2014). La fixation du glucagon à son récepteur entraîne l'activation de la protéine kinase A (PKA) catalysant la phosphorylation de CREB, ce qui permet l'induction de l'expression de ses gènes cibles tels que la PEPCK et la G6Pase (Altarejos and Montminy, 2011). FOXO1 (Forkhead box transcription factor class O1) régule la transcription des gènes de la néoglucogenèse (Tikhanovich et al., 2013). Sous l'effet de l'insuline, FOXO1 est phosphorylé et inhibé par AKT (Matsumoto et al., 2007). Le facteur de transcription C/EBP $\alpha$  (CAAT Enhancer Binding Protein  $\alpha$ ) régule également la transcription des gènes de la néoglucogenèse sous l'effet du glucagon qui induit son expression (Shen et al., 2015). HNF4 $\alpha$  est un récepteur nucléaire régulant les gènes de la néoglucogenèse sous l'effet du glucagon également (Jitrapakdee, 2012). PPAR $\alpha$  est le régulateur majeur de la  $\beta$ -oxydation des acides gras en période de jeûne (Montagner et al., 2016a). En effet, il régule l'expression génique des transporteurs des acides gras tels que CD36, FABP et des enzymes de la  $\beta$ -oxydation telles que ACOX1 et CPT1.

#### **II.1.4. Régulations hormonales du métabolisme énergétique hépatique**

Outre l'insuline et le glucagon, de nombreuses autres hormones jouent un rôle dans la régulation de la balance énergétique. Nous avons choisi de mentionner uniquement les hormones thyroïdiennes et stéroïdiennes qui sont métabolisées et éliminées par le foie.

##### **II.1.4.1. Les hormones thyroïdiennes**

Les hormones thyroïdiennes sont indispensables au maintien de l'homéostasie énergétique. Ainsi un excès d'hormones thyroïdiennes, c'est-à-dire une hyperthyroïdie engendre un statut hypercatabolique caractérisé par une augmentation de la dépense énergétique, une perte de poids, une réduction des niveaux de cholestérol, une augmentation de la lipolyse adipocytaire et de la néoglucogénèse (Brent, 2008). Inversement une hypothyroïdie est associée à une réduction de la dépense énergétique, un surpoids, des niveaux de cholestérol et de triglycéride élevés et une réduction de la lipogénèse et de la néoglucogénèse (Brent, 2012). Au niveau hépatique l'action des hormones thyroïdiennes est régie par l'action de la triiodothyronine (T3) et médiée par le récepteur nucléaire TR (Thyroid Receptor). L'HMG-CoA réductase qui est l'enzyme limitante de la synthèse du cholestérol et le facteur de transcription SREBP sont induits par la T3. Le récepteur TR joue un rôle dans la lipogénèse en induisant l'expression de ACC1, FAS, ChREBP et SREBP-1c *via* un dialogue avec LXR (Huang and Freake, 1998). Des éléments de réponse au récepteur TR (TRE) ont été identifiés au niveau du promoteur du gène Cpt1 $\alpha$ , enzyme limitante de la  $\beta$ -oxydation. Un dialogue entre TR et PPAR $\alpha$  a été décrit comme responsable de l'induction de Cpt1 $\alpha$  et de l'activation de la  $\beta$ -oxydation (Liu et al., 2007). T3 joue également un rôle sur la régulation de la néoglucogénèse, en contrôlant l'expression de la PEPCK (Park et al., 1999). Le processus de mobilisation des gouttelettes lipidiques nommé lipophagie a été démontré comme dépendant de l'hormone T3 (Singh et al., 2009a).

##### **II.1.4.2. Les hormones glucocorticoïdes**

Les glucocorticoïdes (GC) exercent leurs effets physiologiques en se liant au récepteur aux glucocorticoïdes (GR) et sont largement impliqués dans l'homéostasie énergétique. L'excès (syndrome de Cushing) ou la déficience (syndrome d'Addison) en hormones GC engendre de sévères troubles métaboliques. Les patients atteints du syndrome de Cushing développent une obésité viscérale, une hyperglycémie, une stéatose hépatique ainsi qu'une insulino-résistance (Shibli-Rahhal et al., 2006). Inversement, la déficience en GC est associée à une perte de poids et à une hypoglycémie (Nieman and Chanco Turner, 2006). Au niveau hépatique, l'activation de GR induit l'expression des gènes

néoglucogéniques tels que PEPCK (Opherk et al., 2004). Les effets des glucocorticoïdes sur le stockage des TG hépatiques seraient liés à l'augmentation de l'activité et de l'expression des gènes impliqués dans la lipogénèse *de novo* (Lemke et al., 2008).

### II.1.4.3. Les hormones sexuelles

Les hormones sexuelles que ce soient les œstrogènes ou les androgènes sont présentes dans les deux sexes, à des niveaux relativement différents. Leur implication dans la régulation de l'homéostasie énergétique hépatique est distincte suivant le sexe.

#### - Rôle des œstrogènes

La ménopause chez les femmes est caractérisée par un déclin dans la production d'œstrogènes menant à un risque accru de développer une stéatose hépatique, composante du syndrome métabolique (Lizcano and Guzmán, 2014). Le traitement par hormones de substitution est connu pour limiter ces troubles. Le 17 $\beta$ -estradiol (E2) est la principale hormone sexuelle féminine circulante et produite par les ovaires après l'aromatisation de l'androstenedione en estrone (E1). L'action de l'E2 est médiée par le récepteur aux œstrogènes (ER). Chez des souris femelles déficientes pour le récepteur ER, l'insulino-résistance hépatique est accompagnée d'une augmentation de l'expression des gènes lipogéniques (Bryzgalova et al., 2006). Chez des souris rendues diabétiques et obèses de façon génétique par délétion de la leptine (*ob/ob*), un traitement long (30 jours) avec l'hormone E2 entraîne une répression des gènes lipogéniques et permet une réduction des niveaux de triglycérides hépatiques (Bryzgalova et al., 2006). Le traitement avec E2 permet également l'amélioration de la sensibilité à l'insuline chez des souris diabétiques soumises à un régime riche en graisse (Riant et al., 2009a). De même, des souris *ob/ob*, traitées avec un agoniste de ER $\alpha$  présentent une amélioration de leur sensibilité à l'insuline ainsi que leur tolérance au glucose. Le rôle exact de l'hormone E2 au niveau hépatique reste à explorer. Cependant une étude récente a montré que les troubles métaboliques engendrés par une déplétion des niveaux en E2 seraient liés aux glucocorticoïdes et dépendantes de la voie de signalisation GR. Ainsi en cas de déplétion en E2 chez les femelles, les niveaux de FSH (hormone folliculo-stimulante synthétisée par l'hypophyse) sont élevés et activent de façon directe ou indirecte la phosphorylation de GR et son activation. La voie de signalisation GR étant activée au niveau hépatique et entraînent la stéatose hépatique (Quinn et al., 2018).

#### - Rôle des androgènes

Chez l'homme l'hypotestostéronémie augmente le risque de développer un diabète de type 2 (Keating et al., 2012). En revanche, chez les femmes l'hyperandrogénie provoque une insulino-résistance et une intolérance au glucose. Les androgènes jouent donc un rôle dépendant du sexe dans le métabolisme

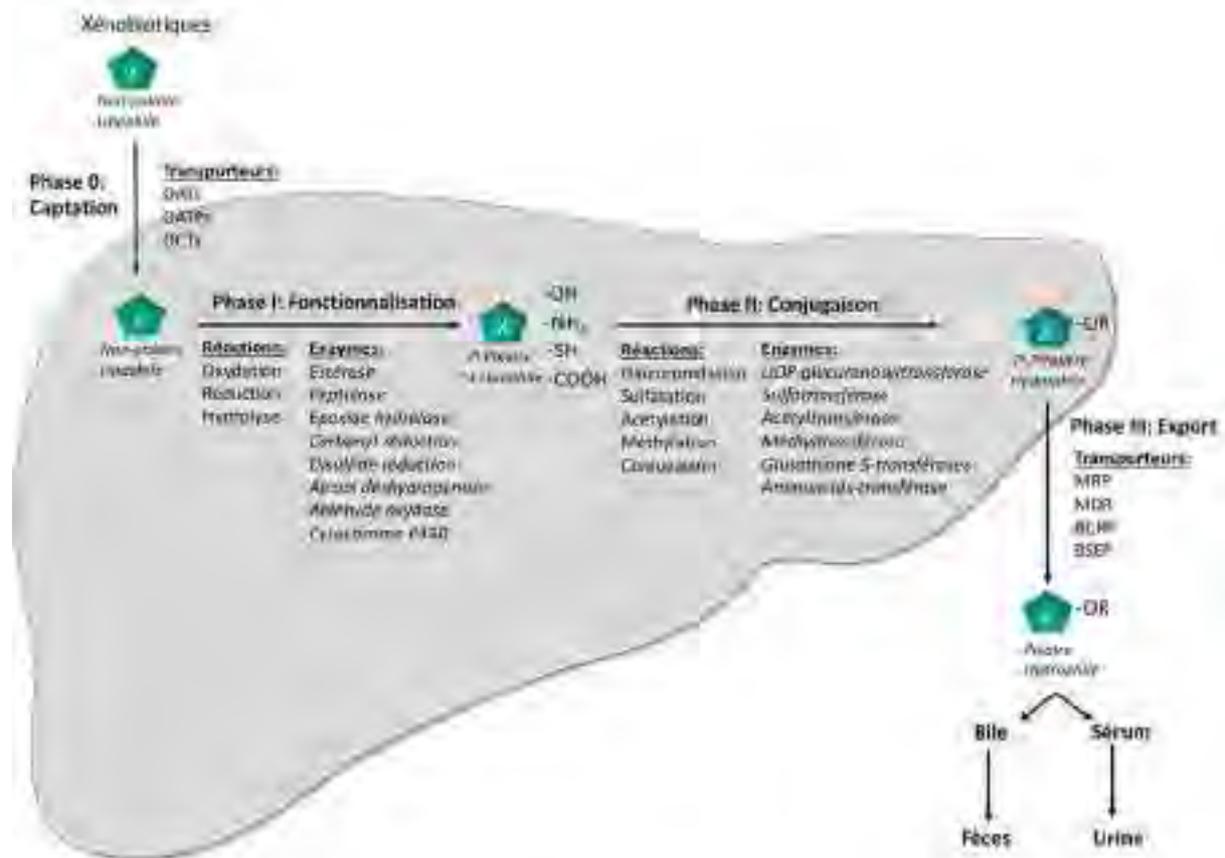
glucidique. Les effets des androgènes sont médiés au niveau systémique par le récepteur AR (Androgen Receptor). Les androgènes chez les mâles augmenteraient la sensibilité à l'insuline en induisant la  $\beta$ -oxydation et en diminuant la lipogenèse *de novo*. En effet, les mâles présentant une délétion spécifique hépatique du récepteur AR présentent une stéatose lorsqu'ils sont soumis à un régime riche en graisse, les femelles sont en revanche protégées (Lin et al., 2008). La stéatose hépatique observée chez ces souris mâles déficientes pour le récepteur AR au niveau hépatique est liée à une diminution de l'oxydation des acides gras et une augmentation de la lipogenèse *de novo*. Les mécanismes mis en jeu impliquent la régulation de l'expression génique de PPAR $\alpha$  et de SREBP-1c respectivement. Le rôle hépatique des androgènes chez les femelles n'est pas clairement établi.

Outre cette adaptation à des changements métaboliques, le foie doit également faire face à l'afflux de xénobiotiques potentiellement toxiques pour l'organisme, dont il assure le métabolisme et l'élimination.

### II.2. Détoxification

Les organismes vivants sont constamment et inévitablement exposés à des molécules chimiques présentes dans leur environnement, désignées sous le terme de xénobiotiques. Ce terme regroupe des contaminants alimentaires, des composés synthétiques, des polluants environnementaux et des médicaments. La majorité des xénobiotiques auxquels nous sommes couramment exposés sont des molécules hydrophobes de faible poids moléculaire (<1000 Daltons), ayant la faculté de franchir aisément la membrane. Ils peuvent ainsi s'accumuler dans la cellule et atteindre rapidement un seuil de toxicité. Au cours de leur évolution, les organismes ont développé des systèmes limitant l'accumulation de ces composés: il s'agit de transporteurs membranaires permettant une sortie rapide des molécules indésirables et de systèmes de conversion chimique des molécules hydrophobes en molécules plus hydrophiles dont l'élimination par les fluides corporels est ainsi facilitée. Les enzymes du métabolisme des xénobiotiques sont responsables de ces réactions. La spécificité de ces enzymes de détoxification est large, c'est pourquoi de nombreuses molécules endogènes sont aussi métabolisées par ces enzymes comme les hormones stéroïdiennes, les acides biliaires, les vitamines A et B et les eicosanoïdes. Le métabolisme des xénobiotiques se décompose en plusieurs phases aboutissant à l'élimination de la molécule exogène dans la bile ou l'urine (**Figure 5**).

La phase 0 correspond à la première étape de l'élimination des xénobiotiques. Les molécules sont captées du sang vers la membrane basolatérale des hépatocytes grâce à différents transporteurs d'influx. Les SLC (Solute Carriers) transporteurs sont impliqués dans cette étape, ils permettent le passage d'un large spectre de composés. Par exemple, les transporteurs OATP (Organic Anion Transporter Polypeptides ou SLC21/SLC0) permettent le passage d'acides organiques faibles, de



**Figure 5: Métabolisme des xénobiotiques hépatiques.** Les xénobiotiques de nature non-polaires et lipophiles sont captés du sang vers le foie par différents transporteurs (phase 0). Ils vont subir des réactions dites de fonctionnalisation afin de les rendre plus polaire et moins lipophiles (phase I). Après cette étape, les xénobiotiques sont conjugués avec différents groupements afin de les rendre plus polaires et plus hydrophiles (phase II). La dernière phase correspond à leurs exports hors de l'hépatocyte par les transporteurs de phase III, ils rejoindront la bile ou le sérum pour être évacués dans les fèces ou l'urine.

BCRP: breast cancer resistance protein, BSEP: Bile Salt Export Pump, MDR: multi-drug resistant, MRP: multi-drug resistance-associated proteins, OATP: organic-anion-transporting polypeptide, OCT: organic cation transporter, OAT: organic anion transporter.

composés neutres et cationiques. Les transporteurs OCT (Organic Cation Transporter) ou OAT (Organic Anion transporter) sont des membres de la famille des SLC22 et permettent le passage de composés chargés positivement ou négativement (Petzinger and Geyer, 2006).

La phase I ou phase de fonctionnalisation permet, grâce à des réactions d'oxydation, de réduction ou d'hydrolyse, de fixer à la molécule un groupement polaire hydroxyl (OH), amino (NH<sub>2</sub>) ou carboxyl (COOH) afin de rendre le composé plus polaire. Les enzymes impliquées sont majoritairement des cytochromes P450 catalysant des réactions de monooxygénation (Lewis et al., 2004).

Le xénobiotique peut être éliminé ou pris en charge par les enzymes de phase II telles que les UDP-glucuronyl-transférases (UGTs), les sulfotransférases (SULTs), les glutathion-S-transférases (GSTs) et les N-acétyl-transférases (NATs) qui conjuguent le composé, fonctionnalisé ou non, avec un groupement acide glucuronique, sulfate, glutathion ou acétyl respectivement. Le rôle de ce groupement est de rendre le xénobiotique plus hydrophile.

Le métabolisme des xénobiotiques a lieu principalement dans le foie mais peut également se produire dans l'intestin, les poumons et les reins (Döring and Petzinger, 2014). Au sein de l'hépatocyte, les enzymes de phase I et II se situent au niveau du réticulum endoplasmique (microsomes) et/ou dans le cytoplasme.

Les métabolites issus de la phase I et/ou de la phase II sont polaires et peuvent être transportés à travers la membrane cellulaire par des pompes d'efflux. Cette étape est assurée par l'intervention de transporteurs actifs de la superfamille des ATP binding cassette (ABC) comprenant entre autres la famille des MDR (Multi Drug Resistance) et la famille des MRP (Multidrug Resistance Protein) ou encore les ABCG2 (ATP Binding Cassette sub-family G member 2) (Cole, 2014).

### **II.2.1. Les cytochromes P450, principales enzymes de phase I**

Les principales enzymes de phase I sont les monooxygénases à cytochrome P450 (CYP), il existe également les monooxygénases à flavines, des déshydrogénases, des époxydes hydrolases, des réductases, des oxydases et carboxylestérases (Oppermann and Maser, 2000). Les CYPs constituent une superfamille d'hémoprotéines possédant des propriétés catalytiques d'oxydation et de réduction. La plus importante des réactions catalysées est l'hydroxylation. Les CYPs ont besoin d'une source d'électron pour être fonctionnelles. Ces électrons sont apportés par la NADPH cytochrome-réductase si le CYP se situe au niveau du réticulum endoplasmique. Cette dernière est une flavoprotéine qui assure le transfert de deux électrons du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) jusqu'au CYP (Porter and Coon, 1991).

## Chapitre I : Généralités sur le foie

La nomenclature de la superfamille des CYPs est la suivante : le symbole CYP est suivi d'un chiffre désignant la famille, suivi d'une lettre majuscule désignant la sous-famille, puis d'un autre chiffre pour chaque isoforme (Nelson et al., 1996). Si les CYPs possèdent plus de 40% d'homologie de séquence ils appartiennent à la même famille.

Chez l'Homme, 57 gènes codant pour les CYPs ont été identifiés et peuvent être répartis en deux grandes catégories en fonction de l'origine de leurs substrats: le métabolisme des composés endogènes et le métabolisme des xénobiotiques (**Tableau 1**). (Guengerich et al., 2005)

**Tableau 1: Répartition des 57 Cytochromes P450 en fonction de l'origine de leurs substrats (d'après Guengerich, 2005)**

Composés exogènes	Composés endogènes				
	Xenobiotiques	Stérols	Acides gras	Eicosanoïdes	Vitamines
1A1	1B1	2J2	4F2	2R1	2A7
1A2	7A1	4A11	4F3	24	2S1
2A6	7B1	4B1	4F8	26A1	2U1
2A13	8B1	4F12	5A1	26B1	2W1
2B6	11A1		8A1	26C1	3A43
2C8	11B1			27B1	4A22
2C9	11B2				4F11
2C18	17				4F22
2C19	19				4V2
2D6	21A2				4X1
2E1	27A1				4Z1
2F1	39				20A1
3A4	46				27C1
3A5	51				
3A7					

Généralement, les CYPs issus de la famille 1, 2, 3 catalysent au niveau hépatique les réactions de phase I. Dans le foie les proportions des différents CYPs sont connues: le CYP3A4 (20 à 50 %), le CYP2C8/9 (10 à 30 %), le CYP2D6 (2 à 6 %), le CYP2C19 (1 à 10 %), le CYP1A2 (1 à 13 %), le CYP2E1 (7 %) ainsi que les CYP2A6, et 4A (Lewis et al., 2004).

La famille CYP3 comprend une sous-famille CYP3A, composée de 4 isoformes 3A4, 3A5, 3A7 et 3A43. CYP3A4 est le plus représenté au niveau hépatique et est considéré comme le CYP le plus important pour la détoxification puisque 50% des médicaments sont métabolisés par celui-ci. CYP3A4 est aussi impliqué dans la métabolisation de la testostérone (Usmani et al., 2003).

Les CYPs sont essentielles à la biotransformation de molécules endogènes telles que les hormones stéroïdiennes, les stérols, les prostaglandines, les acides gras et la vitamine D3. C'est en particulier le cas pour les CYP11A1, 11B1, 11B2, 17A1, 19A1 et 21A. CYP17A1 est indispensable pour la synthèse de

cortisol, de testostérone et d'œstrogène. CYP19A1 catalyse la biotransformation de l'androstenedione en estrone (Handschin and Meyer, 2003; Lewis et al., 2004).

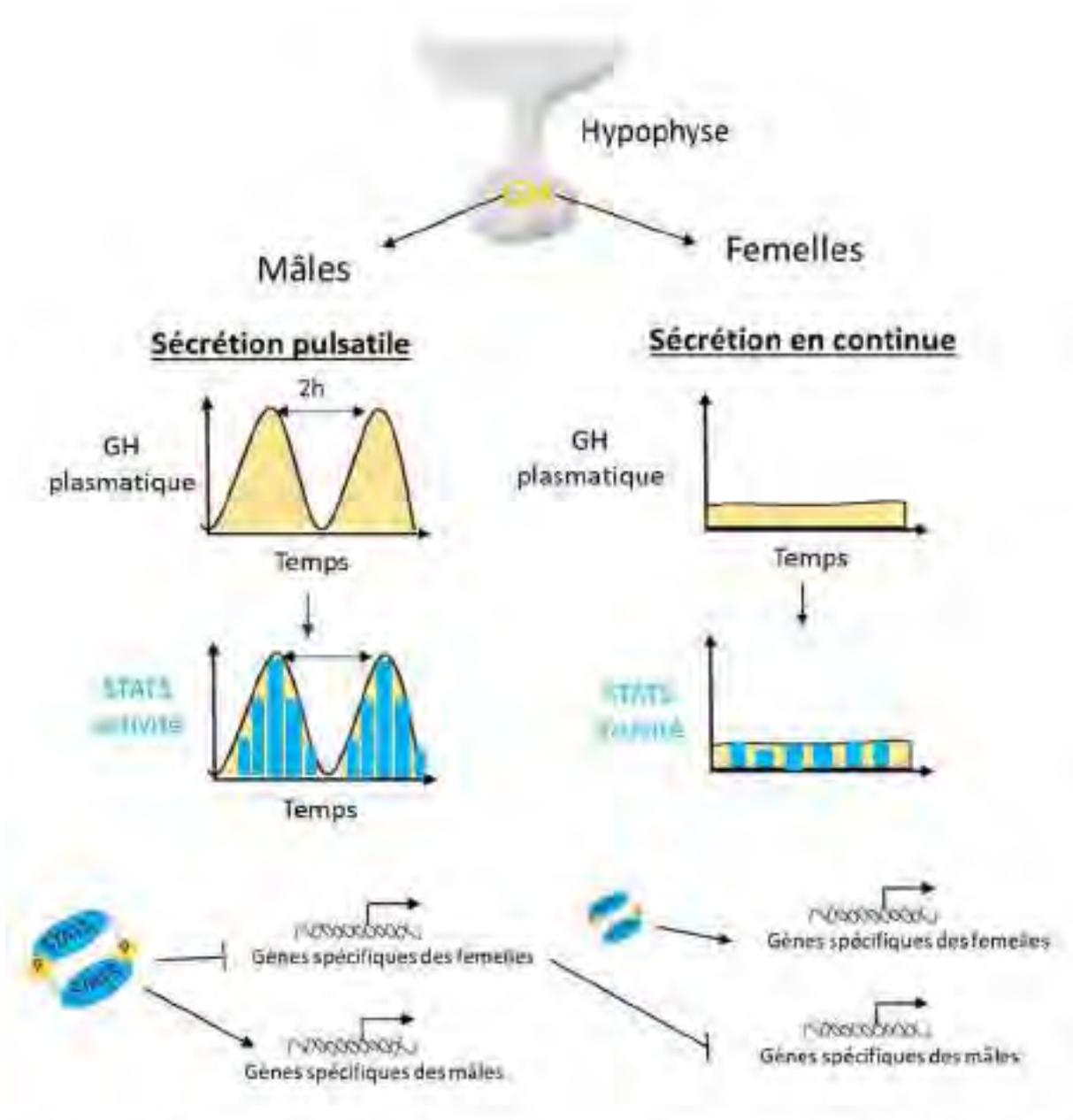
### **II.2.2. Les enzymes de phase II**

La sulfatation, la glucuronidation et la conjugaison avec le glutathion représentent les trois réactions les plus classiques de la phase II de biotransformation, qui se produisent sur le métabolite parent ou le métabolite issu de la phase I d'oxydation. Ces réactions permettent d'augmenter le poids moléculaire et de diminuer l'hydrophobicité des composés par ajout de charges négatives. Les propriétés physico-chimiques de la molécule sont ainsi modifiées, celle-ci peut alors être éliminée dans la bile ou retourner dans la circulation sanguine en vue d'une excrétion urinaire (Falany et al., 2000).

La sulfatation se situe au niveau de l'espace périportale hépatique, et mobilise les enzymes nommées sulfotransférases (SULT). Au niveau hépatique deux familles de SULT sont impliquées, SULT1 et SULT2. La famille des SULT1 a pour principaux substrats les hormones thyroïdiennes, les œstrogènes alors que la famille des SULT2 a comme principaux substrats les stéroïdes, les acides biliaires et les hormones stéroïdiennes (Strott, 2002).

Contrairement à la sulfatation, la glucuronidation s'effectue au niveau de la région périveineuse et fait intervenir les uridines diphosphateglucuronosyl transférases (UGT). Dans la plupart des cas, la glucuronidation des composés intervient en complément de la sulfatation. Les UGT sont divisées en deux familles principales: UGT1 et UGT2. L'UGT1A présente un intérêt majeur parce qu'elle est responsable de la glucuronidation et ainsi de la détoxification du produit de dégradation de l'hème, la bilirubine (Bosma et al., 1994). Comme la sulfatation, la glucuronidation est une réaction réversible grâce aux  $\beta$ -glucuronidases. Une activité importante de la  $\beta$ -glucuronidase par le microbiote intestinal induit par exemple un nouveau passage entéro-hépatique de la molécule mère, après clivage des glucuronides (Naderer et al., 2005).

La conjugaison avec le glutathion est une étape particulièrement importante parce que les substrats de cette réaction sont des molécules électrophiles. La conjugaison de ces molécules avec le glutathion permet leur détoxification qui pourront alors se lier à des macromolécules intracellulaires. La conjugaison au glutathion peut être spontanée mais est plus efficace lorsqu'elle est catalysée par les glutathione-S-transférases (GST). Lorsque la concentration intracellulaire en glutathion est fortement diminuée, cela entraîne une importante hépatotoxicité. L'épuisement des stocks de glutathion est très rare, les concentrations en glutathion étant très importantes (environ 10mM) (Parkinson et al. 2001). Il faut une dose extrême de substrat pour épuiser ces stocks. Les GST sont présentes à la fois dans la membrane et le cytoplasme de l'hépatocyte et sont ainsi classées suivant leurs localisations cellulaires.



**Figure 6: Régulation par l'hormone de croissance de l'expression des gènes hépatiques dépendants du sexe.** La sécrétion de manière pulsatile de l'hormone de croissance (GH, Growth hormone) chez les mâles induit une activité cyclique de STAT5, les phases où la GH est indétectable il n'y a pas d'activité de STAT5. La sécrétion en continue de GH chez les femelles permet une activité moindre de STAT5. Chez les mâles STAT5 va induire de façon spécifique les gènes masculins et réprimés l'expression des gènes féminins. Ces gènes spécifiques des femelles bloquent l'expression des gènes masculins chez les foies des femelles. La faible, mais persistante activité de STAT5 chez les femelles permet une action directe ou indirecte sur les gènes spécifiques des femelles. Le contrôle transcriptionnel exercé par STAT5 requiert le facteur de transcription HNF4α. (D'après Waxman and Holloway, 2009)

GH: Growth hormone, HNF4α : Hepatocyte nuclear factor 4 alpha, STAT5 : Signal transducer and activator of transcription 5

La déconjugaison du glutathion est différente de celle du sulfate et du glucuronide car elle nécessite deux hydrolyses et une acétylation qui conduiront à la formation d'un métabolite mercapturate (Parkinson et al. 2001).

Les autres réactions de phase II (acétylation et méthylation) sont moins courantes. La conjugaison avec des acides aminés a lieu sur de très petites molécules.

### **II.2.3. Dimorphisme sexuel dans l'expression des enzymes de détoxification**

Il existe un fort dimorphisme sexuel dans la métabolisation des médicaments, il y a 40% de différence entre les hommes et les femmes dans la pharmacocinétique des médicaments (Anderson, 2005). Par exemple, la clairance de l'acétaminophène est 22 fois plus importante chez les hommes comparé aux femmes en raison de niveaux de glucuronidation plus élevés (Miners et al., 1983).

De nombreuses études réalisées sur le rat et la souris montrent que cette différence liée au sexe se base sur des niveaux distincts d'expression génique des enzymes de phase I et II du métabolisme des xénobiotiques (Clodfelter et al., 2007; Klaassen et al., 1998).

Au niveau moléculaire, environ 1600 gènes sont différenciellement exprimés entre les deux sexes : cette différence d'expression est liée à une sécrétion distincte de l'hormone de croissance (GH) par l'hypophyse selon le sexe. En 1979, les recherches menées par Edén montrent que la GH est sécrétée différenciellement selon le sexe. Chez le mâle adulte, la GH est libérée dans la circulation sanguine toute les 3 à 5h, avec des niveaux indétectables entre les pics de sécrétion, alors que chez les femelles la sécrétion de GH s'effectue en continue (Jansson et al., 1985; Tannenbaum and Martin, 1976). Le dimorphisme sexuel de la sécrétion de GH est aussi retrouvé chez la souris (MacLeod et al., 1991). Cette « empreinte » de sécrétion est due à l'action des hormones sexuelles sur l'hypothalamus (Jansson et al., 1985). Une sécrétion continue de GH chez les femelles hypophysectomisées suffit à restaurer un profil des enzymes hépatiques féminines. L'Homme a aussi un profil de sécrétion différentiel suivant le sexe (Veldhuis and Bowers, 2003). La GH active de multiples voies de signalisation, l'une d'entre elles implique STAT5b (Signal Transducer and Activator of Transcription 5B), un facteur de transcription GH dépendant. STAT5b est phosphorylé et migre vers le noyau pour se fixer sur ses éléments de réponse et induire la transcription de ses gènes cibles (Herrington and Carter-Su, 2001). STAT5b est indispensable à la régulation de gènes sexe-spécifiques du foie (**Figure 6**). Ainsi, les souris invalidées pour STAT5b présentent une répression de 90% des gènes spécifiques des mâles et une surexpression de 61% de gènes féminins. La délétion spécifique au niveau des hépatocytes de

STAT5b induit chez les mâles une répression des CYPs et une surexpression des gènes spécifiques des femelles (Clodfelter et al., 2007)

L'expression de nombreux gènes spécifiques du sexe requiert le récepteur nucléaire HNF4 $\alpha$ . Ainsi des éléments de réponse de ce facteur de transcription sont retrouvés sur le promoteur de certains gènes dont l'expression est différente en fonction du sexe: Cyp2a4 (souris), Cyp3a16 (souris) CYP2C12 (rat) (Nakayama et al., 2001; Sasaki et al., 1999; Yokomori et al., 1997). Dans les cultures primaires d'hépatocytes, HNF4 $\alpha$  est indispensable pour l'expression de CYP3A4, CYP3A5 et CYP2A6 (Gómez-Lechón et al., 2001). Dans le foie de souris mâles, STAT5b et HNF4 $\alpha$  régulent positivement des gènes spécifiques des mâles et répriment l'expression de gènes spécifiques des femelles (Park et al., 2006). Les gènes spécifiquement régulés dans chaque sexe sont classés suivant que leur expression soit dépendante de STAT5b et/ou de HNF4 $\alpha$ . Par exemple, les gènes spécifiques des mâles de classe I et II diffèrent par leur dépendance d'expression à STAT5b et HNF4 $\alpha$  dans le foie des femelles. Les gènes de classes IA et IB diffèrent par leur dépendance à HNF4 $\alpha$  dans les deux sexes (**Tableau 2**) (Clodfelter et al., 2006).

**Tableau 2: Gènes spécifiques de chaque sexe classés suivant leur dépendance pour leur régulation aux facteurs de transcription STAT5b et HNF4 $\alpha$**  (D'après Clodfelter et al., 2006)

Gène		GH régulation		STAT5b régulation		HNF4 $\alpha$ régulation	
		Mâle Hpx + GH pulsative	Mâle Hpx + GH continue	Mâle	Femelle	Mâle	Femelle
Gène spécifique des mâles	<i>Cyp4a12, GST <math>\pi</math>, Slp</i> (Classe I)	↑	↓	↑	–	↑	–
	<i>Cyp2d9, Cyp7b1, Mup3, Mup1/2/6/8</i> (Classe II)	↑	↓	↑	↑	↑	↑
Gène spécifique des femelles	<i>Cyp2a4, Cyp2b9, Cyp17a12</i> (Classe IA)	↓	↑	↓	–	↓	–
	<i>Cyp2b10, Cyp2b13</i> (Classe IB)	↓	↑	↓	–	–	↑
	<i>Cyp3a16, Cyp3a41, Cyp3a44</i> (Classe II)	–	↑	–	–	–	↑

### II.3. Autres fonctions hépatiques

#### II.3.1. Fonction endocrine, synthèse protéique

Le réticulum endoplasmique des hépatocytes est un site majeur de synthèse protéique. En effet, le foie synthétise de nombreuses protéines plasmatiques telles que l'albumine, les apolipoprotéines et les facteurs de la coagulation. L'albumine est la protéine de transport la plus abondante du sang ; elle permet le maintien de la pression osmotique, le transport des acides gras et des hormones stéroïdes. Le foie produit d'autres protéines de transport telles que la transferrine (transport du fer), la céruloplasmine (transport du cuivre) et les lipoprotéines (transport des lipides). La majorité des facteurs de coagulation est également produite par le foie. Il s'agit des facteurs I (fibrinogène), II (prothrombine), V, VII à XIII mais également de la protéine C et de l'antithrombine. Ces facteurs de

coagulation requièrent pour leur synthèse la vitamine K, vitamine liposoluble absorbée au niveau intestinal grâce aux sels biliaires (Ginès et al., 2011).

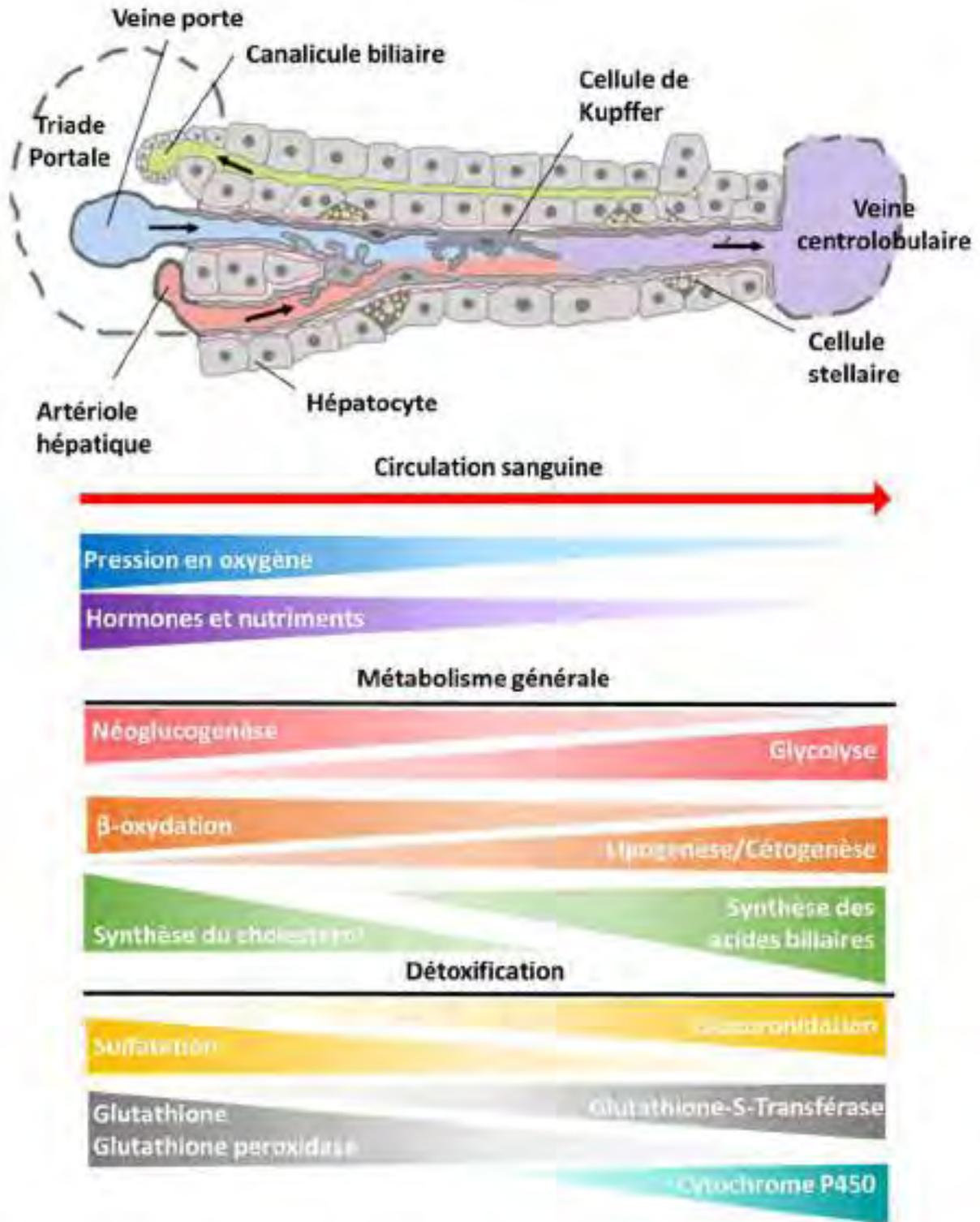
Le foie est responsable de la sécrétion de plusieurs hormones telles que l'angiotensinogène, impliquée dans le contrôle de la pression sanguine et le facteur de croissance IGF1 (Insulin-like Growth Factor). Ces hépatokines sont des protéines sécrétées par les hépatocytes qui peuvent influencer le métabolisme général à travers un signal autocrine, paracrine et endocrine. Le protéome plasmatique comprend 4727 protéines dont environ 25% seraient sécrétées par le foie (Lai et al., 2008). Certaines hépatokines clés exercent des actions positives ou négatives sur l'homéostasie énergétique. Par exemple, la sécrétion hépatique de SHBG (Sex-Hormone Binding Protein), FGF21 (Fibroblast Growth Factor 21), ANGPTL4 (Angiopietin-Like Protein 4) et l'adropine exercent des effets bénéfiques sur le métabolisme énergétique par l'amélioration de la sensibilité à l'insuline, la réduction de la masse adipeuse. En revanche, certaines hépatokines ont des fonctions délétères sur le métabolisme général, c'est le cas de la fétuine A et B, l'hepassocine, LECT2 (Leukocyte Cell-derived Chemotaxin-2), RBP4 (Retinol Binding Protein 4) et la sélanoprotéine P qui sont source d'insulino-résistance et d'inflammation (Meex and Watt, 2017).

### **II.3.2. Fonction exocrine, synthèse des acides biliaires**

Le foie possède une fonction exocrine par sa capacité à synthétiser et excréter la bile dans le tube digestif permettant la digestion des lipides en les émulsifiant. La voie classique de synthèse des acides biliaires (ou sels biliaires) se déroule en plusieurs étapes. Le cholestérol est converti en  $7\alpha$ -HOC par l'enzyme limitante la cholestérol  $7\alpha$ -hydroxylase (CYP7A1) localisée dans le réticulum endoplasmique. La synthèse de l'acide cholique (CA) à partir du métabolite intermédiaire du  $7\alpha$ -HOC est catalysée par la stérol  $12\alpha$ -hydroxylase (CYP8B1) sinon sera formé l'acide chénodésoxycholique (CDCA). Chez la souris CDCA est converti en acide muricholique (MCA). 95% des acides biliaires sont recyclés via le cycle entéro-hépatique (Boyer, 2013).

### **II.4. Zonation du métabolisme énergétique et de la détoxification**

En fonction de leur localisation périportale (PP) ou périveineuse (PV) au sein du lobule, les hépatocytes ont un phénotype métabolique particulier et participent à la zonation métabolique du foie (Jungermann and Keitzmann, 1996). Ainsi les hépatocytes périportaux sont exposés à de fortes concentrations hormonales et à une pression en oxygène élevée ce qui favorise un métabolisme de type oxydatif. A l'inverse, les hépatocytes périveineux sont exposés à une pression en oxygène plus faible, cela favorise un métabolisme de type glycolytique. La voie Wnt/ $\beta$  caténine est fortement impliquée dans la régulation de cette zonation métabolique (Torre et al., 2011) (**Figure 7**).



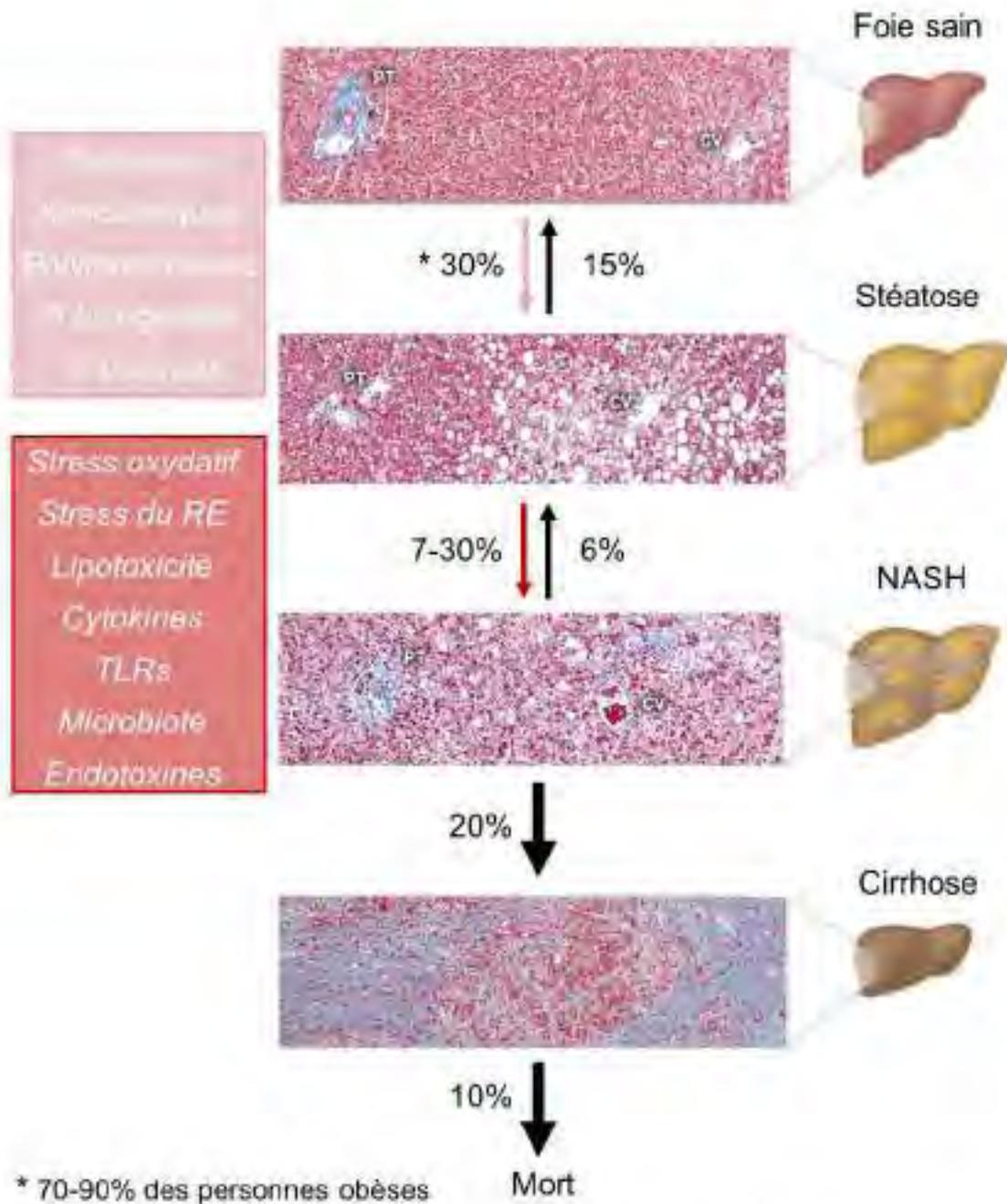
**Figure 7: Zonation du métabolisme énergétique et de la détoxification le long de l'axe portal-pé-ri-veineux du lobule hépatique.** L'espace portale accueille les réactions de type catabolique alors que dans la région périverneuse se situe des réactions anaboliques. (D'après Bierchmeir 2016 et Kietzmann 2017)

Le métabolisme des carbohydrates obéit à cette zonation métabolique. En effet, la néoglucogénèse qui est un processus grand consommateur en énergie oxydative (fournit par la  $\beta$ -oxydation) a lieu dans la zone périportale. La glycolyse qui nécessite moins d'énergie a lieu dans les hépatocytes périveineux, un compartiment moins oxygéné. De nombreuses études montrent en effet une expression des enzymes impliquées dans la néoglucogénèse comme la PEPCK, F1,6Pase et G6Pase au niveau périportal (Braeuning et al., 2006a). De même, l'activité des enzymes glycolytiques est détectée au niveau périveineux à l'état nourri (Jungermann, 1992; Jungermann and Keitzmann, 1996). La glykogénogénèse débute au niveau périveineux et se termine au niveau des hépatocytes périportaux alors que la glykogénolyse débute dans l'espace périportal et se termine au niveau périveineux (Sasse, 1975).

Le métabolisme lipidique est également sous contrôle de cette zonation. L'oxydation des acides gras est très présente au niveau périportal lieu où l'oxygénation est la plus importante. L'activité de la CPT1, enzyme clé de la  $\beta$ -oxydation y est fortement exprimée (Katz et al., 1983). La lipogénèse se situe au niveau périveineux où la synthèse des VLDL est aussi abondante (Jungermann and Keitzmann, 1996). La zonation de la cétogénèse est plus controversée, cependant une activité maximale de la  $\beta$ -hydroxybutyrate dehydrogenase a été mesurée au niveau périveineux (Teutsch et al., 1995). La synthèse du cholestérol est située au niveau périportal alors que sa dégradation en acides biliaires s'effectue au niveau périveineux où la sécrétion biliaire est plus importante (Ugele et al., 1991; Wang et al., 2007).

La plupart des gènes codant pour des enzymes de détoxification est exprimé au niveau périveineux. C'est le cas des cytochromes P450 et des enzymes de phase II telles que les glutathione-S-transférases, sulfotransférases et UDP-glucuronosyltransférases. Des données immunohistochimiques montrent que les enzymes de phase II sont nettement moins représentées par rapport aux CYPs dans la région périveineuse. Cela aurait pour conséquence une accumulation de métabolites réactifs à l'origine d'une toxicité. De plus dans la région périveineuse, les niveaux de glutathion sont réduits par rapport à la zone périportale (Braeuning et al., 2006a; Gebhardt et al., 1994).

Nous avons vu dans les parties qui précèdent comment était organisé le foie et quelles étaient ses grandes fonctions. Nous allons voir dans la partie qui suit que des dérégulations dans le fonctionnement des différentes voies métaboliques hépatiques peuvent conduire à des pathologies comme les stéatoses hépatiques non alcooliques.



**Figure 8: Etiologie de NAFLD.** La NAFLD démarre par l'accumulation excessive de graisses dans les hépatocytes (>5%), nommée stéatose hépatique. Sa prévalence est de 30%. La stéatose hépatique est réversible mais peut donner lieu à la NASH dans 7 à 30% des cas. Puis, dans 20% des cas, la NASH se traduit en cirrhose. Enfin, la cirrhose entraîne la mort chez 1 personne sur 10 environ. Plusieurs facteurs contribuent au développement de la stéatose comme l'alimentation, la lipogénèse, la lipolyse et les polymorphismes. La NASH est quant à elle associée à une lipotoxicité, au stress du RE et à une inflammation médiée par les cytokines et les TLRs. (D'après Cohen et al., 2011)

NAFLD: Non Alcoholic Fatty Liver Disease, NASH: Non-Alcoholic Steatohepatitis, RE: Réticulum endoplasmique, TLRs: Toll-like receptors

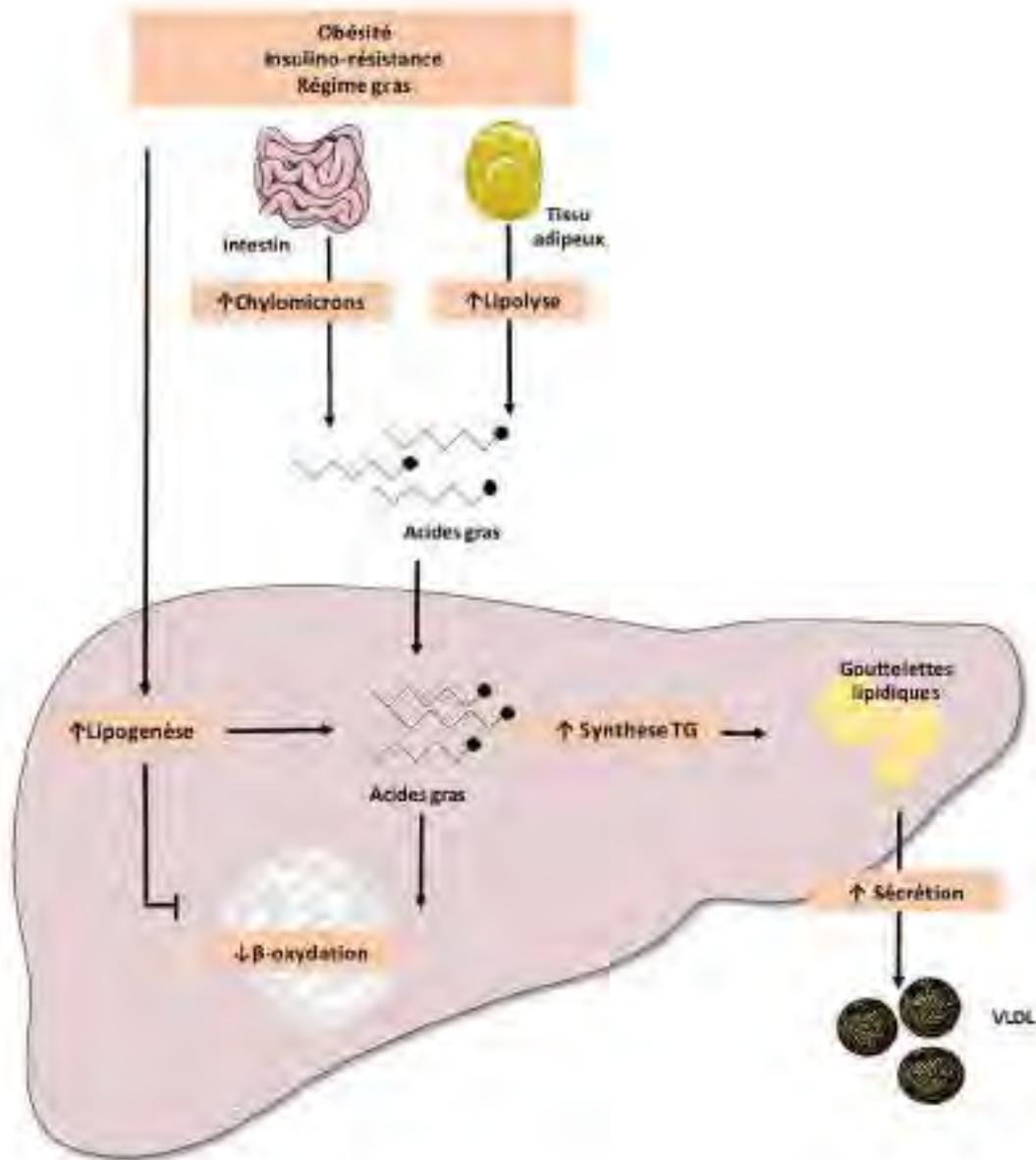
### III. Physiopathologie hépatique: la stéatose hépatique non alcoolique

La stéatose hépatique non alcoolique ou « Non Alcoholic Fatty Liver Disease » (NAFLD) est la composante hépatique du syndrome métabolique, en effet elle est fortement associée au diabète et à l'obésité. La stéatose hépatique non alcoolique est devenue le facteur prédictif le plus puissant du diabète de type 2 (Sung et al., 2013). La prévalence de la NAFLD est de 70-75%, chez les personnes atteintes de diabète de type 2 (Tilg et al., 2017) et de 90% chez celles atteintes d'obésité morbide (Harrison and Day, 2007) (**Figure 8**).

#### III.1. Physiopathogénèse de la stéatose hépatique non alcoolique

La stéatose hépatique correspond à une accumulation intracellulaire de lipides neutres (supérieure à 5% du poids total du foie) et à la formation de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme des hépatocytes entraînant une hépatomégalie. Cette stéatose est bénigne et réversible mais elle peut évoluer vers une stéatohépatite lorsqu'elle s'accompagne d'une inflammation, de lésions hépatocytaires et de fibrose (Cohen et al., 2011). La NAFLD rassemble la stéatose ainsi que les stades plus sévères : la stéatohépatite et la cirrhose (**Figure 8**) (Diehl and Day, 2018). Différents modèles ont été proposés pour expliquer le développement des différents stades de la NAFLD (Hebbard and George, 2011). Le modèle le plus répandu décompose l'évolution de la pathologie en deux stades. Le premier correspond au développement de la stéatose dans le contexte d'une obésité. Le deuxième correspond à l'atteinte du foie par un second stimulus qui va favoriser l'inflammation et la fibrose. Ce second stimuli peut être de différentes natures. On y retrouve le stress oxydatif, le stress du réticulum endoplasmique, les cytokines pro-inflammatoires, la lipotoxicité associée à l'accumulation d'acides gras libres ou encore l'accumulation de cholestérol libre. La limite de ce modèle est que certains de ces stimuli sont à eux seuls capables d'induire la stéatose hépatique.

La stéatose hépatique débute par un dépôt anormal de lipides dans les hépatocytes, notamment sous forme de triglycérides. C'est le résultat d'un déséquilibre métabolique entre les entrées et les sorties d'acides gras au niveau du foie (**Figure 9**). Ce déséquilibre provient de 3 sources principales : (i) l'arrivée massive d'acides gras exogènes *via* les chylomicrons plasmatiques à la suite d'une prise alimentaire excessive ; (ii) un afflux important d'acides gras libres (AGL) libérés par la lipolyse adipocytaire. Cette dernière est augmentée en cas de diabète de type 2. Elle est réalisée à partir des triglycérides du tissu adipeux et produit des acides gras non estérifiés (AGNE) qui seront par la suite captés par le foie ;



**Figure 9: Origines de la stéatose hépatique.** L'équilibre du contenu hépatique en lipides est maintenu grâce à un équilibre entre l'apport, la synthèse, l'oxydation et la sécrétion des lipides. En situation non-pathologique, 60% des lipides hépatiques proviennent de la lipolyse adipocytaire ; 15-20% sont délivrés par l'alimentation et 5-23% synthétisés grâce à la lipogénèse de novo. En cas d'obésité, d'une insulino-résistance et d'une alimentation riche en graisse, les flux sont augmentés pour chacune des voies et une augmentation de la sécrétion de TG est observée via les VLDL. Lorsqu'il y a une NAFLD, il y a un déséquilibre entre toutes ces voies : le  $\beta$ -oxydation des acides gras est diminuée alors que la lipogénèse de novo, la synthèse des TG et leur sécrétion sont augmentées. (D'après Meex et Watt, 2017).

NAFLD: Non Alcoholic Fatty Liver Disease, TG: Triglycerides, VLDL: Very Low Density Lipoprotein

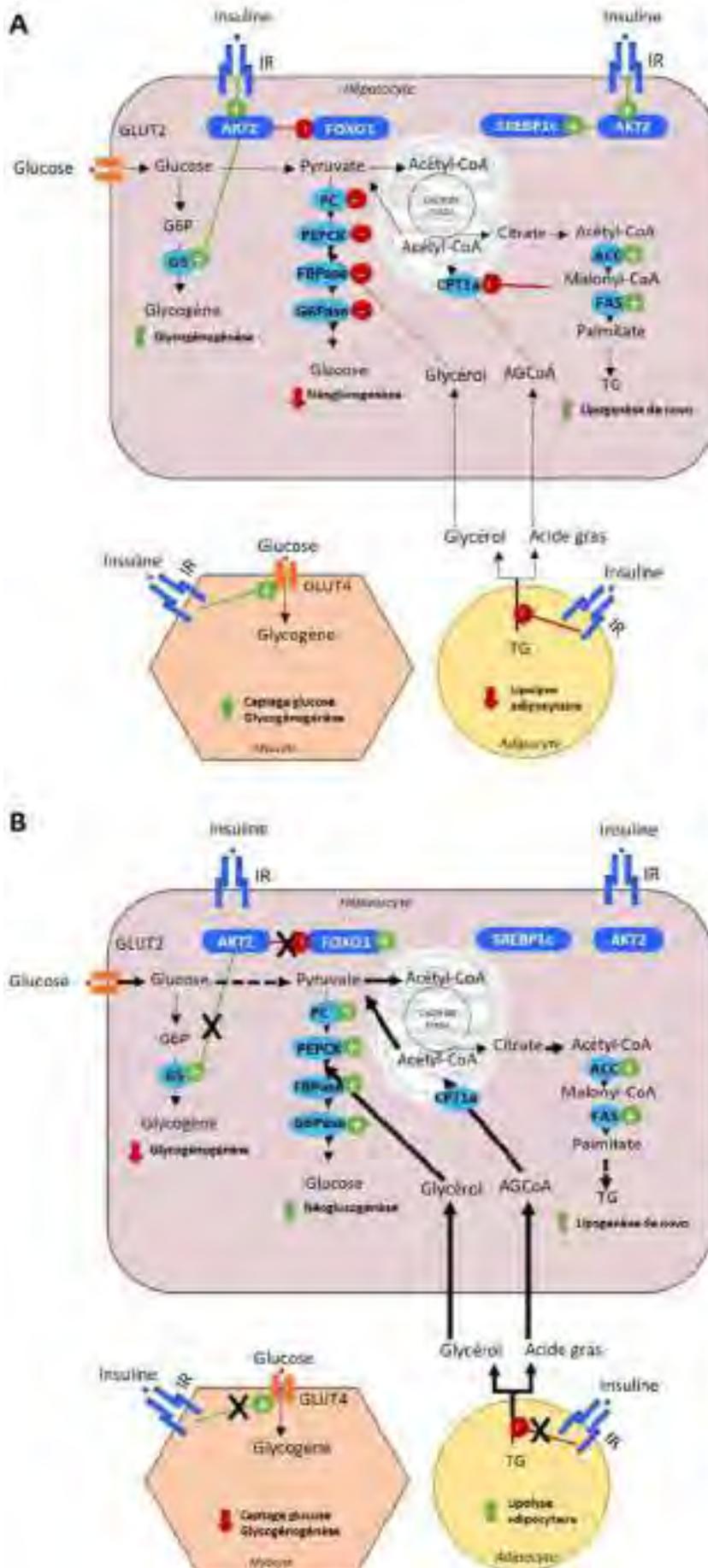
(iii) une augmentation de la lipogenèse *de novo* résultant d'une hyperinsulinémie et d'une insulino-résistance adipocytaire (Lambert et al. 2014; Postic and Girard 2008).

### **III.1.1. L'apport exogène via les chylomicrons**

L'apport exogène de lipides par l'alimentation constitue la source la plus faible d'acides gras au foie dans le contexte de la NAFLD. Il représente en effet environ 15% des apports d'acides gras dans la stéatose hépatique. Après un repas, environ un tiers des triglycérides ingérés est relargué dans la circulation sanguine sous forme d'acides gras (Roust and Jensen, 1993). Ceux-ci sont transportés dans des particules lipidiques comme les chylomicrons ou les LDL. La Lipoprotéine Lipase (LPL) permet l'hydrolyse des triglycérides en acides gras pour leur prise en charge par le foie et par d'autres organes systémiques. L'insuline active la Lipoprotéine Lipase particulièrement au niveau des sites périphériques comme le muscle et le tissu adipeux. Les souris surexprimant le gène de la *Lpl* au niveau hépatique développent une stéatose et une insulino-résistance spécifique du foie (Kim et al., 2001).

### **III.1.2. La lipolyse adipocytaire**

La lipolyse adipocytaire couvre à elle seule environ 59% des apports d'acides gras dans la stéatose hépatique. Elle est donc la voie privilégiée d'arrivée d'acides gras au foie (Donnelly et al. 2005). Ainsi, les sujets atteints de NAFLD présentent une lipolyse accrue et des taux importants d'acides gras libres plasmatiques. Différentes études réalisées chez l'animal et chez l'Homme montrent que le tissu adipeux viscéral est une source importante d'acides gras libres pour le foie (Gastaldelli et al. 2007; Seppälä-Lindroos et al. 2002) du fait de sa proximité avec la veine porte et de sa forte activité lipolytique. Il existe une corrélation importante entre les différentes espèces lipidiques viscérales et celles retrouvées au niveau hépatique (Ko et al., 2017). De ce fait, l'accumulation d'acides gras au niveau viscéral est fortement associée au développement de la NAFLD. Chez une personne saine, l'insuline bloque l'activité de la LHS (Lipase Hormono-Sensible) qui catalyse la libération des AGNE à partir des triglycérides adipocytaires. L'insuline limite donc le flux d'acides gras vers le foie, ces derniers agissant comme des acteurs importants de la néoglucogenèse hépatique. Dans une situation d'insulino-résistance, l'insuline supprime de façon incomplète l'activité de la LHS ce qui a pour effet une libération accrue d'AGNE dans la circulation sanguine par la lipolyse (Morigny et al., 2016; Stefan et al., 2011)(**Figure 10**).



**Figure 10: Action de l'insuline au niveau hépatique et sur les tissus périphériques (A) et mécanismes d'insulino-résistance au cours de la NAFLD (B).** **A.** Au niveau hépatique, la liaison de l'insuline à son récepteur (IR, Insulin Receptor) va mener à l'activation de certaines voies métaboliques comme la glycogénogenèse, la lipogénèse de novo via AKT2 et SREBP1c respectivement, et l'inhibition de la néoglucogénèse via FOXO1. Au niveau périphérique, l'insuline va permettre un captage du glucose et un stockage de celui-ci au niveau musculaire et va inhiber la lipolyse adipeuse. **B.** Le muscle insulino-résistant dû à un stockage ectopique de lipides n'est plus en mesure de capter le glucose et d'assurer son stockage sous forme de glycogène. Le tissu adipeux insulino-résistant présente une lipolyse accrue, l'insuline ne parvient plus à inhiber la lipolyse adipeuse. Au niveau hépatique, il y a un afflux important de glucose et d'acide gras, la lipogénèse de novo est toujours activée alors que la néoglucogénèse n'est plus inhibée et que le stockage du glucose est diminué.

AKT; protéine kinase B, CPT1a; Carnitine Palmitoyl Transferase 1a, FBPase: fructose-1,6-bisphosphatase, FOXO1 : Forkhead box protein O1, G6P: Glucose-6-phosphate, G6Pase: Glucose-6-Phosphatase, GLUT2: glucose transporter, GS: Glycogène Synthase, IR: Insulin Receptor, NAFLD: Non Alcoholic Fatty Liver Disease, PC: Pyruvate Carboxylase, PEPCK: phosphoénolpyruvate carboxykinase, SREBP1c: Sterol regulatory element-binding transcription factor 1

### III.1.3. La lipogenèse *de novo*

La lipogenèse *de novo* est aussi une source importante d'acides gras dans la stéatose hépatique. Alors que la contribution de la lipogenèse *de novo* durant le jeûne chez un sujet sain est dérisoire (environ 5%), elle couvre environ 26% des apports d'acides gras hépatiques dans la NAFLD (Donnelly et al. 2005). La lipogenèse *de novo* est fortement activée en période de renutrition, lorsque les taux de glucose et d'insuline sont très élevés à la suite d'un jeûne prolongé. Elle est fortement régulée par l'insuline par l'intermédiaire des facteurs de transcription mTORC1 et SREBP-1c. Le facteur de transcription SREBP-1c semble jouer un rôle important dans la pathogenèse de la NAFLD. En effet son hyperactivation induit la stéatose hépatique et son expression est induite lors de la stéatose hépatique dans différents modèles génétiques et alimentaires d'obésité associés à une stéatose (Moon et al., 2012). Par ailleurs, une délétion hépatocytaire-spécifique de la protéine de transport SCAP, bloque l'activité des 3 isoformes de SREBPs et prévient la stéatose hépatique induite chez des souris ob/ob ou des souris nourries avec un régime HFD.

La lipogenèse *de novo* reste active en cas de diabète de type 2. Cela constitue un paradoxe central dans la pathogenèse de la NAFLD. Effectivement, dans le diabète de type 2, l'insuline n'arrive plus à supprimer la production hépatique de glucose mais continue de stimuler la lipogenèse *de novo*, suggérant une insulino-résistance hépatique sélective (**Figure 10**). Du fait de ce paradoxe il en résulte souvent une hyperglycémie associée à une hyperlipidémie et une stéatose hépatique. De nombreux travaux s'intéressent à ce phénomène et essayent de comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine de cette divergence entre le métabolisme du glucose et le métabolisme lipidique. Une des hypothèses majeures est un branchement de la voie de signalisation à l'insuline au niveau d'AKT qui contrôlerait différenciellement la néoglucogenèse et la lipogenèse (Cheng and White, 2012; Titchenell et al., 2015, 2016).

### III.1.4. L'intestin

Plus récemment, il a été proposé que le développement de la NAFLD ferait également intervenir d'autres facteurs propres à l'intestin tels que la dysbiose et les défauts de perméabilité intestinale (Goodwin et al., 2013; Mouzaki and Allard, 2012; Williams et al., 2011). Ainsi, la perméabilité intestinale est augmentée chez des patients atteints de NAFLD (Volynets et al., 2012) alors que des manipulations de la flore bactérienne sont associées à la survenue d'hépatopathies (Tarantino et al., 2010). Nous savons aujourd'hui que le tractus intestinal humain héberge plus de 3 millions de bactéries qui elles-mêmes contiennent collectivement environ 100 fois plus de gènes que ceux du génome humain (Eckburg et al., 2005). Etant donné cette imposante présence bactérienne, il

est possible d'imaginer que l'activité du microbiote influence le développement de maladies chez l'Homme (Balmer et al., 2014; Schnabl and Brenner, 2014) et plusieurs études montrent que les bactéries peuvent affecter le développement de la NAFLD. Par exemple, un changement de composition dans la population bactérienne, nommé dysbiose, a été associé à différents dommages hépatiques (Mouzaki et al., 2013; Zhu et al., 2013). La proportion entre différentes espèces bactériennes comme les bactéroïdes et les ruminococcus influence l'apparition de la NASH et de la fibrose (Boursier et al. 2016). Plus généralement, un surplus de bactéries pathogènes est impliqué dans la pathogenèse de la NAFLD (Mokhtari et al., 2017). Le mécanisme produisant cet effet le plus probable implique les LPS (Lipopolysaccharides), également appelés endotoxines, qui sont des composants structuraux des membranes externes des bactéries. Ils sont composés d'un oligosaccharide et d'un lipide qui permet leur ancrage à la membrane externe des bactéries. De par leur structure, ils peuvent traverser la membrane pour se retrouver dans la lymphe. Arrivés au foie par la veine porte, ils se lient à leurs récepteurs spécifiques présents à la surface des cellules du système immunitaire et induisent une inflammation et une résistance à l'insuline. En ce sens, les « mauvaises » bactéries surreprésentées chez les personnes obèses ou atteintes de NAFLD (dysbiose), augmenteraient la libération d'endotoxines vers le foie (Brun et al., 2007; Jandhyala et al., 2015; Soares et al., 2010). Les endotoxines bactériennes comme le LPS sont également reconnues par le récepteur TLR4 (Toll Like Receptor 4) au niveau des hépatocytes et participent à l'initiation la réponse immunologique (Soares et al., 2010). De plus, la dysbiose est associée à une réduction de la synthèse de FIAF (Fasting-Induced Adipocyte Factor) dans l'entérocyte. Cela résulte en une augmentation de l'activité de la LPL et l'accumulation de TG dans le foie (Backhed et al., 2004; Bäckhed et al., 2007).

Une expérience réalisée chez des souris a mis en évidence un rôle causal de la dysbiose sur le développement de la NAFLD (Le Roy et al., 2013). De façon originale, les auteurs ont transplanté les fécès contenant le microbiote de souris atteintes de NAFLD chez des souris saines. Les souris receveuses ont développé une NAFLD dissociée de l'obésité. De ce fait, le microbiote pourrait induire par lui-même la NAFLD et cette transmission pourrait se faire même en absence d'obésité (Le Roy et al., 2013).

### **III.2. Predisposition génétique**

Il existe une disparité ethnique dans la survenue de la NAFLD. En ce sens, les Africains et les Hispaniques ont, respectivement, la plus faible et la plus forte incidence de NAFLD (Browning and Horton, 2004; Browning et al., 2004a, 2004b; Caldwell et al., 2002; Clark et al., 2003). Nous savons aujourd'hui que certains polymorphismes sont impliqués dans la survenue de la NAFLD.

Le plus connu d'entre eux est celui lié au gène *Pnpla3* (Patatin-like Phospholipase domain-containing Protein 3). La forme de *Pnpla3* liée au développement de la NAFLD (rs738409, I148M) est assez largement répandue dans les régions hispaniques et très peu dans les populations africaines. *Pnpla3* code pour une enzyme qui affecte le métabolisme hépatique des lipides. Ce gène influence aussi l'activation des cellules stellaires, importantes dans la fibrogenèse (Romeo et al., 2008; Singal et al., 2014). La fonction exacte de l'enzyme PNPLA3 reste cependant encore incertaine. Elle présente une double activité lipase/transacyclase. Une étude montre son rôle important de remodelage des gouttelettes lipidiques, PNPLA3 permettrait le transfert des acides gras sur les phospholipides (Mitsche et al., 2018). La surexpression de *Pnpla3* conduit à des effets contradictoires puisqu'elle est à l'origine d'une diminution de l'hydrolyse des triglycérides et d'une augmentation des enzymes régulant la lipogenèse *de novo* (Li et al., 2012a). La délétion totale de ce gène n'induit pas de stéatose chez la souris (Basantani et al., 2011; Chen et al., 2010). Ainsi, même si l'association entre PNPLA3 et NAFLD est aujourd'hui bien établie, les mécanismes sous-jacents restent à explorer.

Un autre gène, *Tm6sf2* (Transmembrane 6 Superfamily 2) est aussi connu pour être impliqué dans le métabolisme lipidique et présente des polymorphismes associés à la NAFLD. Plusieurs recherches sont actuellement en cours sur la fonction exacte de l'enzyme TM6SF2 mais il semblerait qu'elle soit impliquée dans la distribution et la localisation lipidique hépatique. Le variant rare de ce gène est associé à un risque plus élevé de développer une NAFLD (rs58542926) mais un risque plus faible de développement des maladies cardiovasculaires (Mahdessian et al., 2014).

### III.3. Dimorphisme sexuel

Il existe également un dimorphisme sexuel dans l'apparition de la NAFLD. Il est connu que la NAFLD se développe prioritairement chez les hommes (Lonardo et al., 2006, 2015). En effet, des études cliniques et pré-cliniques montrent que les femmes en activité sexuelle et préménopausées sont protégées de la NAFLD (Ballestri et al., 2017; Durazzo et al., 2014; Lee et al., 2016; Marinou et al., 2011). Avant la ménopause, les femmes présentent notamment une meilleure capacité à diriger les acides gras hépatiques vers les voies cataboliques comme la cétogenèse plutôt que vers la formation de triglycérides et de VLDL (Marinou et al., 2011). Ce dimorphisme est également retrouvé dans le modèle murin (Ballestri et al., 2017). Une autre étude démontre que la protection de souris femelles contre le développement de la NAFLD pourrait s'expliquer par un meilleur brunissement du tissu adipeux blanc (Lee et al., 2016).

Ce dimorphisme sexuel s'explique majoritairement par la production massive d'œstrogènes chez les femmes, une hormone décrite comme protectrice vis-à-vis de la NAFLD et de la fibrose

(Barton, 2013; Domingos et al., 2012; Lundholm et al., 2008; Pighon et al., 2011; Spangenburg et al., 2012; Turola et al., 2015). Cependant, la plus grande différence entre les hommes et les femmes réside dans la localisation adipocytaire des graisses. La graisse viscérale est une source majeure d'acides gras et de cytokines pour le foie et participe au développement de l'insulino-résistance et de la dyslipidémie (Mueller et al., 2015; Rodrigues et al., 2014). Elle se développe majoritairement chez les hommes et chez les femmes après la ménopause (Shen et al., 2009). A l'inverse, les œstrogènes favorisent le stockage préférentiel des graisses au niveau sous-cutané. Ceci explique pourquoi les femmes pré-ménopausées requièrent une adiposité supérieure à celle des hommes pour développer des troubles métaboliques similaires (Regitz-Zagrosek et al., 2006). Ceci est conforté par une autre étude démontrant qu'après la ménopause, la distribution des graisses bascule vers une localisation viscérale (Kotani et al., 1994). Cependant si les femmes sont protégées contre le développement de la NAFLD, leur protection vis-à-vis de la NASH et de la fibrose est plus controversée (Daryani et al., 2010; Farrell and Larter, 2006; Ratziu et al., 2000; Volzke et al., 2007).

Le chapitre suivant est consacré aux récepteurs nucléaires qui jouent un rôle crucial dans les différentes fonctions hépatiques principalement celles métabolique et de détoxification. Nous insisterons plus particulièrement sur le récepteur nucléaire aux androstanes, CAR sur lequel a porté mon travail de thèse.

## Chapitre II : Le récepteur nucléaire constitutif aux androstanes: CAR

### I. Généralités sur les récepteurs nucléaires

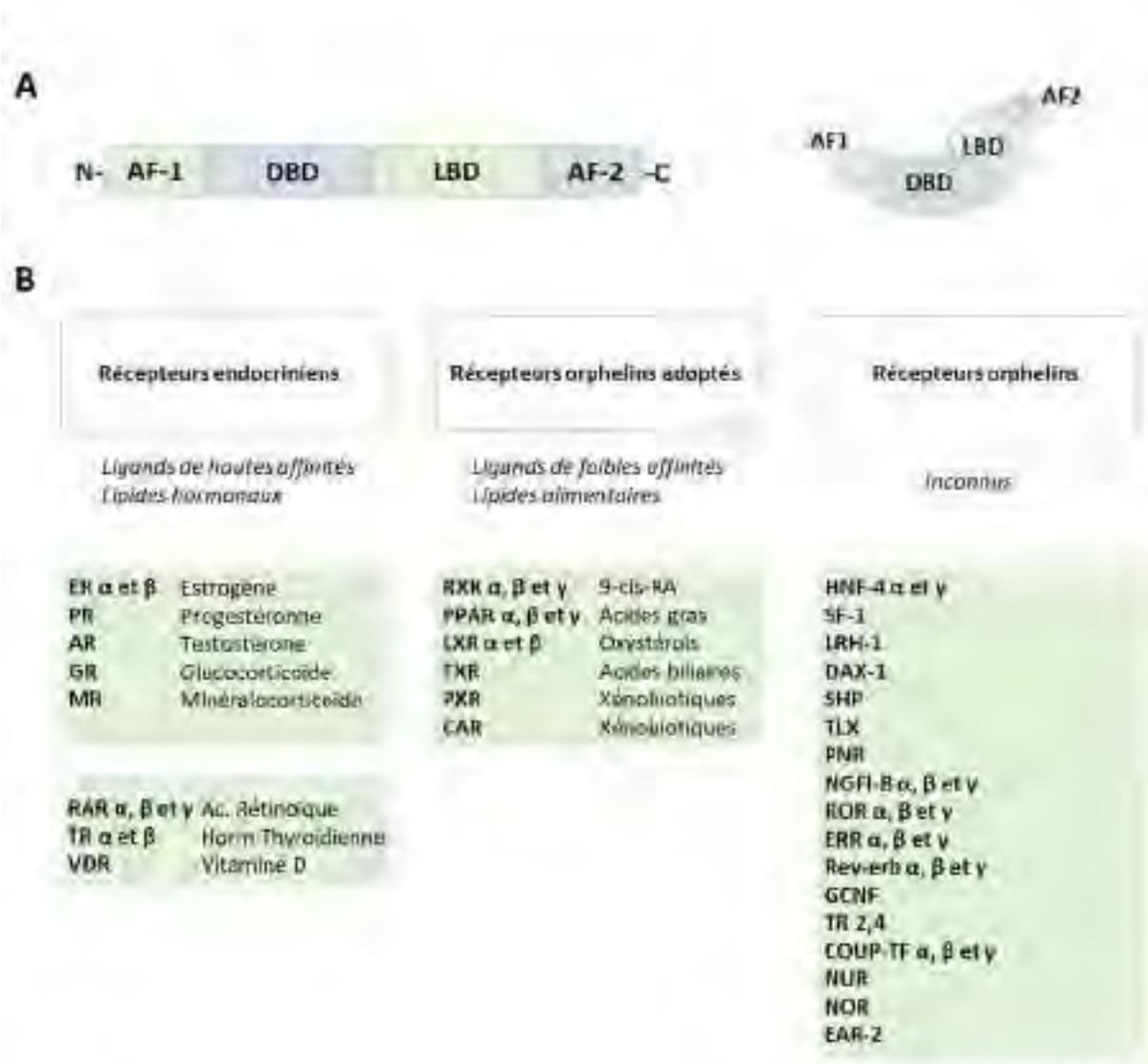
Les récepteurs nucléaires (RN) forment une superfamille de récepteurs intracellulaires qui fonctionnent comme des facteurs de transcription dépendants des ligands. La superfamille des récepteurs nucléaires comprend 49 membres chez l'Homme et 48 chez la souris (McKenna et al., 2009). L'importance des RN dans le maintien d'un statut physiologique normal est illustré par le nombre important de médicaments utilisés pour les cibler. De manière générale les récepteurs nucléaires possèdent une structure commune constituée de 6 domaines fonctionnels nommés A/B, C, D, E et F. Le domaine A/B est situé à l'extrémité de la région N-terminale et contient la fonction activatrice (AF1) ligand-indépendante. Le domaine C est composé du domaine de liaison à l'ADN (DNA Binding Domain : DBD), il est formé de deux motifs en doigt de zinc qui reconnaissent des éléments de réponse spécifiques. Le domaine D peut contenir des signaux de localisation nucléaire et procure une flexibilité à la protéine. Le domaine E, situé à l'extrémité de la région C-terminale contient le domaine de liaison au ligand (Ligand Binding Domain: LBD) et contient la fonction activatrice (AF2) dépendante du ligand. Le domaine F est une région très variable, absent chez certains RN et exercerait une action régulatrice (**Figure 11A**).

#### I.1. Classification et nomenclature

En fonction de leur similarité phylogénétique les RN peuvent être répartis en 6 sous-familles (NR1 à NR6) subdivisées en 28 groupes (A à K). Chacun des groupes regroupe plusieurs gènes paralogues (NURSA : Nuclear Receptor Signalling Atlas).

Selon leur capacité à fonctionner en monomère ou en homo/hétérodimère et selon le type d'élément de réponse auquel ils se fixent, les RN peuvent être répartis en quatre différentes classes (classe I, II, III, IV) (Germain et al., 2006; Mangelsdorf et al., 1995).

De plus, les RN peuvent être aussi classés en fonction de leur capacité à fixer leur ligand. Ainsi les récepteurs endocriniens ont pour ligands des hormones stéroïdiennes, les récepteurs orphelins adoptés ont pour ligands des lipides alimentaires et les récepteurs orphelins n'ont pas de ligands identifiés. Les RN orphelins adoptés ont été découvert avant l'identification de leurs ligands respectifs (Alaynick, 2008) (**Figure 11B**).



**Figure 11 : Structure commune des récepteurs nucléaires (A) et classification en fonction de leur capacité à fixer des ligands (B).** A. Les récepteurs nucléaires contiennent une fonction activatrice (AF1) à l'extrémité N-terminale, un domaine de liaison à l'ADN (DBD), un domaine de liaison au ligand (LBD) et une fonction trans-activatrice dépendante du ligand (AF2). B. Classification des récepteurs nucléaires en fonction de leur capacité à fixer des ligands. (D'après Chawla and Mangelsdorf, 2001).

Récepteurs : aux œstrogènes (ER); à la progestérone (PR); des androgènes (AR); aux glucocorticoïdes (GR); des minéralocorticoïdes (MR); de l'acide rétinoïque (RAR); aux hormones thyroïdiennes (TR); à la vitamine D (VDR); X des rétinoïdes (RXR); activé par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR); des oxystéroïls (LXR); X des farnésoloïdes (FXR); Pregnane X (PXR); constitutif des androstanes (CAR); Hepatocyte Nuclear Factor 4 (HNF); Steroidogenic Factor 1 (SF-1); Liver Receptor Homolog-1 (LRH-1); Dosage sensitive sex reversal-Adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene 1 (DAX-1); Small Heterodimer Partner (SHP); Tailless homolog (TLX); Photoreceptor-specific Nuclear Receptor (PNR); Nerve Growth Factor IB-like receptor (NGFI-B); récepteur apparenté au récepteur de rétinoïdes (ROR); Estrogen-related receptors (ERR); Germ Cell Promoter Transcription Factor (COUP-TF); Neuron-derived orphan receptor (NOR), Neuron-derived clone (NUR); V-erbA-related (EAR-2).

La famille des RN endocriniens comporte les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR), aux estrogènes (ER), à la progestérones (PG), aux androgènes (AR) et aux minéralocorticoïdes (MR). Leurs ligands sont exclusivement de source endogène et sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire (Wilson, 1992). Les hormones stéroïdiennes se lient à leurs récepteurs avec une grande affinité.

Les récepteurs orphelins adoptés s'hétérodimérisent avec RXR (Retinoid X Receptor) afin d'induire la transcription de leurs gènes cibles. Les membres de ce groupe incluent le récepteur aux acides gras (PPARs), aux oxystérols (LXR), aux acides biliaires (FXR) ainsi que ceux aux xénobiotiques (CAR et PXR) (Chawla et al., 2001).

## **I.2. Fonctionnement des récepteurs nucléaires**

Les ligands des RN peuvent être d'origine endogène ou exogène, et sont pour la plus grande majorité de nature lipophile. Ils exercent plusieurs actions sur le récepteur : agoniste (augmentation de l'activité transcriptionnelle basale), antagoniste pur (aucune modification de l'activité transcriptionnelle), agoniste inverse (diminution de l'activité transcriptionnelle basale) et agoniste/antagoniste partiels (modification partielle par rapport aux agonistes/antagonistes purs de l'activité transcriptionnelle).

Les RN régulent l'expression de leurs gènes cibles en se liant à l'ADN sur des éléments de réponses spécifiques. Généralement, ces éléments de réponse se situent en amont de la région promotrice du gène cible. La reconnaissance de ces éléments de réponse conditionne l'activité du RN. Les éléments de réponse sont composés de deux séquences nucléotidiques hexamériques formant des répétitions directes, indirectes, ou inversées séparés par un nombre de nucléotides déterminé. Les RN se lient à ces éléments de réponse sous forme de monomère, d'homodimère ou d'hétérodimère. RXR est le principal partenaire d'hétérodimérisation (Kliewer et al., 1992).

L'activation de gènes par les récepteurs nucléaires se déroule en général en 3 étapes, la première consiste à la liaison du ligand, la seconde au recrutement de co-régulateurs et la troisième au recrutement du complexe transcriptionnel.

Le ligand va se fixer au niveau de la poche hydrophobe (LBD) et induit un changement de conformation qui aura pour but de stabiliser le domaine de transactivation AF2 (Thompson et al., 1998). Cette étape permet le passage de la forme inactive à la forme active du récepteur. La liaison du ligand permet aussi de moduler l'interaction avec des protéines cytoplasmiques comme Hsp (Heat Shock Protein) et permet la translocation nucléaire (Hager et al., 2000).

Les co-régulateurs forment des complexes protéiques qui s'associent aux RN afin de moduler leur activité (Rosenfeld and Glass, 2001). Les co-activateurs sont regroupés en plus de cent membres. On

retrouve par exemple les co-activateurs à activité histone acétyltransférase, favorisant la décondensation de l'ADN et ainsi l'accessibilité à la machinerie transcriptionnelle. Dans ce groupe, il y a la famille des protéines p160 incluant SRC1,2 et 3 (Steroid Receptor Co-activator 1,2 et 3) et la famille des p300 ou CBP (cAMP Response Element Binding protein). Parmi les co-activateurs appartenant à la famille p300, il y a PGC1 $\alpha$  (PPAR $\gamma$  Co activator 1) qui permet la liaison de SRC1. Ce co-activateur est spécifique du statut nutritionnel et de l'environnement cellulaire, il est induit en période de jeûne (Mastropasqua et al., 2018).

Les co-répresseurs interagissent avec les RN liés de manière constitutive à l'ADN. Ils peuvent aussi le faire avec des RN liés à des antagonistes ou agonistes partiels qui leur feront adopter des conformations permettant la fixation de co-répresseurs. La fixation de co-répresseurs permet le recrutement de complexes enzymatiques contenant des histones désacétylases qui empêchent toute forme d'activité transcriptionnelle (Bourguet et al., 1995). Les co-répresseurs les plus connus sont NCoR (Nuclear Receptor co-Repressor) et SMRT (Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid Receptor) (Heinzel et al., 1997).

### **I.3. Rôles physiologiques hépatiques majeurs**

Parmi les 48 RN exprimés au niveau hépatique, 20 sont soumis à un rythme circadien, leur expression ainsi que leur activité sont fortement modulées en fonction du cycle jour/nuit et de la prise alimentaire (Yang et al., 2006).

Les RN participant à la régulation de l'homéostasie glucidique et lipidique les plus actifs au niveau hépatique sont PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , PPAR $\beta$ , FXR, LXR $\alpha$ , VDR, GR. Ceux impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques sont CAR, PXR.

#### **I.3.1. Maintien de l'homéostasie énergétique**

- PPARs, senseurs des acides gras

Les récepteurs PPARs (Peroxisome Proliferator Activated Receptors) sont d'importants régulateurs du métabolisme énergétique et sont de ce fait des cibles pharmacologiques de nombreux médicaments pour le traitement du diabète et de l'obésité (López-Velázquez et al., 2012). Les PPARs sont activés par les acides gras insaturés, les  $\omega$ -3, et de nombreux ligands synthétiques. Chaque isotype de PPAR ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) exerce une fonction spécifique dans le maintien de l'homéostasie lipidique. PPAR $\alpha$  (NR1C1) est l'isotype le plus abondant dans un foie sain. Il régule l'oxydation des acides gras (*via* CPT1a) ainsi que leurs captages (*via* FATPs). Il est garant du maintien suffisant en énergie durant les

adaptations jeûne/nourriture (Montagner et al., 2016a). PPAR $\alpha$  contrôle également le métabolisme glucidique en régulant l'expression de la PEPCK (néoglucogénèse) et de la GSK3 (glycogénogénèse).

- LXR (NR1H3), senseur des stérols

LXR $\alpha$  est abondamment exprimé dans les tissus associés au métabolisme des lipides comme le foie, le tissu adipeux, les reins, et les intestins alors que LXR $\beta$  est exprimé de façon ubiquitaire. LXR est activé par les oxystérols (Quinet et al., 2004). C'est un acteur clé du métabolisme du cholestérol, répondant à des niveaux élevés en cholestérol et favorisant son transport, son catabolisme et son élimination (Chawla et al., 2001). L'activation de LXR au niveau hépatique induit l'expression des transporteurs du cholestérol ABCG5 et ABCG8 afin d'augmenter la sécrétion du cholestérol sous forme biliaire (Peet et al., 1998). L'expression de CYP7A1, l'enzyme limitante de la synthèse biliaire et de l'élimination du cholestérol est aussi régulée par LXR. Enfin, LXR $\alpha$  régule également l'expression des gènes impliqués dans la lipogénèse tels que SREBP-1c, SCD1 et FAS (Repa et al., 2000a, 2000b).

- FXR (NR1H4), senseur des acides biliaires

FXR est largement exprimé au niveau du système entéro-hépatique incluant le foie et l'intestin où il agit comme senseur des acides biliaires en protégeant l'organisme contre des niveaux élevés en acides biliaires. Les ligands endogènes de ce récepteur sont les acides biliaires, notamment l'acide cholique et l'acide chénodéoxycholique. L'activation de FXR au niveau hépatique induit l'expression de BSEP permettant l'efflux des acides biliaires vers la bile. L'activation de FXR entraîne également la répression de l'expression des CYPs impliqués dans la synthèse des acides biliaires (Sinal et al., 2000).

### **I.3.2. Détoxification**

- PXR (NR1I2), senseur des xénobiotiques

Il est aussi connu sous le nom du récepteur des stéroïdes et des xénobiotiques (SXR), a été identifié par différentes équipes indépendamment, à la fois chez la souris et l'Homme (Willson and Kliewer, 2002). PXR est fortement exprimé dans le foie où il est présent à la fois dans les hépatocytes et les dans les cellules de Kupffer (Haughton et al., 2006; Wright, 2006). Il est exprimé également dans d'autres tissus tels que les poumons, l'intestin, la moelle osseuse et le cerveau (Lamba et al., 2004). PXR a la capacité de reconnaître un large spectre de ligands en raison de sa grande poche de liaison (Timsit and Negishi, 2007). Le gène cible prototypique de PXR est le CYP3A4 (Goodwin et al., 1999). Il partage de nombreux gènes cibles avec le récepteur nucléaire CAR. Il s'agit par exemple des CYP2C, de l'UGT1A1, de la SULT2A1, de la GSTA1, de l'OATP et de MDR (Tolson and Wang, 2010). Un rôle dans

le métabolisme énergétique lui est désormais attribué. Les données sur la régulation du métabolisme lipidique par PXR montrent un effet d'inhibition sur les gènes de la  $\beta$ -oxydation et d'activation sur les gènes lipogéniques (Nakamura et al., 2007). PXR est également impliqué dans le métabolisme glucidique par son action inhibitrice sur la néoglucogenèse. Les gènes de la néoglucogenèse tels que PEPCCK et G6Pase sont réprimés suite à son activation (Kodama et al., 2007; Zhou et al., 2006).

AhR, ce récepteur est structurellement distinct de la super-famille des récepteurs nucléaires. Il s'agit en effet d'un facteur de transcription de la famille Per-Arnt-Sim présentant des domaines d'interaction hélice-boucle-hélice. AhR est présent dans la glande mammaire, le foie, le système nerveux central, le système cardiovasculaire, et l'utérus (Gueguen et al., 2006). En absence de ligand, AhR est séquestré dans le cytoplasme dans un complexe de molécules chaperonnes. La liaison de son ligand entraîne la translocation nucléaire de AhR qui s'associe avec son partenaire AhR-nuclear translocator (Arnt). Les gènes cibles de AhR sont principalement des enzymes de phase I et II tels que CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, UGT1A1, MDR1 (Nebert et al., 2000). Il a été démontré que l'activation pharmacologique de AhR est capable d'induire l'expression de CAR et de ses gènes cibles à la fois dans un modèle murin et sur des hépatocytes humains (Patel et al., 2007).

-CAR : les sous-chapitres qui suivent ont été consacré à ce récepteur nucléaire sur lequel a porté mon travail de thèse.

## **II. Principales caractéristiques structurales et fonctionnelles du récepteur CAR**

### **II.1. Découverte, caractérisation et expression tissulaire**

Le récepteur constitutif aux androstanes (CAR) ou NR1i3 (sous-famille 1, groupe I et membre 3) a été pour la première fois cloné en 1994, et nommé MB67 par l'équipe de Baes (Baes et al., 1994). Les auteurs ont montré par Northern Blot que MB67 est essentiellement exprimé dans le foie. Afin d'étudier son fonctionnement, son domaine de liaison au ligand (LDB) a été fusionné avec le domaine de liaison à l'ADN (DBD) du récepteur aux hormones thyroïdiennes (TR $\beta$ ) et avec un plasmide contenant des éléments de réponse à TR $\beta$ . Les auteurs ont montré que même en absence de ligand exogène, cette construction était capable d'activer un gène rapporteur sous contrôle d'éléments de réponse du récepteur TR $\beta$ . Ces auteurs ont aussi montré que CAR était un récepteur actif de manière constitutive. Les mêmes auteurs ont également montré que CAR est capable de s'hétérodimériser avec RXR.

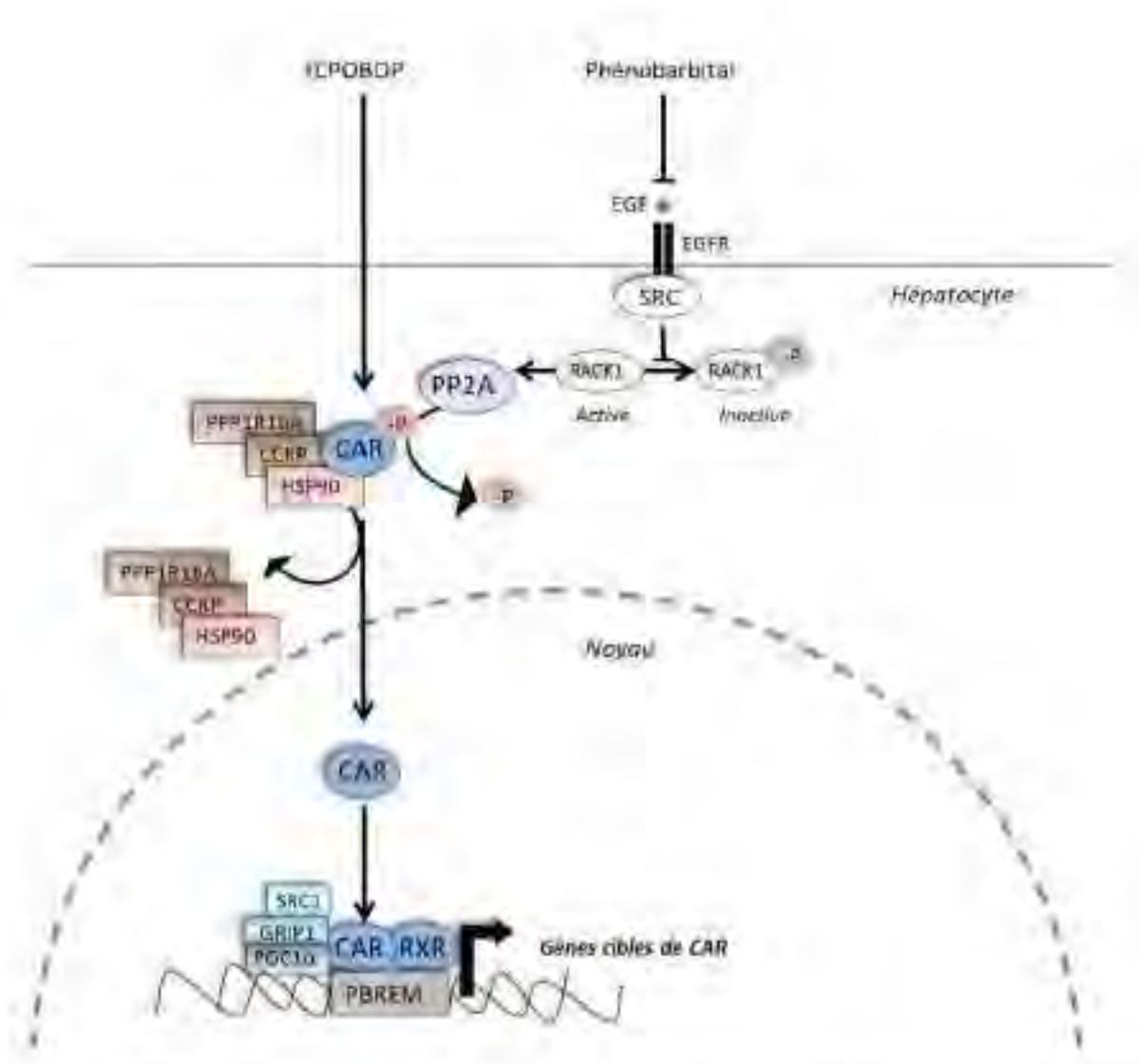
Entre 1997 et 1998, la caractérisation de la forme murine de ce récepteur démontre sa capacité à s'hétérodimériser avec RXR et à se lier aux éléments de réponse de l'acide rétinoïque (RARE) même en absence de ligand exogène (Choi et al., 1997). Les auteurs nomment la forme murine de ce récepteur « Constitutive Androstane Receptor ». Ils identifient deux isoformes: CAR1 et CAR2 qui diffèrent par leur domaine de liaison au ligand. CAR2 est tronqué d'une partie de sa région C-terminale et ne peut ni se lier à l'ADN ni s'hétérodimériser avec RXR. La forme murine de CAR1 possède une activité transactivatrice indépendante de la liaison avec un ligand.

Dans les foies humains, 2 isoformes ont été identifiées ; CAR2 et CAR3 (Auerbach et al., 2005) possédant respectivement 4 ou 5 aminés de plus dans leur domaine de liaison au ligand. Cette insertion pourrait modifier la structure de la poche de liaison et ainsi accueillir des ligands différents de ceux du CAR de référence. CAR2 qui représente 30% du transcrit total chez l'Homme, aurait des capacités limitées à se lier à l'ADN et donc à induire la transcription de ses gènes cibles (Auerbach et al., 2006). Il existe en tout 22 variants d'épissage de CAR et certains sont capables de se lier à l'ADN et de réduire les capacités transactivatrices du récepteur CAR de référence (Jinno et al., 2004).

Un polymorphisme d'un seul nucléotide du récepteur CAR, nommé « NR1I3 rs2501873 » a été identifié. Ce polymorphisme correspond à une substitution A>G au niveau de l'intron 3 du gène. La fonctionnalité de ce polymorphisme n'a pas été testée. Cependant dans une étude épidémiologique réalisée sur une population de 622 brésiliens, la présence de ce polymorphisme uniquement chez les hommes est associée à une hypertriglycémie (Lima et al., 2013).

La protéine humaine de CAR a un poids moléculaire de 40kDaltons où 348 acides aminés se succèdent (Auerbach et al., 2003; Savkur et al.). CAR possède la structure typique des récepteurs nucléaires. Des études structurales de CAR ont montré une particularité de ce récepteur, sa poche de ligand est plus petite que celle d'autres récepteurs nucléaires ce qui limite donc le nombre de ligands potentiels. En effet sa taille est d'environ 500 Angström contre environ 1200 pour PXR et 990 pour VDR (Suino et al., 2004).

En 1998, les travaux de Forman permettent l'identification de deux ligands endogènes, l'androstanol et l'androsténol agissant comme agoniste inverse. Le domaine de liaison du ligand possède même en absence de ligand une conformation active, cependant en présence d'agoniste inverse cette conformation est perdue. Ce récepteur est le premier exemple d'un facteur de transcription régulé négativement par un ligand endogène (Forman et al., 1998a).



**Figure 12: Activation directe (TCPOBOP) et indirecte (Phénobarbital) du récepteur nucléaire CAR.**

La fixation du TCPOBOP dans la poche de liaison de CAR va permettre le recrutement de la protéine phosphatase A2 (PP2A) et la déphosphorylation de CAR et la libération de son complexe de rétention cytosolique (PPP1R16A, CCRP, HSP90). CAR une fois transloqué dans le noyau, s'hétérodimérise avec RXR et recrute différents co-activateurs (SRC-1, GRIP-1, PGC1 $\alpha$ ). Le phénobarbital empêche la fixation de l'EGF (Epidermal Growth Factor) sur son récepteur EGFR, la kinase SRC ne peut plus phosphoryler la protéine kinase RACK1, RACK1 active PP2A, ce qui a pour conséquence la déphosphorylation du récepteur CAR.

CCRP : cytosoplasmic CAR retention protein, EGF : Epidermal Growth Factor, EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor, GRIP-1: Glutamate Receptor Interacting Protein 1, HSP90 : heat shock protein 90, PBREM: phenobarbital (PB)-responsive enhancer module, PGC-1: PPAR $\gamma$  coactivator-1, PP2A : protéine phosphatase 2 (isoforme  $\alpha$ ), PPP1R16A : protein phosphatase 1 regulatory subunit 16A, RACK1: Receptor for Activated C Kinase 1, RXR: retinoid X receptor, SRC: steroid receptor coactivator, SRC-1: steroid receptor coactivator-1, TCPOBOP : 1,4-Bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene

La distribution tissulaire de CAR est la même pour les formes humaines et murines. Il est fortement exprimé dans le foie et l'intestin (Wei et al., 2002a; Xu et al., 2005). Des niveaux plus faibles en ARNm de CAR ont été retrouvés au niveau du cœur, des muscles, des reins des poumons et du cerveau (Baes et al., 1994). Au niveau hépatique CAR est exprimé de façon préférentielle autour de la veine centrolobulaire, lieu où sont localisées certaines réactions de détoxification (Braeuning et al., 2006b).

## II.2. Mécanismes d'activation

Le récepteur nucléaire CAR possède certaines particularités qui le différencient des autres récepteurs nucléaires. L'une de ces particularités est sa localisation dans le cytoplasme sous une conformation active. Il y forme un complexe avec différentes protéines chaperonnes : CCRP (Cytoplasmic CAR Retaining Protein), HSP90 (Heat Shock Protein) et PPP1R16A (the membrane subunit of Protein Phosphatase 1 $\beta$ ) (Kobayashi et al., 2003; Sueyoshi et al., 2008; Yoshinari et al., 2003). Une autre particularité est liée à sa capacité à être activé aussi bien de manière directe qu'indirecte (**Figure 12**). Une fois activé, il migre dans le noyau. Après son hétérodimérisation avec son partenaire RXR, CAR peut se lier à ses éléments de réponses de type DR4 ou DR5 (Direct répétitive séquence séparée de 4 à 5 nucléotides) nommés PBREM (Phenobarbital Response Element Module). Ces PBREM sont situés sur les promoteurs des gènes cibles de CAR, comme CYP2B6 représentant le gène prototypique cible de la forme humaine du récepteur ou Cyp2b10 gène prototypique cible de la forme murine (Mäkinen et al., 2002).

### II.2.1. Activation directe

La fixation d'un ligand agoniste synthétique comme le TCPOBOP (forme murine) ou CITCO (forme humaine) dans la poche de fixation du ligand de CAR induit sa translocation nucléaire (Tzamelis et al., 2000). Cette translocation sollicite le recrutement de la protéine phosphatase A2 (PP2A) en charge de la déphosphorylation au niveau de la thréonine 38 (forme humaine) ou 48 (forme murine) de CAR (Mutoh et al., 2009) et de sa libération du complexe cytosolique (Sueyoshi et al., 2008; Yoshinari et al., 2003). Libéré de son complexe, CAR migre au niveau nucléaire afin de s'hétérodimériser avec RXR et recruter les différents co-activateurs permettant son interaction avec la machinerie transcriptionnelle. GRIP-1 (Glucocorticoid Receptor Interacting Protein-1), PGC1 $\alpha$  (Proliferator Activated Receptor Coactivator 1  $\alpha$ ) et SRC-1 (Steroid Receptor Co-activator) sont les co-activateurs permettant l'initiation de la transcription des gènes cibles de CAR (Min et al., 2002a; Shiraki et al., 2003; Wright et al., 2007). Les co-represseurs empêchent la fixation de ces co-activateurs. Ainsi, le SMILE (Small Heterodimer

partner Interacting Leucine zipper protein) peut entrer en compétition avec d'autres co-activateurs pour le recrutement des histones desacétylases (Xie et al., 2009). CAR peut interagir avec d'autres corépresseurs tels que NCoR, SMRT, SHP et DAX1 modulant ainsi son activité transcriptionnelle (Bae et al., 2004; Laurenzana et al., 2012; Lempiäinen et al., 2005).

### II.2.2. Activation indirecte

CAR a la particularité d'être activé par des molécules à la fois de nature endogène ou exogène stimulant sa translocation sans se lier directement au niveau de sa poche de liaison. C'est le cas du phénobarbital qui induit l'activité transcriptionnelle de CAR via l'induction de sa translocation nucléaire. La rétention cytoplasmique de CAR est permise grâce à une phosphorylation initiée par la protéine kinase C (Mutoh et al., 2009). Le phénobarbital entre en compétition avec le facteur de croissance EGF (Epidermal Growth Factor) par rapport à sa fixation sur son récepteur EGFR. Il empêche ainsi l'activité de la kinase Src induisant la déphosphorylation de la protéine kinase RACK1. RACK1 active PP2A ce qui a pour conséquence la déphosphorylation de CAR par la PP2A et sa translocation nucléaire (Mutoh et al., 2013).

Une nouvelle voie de signalisation contrôlant l'activité de CAR a été identifiée grâce aux travaux de l'équipe de Negishi. Il s'agit de la cascade de signalisation MEK/ERK. Des expériences d'immunoprécipitation montrent une interaction entre CAR et ERK1/2 dans les cellules Hugh-7. Cette interaction empêche la déphosphorylation de CAR et donc sa translocation nucléaire. L'activation de p38 mitogen-activated protein kinase par l'anisomycin augmente l'expression du gène cible de CAR, CYP2B6 attestant son activité dans les cellules HepG2 (Saito et al., 2013). Ainsi les hormones de croissance et cytokines ont un impact sur l'expression des gènes cibles de CAR.

La protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) est une enzyme activée en cas de déplétion énergétique, c'est-à-dire lorsque le ratio AMP/ATP augmente. Cette enzyme permet d'initier les voies cataboliques afin de générer de l'ATP (Hardie and Ashford, 2014). *In vivo*, l'activateur de l'AMPK a la capacité d'induire la translocation nucléaire de CAR mais ne parvient pas à induire l'expression de ses gènes cibles (Shindo et al., 2007). D'autres études montrent que la metformine, médicament activateur de l'AMPK peut supprimer l'induction des gènes cibles de CAR, en modulant la phosphorylation de CAR. En fait, Work et ses collègues ont montré que la metformine phosphoryle CAR grâce à l'AMPK et ERK1/2 empêchant ainsi sa translocation (Yang et al., 2014). Le rôle précis de l'AMPK dans l'activation de CAR reste controversé mais l'ensemble de ces recherches montre l'importance du statut physiologique pour le contrôle de l'activation de CAR.

### II.3. Modulations de l'activité de CAR en situation physiologique et physiopathologique

L'activité du récepteur nucléaire CAR peut être modulée en fonction du statut physiologique ou physiopathologique (**Figure 13**).

- Le jeûne et la restriction calorique

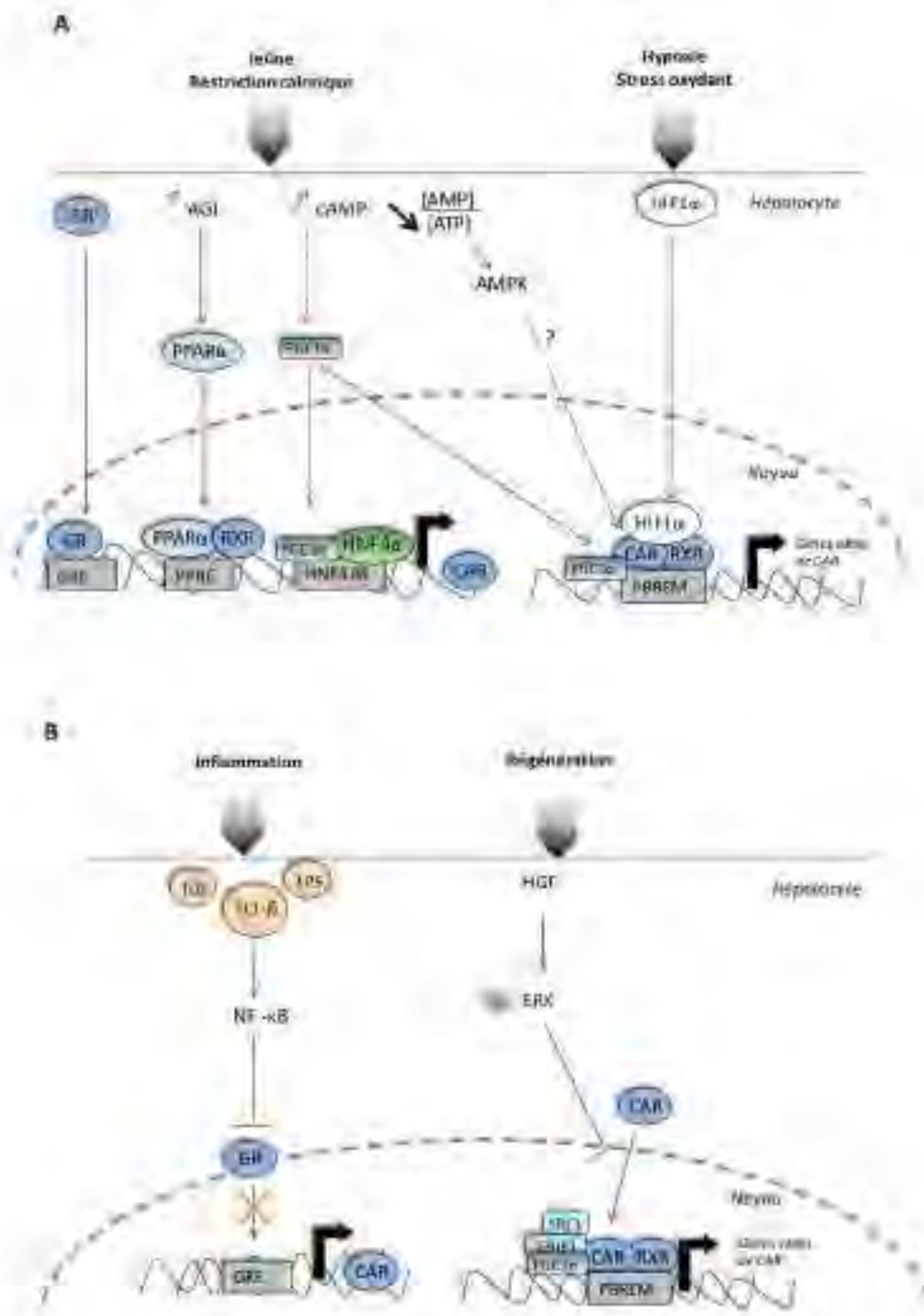
La résistance à la perte de poids pendant un jeûne prolongé ou une restriction calorique incombe la mise en place de voies métaboliques adaptées. Les souris déficientes pour le récepteur CAR présentent un défaut de résistance à un jeûne prolongé (Maglich et al., 2004). Le jeûne entraîne l'activation de CAR. Certains travaux montrent que cette activation passe par l'interaction de PGC1 $\alpha$  et de HNF4 $\alpha$  avec les éléments de réponse régulant l'expression de ce récepteur (Ding et al., 2006). Une autre étude montre l'implication de PPAR $\alpha$  dans l'induction de CAR en réponse au jeûne. Ainsi quand PPAR $\alpha$  est absent l'induction de CAR par le jeûne est abolie (Wieneke et al., 2007). Le récepteur aux glucocorticoïdes semble aussi impliqué, des éléments de réponse à ce récepteur ont été identifiés sur le promoteur de CAR (Pascussi et al., 2003a). Une autre étude réalisée sur les cellules HepG2 montre l'implication de SAPK (Stress Activated Protein Kinase) et Elk1 dans la régulation de l'expression de CAR (Osabe et al., 2009).

- L'hypoxie

L'hypoxie est une condition pathologique qui active la transcription de HIF1 (Hypoxia Inductible Factor) et l'AMPK comme la déplétion énergétique et le stress oxydatif (Lee et al., 2003b). HIF1 est dégradé en condition normoxique, et stabilisé en condition hypoxique afin de réguler la transcription de ses gènes cibles : VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), érythropoïétine (EPO) et des enzymes glycolytiques. Une étude montre que le traitement de souris avec un activateur de HIF1 induit la translocation nucléaire de CAR et l'expression de Cyp2b10. Les auteurs montrent une interaction entre HIF1 et CAR dans leur liaison au niveau des PBREM (Shizu et al., 2013).

- La réponse inflammatoire

Plusieurs éléments rapportés dans la littérature montrent un lien entre la réponse inflammatoire et l'expression ou l'activité du récepteur nucléaire CAR. Ainsi lors d'une réponse inflammatoire, le métabolisme des xénobiotiques est diminué, plus particulièrement l'expression des CYPs est réprimée (Beigneux et al., 2002). La cytokine IL1 $\beta$  et l'endotoxine LPS peuvent réprimer l'expression des gènes cibles de CAR ainsi que sa propre expression via l'activation de la voie NF- $\kappa$ B au niveau hépatique chez l'Homme. NF- $\kappa$ B médie l'inhibition de l'activité transcriptionnelle du récepteur aux glucocorticoïdes. La transactivation de CAR par le GR est ainsi réprimée (Assenat et al., 2004). Les souris mâles adultes sous



**Figure 13: Modulations de l'activité de CAR en condition physiologique (A) et en condition physiopathologique (B).** A. L'expression génique de CAR est induite en réponse au jeûne et à une restriction calorique par l'intervention des récepteurs nucléaires GR, PPARα et HNF4α. L'hypoxie induit la translocation nucléaire de CAR et l'expression de ses gènes cibles via HIF1. B. Les cytokines sont capables via l'intervention de la voie NFκB d'inhiber l'expression génique de CAR ainsi que de ses gènes cibles. En situation de régénération hépatique, le facteur de croissance hépatique (HGF) via la kinase ERK empêche la translocation nucléaire de CAR, réduisant ainsi l'expression de ses gènes cibles.

AGL : Acide Gras Libre, AMP : adenosine 3',5'-monophosphate, AMPK : AMP-activated protein kinase, ATP : Adenosine triphosphate, cAMP : Cycllic adenosine 3',5'-monophosphate, ERK : Extracellular signal-regulated kinases GR: Récepteur des glucocorticoïdes, GRE: Glucocorticoïdes responsive element, HIF-1 : Hypoxia-Inducible Factor-1, HNF4 α: Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha, NFκB: nuclear factor-kappa B, PBREM: phenobarbital (PB)-responsive enhancer module, PGC-1: PPARγ coactivator-1-alpha, PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptors, PPRE: peroxisome proliferator response element, RXR: retinoid X receptor

régime riche en graisse présentent à la fois une induction des cytokines proinflammatoires et une répression aussi bien de Cyp2b10 que de CAR (Ghose et al., 2011). Par ailleurs, une autre étude montre que l'oncostatine M, membre de la famille des IL6 augmente l'expression des gènes cibles de CAR via la voie des MAP kinases (Masuyama et al., 2010).

- La régénération hépatique

Lors d'une régénération hépatique l'expression des CYPs est réprimée (Marie et al., 1988). Le facteur de croissance hépatocytaire (HGF, Hepatocyte Growth Factor) est le puissant stimulateur de la synthèse d'ADN dans le foie. Dans des cultures primaires d'hépatocytes humains traités avec l'HGF, une répression de l'expression des CYPs est observée (Donato et al., 1998). De plus, la surexpression de HGF chez la souris réprime l'expression génique de CAR (Kakizaki et al., 2007). HGF induit la phosphorylation de la protéine kinase ERK1/2 (Extracellular Signal-regulated Kinase) dans le cytoplasme des hépatocytes murins. Cette phosphorylation active la protéine ERK1/2 et empêche la translocation nucléaire de CAR. L'activation de la protéine ERK1/2 est un signal endogène permettant la séquestration de CAR au niveau cytoplasmique (Koike et al., 2007).

#### II.4. Dimorphisme sexuel dans l'activité de CAR

Le lien entre le récepteur nucléaire CAR et les hormones sexuelles est fort et plusieurs éléments de la littérature rapportent un dimorphisme sexuel important dans l'activité de CAR.

Plusieurs études montrent une activité et une expression de CAR plus importante chez les femelles que chez les mâles. Ainsi des souris femelles traitées au TCPOBOP présentent une induction plus importante des gènes cibles de CAR (Ledda-Columbano et al., 2003; Lu et al., 2013). La même observation a été faite suite à un traitement au phénobarbital (Weghorst and Klaunig, 1989). Le niveau d'expression génique de CAR est plus élevé chez les femelles par rapport aux mâles (Petrick and Klaassen, 2007). Le niveau d'expression plus élevé des CYPs chez les femelles a également été démontré en utilisant la Zoxazolamine, un myorelaxant, substrat des CYPs. Ce composé est classiquement utilisé *in vivo* pour tester l'activité des CYPs. Une augmentation du temps de paralysie signifie une inhibition des CYPs alors qu'une diminution signifie une augmentation de l'activité des CYPs. Les souris femelles déficientes pour CAR (CAR<sup>-/-</sup>) sont plus résistantes que les mâles et présentent un temps de paralysie plus court. De plus, aucune des souris femelles CAR<sup>-/-</sup> ne meure suite à ce traitement alors que chez les mâles CAR<sup>-/-</sup> 5 souris sur 6 ne se réveillent pas (Hernandez et al., 2009a).

Les niveaux plus élevés de CYPs chez les femelles peuvent s'expliquer de différentes manières. Ils peuvent s'expliquer par l'inhibition de l'activité de CAR chez les mâles par les métabolites de la

testostérone comme l'androstanol, qui ont été identifiés comme des agonistes inverses de CAR. Ils peuvent aussi s'expliquer par un effet d'activation de CAR par les œstrogènes rapporté dans certaines études (Kawamoto et al., 2000a). Cette différence peut enfin s'expliquer par une régulation plus importante de l'activité de CAR par le récepteur nucléaire HNF4 $\alpha$  chez les femelles (Kamiyama et al., 2007). Ce récepteur nucléaire est impliqué dans la régulation dimorphique des niveaux d'expression basaux des CYPs (Holloway et al., 2008). Plusieurs données sur l'Homme et la souris suggèrent que HNF4 $\alpha$  régulerait l'expression de CAR qui régulerait à son tour l'expression des CYPs (Wiwi et al., 2004; Wortham et al., 2007).

Par ailleurs, CAR semble jouer un rôle important dans la régulation du statut en androgènes au niveau hépatique (Hernandez et al., 2009a). Le métabolisme de la testostérone fait intervenir plusieurs étapes d'hydroxylation. L'activité de l'hydroxylase 6 $\alpha$  est plus importante chez les femelles alors que celle de l'hydroxylase 15 $\alpha$  l'est plus chez les mâles. La mesure du ratio 6 $\alpha$ /15 $\alpha$ -hydroxylase témoigne du statut au niveau des androgènes et est considérée comme un biomarqueur d'une perturbation des niveaux en androgènes (Wilson et al., 1999). Une étude a montré que le métabolisme de la testostérone et en particulier le ratio 6 $\alpha$ /15 $\alpha$ -hydroxylase est diminué chez les femelles déficientes pour le récepteur CAR comparé aux souris sauvages alors qu'il est habituellement plus élevé chez les femelles. Ce ratio, diminué chez les femelles CAR<sup>-/-</sup> témoigne d'une masculinisation de ces souris (Hernandez et al., 2009a).

## II.5. Dialogue entre CAR et les différents récepteurs nucléaires

L'activation des récepteurs nucléaires passe par une série d'étapes: la fixation d'un ligand/activateur, l'association avec le partenaire de dimérisation, la liaison avec des co-régulateurs, la transcription des gènes cibles possédant des éléments de réponse spécifiques et les fonctions biologiques associées aux gènes. Cette vision représente un schéma simplifié qui masque les possibilités d'interactions entre récepteurs nucléaires. Des dialogues croisés entre récepteurs nucléaires sont souvent rapportés dans la littérature. Ils peuvent s'établir sous différentes formes: la présence de ligands communs générant des phénomènes de compétition, la présence d'éléments de réponse communs à l'origine d'une compétition pour le même gène cible, la compétition pour le recrutement des mêmes co-régulateurs, la stimulation ou la répression du récepteur par une modification post-traductionnelle provoquée par un autre récepteur nucléaire. Ainsi des dialogues entre CAR et différents récepteurs nucléaires ont été rapportés dans la littérature (**Figure 14**).

### **II.5.1. Dialogue entre CAR et LXR**

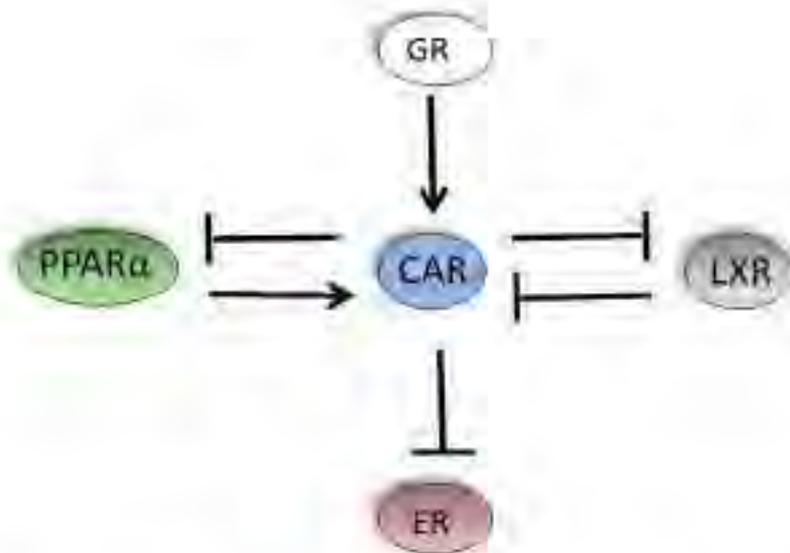
Les oxysterols constituent la source principale de ligands endogènes de LXR. Or CAR est impliqué dans le processus d'inactivation par une sulfatation des oxystérols à travers la régulation d'expression de l'enzyme de détoxification SULT2B1. Son activation conduit donc à une diminution d'activité de LXR et par voie de conséquence d'expression de SREBP-1c et des gènes de la lipogenèse *de novo*. Cet effet suppresseur de CAR sur les gènes de la lipogenèse est aboli sur des souris déficientes pour SULT2B1 (Dong et al., 2009b; Xiao et al., 2010). En accord avec ces données, la délétion de CAR entraîne une augmentation de l'expression des gènes lipogéniques cibles de LXR (Zhai et al., 2010). CAR et LXR exerceraient donc une répression mutuelle. De plus, LXR peut se lier aux éléments de réponse de CAR au niveau des promoteurs des gènes CYP2B6 et CYP3A4 et s'opposer ainsi à son action (Handschin et al., 2002).

### **II.5.2. Dialogue entre CAR et PPAR $\alpha$**

Plusieurs études rapportent l'existence d'un dialogue croisé entre CAR et PPAR $\alpha$ . Ainsi l'activation de PPAR $\alpha$  par son agoniste pharmacologique le WY14643, induit l'expression de CAR et de ses gènes cibles de façon PPAR $\alpha$  dépendante (Saito et al., 2010; Wieneke et al., 2007). D'autres études montrent que les agonistes de PPAR $\alpha$  induisent la translocation nucléaire de CAR de façon indépendante de PPAR $\alpha$  (Guo et al., 2007). Les acides gras libérés au cours d'un jeûne induisent l'expression de CAR *via* un élément de réponse à PPAR $\alpha$  se trouvant sur le promoteur de CAR (Maglich et al., 2004). Par ailleurs, l'activation pharmacologique de CAR *in vivo* chez des souris soumises à un régime riche en graisse diminue l'expression de gènes cibles de PPAR $\alpha$  tels que Cpt1a, Cyp4a14 (Maglich et al., 2009). CAR est enfin capable de se lier à des éléments de réponse à PPAR (PPRE) situés dans les régions promotrices de certains gènes cibles de PPAR $\alpha$  comme l'acyl-Coenzyme A oxydase (Acox) (enzyme limitante de la  $\beta$ -oxydation) (Kassam et al., 2000).

### **II.5.3. Dialogue entre CAR et ER**

En dépit du lien fort entre CAR et les hormones sexuelles peu d'études ont porté sur le dialogue croisé entre CAR et ER à l'exception de deux réalisées par la même équipe sur la lignée hépatocytaire HepG2. Dans la première étude les auteurs montrent que ER pourrait avoir un effet activateur ou inhibiteur sur CAR selon les ligands en présence (Min et al., 2010). Dans la deuxième, ils montrent que l'activation de CAR permet d'inhiber l'activité transcriptionnelle de ER en rentrant en compétition avec le recrutement des co-activateurs qu'ils ont en commun (Min et al., 2002b).



**Figure 14: Schéma simplifié du dialogue existant entre CAR et différents récepteurs nucléaires.** CAR via l'induction de l'enzyme de détoxification SULT2B1 inactive les oxystérols et de ce fait diminue l'activité de LXR, LXR entre en compétition avec CAR pour les mêmes éléments de réponse situés sur le promoteur des gènes CYP2B6 et CYP3A4. L'activation pharmacologique de PPARα induit l'expression génique de CAR et de ses gènes cibles, un élément de réponse à PPARα se situe sur le promoteur du gène codant pour CAR. L'activation pharmacologique de CAR réprime l'expression de gènes cibles de PPARα. CAR entre en compétition avec ER pour le recrutement des co-activateurs limitant ainsi son activité transcriptionnelle. Des éléments de réponse au récepteur aux glucocorticoïdes GR ont été identifiés sur les promoteurs des gènes codant pour CAR et CYP2B9.

ER : récepteurs des œstrogènes, GR : Récepteur des glucocorticoïdes, LXR : Liver X receptor, PPARα : Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Alpha

#### **II.5.4. Dialogue entre CAR et GR**

Les études sur les interactions entre les récepteurs CAR et GR rapportent un effet d'activation de GR sur CAR et ses gènes cibles. Une étude réalisée sur des cultures primaires d'hépatocyte humain a montré que la dexaméthasone, glucocorticoïde synthétique est capable d'induire la transcription de CAR et de ses gènes cibles (Pascussi et al., 2000). La même équipe a montré un peu plus tard la présence d'un élément de réponse à GR (GRE) sur le gène cible prototypique de CAR : CYP2B9 (Gerbal-Chaloin et al., 2002). Un élément de réponse à GR a également été identifié sur le promoteur de CAR (Pascussi et al., 2003b). De même, le traitement avec des antagonistes du récepteur GR (ketoconazole et miconazole) dans les cellules HepG2 inhibe l'expression de CAR et de ses gènes cibles (CYP2B6, CYP2B9) (Duret et al., 2006).

### **III. Régulation de la détoxification hépatique par le récepteur nucléaire CAR**

La génération des souris déficientes pour le récepteur CAR par l'équipe de D.D. Moore a permis de mettre en évidence le rôle majeur de ce récepteur dans la détoxification des xénobiotiques (Moore et al., 2000a). La délétion de CAR altère la sensibilité des souris aux toxines, les souris CAR<sup>-/-</sup> étant incapables d'induire certaines enzymes clés de la détoxification. CAR joue également un rôle majeur dans le métabolisme de différentes substances endogènes dont l'accumulation pourrait être toxique pour la cellule.

#### **III.1. Détoxification des xénobiotiques**

CAR coordonne l'expression de nombreux gènes hépatiques impliqués dans le catabolisme des xénobiotiques : il induit les réactions de biotransformation de phase I et II ainsi que l'expression des transporteurs. Les gènes cibles spécifiquement régulés par ce récepteur sont récapitulés dans le tableau 3 (Hernandez et al., 2009b).

**Tableau 3: Gènes cibles du récepteur nucléaire CAR impliqués dans les phases de détoxification**

	<b>Souris</b>	<b>Homme</b>
<b>Phase I</b>	<i>Cyp1a1, Cyp1a2, Cyp2a4, Cyp2b10, Cyp2c29, Cyp2c37, Cyp2c55, Cyp3a11, Nqo1, Aldh1a1, Aldh1a7, Akr1b7, Ces6</i>	<i>CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5</i>
<b>Phase II</b>	<i>Ugt1a1, Ugt1a9, Ugt2b34, Ugt2b35, Ugt2b36, Sult1e1, Sult2a1, Sult2a2, Sult3a1, Sult5a1, Gsta1, Gsta4, Gstm1, Gstm2, Gstm3, Gstm4, Gstp, Gstt1</i>	<i>UGT1A1, SULT2A1</i>
<b>Transporteurs</b>	<i>Mrp2, Mrp3, Mrp4, Oatp1a4</i>	<i>MDR1</i>

L'action hépatoprotectrice de CAR contre les xénobiotiques ne consiste pas uniquement en l'induction d'expression des gènes de détoxification, elle peut aussi conduire à la répression d'expression de certains gènes. Ainsi, CAR empêche par exemple l'induction de CYP4A, enzyme majeure pour la peroxydation lipidique, par induction de la superoxyde dismutase-3 (SOD) afin de limiter le stress oxydant (Swales and Negishi, 2004).

Deux classes de xénobiotiques principales sont décrites comme modulatrices de l'activité du récepteur CAR ; les médicaments et les polluants environnementaux.

### **III.1.1. Polluants environnementaux**

L'ensemble des polluants environnementaux activateurs de CAR ont été regroupés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 4: Polluants environnementaux identifiés comme activateurs du récepteur nucléaire CAR**

Composés	Espèces	Références
Acide perfluorocarboxylique, PFCA (détergent)	Souris	Abe et al., 2017; Cheng and Klaassen, 2008
Acide perfluorooctanoïque, PFOA (détergent)	Souris	Kawamoto et al., 1999; Oshida et al., 2015
Acide perfluorooctanesulfonique PFOS (détergent)	Rat	Elcombe et al., 2012
Alachlor (Pesticide)	Souris	Baldwin and Roling, 2009
Arsenite (Chimique)	Souris	Baldwin and Roling, 2009
Colorants azoïques (Peinture)	Souris et Rat	Pakharukova et al., 2007
Bisphénol A (Chimique)	Souris	Baldwin and Roling, 2009
Butylate (Pesticide)	Souris	Baldwin and Roling, 2009
Chlorpropham (Pesticide)	Souris	Baldwin and Roling, 2009
Chlorpyrifos (Pesticide)	Souris	Baldwin and Roling, 2009
Cyperméthrin (Pesticide)	Souris	Baldwin and Roling, 2009
Cyproconazole (Pesticide)	Souris	Peffer et al., 2007
DBP, Di-n-butylphthalate (Plastifiant)	Rat	Wyde et al., 2005
DDE, Dichlorodiphényldichloroéthylène (Pesticide)	Rat	Wyde et al., 2003
Di-isononyl phthalate (DiBP) (Plastifiant)	Homme	Laurenzana et al., 2016
O,p-DDT , 1,1,1-Trichloro-2-(2-chlorophenyl)-2-(4-chlorophenyl)éthane (Pesticide)	Souris et Rat	Sueyoshi et al., 1999; Wyde et al., 2003
DEHP (Plastifiant)	Souris et Homme	Baldwin and Roling, 2009; DeKeyser et al., 2009
Dieldrine (Pesticide)	Souris	Wei et al., 2002b
Endosulfan (Pesticide)	Souris et Homme	Baldwin and Roling, 2009; Savary et al., 2014
Ferriéthion (Pesticide)	Souris	Baldwin and Roling, 2009
Hydrocarbures polycycliques aromatiques	Souris	Zhang et al., 2015
Imazalil (Pesticide)	Souris	Baldwin and Roling, 2009
Képone (Pesticide)	Souris	Baldwin and Roling, 2009
MEHP (Plastifiant)	Souris	Baldwin and Roling, 2009
Métolachlor (Pesticide)	Souris	Baldwin and Roling, 2009
Méthoxychlor (Pesticide) et métabolites	Souris, Rat et Homme	Baldwin and Roling, 2009; Blizard et al., 2001; Savary et al., 2014
Monosodium méthane arsenate	Souris	Baldwin and Roling, 2009
Nonylphénol (Plastifiant)	Homme	Hernandez et al., 2007
Parathion (Pesticide)	Souris	Hernandez et al., 2007
PCB Polychlorobiphényles (dérivés chimiques)	Souris	Sueyoshi et al., 1999
Propachlor (Pesticide)	Souris	Baldwin and Roling, 2009
2,3,7,8-Tétrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)	Souris	Prokopec et al., 2015
SSS-Tributylphosphorotithioate (Pesticide)	Souris	Baldwin and Roling, 2009
Triclopyr (Pesticide)	Souris	Baldwin and Roling, 2009

### III.1.2. Médicaments

L'ensemble des médicaments activateurs ou inhibiteurs de CAR a été regroupé dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 5: Médicaments exerçant une action activatrice ou inhibitrice sur le récepteur nucléaire CAR**

Médicaments	Espèces	Action	Références
Acide valproïque	Homme	Activateur	Cervený et al., 2007
Acétaminophène	Souris	Activateur	Zhang et al., 2002, 2004a
Antifongiques triazolés	Souris	Activateur	Goetz et al., 2006; Peffer et al., 2007
Artémisine	Souris et Homme	Activateur	Burk et al., 2005; Swales and Negishi, 2004
Benzodiazépines	Homme	Inhibiteur	Li et al., 2008
Clotrimoxazole	Homme	Inhibiteur	Moore et al., 2000b
Cocaïne	Homme	Inhibiteur	Malaplate-Armand et al., 2005
Déxaméthasone	Homme	Activateur	Pascussi et al., 2000; Qatanani et al., 2004
Kétoconazole	Homme	Inhibiteur	Duret et al., 2006
Méclizine	Souris et Homme	Activateur (Souris) Inhibiteur (Homme)	Huang et al., 2004
Métamizole	Homme	Activateur	Saussele et al., 2007
Méthotrexate	Souris	Inhibiteur	Chen et al., 2006; Shibayama et al., 2006
Orphénadrine	Rat	Activateur	Murray et al., 2003
Phénobarbital	Souris, Rat	Activateur	Li et al., 2017 ;Currie et al., 2014
Phénytoïne	Homme	Activateur	Jackson et al., 2004, 2006; Wang et al., 2004
Statines	Homme	Activateur	Howe et al., 2011; Režen et al., 2017

### III.2. Détoxification des composés endogènes

A travers la régulation de ces enzymes du métabolisme des xénobiotiques, CAR est également impliqué dans le métabolisme d'un certain nombre de substances endogènes dont les hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes ainsi que les acides biliaires et la bilirubine.

#### III.2.1. Hormones stéroïdiennes

Les premiers ligands de CAR identifiés sont de nature stéroïdienne: l'androstanol et l'androsténol qui peuvent inhiber l'activité de CAR en entraînant la dissociation de CAR avec le coactivateur SRC1 (Forman et al., 1998b). De façon similaire, la progestérone et la testostérone inhibent également l'activité de CAR (Swales and Negishi, 2004). Les œstrogènes (17 $\beta$ -estrone (E2) et estrone (E1)) sont

capables d'activer CAR dans les cellules HepG2 alors que les métabolites œstrogéniques (estriol, estetrol, et estradiol sulfate) ne l'activent pas. *In vivo*, ce résultat n'est pas confirmé, les œstrogènes ne sont pas capables d'activer CAR chez des souris femelles, en revanche chez des souris mâles les androgènes sont toujours inhibiteurs de son activité (Kawamoto et al., 2000b). Cependant lors d'une grossesse, les niveaux élevés en E2 activent CAR et le récepteur aux œstrogènes (ER) qui peuvent par synergie induire l'expression de CYP2B6 (Koh et al., 2012). Dans les hépatocytes humains, le précurseur majeur de l'œstrogène et des androgènes, le déhydroépiandrostérone (DHEA), induit la translocation nucléaire de CAR ainsi que l'expression de CYP2B6 (Kohalmy et al., 2007).

Les niveaux en hormones stéroïdiennes sont maintenus grâce à une balance dynamique entre leur synthèse et leur inactivation. Les capacités de stockage des hormones stéroïdiennes étant limitées, une coordination entre leur synthèse et leur biotransformation est indispensable pour maintenir des fonctions physiologiques normales. De nombreux CYPs (CYP11, CYP17, CYP19, CYP21) sont spécifiquement responsables de la synthèse des hormones stéroïdiennes et de leur catabolisme et inactivation (Ruckpaul et al., 1985). Le foie est le site majeur du catabolisme des hormones stéroïdiennes et le récepteur CAR joue un rôle important dans ce catabolisme à travers la régulation d'expression des CYPs et des sulfotransférases. L'activation de CAR et de ses gènes cibles par le TCPOBOP induit le catabolisme des œstrogènes et favorise leur excrétion (Yamamoto et al., 2006).

Le cortisol peut être hydroxylé par le CYP3A4 pour donner le 6 $\alpha$ -hydroxycortisol, qui est recherché dans les urines comme marqueur du fonctionnement des CYP3A4 chez l'Homme (Abel et al., 1992; Ged et al., 1989). CYP3A4, CYP2C19 et 2C9 sont des cytochromes également impliqués l'hydroxylation de la progestérone et de la testostérone (Yamazaki and Shimada, 1997). Les hydroxylations de l'estradiol et de l'estrone impliquent les CYP1A1, CYP1B1 et CYP3A4 (Lee et al., 2003a). Le CYP3A4 semble jouer un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie de l'œstradiol (Yu et al., 2005).

Les sulfotransférases jouent également un rôle prépondérant dans l'inactivation des hormones stéroïdiennes. C'est le cas de l'EST (Estrogen Sulfotransférase) dont le gène SULT1E1 catalyse la conjugaison d'un sulfate sur l'œstrogène. L'œstrogène sulfaté ne peut se plus se lier à son récepteur ER. L'EST est considéré comme un facteur majeur d'inactivation de l'œstrogène (Song, 2001). Une étude a montré chez la souris une induction CAR dépendante de cette enzyme (Sueyoshi et al., 2011). La sulfotransférase SULT2A1 est importante pour la conjugaison de l'hydroxysteroid dehydroepiandrosterone, des travaux montrent également l'importance de CAR dans l'induction de cette enzyme (Chen et al., 2007b).

### III.2.2. Hormones thyroïdiennes

Les niveaux en hormones thyroïdiennes sont contrôlés par une balance entre synthèse, métabolisation et sécrétion. La TSH (Thyroid Stimulating Hormone) induit la synthèse de la forme inactive T4 (3-5-3'-5'-tetraiodothyronine) dans la glande thyroïdienne qui est ensuite convertie en différentes formes par les désiodidases dans les tissus périphériques comme le foie et les reins. Trois désiodidases ont été identifiées : désiodidase de type 1 (D1), de type 2 (D2) et de type 3 (D3). D1 est l'enzyme majeure responsable de la conversion du T4 en la forme active T3 (3-3'-5-triiodothyronine) dans le foie.

De nombreuses études font le lien entre l'activité de CAR et celle des hormones thyroïdiennes. Ainsi des traitements chroniques au phénobarbital entraînent des hypertrophies de la thyroïde que ce soit chez le rat ou chez l'humain (Curran and DeGroot, 1991). Deux études ont montré que l'activation de CAR par le phénobarbital ou la phénytoïne diminue le niveau sérique de T4 sans changer le niveau de T3 chez des souris CAR<sup>+/+</sup> (Curran and DeGroot, 1991; Maglich et al., 2004; Qatanani et al., 2005). De plus cette diminution des niveaux de T4 est accompagnée d'une augmentation des niveaux de TSH, correspondant à un état d'hypothyroïdie. Un statut hypothyroïdien obtenu grâce à un régime carencé en iode contenant 0.15% de propylthiouracil induit chez la souris à la fois l'expression génique de CAR et celle de son gène cible Cyp2b10 (Park et al., 2012). Une autre étude montre qu'une thyroïdectomie ou un traitement au 6-propyl-2-thiouracil ; deux méthodes utilisées pour induire une hypothyroïdie chez le rat, répriment l'expression de CAR et CYP2B1 (Ooe et al., 2009). Une étude plus récente montre que des cellules Huh7 traitées avec l'hormone T3 présente une augmentation de l'expression de CAR (Bing et al., 2014).

CAR est également impliqué dans le catabolisme des hormones thyroïdiennes. Ce catabolisme implique des conjugaisons avec des groupements sulfates ou glucuronides (Visser et al., 1998). Ces réactions sont catabolisées par deux enzymes de phase II, l'UGT1A1 et la SULT1A1 qui sont toutes les deux régulées par CAR (Hernandez et al., 2009).

### III.2.3. Bilirubine et hème

La bilirubine est le produit de dégradation de l'hème, c'est un des composés les plus toxiques de l'organisme. Son accumulation est associée à un ictère et en cas d'accumulation prolongée, cela entraîne une neurotoxicité. La glucuronidation par l'enzyme UGT1A1 est la voie majeure de détoxification de ce composé qui est ensuite sécrété dans la bile par le transporteur actif MRP2. CAR est impliqué dans la clairance de la bilirubine par induction des enzymes UGT1A1, GSTa1 (Sugatani et al., 2001) et des transporteurs OATP2 et MRP2 (Guo et al., 2002). Sur des cultures primaires

d'hépatocytes de souris, la bilirubine comme le phénobarbital est capable d'induire la translocation nucléaire de CAR (Huang et al., 2003).

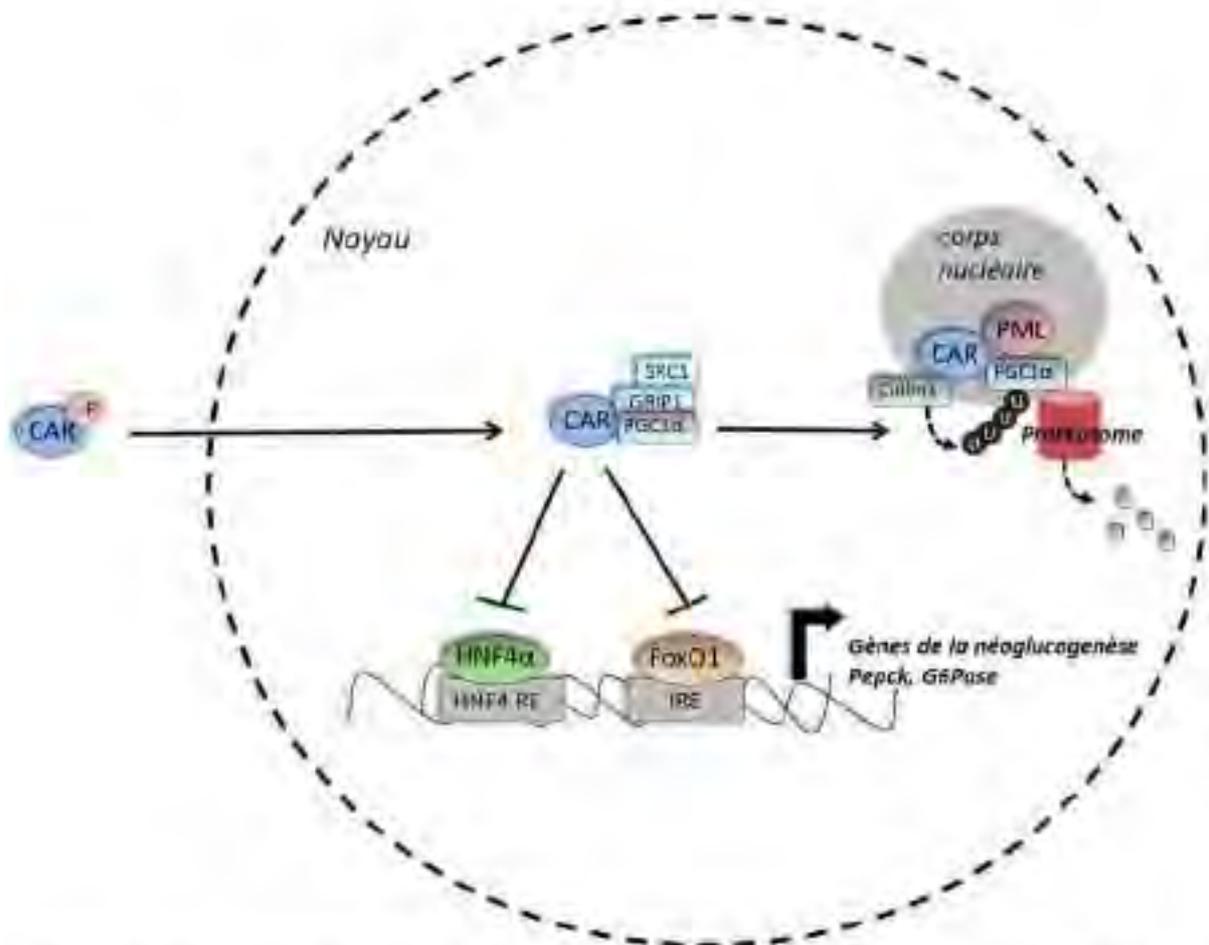
#### **III.2.4. Acides biliaires**

Les acides biliaires produits par le foie sont indispensables pour l'élimination du cholestérol et l'absorption des lipides d'origine alimentaire. L'homéostasie des acides biliaires est finement régulée, des niveaux élevés étant extrêmement toxiques pour l'organisme. La sécrétion biliaire est importante pour la sécrétion des composés endogènes et exogènes hydrophobes. Il a été démontré que chez la souris l'activation de CAR induisait l'expression d'enzymes (CYP3A11, SULT2A1) et de transporteurs (MRP3) impliqués dans le métabolisme et l'élimination des acides biliaires (Zhang et al., 2004b). L'activation de CAR par le TCPOBOP protège le foie de la cholestase, en permettant la production d'acides biliaires moins toxiques pour le foie (Beilke et al., 2009). CAR semble agir indépendamment du xénosenseur aux acides biliaires, le récepteur FXR. En effet chez les souris déficientes pour FXR et PXR, des niveaux élevés d'acide cholique induisent l'expression de CAR et de ses gènes cibles et permettent une protection contre sa toxicité en induisant sa métabolisation et son catabolisme (Guo et al., 2003).

Le cholestérol hépatique est dégradé en deux acides biliaires primaires, l'acide cholique (CA) et l'acide chenodeoxycholique (CDCA). Dans l'intestin, ces acides biliaires sont hydroxylés par le microbiote en acides biliaires secondaires, l'acide déoxycholique et l'acide lithocolique (LCA) (Ridlon et al., 2006). Le LCA est réabsorbé au niveau intestinal et est transporté vers le foie. Des souris de type sauvage nourries avec un aliment contenant 0.5% de LCA présentent une induction de Cyp2b10 qui n'est pas retrouvée chez des souris déficientes pour CAR nourries avec le même régime (Zhang et al., 2004b).

### **IV. Régulation du métabolisme énergétique hépatique**

Un rôle de CAR dans la régulation du métabolisme glucido-lipidique a été récemment attribué à ce récepteur nucléaire sur la base d'études cliniques qui ont ensuite été confirmées par des études chez l'animal.



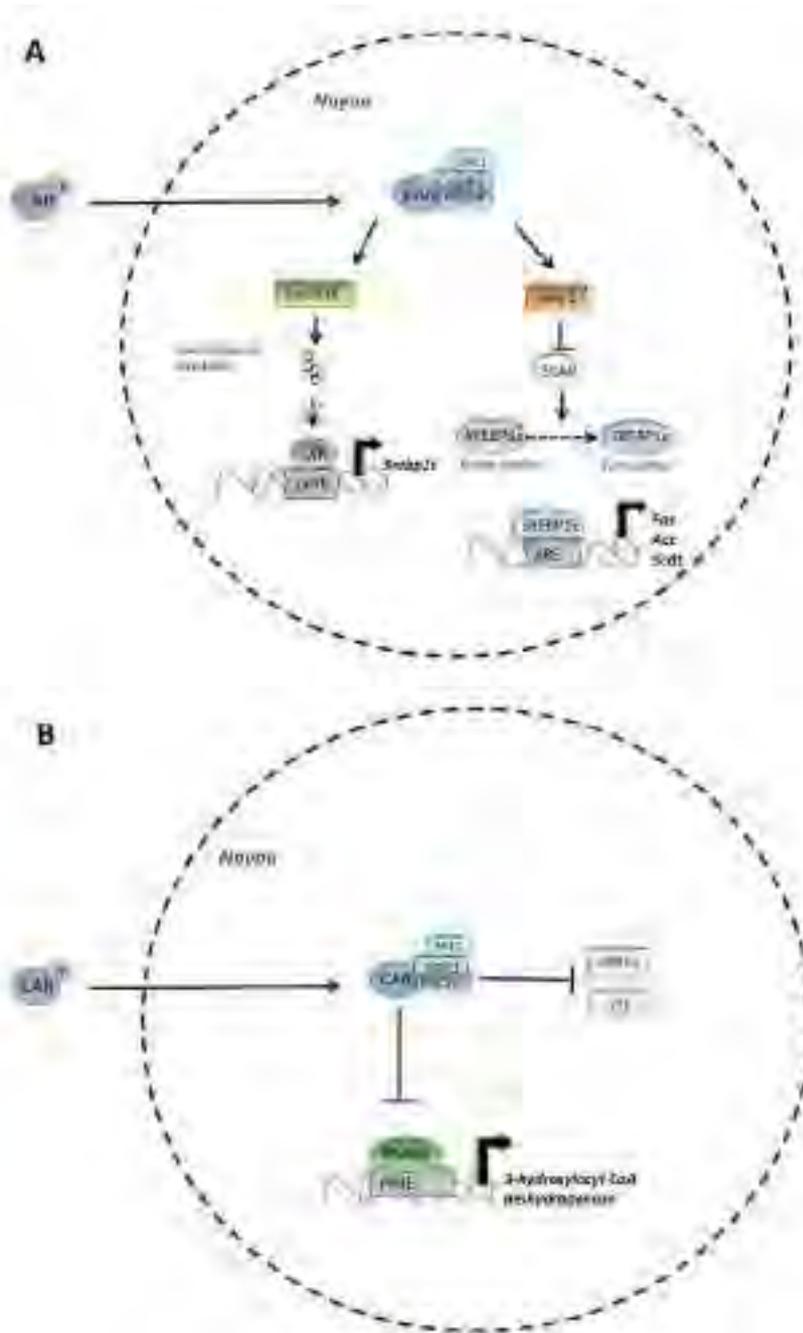
**Figure 15: Répression des gènes de la néoglucogenèse par le récepteur nucléaire CAR.** Différents modèles sont proposés : (i) CAR entre en compétition pour les mêmes éléments de réponse de HNF4α (HNF4 RE) et FoxO1 (IRE) situés sur le promoteur des gènes de la néoglucogenèse (ii) CAR entre en compétition avec HNF4α pour le recrutement des mêmes co-activateurs (SRC1 et GRIP1), diminuant ainsi son activité transactivatrice sur les gènes néoglucogéniques (iii) CAR se lie à PGC1α et permet le recrutement de la ligase Cullin1, ceci permet l'adressage de PGC1α pour y être ubiquitiné et dégradé par le protéasome (d'après Yan, et al., 2015 et Geo et al., 2015)

FoxO1: Forkhead box protein O1, GRIP-1: Glutamate Receptor Interacting Protein 1, HNF4 RE: Hepatocyte nuclear factors 4 responsive elements, HNF4α: Hepatocyte nuclear factor 4 alpha, IRE: insulin responsive elements, PGC-1α: PPARγ coactivator-1-alpha, PML: promyelocytic leukemia, SRC-1: steroid receptor coactivator-1

#### IV.1. Métabolisme du glucose

Le rôle de CAR sur l'homéostasie glucidique a été suggéré pour la première fois suite à différentes études cliniques chez des patients diabétiques traités au phénobarbital qui présentaient une amélioration de leur sensibilité à l'insuline ainsi qu'une diminution de leur glycémie (Lahtela et al., 1985; Sotaniemi et al., 1983). Les souris diabétiques présentent également une amélioration de leur tolérance au glucose suite à un traitement avec l'agoniste pharmacologique de CAR, le TCPOBOP (Dong et al., 2009b). L'amélioration de la tolérance au glucose est principalement permise par la suppression de la production hépatique de glucose par la néoglucogenèse. En effet, l'activation de CAR entraîne la répression des enzymes limitantes de la néoglucogenèse : PEPCK, G6Pase. Plusieurs modèles proposent des mécanismes pour expliquer la répression de ces gènes par CAR. Dans le premier modèle CAR entrerait en compétition avec FoxO1 (Forkhead box protein O1) et HNF4 $\alpha$  pour la fixation sur leurs éléments de réponse IRE et HNF4RE respectivement situés sur le promoteur de la PEPCK et de la G6Pase (Kodama et al., 2004). Dans un second modèle CAR se lierait à SRC2/GRIP1 et PGC1 $\alpha$  qui sont deux co-activateurs de HNF4 $\alpha$ , diminuant ainsi l'expression des gènes de la néoglucogenèse (Miao et al., 2006). Un troisième modèle propose que la translocation nucléaire de CAR entraînerait une interaction physique de CAR avec PGC1 $\alpha$ . Cette interaction permettrait de recruter la ligase E3 culline permettant à son tour l'adressage vers les corps nucléaires PML ((promyelocytic leukemia) noyaux macromoléculaires séquestrant et libérant les facteurs de transcription et co-activateurs au sein du noyau). Dans cette structure, PGC1 $\alpha$  est ubiquitinylé afin d'être par la suite dégradé par le protéasome. La disponibilité en PGC1 $\alpha$  étant diminuée, l'expression des gènes de la néoglucogenèse est réprimée (Gao et al., 2015) (**Figure 15**). Enfin, un dernier modèle propose que CAR agirait à travers sa régulation de SULT2b1 sur la désacétylation de HNF4 $\alpha$  empêchant ainsi sa translocation nucléaire et son action sur les gènes de la néoglucogenèse (Shi et al., 2014). La répression par CAR des gènes de la néoglucogenèse est retrouvée sur des cultures primaires d'hépatocytes humains (Lynch et al., 2014).

Le fait qu'un récepteur aux xénobiotiques induise la répression de la néoglucogenèse peut s'expliquer par l'implication de cette voie dans la synthèse du co-facteur NADPH indispensable pour l'activité des cytochromes P450. En effet, la voie hépatique des pentoses phosphates permet de convertir le glucose-6-phosphate en ribose-5-phosphate afin de générer du NADPH. Augmenter la production de glucose-6-phosphate par la répression de la G6Pase est un moyen de générer du NADPH. Ainsi la répression de la néoglucogenèse par CAR permettrait de maintenir un stock suffisant de NADPH pour la détoxification.



**Figure 16: Implication de CAR dans la régulation du métabolisme lipidique : la lipogenèse de novo (A) et la  $\beta$ -oxydation (B).** A. Sult2B1b est un gène cible de CAR et permet l'inactivation des oxystéroïles, ligands endogènes du récepteur nucléaire LXR. L'activité transactivatrice de LXR sur ces gènes cibles est ainsi diminuée. CAR induit l'expression de Insig-1 qui va se lier à SCAP et empêcher son action protéolytique et la maturation de Srebp1c. B. CAR entre en compétition avec PPAR $\alpha$  pour sa liaison au niveau des éléments de réponse, sur le promoteur du gène 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase, gène clé de la  $\beta$ -oxydation, l'activation de CAR entraîne la répression de l'expression des gènes CPT1a, CTE, ECI. (d'après Yan, et al., 2015 et Gao et al., 2015)

CPT1a: Carnitine Palmitoyl Transférase 1a, CTE: constitutive transport element, Fas: Fatty acid synthase, GRIP-1 : Glutamate Receptor Interacting Protein 1, Insig-1: Insulin Induced gene 1, LXR: Liver X receptor, LXREs: LXR response elements, PGC-1 $\alpha$ : PPAR $\gamma$  coactivator-1-alpha, SCAP: SREBP cleavage-activating protein, Scd1: Stearoyl-CoA desaturase-1, SRC-1: steroid receptor coactivator-1, SREBP1c: Sterol regulatory element-binding transcription factor 1, Sult2B1b: Hydroxysteroid sulfotransferase 2B1b

## IV.2. Métabolisme des lipides

Des études épidémiologiques rapportent une modification du profil lipoprotéique suite à des traitements chroniques avec des médicaments antiépileptiques ou anti-convulsants mais ces études restent contradictoires (Aynaci et al., 2001; Berlit et al., 1982; Eiris et al., 2000, 1995). Certaines rapportent des effets hypertriglycéridémiques et d'autres hypotriglycéridémiques suite à ces traitements. Les effets sont très contradictoires suivant les différentes classes d'anti-convulsants utilisés. D'autres études ont montré que des traitements chroniques avec des médicaments activateurs de CAR comme le phénobarbital ou l'acide valproïque étaient associés à la survenue de désordres hépatiques (Vecchia and Negri, 2014; Verrotti et al., 2011).

Ces données cliniques ont par la suite été confirmées par des expériences chez l'animal montrant un contrôle par CAR de gènes impliqués dans le catabolisme des acides gras et dans la lipogenèse hépatique.

### IV.2.1. Répression du catabolisme des acides gras

CAR agit sur la voie de la  $\beta$ -oxydation des acides gras en interférant avec le régulateur majeur de cette voie qu'est PPAR $\alpha$ . CAR entre en compétition avec PPAR $\alpha$  pour sa liaison au niveau des éléments de réponse, sur le promoteur du gène 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (HADH), une enzyme clé de la  $\beta$ -oxydation péroxyssomale (Kassam et al., 2000). De plus, l'activation de CAR par le phénobarbital chez des souris sauvages entraîne une répression de PPAR $\alpha$  et de ses gènes cibles tels que Cyp4a14, Cpt1 $\alpha$  et CTE. Cet effet n'est pas observé chez les souris CAR<sup>-/-</sup> (Maglich et al., 2009; Ueda et al., 2002) (**Figure 16B**).

### IV.2.2. Régulation de la lipogenèse *de novo* hépatique

De nombreuses études ont montré l'implication de CAR dans le métabolisme lipidique, cependant les résultats obtenus sont contradictoires.

Chez des souris obèses de type ob/ob ou soumises à un régime riche en graisse, l'activation de CAR par une exposition prolongée au TCPOBOP permet une diminution de la stéatose hépatique par inhibition de la lipogenèse *de novo* via la répression des gènes Scd1, Fas et Acc et de SREBP-1c (Dong et al., 2009b; Gao et al., 2009). Cet effet de CAR sur SREBP-1c pourrait être médié par la protéine Insig-1. En effet, le traitement des souris sauvages par le TCPOBOP a mis en évidence une régulation positive de Insig-1 par CAR. La protéine Insig-1 se lie à SCAP et empêche ainsi le clivage protéolytique de SREBP-1c et donc son effet transactivateur sur ses gènes cibles (Roth et al., 2008). Une autre hypothèse

propose que CAR agirait sur les gènes de la lipogenèse *de novo* par l'intermédiaire du récepteur nucléaire LXR qui est un des régulateurs des gènes de la lipogenèse hépatique. Il le ferait en contribuant à l'inactivation des oxystérols, ligands endogènes de LXR, à travers la régulation de l'expression de la sulfotransférase Sult2B1b. L'inactivation des oxystérols permet de diminuer l'activation de LXR et de réduire la voie LXR-SREBP (Chen et al., 2007a). En accord avec cela, les souris déficientes pour Sult2B1b traitées au TCPOBOP ne présentent plus de répression des gènes de la lipogenèse *de novo* (Dong et al., 2009a) (**Figure 16A**).

Cependant les effets de CAR sur la régulation d'expression des gènes de la lipogenèse *de novo* restent controversés puisque une étude montre qu'à l'inverse l'activation de CAR dans des cultures primaires d'hépatocytes humains induit l'expression des gènes de la lipogenèse *de novo* tels que Fasn et Scd1 (Breuker et al., 2010). Cette même équipe montre que Spot14 qui est un gène cible de CAR et un modulateur important de la lipogenèse hépatique. Ces résultats ne sont pas retrouvés par une autre équipe qui montre que dans des cultures primaires d'hépatocytes humains, l'activation de CAR par le CITCO n'affecte pas l'expression des gènes de la lipogenèse *de novo* (Lynch et al., 2014). Cet effet est par contre retrouvé *in vivo* chez des souris soumises à un régime standard et chez lesquelles le traitement au TCPOBOP induit une augmentation de la lipogenèse *de novo* ainsi que de la cétogenèse avec une répression de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale (Rezen et al., 2009). Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer par un rôle différent du récepteur nucléaire CAR en fonction du statut physiopathologique dans lequel se trouvent les organismes.

### **IV.3. Métabolisme du cholestérol et des acides biliaires**

Le profil lipoprotéique est modifié suite à une activation de CAR chez la souris, une étude expérimentale montre que l'activation de CAR par son agoniste spécifique (TCPOBOP) entraîne une diminution des concentrations plasmatiques en cholestérol total, HDL et LDL cholestérol, il semblerait que ces effets soient en partie dus à la répression de la transcription du gène de l'apolipoprotéine AI au niveau hépatique par CAR (Masson et al., 2008). La même équipe a également montré que lorsque les souris sont soumises à un régime riche en graisse, l'activation de CAR diminue la charge de cholestérol au niveau hépatique par stimulation de l'expression des enzymes de synthèse des acides biliaires et donc de leur excrétion fécale sous forme biliaire (Sberna et al., 2011). De manière concordante, les souris déficientes pour le récepteur CAR présentent une augmentation des HDL-cholestérol en condition de cholestase (Stedman et al., 2005).

Des analyses transcriptomiques hépatiques montrent que l'activation de CAR induit l'expression des gènes impliqués dans la cholestérogenèse tels que HMGCR, SQLE, et LSS. Cependant cet effet n'est pas associé à une augmentation du ratio lathostérol/cholestérol indiquant que la modification

d'expression génique ne s'accompagne pas d'une augmentation de la biosynthèse de cholestérol (Rezen et al., 2009).

L'activation de CAR empêche aussi la formation de calculs biliaires en diminuant l'expression des gènes ABCG5 et ABCG8 et en augmentant l'expression de Cyp7a1, favorisant la conversion du cholestérol en acides biliaires. Au niveau intestinal, CAR favorise la réabsorption biliaire en induisant l'expression des transporteurs ASBT et OST $\beta$ . Ceci permet de diminuer la charge en cholestérol des acides biliaires et de limiter la formation des calculs biliaires (Cheng et al., 2017).

Le rôle hépatoprotecteur de CAR face aux acides biliaires a été largement décrit et provient du fait de l'induction de leur métabolisation par la stimulation des SULT (2A1 et 2A9) et de leur excrétion par l'augmentation des transporteurs des acides biliaires (MRP2/ABCC2 ; MRP3/ABCC3) au niveau des hépatocytes (Cherrington et al., 2002; Kast et al., 2002; Staudinger et al., 2003). En accord avec ces observations, les médicaments agonistes de CAR sont utilisés pour le traitement de la cholestase (Stedman et al., 2005).

## Chapitre III: Les pesticides

### I. Généralités sur les pesticides

#### I.1. Définitions

Le terme « pesticide » est dérivé des termes latins « *caedere* » (tuer) et « *pestis* » (fléau) : c'est une appellation d'origine générique qui couvre toutes les substances (molécules) ou produits (formulations) éliminant les organismes nuisibles (animaux, végétaux, champignons). Ils peuvent aussi réguler la croissance des végétaux, améliorer le stockage ou le transport des produits de culture. Le document mondial d'orientation concernant la gestion des pesticides rédigé par la Food Agriculture Organization (FAO) en 2002 définit les pesticides comme toute substance ou association de substances, ou micro-organismes y compris les virus, destinée à repousser, détruire ou combattre les ravageurs, y compris les vecteurs de maladies humaines ou animales, les ravageurs nuisibles, les espèces indésirables de plantes ou d'animaux causant des dommages ou se montrant autrement nuisibles durant la production, la transformation, le stockage, le transport ou la commercialisation des denrées alimentaires, des produits agricoles, du bois et des produits ligneux, ou des aliments pour animaux, ou qui peut être administrée aux animaux pour combattre les insectes, les arachnides et les autres endo- ou ecto-parasites. Le terme inclut les substances destinées à être utilisées comme régulateur de croissance d'insectes ou de plantes, comme défoliant, comme agent de dessiccation, comme agent d'éclaircissage des fruits ou pour empêcher la chute prématurée de ceux-ci, ainsi que les substances appliquées sur les cultures, avant ou après la récolte, pour protéger les produits contre la détérioration durant le stockage et le transport. Ce terme inclut aussi les produits synergistes et détoxifiants des pesticides quand ils sont essentiels pour obtenir une prestation satisfaisante du pesticide.

Les pesticides sont définis en fonction de leurs usages selon quatre réglementations européennes distinctes : les produits phytosanitaires, les biocides, les médicaments vétérinaires et les médicaments à usage humain. Une même substance peut être réglementée par plusieurs directives.

##### I.1.1. Les produits phytosanitaires

Le règlement européen (CE n°1107/2009) définit les produits phytosanitaires (PP) destinés à l'usage suivant : protéger les végétaux ou les produits végétaux contre les organismes nuisibles ou à prévenir de leurs actions, exercer une action sur les processus vitaux des végétaux autres que les substances nutritives (par exemple les régulateurs de croissance), assurer la conservation des produits végétaux

autres que les substances ou produits faisant l'objet de dispositions communautaires particulières concernant les agents conservateurs, détruire les végétaux autres que les algues et freiner ou prévenir une croissance indésirable des végétaux. La grande majorité des produits utilisés en agriculture dépend de ce règlement. Chaque substance fait l'objet d'une évaluation au niveau européen (incidence sur la santé humaine, devenir et comportement dans l'environnement et écotoxicologie). En 2012, 340 substances actives phytopharmaceutiques ont été répertoriées en France et regroupent principalement des herbicides (106), des fongicides (91) et des insecticides (59).

### **I.1.2. Les biocides**

Les biocides sont définis par le règlement européen (CE n°528/2012) comme des substances actives et préparations contenant une ou plusieurs substances actives qui sont présentées sous la forme dans laquelle elles sont livrées à l'utilisateur, destinées à détruire, repousser ou rendre inoffensif les organismes nuisibles, à en prévenir l'action ou à les combattre de toute autre manière, par une action chimique ou biologique. Ce sont les produits anciennement nommés « pesticides à usage non agricole ». Les biocides sont destinés à des usages domestiques, par exemple les insecticides ménagers et les produits antiparasitaires.

### **I.1.3. Les médicaments vétérinaires**

Les médicaments vétérinaires sont définis par la directive 2004/28CE du Parlement européen comme toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies animales. Ces produits sont très utilisés dans le milieu agricole pour les activités d'élevage mais aussi au niveau domestique pour les animaux de compagnie.

### **I.1.4. Les médicaments à usage humain**

Les médicaments à usage humain sont définis par la Directive 2004/27/CE du Parlement européen comme toute substance ou composition présentée ou possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines. En 2010, 21 produits ont été identifiés comme antiparasitaires externes utilisés en dermatologie (par exemple les organochlorés, les organophosphorés) et antiparasitaires systémiques utilisés en infectiologie et en parasitologie (par exemple l'ivermectine).

## I.2. Classification des produits phytosanitaires

La grande majorité des pesticides utilisés sont des produits phytosanitaires, ils peuvent être classés en fonction de leur cible principale. Les trois catégories principales sont : les herbicides (luttant contre les plantes adventices des cultures), les fongicides (luttant contre les champignons pathogènes) les insecticides (luttant contre les insectes nuisibles).

A cette classification peut s'ajouter la grande variété de mode d'action. Parmi les herbicides, les principaux modes d'action des PP sont les suivant : blocage de la synthèse des acides aminés aromatiques, inhibition de la photosynthèse, perturbation de la régulation de l'auxine (hormone de croissance). Les fongicides permettent une inhibition de la formation des microtubules, une inhibition de la biosynthèse des stérols ou une inhibition de la germination des spores et de la croissance mycélienne. Les principaux modes d'action des insecticides sont de perturber le système respiratoire, le système nerveux ou encore de perturber la synthèse des mélanines (**Tableau 6**) (Casida et al., 2011).

**Tableau 6: Exemple de mode d'action des pesticides suivant leurs cibles biologiques**

Herbicides	Fongicides	Insecticides
Elongases des acides gras	Tubuline	Acétylcholinestérase
Glutamine synthase	14 $\alpha$ -déméthylase	Canaux sodium
Tubuline	Biosynthèse des phospholipides	Récepteurs acétylcholine ou GABA
Acétolactate synthase	ARN polymérase	Glutamate
Photosystème II	ATP synthase	ATP-synthase
		NADH déshydrogénase

Le deuxième système de classification prend en compte la nature chimique de la substance majoritaire qui compose le PP. Parmi les familles chimiques les plus répandues on peut citer les organochlorés, les organophosphorés, les pyréthriinoïdes, les azoles, les néonicotinoïdes et les carbamates. Certaines familles chimiques de pesticides peuvent contenir des substances avec des cibles biologiques différentes, ainsi les carbamates peuvent être insecticides, herbicides ou fongicides (**Tableau 7**).

**Tableau 7: Principales familles chimiques des pesticides et exemples de molécules associées**

Famille chimique	Exemple de molécules	Cible
Organochlorés	DDT, Chlordane, Lindane, Dieldrine, Heptachlore...	Insecticides
Organophosphorés	Malathion, Parathion, Chlorpyrifos, Diazinon	Insecticides
Pyréthroïdes	Perméthrine...	Insecticides
Carbamates	Aldicarbe, Carbaryl, Carbofuran, Méthomyl	Insecticides
	Asulame, Diallate, Terbucarbe, Triallate	Herbicides
	Benthiavalicarbe	Fongicides
Dithiocarbamates	Mancozèbe, Manèbe, Ziram...	Fongicides
Phtalimides	Folpel, Captane, Captafol	Fongicides
Triazines	Atrazine, Simazine...	Herbicides
Phénoxyherbicides	MCPA, 2,4-D, 2,4,5-T...	Herbicides
Chloroacétamides	Alachlore...	Herbicides
Pyridines, vipyridiliums	Paraquat, Diquat...	Herbicides
Aminophosphates glycine	Glyphosate...	Herbicides
Néonicotinoïdes	Acétamipride, Clothinidine, Imidaclopride, Thiaclopride...	Insecticides
Carboxamides	Boscalid, Bixafen, Fluxapyroxad...	Fongicides
Benzimidazole	Thiofanate	Fongicides

### I.3. Autorisation de Mise sur le Marché

L'évaluation, la mise sur le marché et l'utilisation des produits phytosanitaires sont régies au niveau européen par le règlement CE/1107/2009. Il établit une procédure complète d'évaluation des risques et d'autorisation pour les substances actives. Il incombe au demandeur de l'AMM de fournir les preuves nécessaires attestant qu'une substance ne représente pas de danger pour la santé humaine et l'environnement.

Un système en deux étapes est mis en place pour obtenir l'AMM : tout d'abord les substances actives doivent être autorisées au niveau de l'Union européenne (UE): l'agence européenne de sécurité alimentaire (EFSA) est en charge de mener l'évaluation scientifique, si la substance est approuvée et autorisée, elle est inscrite à l'annexe du règlement UE/540/2011, liste européenne des substances actives approuvées. Les substances actives sont ensuite autorisées au niveau des états membres de l'UE. Le demandeur de l'AMM soumet un dossier pour son produit dans chaque état membre où il veut commercialiser son produit. En France, l'Agence nationale de sécurité sanitaire (ANSES) est en charge de l'analyse des risques, elle remet un avis public de son expertise. C'est le ministère de l'Agriculture se basant sur le rapport de l'ANSES qui délivrera l'AMM. Elle sera valable 10 ans, mais elle peut être retirée à tout moment. Les décisions individuelles d'AMM délivrées sont rendues publiques sur le site de l'ANSES, site e-phy.

Afin d'obtenir l'AMM les firmes phytopharmaceutiques doivent soumettre un dossier scientifique complet comprenant :

- Un dossier biologique renseignant sur l'efficacité agronomique de la préparation et de sa sélectivité vis-à-vis des végétaux
- Un dossier toxicologique renseignant de la toxicologie pour l'Homme et l'environnement (non développé dans ce chapitre).

L'évaluation du risque d'un produit phytosanitaire pour l'Homme est constituée de batteries de tests imposés par la directive 91/414/CE. Ces tests vont permettre de déterminer les valeurs toxiques de référence (VTR). C'est une appellation générique regroupant tous les indices toxicologiques permettant d'établir une relation entre une dose et un effet (toxique à seuil d'effet) ou entre une dose et une probabilité d'effet (toxique sans seuil d'effet). On distingue quatre catégories de tests régis par des protocoles expérimentaux standardisés (lignes directrices de l'organisation de coopération et de développement économique (OCDE)) :

### **I.3.1. Tests de toxicité**

Les tests de toxicité aiguë concernent une exposition unique ou répétée sur 24h à la substance étudiée (ligne directrice de l'OCDE n°401, 402, 403 pour les rongeurs) : ces tests permettent d'estimer la dose létale ainsi que les effets irritants ou sensibilisants du produit (voie cutanée et par inhalation).

Les tests de toxicité subchronique correspondent à une exposition multiple ou continue à un produit pendant une période inférieure à 3 mois (ligne directrice de l'OCDE n°407, 410, 412 pour le rongeur). Ces tests permettent d'étudier la pharmacocinétique du produit et donc d'établir son absorption, sa distribution, sa métabolisation et son élimination (ADME).

Des tests de toxicité chronique correspondent à des expositions supérieures à 90 jours et généralement des expositions d'une durée d'au moins 1 an sont également réalisés (ligne directrice de l'OCDE n°452,453 pour les rongeurs).

### **I.3.2. Tests de génotoxicité**

Parmi les dommages à l'ADN on retrouve principalement les alkylations et les oxydations de bases, les cassures simple et double-brins, les intercalants, les hydrolyses et les adduits. Ce sont majoritairement des composés aux propriétés électrophiles qui ont un potentiel génotoxique. Les tests *in vitro* utilisés sont : des tests d'Ames sur bactéries ou cellules de mammifères et des tests d'aberration chromosomique. Ces tests sont ensuite complétés avec d'autres études réalisées à partir des produits

de la molécule mère. Les tests *in vivo* sont ensuite réalisés sur des cellules germinales ou sur moelle osseuse de rongeur afin de renseigner la nature de l'effet (risque héréditaire, effet direct ou indirect sur l'ADN).

### **I.3.3. Tests de cancérogénèse**

Ces tests sont effectués sur deux espèces animales exposées par voie orale de manière chronique (2 ans chez le rat et 18 mois chez la souris). Les travaux consacrés aux mécanismes d'action permettent de faire la distinction entre les effets spécifiques aux rongeurs et ceux qui sont susceptibles de se produire également chez l'Homme (Boobis et al., 2008; Guyton et al., 2008).

### **I.3.4. Tests de reprotoxicité et effet sur le développement**

Ces études sont réalisées sur plusieurs générations chez le rongeur et concernent les effets sur la fertilité et la gamétogénèse des reproducteurs ainsi que sur le développement pré/post-natal, la mortalité et la croissance de la descendance. Les effets tératogènes et sur l'organogénèse sont également examinés.

Les substances phytosanitaires peuvent être classées selon leur caractère CMR (Cancérigène, Mutagène, Reprotoxique) pour l'Homme en 3 catégories :

- Catégorie 1 : substance connue par des preuves épidémiologiques comme cancérigène ou mutagène ou reprotoxique
- Catégorie 2 : substance assimilée (forte présomption) à un CMR pouvant provoquer des effets CMR chez l'Homme
- Catégorie 3 : Effets CMR possibles chez l'Homme, les substances sont jugées préoccupantes mais les preuves sont insuffisantes pour les classer en catégorie 2.

## **I.4. Exemple de protocole standardisé pour évaluer la toxicité chronique d'un produit phytosanitaire**

*OCDE n°408: étude de toxicité orale à doses répétées pendant 90 jours chez le rongeur*

Différentes doses de la substance d'essai sont administrées quotidiennement par voie orale (par gavage ou dans les aliments ou dans l'eau de boisson) à plusieurs groupes d'expériences (une dose par groupe) durant 90 jours.

Les espèces utilisées sont le rat et la souris, au moins 20 animaux (10 femelles et 10 mâles) doivent être utilisés pour chaque dose.

Les niveaux de dose peuvent être établis en fonction des résultats obtenus lors des études de pharmacocinétique. La dose la plus élevée par exemple doit être choisie en vue d'induire un effet toxique mais ne doit pas entraîner la mort.

Des observations cliniques détaillées sont effectuées au moins une fois par semaine durant toute l'exposition (sécrétion de larmes, respiration anormale, démarche, mouvements stéréotypés...). Vers la fin de la période d'exposition la réactivité sensorielle à différents stimuli (auditifs, visuels...) ainsi que l'activité motrice sont vérifiées. Le poids corporel et la consommation alimentaire et hydrique sont mesurés de façon hebdomadaire.

A la fin de l'étude, des analyses hématologiques et biochimiques sont effectuées sur le sérum et comprennent la mesure du sodium, potassium, glucose, cholestérol, urée, la créatinine, l'albumine ainsi que deux enzymes indicatrices d'une hépatolyse (l'alanine transférase et l'aspartate aminotransférase). Pendant l'autopsie générale, les principaux organes sont prélevés (foie, reins, cerveau etc...) et les organes présentant des lésions macroscopiques seront conservés en vue d'un examen histopathologique.

### **I.5. Les valeurs toxiques de référence**

Les valeurs toxiques de référence correspondent à des doses ne devant pas entraîner la survenue de l'effet néfaste. Pour ajuster cette valeur, des facteurs d'incertitudes (Uncertainty Factor ou UF) sont appliqués afin de tenir compte des différences lors de l'extrapolation à l'Homme (Vermeire et al., 1999) ainsi que des variabilités inter-espèces, inter-individuelles et des incertitudes liées aux protocoles expérimentaux (Dourson et al., 1996; Gaylor, 1983). La valeur haute de 10 pour chaque UF est utilisée par défaut lorsqu'aucune connaissance ne permet de la réduire. La VTR est donc égale à la dose critique observée chez l'animal ou chez l'Homme divisé par des facteurs d'incertitude.

La dose critique correspond le plus souvent à la NOAEL (dose ou concentration sans effet nocif observé ou No observable adverse effect level) ou à la LOAEL (dose ou concentration minimale avec un effet nocif observé ou Lowest observed adverse effect level). Ces doses ou concentrations sont déterminées à partir des études toxicologiques sur les animaux ou sur la base d'études épidémiologiques sur l'Homme.

Pour le consommateur, les principales VTR sont :

- La Dose Journalière Admissible (DJA ou Admissible Daily Intake ; ADI) représente la quantité de produit qui peut être ingérée par un individu quotidiennement et pendant toute sa vie sans risque appréciable pour sa santé. Elle constitue un seuil de sécurité sanitaire à long terme. La DJA s'exprime

en mg de substance/kg de poids corporel/jour. Elle se calcule à partir de la valeur de NOAEL obtenue généralement après des expositions chroniques chez l'espèce animale la plus sensible (rat ou souris) à laquelle on applique un facteur de variabilité inter (x10) et intra-espèces (x10) et un coefficient de sécurité supplémentaire qui prend en compte d'éventuels effets critiques. En général, la DJA est égale à NOAEL/100. La DJA concerne les substances ajoutées volontairement aux denrées, par exemple les additifs. Leur présence dans les aliments est potentiellement attendue.

- La Dose Journalière Tolérable (DJT ou Tolerable daily intake ; TDI) correspond à la dose d'une substance qui peut être ingérée tous les jours sans risque appréciable pour la santé du consommateur. Cette valeur est utilisée pour des substances dont la présence dans les denrées n'est pas attendue ou est inévitable.

- L'ARfD (Acute Reference Dose ou dose de référence aiguë) est contrairement à la DJA un seuil de sécurité sanitaire pour des expositions à court terme. C'est la quantité la plus élevée du produit pouvant être ingérée sur une très courte durée (une journée ou un repas) sans risque pour le consommateur. C'est une valeur supérieure à la DJA, elle sera égale à la DJA uniquement si la valeur de la NOAEL à court terme est égale à la NOAEL chronique.

- La LMR (Limites Maximales de résidus) sont définies pour les cultures autorisées aux traitements et représentent la quantité maximale de substance autorisée par kg de produit agricole. L'ensemble des LMR fixées doit conduire au respect de la DJA et ARfD de chaque substance évaluée.

### **I.6. Utilisations en France**

Il est difficile d'établir un état des lieux récent sur l'utilisation des produits phytosanitaires en France.

Des données récentes sur l'utilisation des pesticides sont disponibles pour certaines années au sein d'Eurostat, service de données statistiques de la commission européenne. La vente totale de pesticides vendue en France a augmenté de 17% en l'espace de 5 ans, en 2011 environ 59 000 tonnes de substances actives ont été vendues, alors qu'en 2016 c'est environ 69 000 tonnes (Base de données Eurostat). Au niveau européen, la France avec l'Italie et l'Espagne se situe en tête des ventes de pesticides. Mais en considérant la surface agricole utile, la France est le 5<sup>ème</sup> pays européen pour la densité moyenne d'usage des pesticides sur la période de 2001 à 2003. En 2016, les fongicides et bactéricides font partie des substances actives les plus vendues (Base de données Eurostat).

Les résultats du Réseau d'Information Comptable Agricole et des enquêtes pratiques culturales de 2006 réalisées par le Service de la Statistique et de la Prospective (SSP) du ministère de l'Agriculture ont permis de définir une situation sur l'utilisation des produits phytosanitaires en France. Au cours de

ces études, la pression sanitaire est mesurée par l'indicateur de fréquence des traitements (IFT). L'IFT correspond à la moyenne par hectare, du nombre des traitements effectués en produits commercialisés, pondérés par le rapport entre la dose utilisée et la dose homologuée (Pingault et al., 2007). La pression sanitaire varie selon les productions et elle est forte en viticulture, en cultures fruitières et légumières. Ainsi l'IFT de la pomme (36,5) est le plus élevé par rapport à l'IFT de la viticulture (12,5) en France en 2006 (Faessel et al, 2016). Il est important de noter que pour une même production, la pression phytosanitaire peut varier selon les régions. Par exemple, pour la vigne l'IFT est de 7 en Provence et de 22 en Champagne (Faessel et al, 2016).

Aujourd'hui, le Ministère de l'Agriculture de l'agroalimentaire et de la forêt et le ministère de l'écologie du développement durable et de l'énergie ont mis en place le plan Ecophyto II visant une réduction de 50% du recours aux produits phytopharmaceutiques à long terme en France.

### **I.7. Modes d'expositions de l'Homme aux pesticides**

Les pesticides sont utilisés professionnellement par différents acteurs (agriculteurs, industries et collectivités locales). L'ensemble de la population est aussi exposé aux pesticides dans le cadre d'un usage domestique mais surtout au travers de l'environnement (eau, air, particules en suspension et poussières) et de l'alimentation. Qu'il s'agisse d'une exposition professionnelle ou de la population générale, les contaminations aux pesticides, c'est-à-dire l'introduction des substances dans le corps, se font par contact cutané, par ingestion, et par inhalation. On considère que la voie principale d'exposition aux pesticides des professionnels est la voie cutanée alors que pour la population générale la voie orale par l'alimentation est la plus importante (Jakubowski and Trzcinka-Ochocka, 2005).

#### **I.7.1. Voies d'expositions**

##### **I.7.1.1. Voie d'exposition cutanée**

Différentes méthodes peuvent être utilisées pour évaluer les expositions aux pesticides lors de leurs applications en agriculture. Ainsi, une des plus simples consiste à utiliser des produits fluorescents ou des colorants mélangés aux pesticides ce qui permet de visualiser les différentes zones exposées. Cette méthode a surtout été utilisée dans le cadre de campagne de sensibilisation et de prévention (OECD 2002). Afin de quantifier l'exposition cutanée, des patchs sont également utilisés et répartis sur différentes parties du corps. Mais pour évaluer l'exposition totale il est nécessaire d'avoir recours à des combinaisons totales et d'une analyse du vêtement. Différentes études ont été effectuées et confirment l'importance de l'exposition cutanée. Cependant, cette exposition n'est pas homogène mais dépend des tâches effectuées (Adamis et al., 1985). L'étude nommée PESTEXPO a montré que le

port d'une combinaison protégeait partiellement les viticulteurs d'une contamination cutanée par les produits phytosanitaires (Baldi et al., 2006). Une étude rapporte que sur 237 agriculteurs surveillés en Floride 37.1% (n=88) présentaient des signes d'irritation cutanée sur au moins une partie du corps (Campbell et al., 2017). Une étude réalisée sur des agriculteurs italiens montrent que pour 20% des pesticides absorbés par contact cutané les quantités dépassaient la dose journalière admissible (Basilicata et al., 2013).

### I.7.1.2. Voie d'exposition respiratoire

Dans le cadre des professionnels cette voie d'exposition concerne des conditions d'utilisation particulières comme l'usage des fumigations et l'application dans des endroits fermés. L'exposition respiratoire chez les applicateurs du Fosétyl-Aluminium (fongicide) représente 7 à 9% de l'exposition totale (Fenske et al., 1987). Il est difficile de mesurer l'exposition par voie respiratoire, cela nécessite d'évaluer les fractions respirables (particules atteignant les alvéoles pulmonaires et circulant dans le système sanguin) et de les distinguer des fractions ingérées (Vincent and Mark, 1987).

Cette voie d'exposition sur la population générale est peu étudiée, il n'existe pas de valeur réglementaire concernant les concentrations de pesticides dans l'air extérieur. Pourtant différentes études montrent que l'exposition à proximité des lieux d'épandages est non négligeable (INVS exposition aérienne 2006). Dans les résidences proches de zones agricoles des niveaux plus élevés de résidus de pesticides ont été retrouvés dans les urines d'enfants et dans les poussières des maisons (Fenske et al.; Loewenherz et al., 1997). En Californie deux études ont mis en évidence une relation positive entre les niveaux de pesticides dans les poussières de maison et les quantités de pesticides utilisées dans les champs autour des lieux de résidence (Gunier et al., 2011; Harnly et al., 2009). Le programme EXPOPE (Evaluation de l'exposition aux pesticides organophosphorés dans la population générale en France) a mesuré sur 3 ans l'exposition non alimentaire (air extérieur, poussières) aux pesticides chez 171 personnes, les résultats montrent une très faible corrélation entre les mesures environnementales et les concentrations urinaires en pesticides (Bouvier et al., 2005).

### I.7.1.3. Voie d'exposition orale

C'est la voie d'exposition la plus importante de la population générale, elle est due à l'ingestion des résidus de pesticides contenus dans les aliments ou les boissons. Des données de l'OMS (organisation mondiale de la santé) estiment que la contamination des aliments par les pesticides est plus importante que celle de l'eau, avec une évaluation de risque de 90% de l'exposition alimentaire contre 10% pour l'eau. Une étude montre une corrélation positive entre les niveaux de pesticides (par exemple le chlorpyrifos) retrouvés dans les aliments et la concentration urinaire de son métabolite

principal (TCPy) (MacIntosh et al., 2001). Aux Etats-Unis, une diminution des niveaux de la concentration urinaire des métabolites d'insecticides organophosphorés a été observée sur des enfants soumis à un régime alimentaire d'origine biologique comparé à un régime alimentaire classique (Curl et al., 2003; Lu et al., 2006).

Selon le rapport de l'EFSA de 2015, la recherche de résidus de 209 pesticides réalisée sur 11582 aliments issus de 12 produits alimentaires différents montre la présence de résidus sur 47.4% des échantillons dans les limites légales et 54.6% des échantillons ne présentent pas de résidus quantifiables. 2,6% des échantillons analysés excèdent la limite maximale de résidu (LMR) soit 2116 échantillons. De plus, la présence de plus d'un résidu est observée sur 27.3% des échantillons. Les produits avec les plus hauts pourcentages de présence de résidu sont les fraises (63%), les pêches (53%), les pommes (46%) et la laitue (36%). La présence de résidus de pesticides est faible pour les produits d'origine animale (3.5% pour le lait). Les pesticides tels que le boscalide, captane, chlorpyrifos, cyprodinil, dithiocarbamates, fenhexamid, fludioxonil, folpet, iprodione, pyraclostrobin et le tebuconazole sont les plus fréquemment retrouvés, avec une présence de plus de 4% dans les échantillons.

La pomme fait partie des fruits les plus traités, sur un total de 1610 échantillons analysés, 739 échantillons présentent plusieurs résidus de pesticides, soit 46%. Parmi ces 46%, 8% présentent 5 résidus de pesticides et 3% plus de 6 résidus. Les résidus de pesticides les plus communément retrouvés sur les pommes en 2013 sont le captane/folpet (détecté dans 27.9% des échantillons analysés), le dithianon (23.0 %) et les dithiocarbamates (17.7 %). Selon le rapport de l'ANSES (EAT2), les teneurs quantifiées en résidus par exemple pour le chlorpyrifos ethyl sont comprises entre 0,003 et 0,135 mg/kg.

Le consommateur est donc majoritairement soumis dans l'alimentation à des mélanges de pesticides à faible dose.

### **I.7.2. Effets des mélanges de pesticides**

Les effets des mélanges de pesticides ont fait l'objet de la revue « Les effets des mélanges de pesticides » parue dans « Les cahiers de nutrition et diététique ».



Disponible en ligne sur

ScienceDirect

www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte

www.em-consulte.com



TOXICOLOGIE

## Les effets des mélanges de pesticides



*Impact of pesticides mixtures*

Laurence Gamet-Payrastré\*, Céline Lukowicz

UMR 1331, integrative toxicology and metabolism, Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Inra, Toulouse university, 180, chemin de Tournefeuille, 31300 Toulouse, France

Reçu le 4 janvier 2017 ; accepté le 7 mars 2017

Disponible sur Internet le 5 mai 2017

### MOTS CLÉS

Produits  
phytosanitaires ;  
Pesticides ;  
Interaction ;  
Effet cocktail

**Résumé** Les produits phytosanitaires (PP) sont des pesticides dédiés à un usage en lien avec les végétaux et produits végétaux, et sont considérés comme des facteurs de risque pour la santé humaine et animale. L'impact sur la population générale, exposée à des mélanges de PP à faibles doses, est encore mal défini. Les PP sont des composés biologiquement actifs capables d'exercer des effets sur des cibles cellulaires variées. Les effets cocktails se traduisent par un spectre large de réponse : addition, synergie, antagonisme et/ou potentialisation. L'effet des mélanges de PP est une question difficile à élucider car ces composés peuvent interagir au niveau toxicocinétique et/ou au niveau des cibles propres à leur classe chimique. De plus, les effets cocktails peuvent provenir d'un réseau d'interactions impliquant différentes cibles cellulaires. Les bases des interactions entre PP sont complexes et la question posée est de savoir si les notions de mécanismes de toxicité (additif, synergique etc.) sont applicables compte tenu des réseaux multiples des niveaux d'interactions.

© 2017 Société française de nutrition. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

### KEYWORDS

Phytosanitary  
products;  
Pesticides;  
Interaction;  
Cocktail effect

**Summary** Pesticides are well thought out as risk factors for human health. The impact on consumers' health who are exposed to low doses mixtures, is still poorly defined. Pesticides are biologically active compounds having effects on various cellular targets and their combinations lead to a broad spectrum of responses: addition, synergy, antagonism and potentiation. When combined, pesticides can interact at different levels on specific targets linked to their chemical class (mechanism of toxicity) and/or on toxicokinetic level. In addition, the cocktail effect can be derived from an interaction network involving different cellular targets. The bases of the interaction between pesticides compounds are complex and the question still remains as to the notion of toxicity mechanisms (additive, synergistic etc) are well adapted to talk about the multiple interaction levels networks.

© 2017 Société française de nutrition. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : laurence.payrastré@inra.fr (L. Gamet-Payrastré).

## Introduction

Le terme « pesticide » regroupe un certain nombre de composés, i.e. les biocides, les produits à usage vétérinaires, les médicaments humains, et les produits phytosanitaires. Ce document fera référence essentiellement aux produits phytosanitaires (PP) dont l'utilisation est en lien avec les végétaux et produits végétaux. Les PP regroupent plusieurs produits destinés à l'agriculture, dans lesquels on peut trouver environ 300 substances actives appartenant à diverses familles chimiques [1].

L'exposition aux mélanges de PP concerne les professionnels et la population générale. Les activités professionnelles les plus exposantes sont celles liées à l'agriculture (90 % des tonnages de PP produits en France sont dédiés à cette activité [1]). Par exemple, dans le cas de la pomiculture (culture et exploitation des pommiers), les professionnels sont amenés à effectuer, au cours d'une période allant du mois de mars au mois de septembre, des traitements distincts pour chaque étape de la culture (éclaircissage, floraison, avant la récolte etc.). Chaque traitement correspond à l'utilisation d'environ 5 à 6 substances actives différentes (fongicides et insecticides) qu'ils utiliseront isolément ou en mélange (certains produits contiennent des cocktails). Pour une étape donnée, les traitements seront répétés plusieurs fois. À la fin de la saison, le professionnel est donc susceptible d'être exposé à des mélanges de PP de façon séquentielle et/ou simultanée.

La population générale est exposée aux PP essentiellement via l'alimentation. Une enquête de la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) effectuée sur un large échantillonnage de fruits, légumes, épices, céréales et produits infantiles, montre que 74 % des échantillons de fruits, 59 % des céréales et un produit infantile sur 16, contenaient des pesticides quantifiables [2]. D'autres enquêtes alimentaires confirment la contamination de l'alimentation avec de faibles doses de pesticides et montrent par ailleurs que les denrées alimentaires peuvent contenir plusieurs résidus de pesticides [3], confirmant ainsi une exposition des consommateurs à de multiples résidus de PP. Dans l'étude EAT2 de l'ANSES ou dans leurs travaux récemment publiés [4], les auteurs précisent les principaux mélanges de pesticides auxquels la population française peut être exposée, et les études à réaliser afin d'améliorer l'investigation, la prévision et le suivi de leurs effets potentiels sur la santé humaine.

## Effets des PP sur la santé : des composés biologiquement actifs

L'omniprésence des PP dans les différents constituants de l'environnement pose un problème de santé publique car ces composés sont considérés comme des facteurs de risques pour la santé. Les études épidémiologiques montrent souvent une corrélation positive entre l'exposition professionnelle à ces composés et l'incidence de certains cancers, de maladies neuro-dégénératives, des troubles de l'immunité, des troubles métaboliques [1]. Certaines associations sont également rapportées entre des pathologies neuro-développementales et l'exposition résidentielle [1]. L'impact de l'exposition alimentaire aux PP sur la santé du consommateur est encore mal défini. Les études de populations ne sont pas disponibles chez les consommateurs et,

de plus, le risque tel qu'il est rapporté dans les études épidémiologiques pour la population professionnellement exposée, ne peut pas être transposé à la population générale car les voies, les doses et les fréquences d'exposition sont différentes. Par contre, il existe des arguments de causalité en faveur d'un effet des PP sur la santé. En effet, les études expérimentales réalisées *in vitro* et *in vivo* montrent que les PP exercent des effets biologiques sur des cibles autres que celles pour lesquelles ils ont été conçus (insectes, végétaux, champignons etc.). Les PP sont des composés biologiquement actifs capables d'exercer des effets spécifiques sur des cibles biologiques chez les mammifères. Les PP peuvent endommager l'ADN, se lier à des récepteurs nucléaires impliqués dans la détoxification, le métabolisme, la régulation endocrinienne. Les PP peuvent exercer des impacts sur l'activité mitochondriale, ce qui peut conduire à une perturbation de la balance métabolique intracellulaire, à des dérégulations des voies de survie, à l'augmentation des taux de radicaux libres. Le stress oxydant qui en résulte, peut induire des modifications des voies de signalisation qui contrôlent la prolifération et la survie, une réponse inflammatoire et des dommages à l'ADN (Fig. 1) [5].

Les effets pléiotropiques des PP conduisent inévitablement à poser la question de savoir quelle sera la résultante de la présence simultanée de plusieurs PP au niveau cellulaire et/ou au niveau de l'organisme.

## Effet des mélanges de PP : une revue de la littérature

Nous avons réalisé récemment [5] une analyse critique de la littérature relative aux effets des mélanges de PP dans des modèles de mammifères *in vitro* et *in vivo*. Des 78 études sélectionnées dans cette revue, il ressort que 48 % des cocktails évalués produisaient un effet dose additif, et 17 % exerçaient un effet comparable à l'un des composés du mélange. Dans 35 % des cocktails étudiés, les composés interagissaient entre eux, le résultat de cette interaction étant un effet synergique (un composé du mélange accroît l'effet des autres chez 71 %), antagoniste (réduction des effets par un ou plusieurs produits chez 21 %) ou potentialisateur (accroissement de la dangerosité d'un produit toxique (b) par une substance n'ayant habituellement pas d'effet toxique (a) chez 8 %). Les effets cocktails de PP se traduisent donc par un large spectre de réponses.

L'analyse bibliographique de la littérature nous a permis d'identifier certains cocktails de composés impliqués spécifiquement dans les effets synergiques, antagonistes ou de potentialisation. Des interactions synergiques ont été clairement observées entre deux insecticides appartenant aux familles des organochlorés (OC) et des carbamates (CARB) (endosulfan et carbofuran) dans des cellules humaines en culture, et entre deux fongicides appartenant aux familles des azoles et des dicarboximides dans les cellules mammaires humaines (vinclozoline et tébuconazole/vinclozoline + ecoconazole), à faible concentration ( $\mu\text{M}$ ). L'effet synergique d'un mélange d'organophosphorés (OP), de pyréthrinoides (PYR), de deux triazoles (TriAZ) et d'une triazine (TRIA) (terbuthylazine, bitertanol, propiconazole, cyperméthrine et malathion) *in vitro* dans les cellules CHO est significatif et observé avec un IC50 de l'ordre de 10  $\mu\text{M}$ . Ces effets synergiques sont spécifiques des composés évalués et ne peuvent à l'heure actuelle être généralisés à l'ensemble des composés des familles chimiques

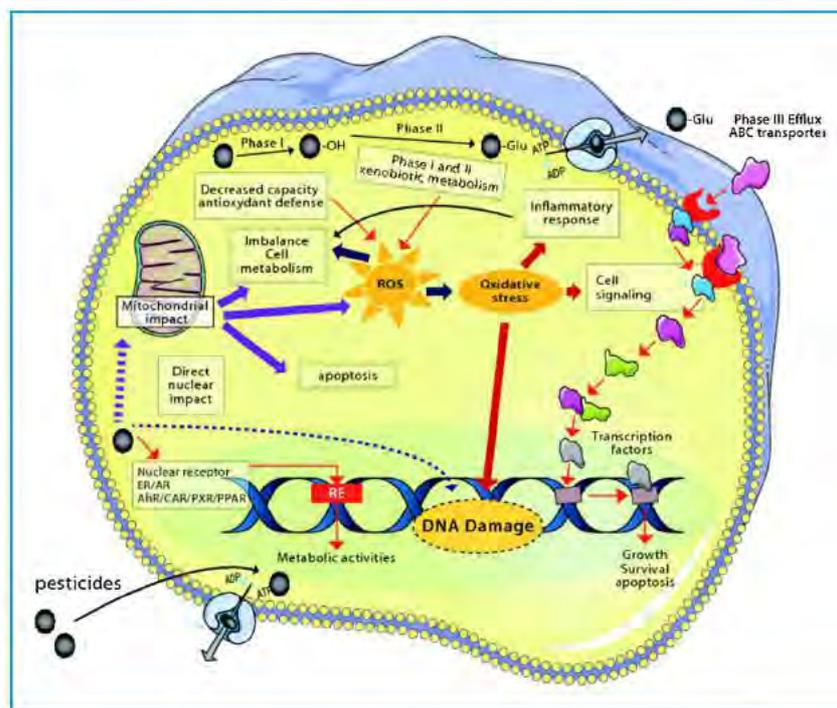


Figure 1. Impact des PP sur différentes cibles cellulaires et moléculaires (extrait de Rizzati et al., Biol. Chem Interact 2016).

correspondantes. Il est donc important d'évaluer d'autres composés PP appartenant à ces familles chimiques. Ces effets observés à faibles doses suggèrent que ces mélanges peuvent représenter un danger pour la santé humaine mais ces données nécessitent une confirmation dans les lignées cellulaires humaines avant que ces résultats puissent être transposés en termes de risque pour la santé humaine [5]. Des effets antagonistes ont été rapportés pour des mélanges contenant un triazole et une pyridine (triadiméfon et paraquat) chez des souris mâles exposés par voie orale pendant 12 semaines à des doses excédant celles auxquelles les consommateurs pourraient être exposés [6]. Par ailleurs, une potentialisation a été montrée *in vitro* entre un organochloré et un dithiocarbamate dans des cellules de tumeur d'ascite. En effet, *in vitro*, le thiram potentialiserait la cytotoxicité de l'endosulfan par l'appauvrissement en glutathion, conduisant à un stress oxydatif [7]. Cependant les interactions potentialisatrices entre l'endosulfan et le thiram ont été observées à des doses non réalistes.

Aujourd'hui, on ne peut donc pas généraliser les interactions observées entre composés de familles chimiques différentes. D'autres composés appartenant aux familles chimiques supposées être impliquées dans les différents effets, doivent également être évalués, qui plus est, en utilisant différents modèles d'études.

### Effets des mélanges de PP : les mécanismes des interactions

Les mécanismes des interactions entre PP rendent l'étude des effets des mélanges difficiles à élucider, car ces interactions se situent à différents niveaux.

Les interactions entre les PP peuvent se produire au niveau des cibles propres à leur classe chimique. En effet

Tableau 1 Exemple de combinaisons de familles chimiques susceptibles d'être associées à un effet cocktail spécifique, (extrait de l'article Rizzati et al., Chem Biol Interact, 2016).

Synergie	Antagonisme	Potentialisation
Azoles + dicarboximide	Triazole + pyridine	OC + DTCARB
OC + carbamate		
A-PYR + phenylpyrrole		
OP + PYR + AZ + TRIA		
Pyréthroïde + NEO		
NEO + phenylamide		

chaque classe chimique possède un mécanisme de toxicité préférentiel. Deux composés appartenant à des familles chimiques différentes peuvent interagir en synergie par différents mécanismes conduisant au même effet. Ainsi par exemple, un organophosphoré (propoxur) et un pyréthri-noïde (perméthrine) peuvent agir en synergie pour accroître l'accumulation d'acétylcholine au niveau de la synapse. Le pyréthri-noïde permet la libération d'acétylcholine dans la synapse via une activation des canaux sodium, et l'organophosphoré inhibe l'activité de l'acétylcholine estérase dégradant l'acétylcholine. Ces deux composés perturberont ainsi de façon synergique la transmission de l'influx nerveux [8]. L'identification des associations de substances dont l'effet est spécifiquement synergique, antagoniste ou potentialisateur, à partir des études compilées dans l'analyse critique de la littérature citée précédemment, confirme que les interactions mises en évidence dans les différentes études référencées dans ce manuscrit [5] sont observées uniquement entre composés appartenant à des familles chimiques différentes (Tableau 1).

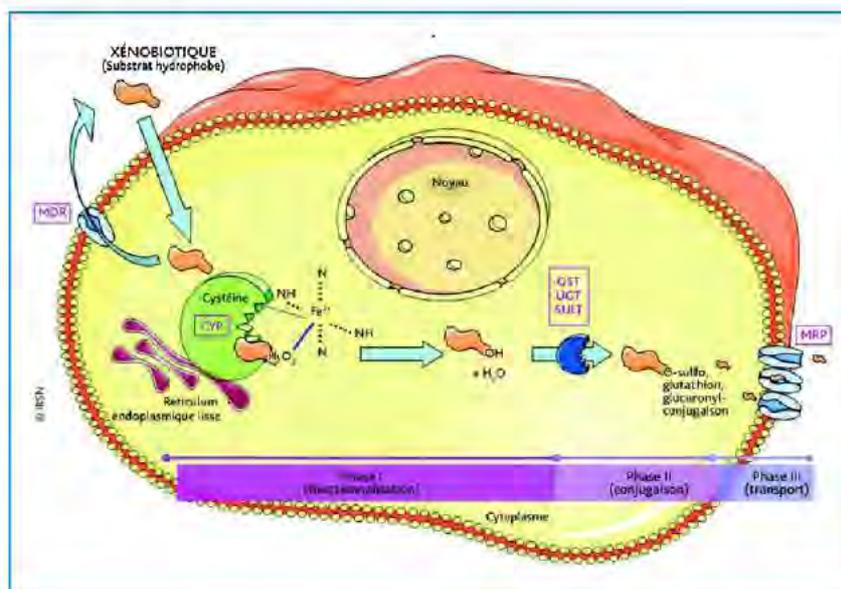


Figure 2. Métabolisme des xénobiotiques. Extrait de l'actualité de recherches à l'IRSN « Les effets biologiques des expositions chroniques à des radionucléides et leurs impacts sur la santé Rouas C et Y Gueguen (2011) <http://www.irsn.fr/FR/Larecherche/publications-documentation/aktis-lettre-dossiers-thematiques/envirohm/xenobiotique/Pages/xeno1.aspx#.WFkmE1PhC00>.

Les interactions entre PP peuvent aussi se produire au niveau toxicocinétique (Fig. 2). Tout composé exogène est pris en charge au niveau cellulaire par les enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMX). Deux étapes principales caractérisent ce processus : l'activation métabolique par les enzymes de la phase I (cytochrome), et celle de la phase II (glutathion-S-transférase, sulfotransférase par ex). Les enzymes de la phase I (principalement les cytochromes P450), catalysent surtout les réactions d'oxydo-réduction et d'hydrolyse. Les enzymes de la phase II (glutathion-S-transférases [GST], UDP glucuronosyltransférases [UGT]...), dite de conjugaison, catalysent les réactions de conjugaison. Généralement, les transporteurs (P-glycoprotéine [Pgp], *multidrug resistance proteins* [MRP]...) excluent au travers des membranes les xénobiotiques, et surtout leurs dérivés, en vue de leur élimination de la cellule (Fig. 2).

Un composé peut altérer ces activités métaboliques et modifier la biodisponibilité et donc la toxicité des autres composés du mélange. De telles interactions sont observées entre certaines familles chimiques de PP : les néonicotinoïdes, en activant la première phase du métabolisme des organophosphorés, augmentent la quantité de dérivés oxon, plus toxiques que les molécules mères. Les azoles inhibent les monoxygénases qui métabolisent les composés lipophiles (pyréthrinoides). Les OP empêchent la dégradation des pyréthrinoides (inhibition des estérases ou oxydases [phase II]) [9]. Ainsi, les pyréthrinoides seront moins métabolisés s'ils sont en présence d'azote ou en présence d'organophosphorés, et leurs effets seront sans doute plus marqués.

L'interaction des PP dans un mélange pourrait aussi se produire au niveau de leurs cibles cellulaires et moléculaires. Des études récentes montrent que deux composés peuvent interagir au sein même de la poche du ligand d'un récepteur nucléaire [10]. En effet, un œstrogène pharmaceutique et un pesticide organochloré, tous deux présentant une faible efficacité lorsqu'ils sont étudiés séparément, se lient lorsqu'ils sont mélangés au récepteur *pregnane*

*Xenobiotique receptor* (PXR), conduisant à une activation synergique. Les auteurs expliquent la formation de « ligands supramoléculaires » dans la poche de liaison des récepteurs nucléaires dans laquelle chaque ligand augmente l'affinité de liaison de l'autre.

Les effets cocktails peuvent provenir d'un réseau d'interactions impliquant différentes cibles cellulaires. Les effets combinés du paraquat et du maneb sont consécutifs à des impacts sur la prolifération, les systèmes de transport, l'équilibre redox, les voies du métabolisme intermédiaire [11]. Par ailleurs, certains cocktails exercent des effets différentiels selon la cible cellulaire. Ainsi un cocktail d'OC (lindane et dieldrine) produit des effets antagonistes sur les concentrations de calcium dans les cellules dopaminergiques de rat en culture (PC12) alors qu'il induit dans le même modèle un effet additif sur la dépolarisation membranaire [12]. Dans les cellules HepaRG, les organophosphorés interagissent en synergie pour induire des dommages à l'ADN. Par contre, des effets antagonistes entre ces composés sont observés sur les paramètres de l'apoptose [13]. Un mélange de composés OC (composé d'endosulfan et de méthoxychlore) conduit dans des cellules humaines en culture à un effet synergique sur la toxicité, additif sur l'expression de CYP3A4 et antagoniste sur l'activité de CYP2B6 [14].

Les interactions entre deux composés peuvent être synergiques ou antagonistes en fonction de la dose de chaque composé dans le mélange (chaque composé étant présent à des concentrations équipotentes) [15]. Le propiconazole et la vinclozoline exercent des effets antiandrogéniques et interagissent de façon antagoniste lorsqu'ils sont évalués à des doses correspondant à l'EC50 du mélange. Pour de plus faibles doses, un effet synergique est observé entre ces deux composés. Selon les auteurs, les différences d'effet des mélanges observées en fonction des concentrations peuvent être dues aux potentialités de compétition des composés pour le site de liaison du ligand du récepteur aux androgènes (AR), soit à des interactions avec des sites distincts

de l'AR, soit à un mécanisme de transactivation [15]. Un mélange de composés de pyridine et de carbamate interagit de manière synergique sur le système dopaminergique chez la souris [16], mais aucune interaction n'a été retrouvée sur les processus inflammatoires liés à la neurodégénérescence chez le rat [15]. Dans les deux études, les doses utilisées sont comparables, avec des souris exposées par voie intrapéritonéale deux fois par semaine pendant 6 semaines dans la première étude [16], et des rats traités deux fois par semaine pendant 4 semaines dans la deuxième étude. La durée différente des expositions peut expliquer les effets différentiels de ce mélange. Dans les travaux de Moser et al. [17] l'évaluation de différentes doses des 7 carbamates dans le mélange, montre des effets variables chez des rats Long-Evans adultes exposés avant le sevrage. Les effets sont principalement additifs lorsque les proportions des composés dans le mélange sont basées sur leur efficacité (la dose de chaque composé dans le mélange induit le même pourcentage d'effet), tandis que des effets plus qu'additifs ou synergiques sont observés lorsque les proportions utilisées sont basées sur des données d'exposition. Les auteurs soulignent que les réponses « non additives » ne sont pas limitées aux fortes doses.

## Conclusion

Les effets des mélanges de PP sont un sujet difficile à élucider. Ces composés induisent des effets variés lorsqu'ils sont combinés. Les bases des interactions sont complexes, impliquant un réseau de cibles et de mécanismes d'interactions à différents niveaux. Conscients de cette complexité, les questions restent posées de savoir (i) si les notions de mécanismes de toxicité additif, synergique antagoniste etc. sont adaptées pour parler des réseaux multiples des niveaux d'interactions, (ii) quelles étapes des mécanismes d'action de deux produits chimiques doivent être prises en considération pour assurer la fiabilité des modèles prédictifs, et (iii) comment intégrer l'ensemble des perturbations mécanistiques, toxicocinétique, moléculaires et les transposer en termes d'évaluation des risques toxicologiques.

## Remerciements

Ministère de l'Agriculture de l'Alimentation et de la Forêt, Région occitanie, Fonds européens de développement économique et régional (FEDER).

## Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

## Références

- [1] Inserm. Pesticides : effets sur la santé. Expertise collective; 2013 [<http://ipubli-insem.inist.fr/handle/10608/1>].
- [2] Direction générale de la concurrence, d.l.c.e.d.l.r.d.f. Résidus de pesticides dans les denrées d'origine végétale; 2016 [<http://www.economie.gouv.fr/dgccrf/residus-pesticides-dans-denrees-dorigine-vegetale>].
- [3] Authority E.F.S. The 2013 European Union report on pesticide residues in food. EFSA J 2015;13(3):4038.
- [4] Crepet A, et al. The PERICLES research program: an integrated approach to characterize the combined effects of mixtures of pesticide residues to which the French population is exposed. *Toxicology* 2013;313(2-3):83-93.
- [5] Rizzati V, et al. Effects of pesticide mixtures in human and animal models: an update of the recent literature. *Chem Biol Interact* 2016;254:231-46.
- [6] Reeves R, et al. Interactions of paraquat and triadimefon: behavioral and neurochemical effects. *Neurotoxicology* 2003;24(6):839-50.
- [7] Rana I, Shivanandappa T. Mechanism of potentiation of endosulfan cytotoxicity by thiram in Ehrlich ascites tumor cells. *Toxicol In Vitro* 2010;24(1):40-4.
- [8] Corbel V, et al. Synergism between insecticides permethrin and propoxur occurs through activation of presynaptic muscarinic negative feedback of acetylcholine release in the insect central nervous system. *Neurotoxicology* 2006;27(4):508-19.
- [9] Svendsen C, et al. Similarity, independence, or interaction for binary mixture effects of nerve toxicants for the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ Toxicol Chem* 2010;29(5):1182-91.
- [10] Delfosse V, et al. Synergistic activation of human pregnane X receptor by binary cocktails of pharmaceutical and environmental compounds. *Nat Commun* 2015;6:8089.
- [11] Roede JR, Youngja P, Tran V, Jones DP. Transcriptome-metabolome wide association study (TMWAS) of maneb and paraquat neurotoxicity reveals network level interactions in toxicologic mechanism. *Toxicology Reports* 2014;1:435-44.
- [12] Heusinkveld HJ, Westerink RH. Organochlorine insecticides lindane and dieldrin and their binary mixture disturb calcium homeostasis in dopaminergic PC12 cells. *Environ Sci Technol* 2012;46(3):1842-8.
- [13] Josse R, et al. Impact of isomalathion on malathion cytotoxicity and genotoxicity in human HepaRG cells. *Chem Biol Interact* 2014;209:68-76.
- [14] Savary CC, et al. Interactions of endosulfan and methoxychlor involving CYP3A4 and CYP2B6 in human HepaRG cells. *Drug Metab Dispos* 2014;42(8):1235-40.
- [15] Christen V, Crettaz P, Fent K. Additive and synergistic anti-androgenic activities of mixtures of azol fungicides and vinclozolin. *Toxicol Appl Pharmacol* 2014;279(3):455-66.
- [16] Thiruchelvam M, et al. The nigrostriatal dopaminergic system as a preferential target of repeated exposures to combined paraquat and maneb: implications for Parkinson's disease. *J Neurosci* 2000;20(24):9207-14.
- [17] Moser VC, et al. Impact of chemical proportions on the acute neurotoxicity of a mixture of seven carbamates in preweaning and adult rats. *Toxicol Sci* 2012;129(1):126-34.

## II. Pesticides et syndrome métabolique

### II.1. Etudes épidémiologiques

Le syndrome métabolique regroupe un certain nombre de manifestations pathologiques dont l'obésité le diabète et la composante hépatique: la NAFLD. Leur prévalence est en augmentation et les facteurs environnementaux tels que les pesticides sont susceptibles de jouer un rôle dans leur développement (Casals-Casas and Desvergne, 2011; Grün and Blumberg, 2009; Wahlang et al., 2013). Plusieurs études épidémiologiques suggèrent le lien potentiel entre une exposition à certains pesticides et le développement de troubles métaboliques. La plupart des études concerne l'exposition aux pesticides persistants tels que les organochlorés (OC).

Une étude a montré que la concentration plasmatique de 11 pesticides OC était supérieure chez les sujets obèses en comparaison à des sujets témoins non-obèses (Pelletier et al., 2002). Les mêmes auteurs ont montré que les sujets les plus obèses ont tendance à avoir des niveaux d'accumulation en pesticides lipophiles plus élevés qui une fois libérés dans la circulation après une perte de poids favoriseraient la reprise de poids (Pelletier et al., 2003). D'autres études montrent une association positive entre l'exposition intra-utérine au DDE (dichlorodiphényldichloroethylene) principal métabolite du pesticide DDT (dichlorodiphényltrichloroethane) et le poids corporel des enfants exposés (Verhulst et al., 2009). Les travaux de Smink ont permis de montrer que les enfants les plus exposés à un pesticide en période prénatale (l'hexachlorobenzène, un OC dosé dans le sang du cordon ombilicale) présentaient une augmentation du risque d'être en surpoids ou obèse à 6 ans (Smink et al., 2008). Chez 650 couples, la concentration sérique du DDE de la mère était associée à une augmentation de l'indice de masse corporelle (IMC) chez l'enfant (Mendez et al., 2010). Karmaus et al ont mis en évidence un effet dose réponse entre l'exposition des mères au DDE et l'IMC de leurs filles (Karmaus et al., 2009). Une autre étude montre que les enfants dont les mères ont travaillé dans des serres pendant la période prénatale présentent une accumulation de masse adipeuse plus importante à l'âge de 6 ans (Wohlfahrt-Veje et al., 2011). D'autres composantes du syndrome métabolique sont associées avec l'exposition aux OC. L'exposition environnementale estimée par dosage sérique et/ou urinaire (Everett and Matheson, 2010; Lee et al., 2010; Patel et al., 2010; Ukropec et al., 2010) ou professionnelle (Cox et al., 2007; Mostafalou, 2016; Starling et al., 2014) aux pesticides OC augmente le risque de développer un diabète de type 2. En parallèle, les concentrations en DDE dans le tissu adipeux dans une population européenne sont associées positivement avec une prévalence du diabète de type 2 (Arrebola et al., 2013). Les résultats de la cohorte PELAGIE mère/enfant montrent une

diminution des niveaux circulants d'adiponectine et d'insuline corrélée à des taux élevés de DDE chez les nouveau-nés de sexe féminin (Debost-Legrand et al., 2016).

Ces résultats sont appuyés par une méta-analyse récente basée sur 13 études montrant une augmentation du risque de diabète de type 2 (OR :1,61 95%CI : 1,37-1,88,  $p=3,51 \times 10^{-9}$ ) dans les populations exposées (Evangelou et al., 2016).

D'autres familles chimiques de pesticides pourraient être impliquées dans les perturbations métaboliques. Une étude incluant plus de 33000 participants suivis sur 5 ans par questionnaire a montré que l'exposition professionnelle aux pesticides OC (aldrin, chlordane, heptachlor) mais aussi à des pesticides appartenant à d'autres familles chimiques (dichlorvos, trichlorfon, alachlor, et cyanazine) augmente les risques de développer un diabète (Montgomery et al., 2008). Par ailleurs, un lien entre l'IMC et les taux plasmatiques de l'herbicide bromoxynil a été démontré dans une population rurale Canadienne (Semchuk et al., 2004). Le taux de mortalité liée à un infarctus du myocarde et un diabète de type 2 a été corrélé positivement avec une exposition aux herbicides chlorophenoxy dans des populations habitant dans des zones à activité agricole intense (Schreinemachers, 2006). De même l'exposition professionnelle aux pyréthriinoïdes et aux organophosphorés (OP) est aussi associée dans la littérature à des troubles du métabolisme général. Par exemple, les ouvriers d'industries de production de phytosanitaires de type pyréthriinoïdes présentent un risque accru de développer une perturbation du métabolisme glucidique (OR = 1.482, 95%CI = 1.238–1.774) (Wang et al., 2011). De nombreuses études montrent l'impact d'une exposition aux OP sur l'homéostasie glucidique et le risque de développer un diabète de type 2 (Lasram et al., 2014a). Selon une étude réalisée dans une province égyptienne les taux sanguins de malathion chez les exploitants agricoles sont corrélés avec une insulino-résistance et une augmentation de l'IMC (Raafat et al., 2012). A partir des données de l'Agricultural Health Study des auteurs ont également montré une augmentation de l'incidence du diabète gestationnel pendant le premier trimestre de grossesse chez les femmes exposées professionnellement à certains insecticides OP ainsi qu'à des herbicides (Saldana et al., 2007). L'étude réalisée dans la cohorte PELAGIE mère/enfant montre que les taux urinaires maternels de métabolites de pesticides OP sont corrélés à une augmentation de l'insulinémie chez les nouveau-nés (Debost-Legrand et al., 2016).

Il existe aujourd'hui des données épidémiologiques comparant l'impact d'une consommation d'aliments issus de l'agriculture biologique ou conventionnelle. Les aliments issus de l'agriculture biologique présentent 12% de moins de résidu de pesticides par rapport à des aliments non biologiques. De ce fait il est possible de considérer que les personnes consommant une alimentation biologique diminuent leur exposition aux pesticides (Bradman et al., 2015; Curl et al., 2002, 2015;

Oates et al., 2014). Or des études épidémiologiques récentes montrent une association entre la proportion d'aliments issus de l'agriculture biologique dans le régime alimentaire et la prévalence du syndrome métabolique. Ainsi les études de Baudry et al, basées sur la cohorte Nutri-Net Santé, montrent une association négative entre la consommation régulière d'aliments issus de l'agriculture biologique et l'IMC ainsi qu'un faible risque de développer un surpoids et une obésité (Kesse-Guyot et al., 2017). De plus un taux de 38% d'aliment issus de l'agriculture biologique dans la ration quotidienne diminue la probabilité d'augmenter la glycémie, le tour de taille, la triglycéridémie ainsi que la pression sanguine. Cette étude a pris en compte des facteurs de confusion tels que la qualité globale de l'alimentation et l'activité physique (Baudry et al., 2017). Il est cependant important à noter que ces résultats concernent les aliments issus de produit végétaux et exclus les produits dérivés de la viande et des volailles. Ce qui est en accord avec les études de l'EFSA montrant que les produits végétaux contribuent le plus à l'exposition alimentaire aux pesticides (EFSA 2015).

Ainsi l'ensemble des études épidémiologiques suggère une corrélation entre une exposition aux pesticides et une dérégulation de l'homéostasie énergétique. Si la présomption d'un tel lien n'est pas la preuve d'un lien de causalité, les études expérimentales apportent aujourd'hui des arguments en faveur de la relation de causalité entre pesticides et santé.

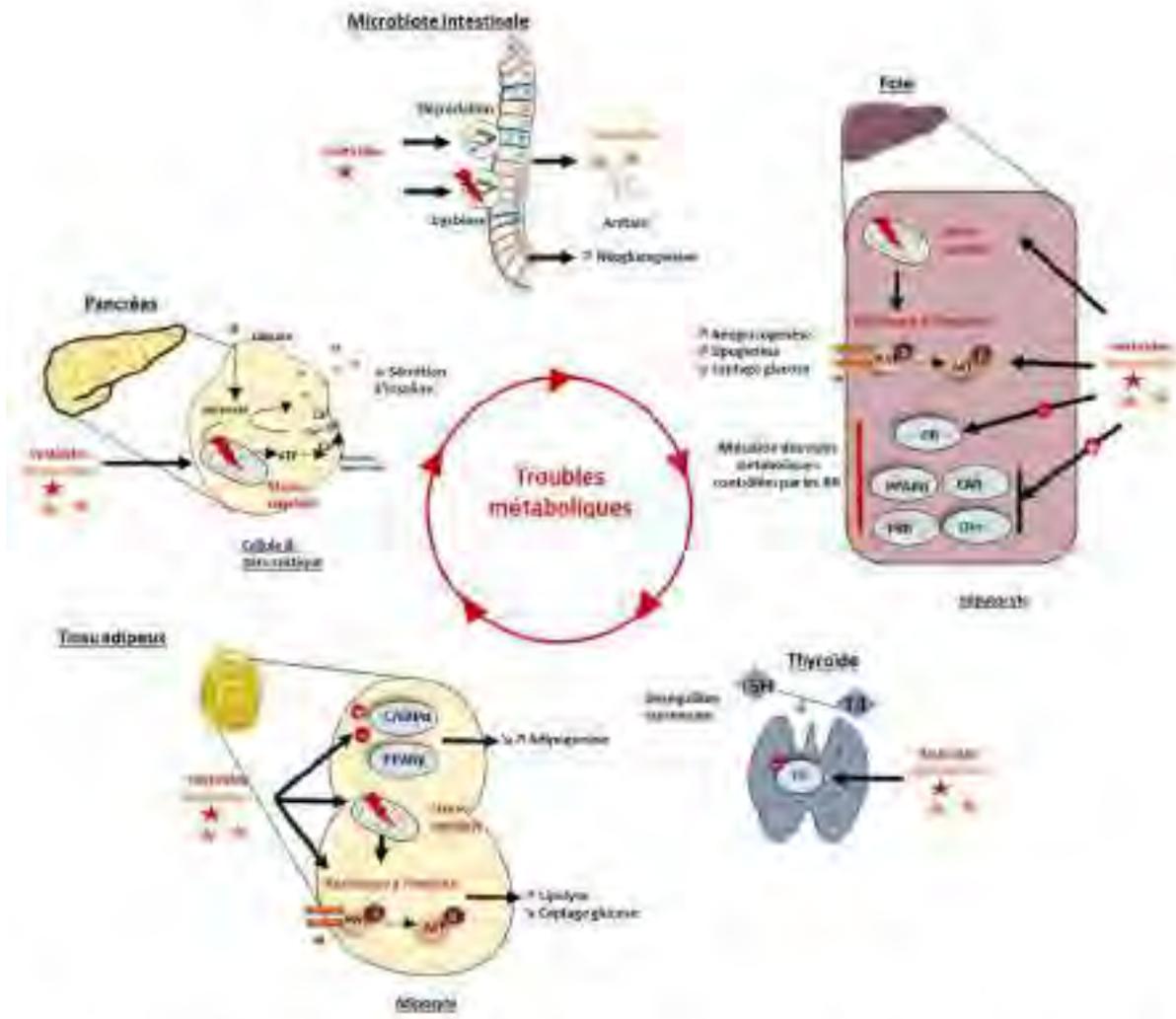
### **II.2. Etudes expérimentales**

Les données épidémiologiques sont confortées par de nombreuses données expérimentales à la fois *in vivo* et *in vitro* démontrant la contribution d'une exposition aux pesticides dans des changements du métabolisme général ou hépatique. Ces études sont divergentes du point de vue de la méthodologie (doses, phase d'exposition, voie d'exposition, durée du traitement, modèles animaux, composés testés de façon individuel ou en mélange) mais convergent vers un impact de certaines familles de pesticides sur le métabolisme énergétique.

L'exposition de souris par gavage à des insecticides OP et des carbamates seuls ou en combinaison pendant 30 jours (1/50 et 1/10 de la LD50) conduit à une perturbation de l'homéostasie glucidique, du métabolisme des protéines et des lipides ainsi qu'une dérégulation du métabolisme général. De plus, l'analyse métabolomique des extraits hépatiques des souris exposées révèle des modifications des taux de lactate, glucose, choline, glutathion, alanine, glutamine et isoleucine (Wang et al., 2014). Des rats adultes exposés par gavage à du malathion (200mg/kgPC pendant 28 jours) présentent de sévères perturbations métaboliques traduites par une augmentation de la glycémie, de l'insulinémie, de l'index HOMA-IR, une inflammation ainsi qu'une stéatose hépatique (Lasram et al., 2014b). Des résultats marquants ont été obtenus avec d'autres familles chimiques de pesticides comme l'atrazine (herbicide) ou la cyperméthrine (insecticide pyréthriinoïde) administrés dans l'eau de boisson pendant

20 semaines (100 et 50 µg/Kg PC de souris). Les animaux exposés à l'un ou à l'autre de ces deux pesticides et nourris avec un régime supplémenté en sucre, gras et cholestérol présentent une accumulation hépatique de triglycérides ainsi qu'une élévation du taux plasmatique d'acides gras libres à la fin de l'exposition comparativement aux contrôles non exposés (Jin et al., 2014). D'autres effets observés sur l'homéostasie du glucose sont rapportés dans la revue de Karami-Mohajeri and Abdollahi publiée en 2011 (Karami-Mohajeri and Abdollahi, 2011). Notamment, il a été montré que des animaux exposés à des doses sublétales de acephate, dimethoate, fenitrothion, carbofuran, diazinon, carbaryl et phorate présentent une hyperglycémie. L'exposition de souris mâles exprimant l'apolipoprotéine E3 humaine aux chlorpyrifos pendant 8 semaines (2mg/kg) exacerbe leur obésité et les marqueurs métaboliques associés (Peris-Sampedro et al., 2015). Une exposition chronique à un composé OP (monocrotophos) à des doses subléthales entraîne une hyperinsulinémie ainsi qu'une intolérance au glucose chez le rat (Nagaraju et al., 2015).

Les perturbations métaboliques induites par les pesticides semblent différentes selon le sexe de l'animal. En effet, une étude réalisée chez le rat exposé par voie sous-cutanée au chlorpyrifos (1mg/kg) pendant les 4 premiers jours suivant la naissance montre une augmentation du cholestérol et des triglycérides plasmatiques uniquement chez les descendants mâles âgés de 110 jours (Slotkin et al., 2005). L'administration en sous-cutanée d'OP (parathion) chez le rat à des doses allant de 0,1 ou 0,2 mg/kg poids corporel par jour pendant les 4 jours suivant leur naissance conduit après 21 semaines à un état pré-diabétique (hyperglycémie à jeun), ces troubles étant plus marqués chez les femelles (Lassiter et al., 2008). Les mêmes auteurs montrent que l'administration chez le rat par gavage de chlorpyrifos à une dose de 2mg/kg pendant les phases de gestation et de lactation entraîne une augmentation de l'adiposité et du poids corporel uniquement chez les descendants mâles (Lassiter and Brimijoin, 2008). L'exposition de souris au mancozeb à 40mg/kg (fongicide dithiocarbamate) et à l'imidaclopride à 0,65mg/kg (insecticide néonicotinoïde) en mélange durant la phase de lactation entraîne une augmentation du poids corporel plus importante chez les descendants mâles par rapport aux femelles. L'exposition à ce cocktail entraîne aussi une diminution des taux plasmatiques d'hormones thyroïdiennes et une augmentation des niveaux de cholestérol et de triglycérides ainsi qu'à une dérégulation de l'adipogénèse (Bhaskar and Mohanty, 2014).



**Figure 17: Mécanismes d'action des pesticides favorisant l'apparition de perturbations métaboliques sur différents organes cibles.** Les pesticides peuvent moduler la composition et/ou l'activité intestinale du microbiote conduisant à la production d'acides gras à courtes chaînes dont l'acétate qui induit la néoglucogénèse hépatique. Les récepteurs nucléaires hépatiques tels que GR, PPAR $\alpha$ , CAR, PXR et ER $\alpha$  constituent des cibles des pesticides et/ou de leurs métabolites, modulant ainsi leurs activités et l'expression de leurs gènes cibles. Les pesticides et/ou leurs métabolites provoquent un stress oxydant et induisent une résistance à l'insuline hépatique, menant à une diminution du captage du glucose, une néoglucogénèse et lipogénèse *de novo* accrues. La thyroïde et le récepteur nucléaire TR constituent une cible potentielle des pesticides et/ou de leurs métabolites pouvant induire un déséquilibre hormonal. La différenciation adipocytaire est modulée par les pesticides et/ou leurs métabolites via l'activation et/ou l'inhibition des facteurs de transcription tels que C/EBP $\alpha$  et PPAR $\gamma$ . L'exposition aux pesticides entraîne une insulino-résistance adipocytaire pouvant être liée à un stress oxydatif important, menant à une lipolyse accrue et une diminution du captage du glucose circulant. La fonction biologique du pancréas est également impactée par l'exposition aux pesticides et/ou leurs métabolites, la sécrétion d'insuline est diminuée liée à une augmentation du stress oxydant.

AKT : protéine kinase B, ATP: Adénosine-Triphosphate, C/EBP $\alpha$ : CCAAT/enhancer-binding proteins alpha, Ca $^{2+}$ : calcium, ER $\alpha$  : Estrogen receptor alpha, GR: Récepteurs aux glucocorticoïdes, IR : Insulin receptor, IRS1 : Insulin receptor substrate 1, PPAR $\alpha$ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptors  $\alpha$ , PXR: pregnane X receptor, T $_4$  : thyroxine, TR : Récepteurs aux hormones thyroïdiennes TSH : thyroïdostimuline

### II.3. Mécanismes d'action des pesticides

Les différents troubles métaboliques observés chez les animaux exposés aux pesticides sont liés aux propriétés de perturbateurs endocrino-métaboliques de certains composés. Celles-ci se manifestent de différentes façons avec un impact hépatique ou sur les organes périphériques (tissu adipeux, pancréas, intestins et thyroïde) et des mécanismes impliquant les récepteurs nucléaires, la dérégulation du statut oxydoréducteur et les voies de signalisation impliquées dans le contrôle du métabolisme glucidique et lipidique (**Figure 17**).

#### II.3.1. Les récepteurs nucléaires cibles potentielles des pesticides

Les pesticides peuvent affecter le métabolisme lipidique ou glucidique à différents niveaux. Ces voies métaboliques sont contrôlées finement à la fois par une balance hormonale insuline/glucagon et au niveau transcriptionnel *via* l'intervention de facteurs de transcription et des récepteurs nucléaires, tels que les récepteurs aux hormones thyroïdiennes (TR), sexuelles (AR, ER) et glucocorticoïdes (GR) ou les récepteurs aux xénobiotiques (CAR et PXR) et le récepteur nucléaire senseur des acides gras PPAR $\alpha$ . De par leur capacité à lier les composés lipophiles ces récepteurs nucléaires constituent en effet des cibles privilégiées des pesticides.

Des études utilisant des systèmes gènes rapporteurs confirment l'activation de nombreux récepteurs nucléaires par les pesticides. L'étude de Takeuchi montre notamment l'action agoniste de deux pesticides à la fois *in vitro* et *in vivo* sur PPAR $\alpha$  (Takeuchi et al., 2006). Des études ont identifié une centaine de pesticides appartenant à diverses familles chimiques capables d'activer la forme humaine et/ou murine de PXR *in vitro* dans des cellules hépatiques (Coumoul et al., 2002; Kojima et al., 2011; Lemaire et al., 2006). Par ailleurs, le récepteur nucléaire CAR est lui aussi susceptible d'être activé par diverses familles chimiques de pesticides tels que les pyréthriinoïdes, les OP et les carbamates (Abass and Pelkonen, 2013). *In vivo*, l'exposition de rats mâles à un herbicide (pronamide) à des doses allant de 5 à 500mg/kg pendant 7 jours promeut l'activation de CAR, PXR et PPAR $\alpha$  (LeBaron et al., 2014). L'étude de Lake et al., présente une liste de pesticides (fongicide triazole, insecticide pyréthriinoïde et sulfoxalor) activateurs de CAR *in vivo* dans le foie de rongeurs (Lake et al., 2015).

L'activité transactivatrice potentielle de nombreux pesticides non-persistants suite à une liaison sur les récepteurs hormonaux (ER et AR) et sur le récepteur AhR a été testée *in vitro*, confirmant le potentiel de perturbations endocriniennes de certains composés. Les résultats montrent que le fludioxonil et le fenhexamid (fongicides de la famille des anilides) sont des agonistes de Er $\alpha$  pouvant induire à la fois son activation et la transcription de ses gènes cibles. Le fludioxonil et fenhexamid sont aussi des ligands

potentiels du récepteur AR. Fludioxonil, mepanipyrim, cypronidil, pyremethanil et le chlorpyrifos sont des agonistes de AhR (Medjakovic et al., 2014).

Deux organochlorés, methoxychlor et DDT exercent des activités oestrogéniques par liaison directe avec les récepteurs ER $\alpha$  et ER $\beta$  au niveau de leur poche de liaison (Kuiper et al., 1998). D'autres familles chimiques peuvent se lier aux deux isotypes de ER pouvant conduire à des effets additifs (Seeger et al., 2016).

Les métabolites des carbamates exercent une activité antagoniste sur le récepteur nucléaire TR *in vitro* affectant ainsi la voie de signalisation dépendante des hormones thyroïdiennes (Sun et al., 2008). Une étude de 2010 a montré *in vitro*, le potentiel antagoniste sur le récepteur TR d'un pesticide de la classe des pyréthrinoides (Du et al., 2010). Ce potentiel inhibiteur a aussi été démontré pour le fipronil *in vitro* (Lu et al., 2015).

Dans une étude récente, l'effet de 34 pesticides sur le récepteur GR a été étudié *in vitro* en utilisant un système gène rapporteur. De façon surprenante aucun des pesticides testés ne montre d'action agoniste sur le récepteur GR, cependant 12 pesticides montrent un effet antagoniste sur ce récepteur. L'antagonisation de GR par ces 12 pesticides empêche ainsi l'activité transcriptionnelle de GR. En effet *in vitro*, le traitement concomitant au cortisol et avec un de ces 12 pesticides bloque l'induction de l'expression d'un gène cible de GR, la PEPCK (Zhang et al., 2016).

L'expression de PPAR $\gamma$  dans le tissu adipeux chez la souris est induite après une exposition chronique dans l'eau de boisson à l'atrazine (Jin et al., 2014).

Ces données à la fois *in vitro* et *in vivo* suggèrent que les pesticides peuvent moduler l'activité de nombreux récepteurs nucléaires affectant ainsi leur rôle de garant du maintien de l'homéostasie hormonale et métabolique et par conséquent l'expression des gènes clés des voies métaboliques. Par exemple, l'exposition expérimentale des souris à l'atrazine ou cyperméthrine est associée à l'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la glycolyse, le transport de glucose et de la lipogenèse *de novo* au niveau hépatique (Jin et al., 2014). Un autre exemple montre que un OP (dichlorvos) inhibe l'activité et l'expression de la glucokinase hépatique après une exposition aiguë chez le rat (Romero-Navarro et al., 2006).

### **II.3.2. Action sur la sécrétion et la réponse à l'insuline**

Une insulino-résistance qu'elle soit hépatique ou périphérique est fortement associée aux troubles métaboliques (diabète et obésité). Ainsi l'altération de la voie de signalisation de l'insuline sous l'action

directe ou indirecte des pesticides constitue un possible mécanisme d'action de l'effet obésogène et diabétogène de ces composés.

Sur trois modèles cellulaires différents (adipocyte 3T3 L1, hépatocyte HepG2 et des myocytes C2C12), une équipe a démontré que le traitement avec des doses croissantes d'imidacloprid (insecticide néonicotinoïde) réduisait la phosphorylation des protéines kinases AKT et S6K de façon dose dépendante, altérant ainsi la réponse à l'insuline (Kim et al., 2013). Une autre étude *in vitro* plus récente confirme les effets de l'imidacloprid sur la voie de signalisation de l'insuline en montrant un impact de ce pesticide sur la phosphorylation de IRS et l'inhibition de la phosphorylation de AKT (Shen et al., 2017).

Chez les souris femelles exposées pendant 12 semaines, la perméthrine potentialise l'insulino-résistance induite par un régime riche en graisse en perturbant la phosphorylation d'AKT au niveau du muscle squelettique en réponse à l'insuline (Xiao et al., 2017).

*In vivo* chez le rat l'exposition à l'atrazine conduit à un blocage de la phosphorylation oxydative des complexes mitochondriaux I et II conduisant à une inhibition de la phosphorylation de la protéine kinase AKT sans affecter la cascade de signalisation en amont aussi bien au niveau hépatique que musculaire (Lim et al., 2009).

Dans les cultures primaires d'hépatocytes murins l'addition de roténone (pesticide de la famille des rotinoïdes) induit une résistance à l'insuline due à une phosphorylation de la protéine IRS1 dépendante des voies MAP Kinases et du stress oxydant (Al-Lahham et al., 2016).

Les dérégulations métaboliques induites par les pesticides peuvent être liées à une altération de la sécrétion au niveau pancréatique de l'insuline. Une étude montre que chez le rat l'hyperglycémie induite suite à une exposition chronique au malathion est consécutive à un impact de ce composé sur les enzymes clés impliquées dans la sécrétion d'insuline par les îlots pancréatiques (Panahi et al., 2006a). Les pesticides OP sont connus pour modifier les fonctions endocrines et biochimiques du pancréas, notamment le diméthoate administré à des doses sublétales chez le rat favorise un stress oxydant conduisant à des dommages oxydatifs au niveau pancréatique (Kamath and Rajini, 2007). Cependant une autre étude montre que l'exposition aiguë à un OP (dichlorvos) n'exerce pas d'impact sur les activités et l'expression des enzymes pancréatiques (Romero-Navarro et al., 2006). Le diazinon lorsqu'il est administré en aigu chez le rat induit un stress oxydant dans les îlots de Langerhans ce qui résulte en une hyperglycémie due à une sécrétion insuffisante d'insuline (Ghafour-Rashidi et al., 2007). Des cellules  $\beta$  pancréatiques isolées en culture et prétraitées au malathion présentent une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Vosough-Ghanbari et al., 2007). Le diazinon

administré *in vivo* chez l'animal augmente l'activité d'une enzyme clé pour la sécrétion d'insuline (GDH glutamate deshydrogenase) (Jamshidi et al., 2009).

### **II.3.3. Action sur la différenciation adipocytaire**

Au niveau moléculaire les contaminants obésogènes peuvent intervenir sur la prolifération et la différenciation adipocytaire en interférant avec les différents récepteurs nucléaires comme PPAR $\gamma$  et les récepteurs aux hormones stéroïdiennes ou des facteurs de transcription comme le C/EBP (CCAAT Enhancer Binding Protein). Par exemple, l'endrine inhibe de façon dose dépendante la différenciation adipocytaire dans les cellules NIH3T3 en diminuant les niveaux d'expression de CEBP $\alpha$  (Moreno-Aliaga and Matsumura, 1999). L'exposition de souris pendant la phase de gestation et lactation à de faibles doses de deltaméthrin diminue l'expression des gènes de l'adipogenèse cibles de PPAR $\gamma$  dans la descendance (mâles âgés de 5 mois) ainsi que des gènes impliqués dans l'homéostasie glucidique et lipidique (Armstrong et al., 2013). Une autre étude montre que le triflumizole, un fongicide, induit la différenciation adipocytaire par un mécanisme dépendant de PPAR $\gamma$  à la fois *in vivo* et *in vitro* (Li et al., 2012b). Les insecticides de type pyréthriinoïde (deltaméthrine) induisent l'adipogenèse dans les cellules 3T3 *via* une augmentation de l'expression de C/EBP $\alpha$  et PPAR $\gamma$  (Shen et al., 2017). L'imidaclopride, les organochlorés et le fipronil ont montré des effets comparables sur l'adipogenèse sur les cellules 3T3 L1 (Kim et al., 2014; Mangum et al., 2015; Park et al., 2013; Sun et al., 2016). Par contre, le glyphosate dans les cellules 3T3 induit un stress oxydant et diminue la différenciation adipocytaire *via* l'inhibition de l'induction de PPAR $\gamma$  (Martini et al., 2016). Le fongicide pyraclostrobin induit une dysfonction mitochondriale entraînant une modification de l'homéostasie lipidique et une accumulation de triglycérides dans les cellules 3T3 indépendamment de PPAR $\gamma$  (Luz et al., 2018).

### **II.3.4. Action sur la fonction thyroïdienne**

Une étude montre que l'exposition à un mélange de carbamates (methomyl et triazine (metribuzin) à faible dose chez des rats conduit à une augmentation des niveaux plasmatiques en hormones T4 (Porter et al., 1993). Une étude plus récente rapporte au contraire que l'exposition à la deltaméthrin et à la perméthrin (pesticides de la famille des pyréthriinoïdes) conduit à des diminutions des taux d'hormones T4 sériques chez le rat (Wang et al., 2002). Certains pesticides comme le boscalid (famille des carboxamides) modifient le taux circulant des hormones thyroïdiennes en dérégulant les enzymes hépatiques impliquées dans leur turnover (Montoya et al., 2014). Les effets des pesticides sur la fonction thyroïdienne sont rapportés dans la revue de Campos et Freire, leurs conclusions générales sont que les pesticides induisent en général une diminution des niveaux circulants de T4 et T3 parfois

accompagnée d'une augmentation des niveaux de TSH, correspondant à un statut hypothyroïdien (Campos and Freire, 2016).

### **II.3.5. Action sur le microbiote intestinal**

Des déséquilibres de l'écosystème bactérien intestinal (appelés dysbioses) sont associés à des pathologies métaboliques telles que l'obésité (Ley et al., 2006), le diabète (Qin et al., 2012) et les maladies hépatiques (Bajaj et al., 2014; Le Roy et al., 2013).

La façon dont le microbiote intestinal et les polluants interagissent n'est pas encore très claire. En toxicologie, ces interactions sont un sujet émergent (Snedeker and Hay, 2012). Une revue de la littérature montre que ces interactions bactéries-polluants pourraient être un des mécanismes clés de toxicité de certaines molécules (Claus et al., 2016). Le microbiote possède en effet une capacité métabolique importante vis à vis des xénobiotiques avec 5 familles enzymatiques particulièrement impliquées (les azoréductases, les nitroréductases, les  $\beta$ -glucuronidases, les sulfatases et les  $\beta$ -lyases). Pour de nombreux xénobiotiques, le métabolisme bactérien intestinal est un facteur modulant clairement la toxicité vis-à-vis de l'hôte. Par exemple, une étude récente montre que, chez des souris traitées au monocrotophos (insecticide organophosphoré) pendant 180 jours (10 fois la dose journalière admissible), la dégradation de ce pesticide par le microbiote intestinal produit des acides gras à courtes chaînes, dont l'acétate, qui induit la néoglucogenèse hépatique, contribuant ainsi à l'apparition d'une intolérance au glucose chez ces animaux (Velmurugan et al., 2017). Réciproquement, les xénobiotiques peuvent parfois moduler la composition et/ou l'activité métabolique du microbiote intestinal, pouvant donc être un facteur contribuant à la sélection du microbiote d'un individu. Par exemple l'exposition de souris au diazinon (insecticide organophosphoré) dans l'eau de boisson modifie la composition du microbiote après 13 semaines d'exposition et de façon dépendante du sexe (Gao et al., 2016). De même l'exposition orale des souris aux carbendazime (fongicide de la famille des benzimidazoles et des carbamates) induit des désordres du métabolisme lipidique hépatique et une dysbiose du microbiote intestinal. Par ailleurs, la transplantation de fèces préalablement cultivées en présence de pesticides organophosphorés (monocrotophos, chlorpyrifos, malathion ou methyl parathion) chez des souris saines entraîne l'apparition d'une intolérance au glucose chez les souris receveuses (Velmurugan et al., 2017). Ces résultats indiquent que le microbiote intestinal joue un rôle prépondérant dans l'induction de l'intolérance au glucose par les pesticides organophosphorés, et cela semble être un mécanisme commun à la plupart des organophosphorés. D'autres études confirment ces résultats pour d'autres pesticides tels que le glyphosate (herbicide de la famille des aminophosphates glycine) (Shehata et al., 2013). Cependant, les études sur ce sujet restent pour l'instant peu nombreuses. Une seule étude a étudié l'impact d'un traitement à un

pesticide (chlorpyrifos) sur le microbiote en période périnatale (Joly et al., 2013), période pourtant critique pour l'installation du microbiote intestinal et des fonctions physiologiques associées (métabolisme en particulier).

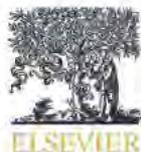
# ETUDES EXPERIMENTALES

## Chapitre I

### ***L'activation du récepteur nucléaire CAR induit au niveau hépatique la lipogenèse de novo et la régulation de Pnpla3 indépendamment de la voie LXR.***

Un des premiers objectifs de ces travaux de thèse a consisté à étudier les mécanismes de régulation des gènes du métabolisme glucido-lipidique hépatique par le récepteur nucléaire CAR *via* son interaction potentielle avec le récepteur nucléaire LXR et le facteur de transcription ChREBP. Cette étude a permis de montrer que l'activation pharmacologique de CAR par l'activateur pharmacologique de CAR (TCPOBOP) induit aussi bien l'expression des gènes de la glycolyse tels que la *Gk* et la *Lpk* et de la lipogenèse *de novo* tels que *Fas*, *Elovl6*, *Gpat* et *Pnpla3* conduisant à une stéatose hépatique. Cette induction n'est pas retrouvée chez les souris déficientes pour CAR suggérant une activation CAR dépendante de ces gènes. *Pnpla3* est un gène pour lequel il existe un polymorphisme qui prédispose à la survenue de la NAFLD. Comme vu dans l'étude bibliographique, le récepteur nucléaire LXR est un régulateur majeur de l'expression des gènes de la lipogenèse *de novo* au niveau hépatique, par la régulation directe de gènes de la lipogenèse *de novo* et indirecte par la régulation des facteurs de transcription ChREBP et SREBP-1c. Des souris déficientes pour le récepteur nucléaire LXR et n'exprimant pas le facteur de transcription SREBP-1c traitées avec l'activateur pharmacologique de CAR a permis de montrer que la voie LXR/SREBP-1c n'était pas impliqué dans la régulation des gènes de la lipogenèse et *Pnpla3* par le récepteur CAR. En revanche, le facteur de transcription ChREBP semble en partie impliqué dans ces régulations d'expression génique, l'activation pharmacologique de CAR entraînant à la fois sa translocation nucléaire et une augmentation de son expression génique. Ces données apportent de nouveaux éléments sur le rôle de CAR en situation physiologique dans les mécanismes de régulation des gènes du métabolisme glucido-lipidique.

Ce projet a mené à la publication d'un article paru dans le journal « Toxicology and Applied Pharmacology ».



## Activation of the Constitutive Androstane Receptor induces hepatic lipogenesis and regulates *Pnpla3* gene expression in a LXR-independent way



Alice Marmugi<sup>a,b,1</sup>, Céline Lukowicz<sup>a,b,1</sup>, Frederic Lasserre<sup>a,b</sup>, Alexandra Montagner<sup>a,b</sup>, Arnaud Polizzi<sup>a,b</sup>, Simon Ducheix<sup>a,b</sup>, Adeline Goron<sup>a,b</sup>, Laurence Gamet-Payrastra<sup>a,b</sup>, Sabine Gerbal-Chaloin<sup>c</sup>, Jean Marc Pascussi<sup>d</sup>, Marthe Moldes<sup>e,f</sup>, Thierry Pineau<sup>a,b</sup>, Hervé Guillou<sup>a,b</sup>, Laila Mselli-Lakhal<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> INRA, TOXALIM (Research Centre in Food Toxicology), Toulouse, France

<sup>b</sup> Université de Toulouse, INP, UPS, TOXALIM, Toulouse, France

<sup>c</sup> Institute of Regenerative Medicine and Biotherapy, INSERM, UJ 183 Montpellier, France

<sup>d</sup> Centre National de la Recherche Scientifique, UMR5203, Institut de Génétique Fonctionnelle, Montpellier, France

<sup>e</sup> Centre de Recherche Saint-Antoine, INSERM, UMR 938, Sorbonne Universités, Université Paris 6, Paris, France

<sup>f</sup> Institut Hospitalo-Universitaire ICAN, Paris, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 20 January 2016

Revised 2 May 2016

Accepted 9 May 2016

Available online 11 May 2016

#### Keywords:

PNPLA3/adiponitrin  
Constitutive Androstane Receptor  
Liver X Receptor  
Lipogenesis  
Non-alcoholic fatty liver disease

### ABSTRACT

The Constitutive Androstane Receptor (CAR, NR1H3) has been newly described as a regulator of energy metabolism. A relevant number of studies using animal models of obesity suggest that CAR activation could be beneficial on the metabolic balance. However, this remains controversial and the underlying mechanisms are still unknown. This work aimed to investigate the effect of CAR activation on hepatic energy metabolism during physiological conditions, i.e. in mouse models not subjected to metabolic/nutritional stress. Gene expression profiling in the liver of CAR knockout and control mice on chow diet and treated with a CAR agonist highlighted CAR-mediated up-regulations of lipogenic genes, concomitant with neutral lipid accumulation. A strong CAR-mediated up-regulation of the patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (*Pnpla3*) was demonstrated. *Pnpla3* is a gene whose polymorphism is associated with the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) development. This observation was confirmed in human hepatocytes treated with the antiepileptic drug and CAR activator, phenobarbital and in immortalized human hepatocytes treated with CITCO. Studying the molecular mechanisms controlling *Pnpla3* gene expression, we demonstrated that CAR does not act by a direct regulation of *Pnpla3* transcription or via the Liver X Receptor but may rather involve the transcription factor Carbohydrate Responsive Element-binding protein. These data provide new insights into the regulation by CAR of glycolytic and lipogenic genes and on pathogenesis of steatosis. This also raises the question concerning the impact of drugs and environmental contaminants in lipid-associated metabolic diseases.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Abbreviations:** CAR, Constitutive Androstane Receptor; ChREBP, Carbohydrate Responsive Element-binding protein; CYP2B10, cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 10; CYP2C29, cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 29; CYP3A11, cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 11; ELOVL6, elongation of long-chain fatty acids family member 6; FASN, fatty acid synthase; G6K, glucokinase; GPAT, glycerol-3-phosphate acyltransferase; LPK, L-type pyruvate kinase; LXR, Liver X Receptor; NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease; NAFLS, nonalcoholic steatohepatitis; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase 1; PNPLA3, patatin-like phospholipase domain-containing protein 3; TCPOBOP, 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)] benzene; PB, phenobarbital; SCD1, stearoyl-CoA desaturase-1; SREBP1c, sterol regulatory element binding protein1c; TBP, TATA-box binding protein; THRSP-SPOT14, thyroid hormone responsive Spot14 homolog.

\* Corresponding author at: ToxAlim UMR1331 INRA/INPT/UPS, Integrative Toxicology & Metabolism Group, 180 chemin de Tournefeuille, BP 93173, 31027 Toulouse Cedex 3, France.

E-mail address: [laila.lakhal@toulouse.inra.fr](mailto:laila.lakhal@toulouse.inra.fr) (L. Mselli-Lakhal).

<sup>1</sup> Both authors contributed equally to this work.

### 1. Introduction

The Constitutive Androstane Receptor (CAR, NR1H3) was initially characterized as a xenosensor playing an important role in the transcriptional activation of multiple xenobiotic-metabolizing enzymes in response to drugs and endocrine-disruptive chemicals (Zhang et al., 2015; Baldwin and Roling, 2009). Recent studies have also linked CAR to lipid and glucose metabolism. Clinical studies demonstrated a link between the use of CAR-activating drugs and the occurrence of metabolic disruptions in patients. Long-term use of phenobarbital (PB), a CAR activator, as an antiepileptic drug, induced a change in plasma lipid profiles of patients (Calandre et al., 1991; Luoma et al., 1979; Yamamoto et al., 1989) and chronic treatment with other CAR activators like valproic acid or tamoxifen were

associated with the occurrence of hepatic disorders (Bilici et al., 2007; Verrotti et al., 2011).

The role of CAR in the repression of genes involved in gluconeogenesis and  $\beta$ -oxidation was clearly established while its role in lipogenesis remains controversial. Hepatic gluconeogenesis regulatory enzymes phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPCK) and glucose-6-phosphatase (G6Pase) were reported to be repressed by CAR in several studies (Miao et al., 2006; Kachaylo et al., 2012; Yarushkin et al., 2013; Yu et al., 2015; Ling et al., 2014). It was suggested that CAR inhibits gluconeogenic genes through a competition with the hepatocyte nuclear factor 4 (HNF4) for binding in direct repeat 1 (DR1) motif in the promoter of gluconeogenic genes (Miao et al., 2006). It was also proposed that this inhibition was through interaction with the forkhead box protein O1 (FOXO1) to prevent its fixation in the insulin response sequence in gluconeogenic genes (Kodama et al., 2004) or by facilitating the ubiquitination and degradation of PGC1 $\alpha$  (Gao et al., 2015). Inhibition of genes like cytochrome P450 4A14 (*Cyp4a14*), enoyl-CoA isomerase (*Eci*), carnitine palmitoyltransferase 1A (*Cpt1a*) and cytosolic acyl-CoA thioesterase (*Cte*), involved in the  $\beta$ -oxidation process is well established (Maglich et al., 2009; Ueda et al., 2002; Kassam et al., 2000). It was supposed to occur through interaction with the peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ), which is the major regulator of fatty acid metabolism (Kassam et al., 2000). The role of CAR in the regulation of lipogenesis is more controversial, some studies reporting CAR as an “anti-obesogenic” factor (Dong et al., 2009; Masuyama and Hiramatsu, 2012a,b) and others as a “pro-lipogenic factor” (Maglich et al., 2004, 2009; Breuker et al., 2010). In leptin-deficient (*ob/ob*) or high fat fed mice CAR activation was shown to alleviate hepatic steatosis by repressing lipogenic genes like the stearoyl-CoA desaturase-1 (*Scd1*), sterol regulatory element-binding protein 1c (*Srebp-1c*) and the acetyl-CoA carboxylase (*Acc*) (Dong et al., 2009; Gao et al., 2009). It was suggested that CAR inhibited lipogenesis through an interaction with Insig-1 a protein blocking the proteolytic activation of SREBP-1c (Roth et al., 2008). But some other studies reported on an up-regulation of lipogenic genes by CAR on human hepatocytes likely through a nonclassical S14 pathway (Breuker et al., 2010). The effect of CAR activation on non-alcoholic steatohepatitis (NASH) pathogenesis in NASH-induced dietary mouse models was also subject to controversy (Yamazaki et al., 2007; Baskin-Bey et al., 2007).

To our knowledge, there is no study investigating the effect of CAR activation on lipogenic gene expression and on the development of steatosis in physiological conditions, i.e. in mouse models not subjected to metabolic/nutritional stress and without pre-established disease. This is what we sought to evaluate in this study. In these conditions, CAR was identified as an enhancer of hepatic *de novo* lipogenesis and glycolysis through a Liver X Receptor (LXR)-independent pathway. Concomitantly, CAR activation resulted in hepatic lipid accumulation. We also demonstrated for the first time that CAR is a new player in the patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (*Pnpla3*) regulation, a gene whose polymorphism (I148M) in humans represents a strong modifier of NAFLD severity and progression (Romeo et al., 2008; Dongiovanni et al., 2013).

## 2. Material and methods

### 2.1. Chemicals

Culture media and additives were purchased from Gibco-Life technologies (Saint Aubin, France). 1,4-Bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene (TCPOBOP), dimethyl sulfoxide (DMSO), phenobarbital (PB) and 6-(4-chlorophenyl)imidazo[2,1-b][1,3] thiazole-5-carbaldehyde O-(3,4-dichlorobenzyl)oxime (CTCO) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Williams E medium, fetal calf serum (FCS), insulin, glutamine and dexamethasone were purchased from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France).

### 2.2. Animals and treatment

All *in vivo* experiments were conducted following French national and European laws and regulations relating to the housing and use of animals in research and were approved by an independent ethic committee (Toxicométrique, INRA ToxAlim, Toulouse, France). This study employed CAR knockout mice (CAR $^{-/-}$ ; 10–11-week-old) backcrossed to C57BL/6J, as described in Wei et al. (2000), and age-matched C57BL/6J wild-type (WT) counterparts (Charles River, Les Oncins, France; one week acclimatization) as well as, LXR $\alpha\beta$  double-deficient mice (LXR $^{-/-}$ ; 12-week-old) from a C57BL/6J  $\times$  129/SvJ mixed genetic background and littermate controls (Repa et al., 2000). CAR $^{-/-}$  mice were provided by Dr. Urs A. Meyer (BioCenter, University Basel, Switzerland) and LXR $^{-/-}$  mice were provided by Dr. David J. Mangelsdorf (Howard Hughes Medical Institute, Dallas, TX). For short-term treatment, male and/or female mice ( $n = 6$ /group) were injected intraperitoneally (i.p.) once-daily during three days with either corn oil (vehicle) or TCPOBOP (3 mg/kg of body weight) dissolved in corn oil. For chronic treatment, male mice ( $n = 6$ /group) were injected once-weekly with TCPOBOP (3 mg/kg of body weight; i.p. injection) during seven consecutive weeks using corn oil as vehicle. Mice were housed at INRA's transgenic rodent facility (ToxAlim, Toulouse, France) in a pathogen-free room under a standard 12-h light, 12-h dark cycle and fed a standard chow diet (SAFE Diet A04, Augy, France) with *ad libitum* drinking water.

### 2.3. Blood and organ sampling

Blood was collected at the submandibular vein in EDTA-coated capillaries as described in Golde et al. (2005). Plasma was prepared by centrifugation (2000g; 10 min) and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. Following euthanasia by cervical dislocation (fed state), the liver and pWAT were removed, weighed, dissected, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use.

### 2.4. Biochemical assays

Hepatic lipid content was quantified as described in Marmugi et al. (2012). Plasma levels of triglycerides and glucose were determined on a biochemical analyzer, COBAS-MIRA + (Roche Diagnostics; Anexplo Service Phénotypage, Toulouse, France). Plasma insulin was assayed with the ultrasensitive mouse insulin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Crystal Chem, Downers Grove, IL USA).

### 2.5. Histology

Frozen liver samples were embedded in Neg50 (Fisher Scientific, Courtabouef, France). Sections (5  $\mu\text{m}$ , Leica RM2145 microtome, Nanterre, France) were stained with Oil-Red-O and hematoxylin/eosin and visualized with a Leica DFC300 camera (Leica Microsystems, Nanterre, France).

### 2.6. Cell culture experiments

HepG2 human hepatoma cells and JWZ murine hepatic cells, also known as MuSH immortalized hepatocytes (Tien et al., 2003), and kindly provided by Joshua P. Gray (Center for Molecular Toxicology and Carcinogenesis, Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania, USA), were grown in DMEM supplemented with l-glutamine (2 mM), penicillin (100 IU/ml), streptomycin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), and 10% fetal bovine serum (FBS). The culture medium of JWZ cells was supplemented with dexamethasone (1  $\mu\text{M}$ ). To allow CAR overexpression, HepG2 and JWZ cells were transfected with either pCR3-hCAR (HepG2)/pCR3-mCAR (JWZ) plasmid, or pCR3-empty plasmid using lipofectamine 2000 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) according to the manufacturer's protocol. Following 48 h of transfection, cells were

harvested with Trizol® (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) before RNA extraction.

Immortalized human hepatocytes (IHH, Schippers et al., 1997) were cultured in Williams E medium containing 11 mM glucose and supplemented with 10% FCS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 120 nM insulin, 2% glutamine and 50 nM dexamethasone. Cells were then exposed to DMSO 1% or CITCO 1 µM (1% DMSO) in the same cell culture media containing 4% FCS instead of 10%. Following 48 h of treatment, cells were harvested with Trizol® (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) before RNA extraction.

2.7. Luciferase reporter gene assay

JWZ cells were co-transfected either with a 3.3 kb Pnpla3 promoter construct cloned into a pGL3-basic vector, or the (NR1)<sub>5</sub>-tk-luc pGL3 construct, or a pGL3-empty vector (0.5 µg), and with the pRL-TK plasmid (25 ng), and either with pCR3-mCAR or pCR3-empty (0.5 µg), using Lipofectamine 2000. The Pnpla3 promoter construct and (NR1)<sub>5</sub>-tk-luc pGL3 construct were a gift from Dr. Marthe Moldes (Centre de Recherche Saint-Antoine, INSERM, UMR 938, Université Paris 6, Paris, France) (Dubuquoy et al., 2011) and Dr. Masahiko Negishi (Reproductive & Developmental Biology Laboratory/Pharmacogenetics Group, Research Triangle Park, North Carolina, USA), respectively. After 48 h exposure, cells were lysed in cell culture lysis reagent (Promega, Madison, USA). Luciferase activities were determined according to the manufacturer's instruction (Dual-Luciferase® Reporter (DLR™) Assay System, Promega). Lysate samples were assayed in triplicate from four independent experiments. The firefly luciferase activity of each sample was normalized to Renilla luciferase activities.

2.8. Gene expression studies

Total RNA was extracted with Trizol® reagent. Transcriptomic profiles were obtained by quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) as described in Marmugi et al. (2012). Primers for SYBR

Table 2  
Clinical characteristics of the liver donors.

Liver identification	Sex	Age	Pathology
PHH 367	M	59	Cholangiocarcinoma
PHH 374	F	41	Adenoma
PHH 366	M	62	Metastasis of colorectal cancer
PHH 486	F	78	Hepatocellular carcinoma

F = female; M = male; PHH = primary human hepatocyte; age in years.

Green assays are presented in Table 1. qPCR data were normalized by TATA-box binding protein (TBP) for mouse messenger RNA (mRNA) levels or β-ACTIN/PSMB6 for human messenger RNA (mRNA) levels as indicated in figure legends and raw data were analyzed with LinRegPCR (Ruijter et al., 2009).

2.9. Immunoblot analysis

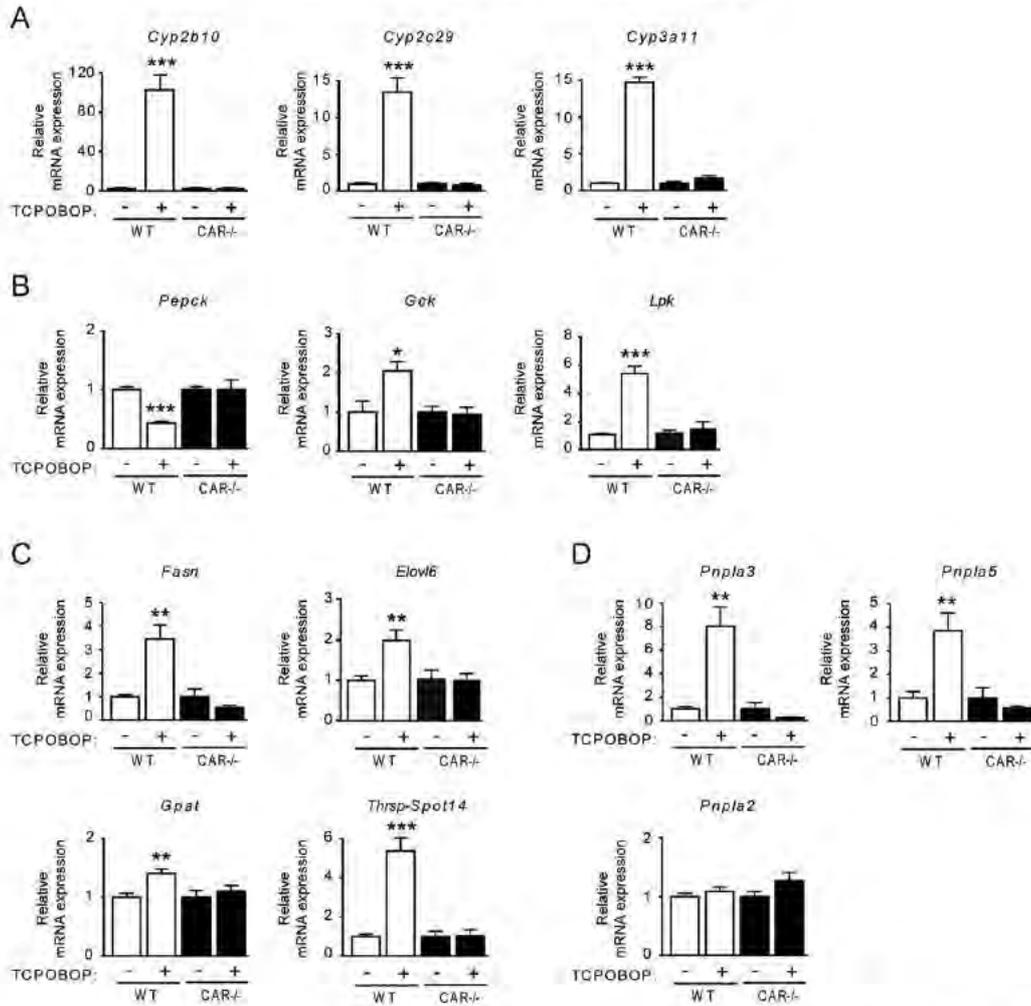
Nuclear protein extracts were prepared using NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Scientific), according to the manufacturer's instructions. Following separation by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), nuclear protein extracts were probed with primary antibodies from Cell Signaling Technology (LAMIN A/C: 2032; Danvers, MA, USA), Novus Biological (CHREBP: nb400-135; Littleton, CO, USA), and secondary antibodies from Biotium (CF680 or CF770-labeled; Hayward, CA, USA). Band intensities were normalized to those of LAMIN A/C. The images were analyzed on the Odyssey Infrared Imaging System (Li-Cor, Lincoln, NE, USA).

2.10. Primary culture of human and mouse hepatocytes

Liver samples were obtained from liver resections performed in adult patients for medical reasons unrelated to our research program. The use of human specimens for scientific purposes was approved by

Table 1  
Oligonucleotide sequences for real time PCR.

Gene	NCBI Refseq	Forward primers (5'–3')	Reverse primers (5'–3')
<i>Mus musculus</i>			
<i>Chrebp</i>	NM_021455	CCACACTCCACCCTCTC	TTGTTACGCGGATCTGTG
<i>Chrebpβ</i>	NM_021455	TCFCAGATCCCGTGGAG	CTTGTCCCGCATAGCAAC
<i>Cyp2b10</i>	NM_008999	TTTCTGCCCTCTCAACAGAA	ATGGACGTGAAGAAAGCAAC
<i>Cyp2c29</i>	NM_007815	GCTCAAAGCCTACTGTCA	CATGAGTGTAAATCGTCTCA
<i>Cyp3a11</i>	NM_007518	TCACACACAGTGTGAGGAGAA	GTTTACGAGTCCCATATCGGTAGAG
<i>Elovl6</i>	NM_130458	TCGTATGAACAAGCGAGCA	TGGTCATCAGAAATGACAGCATGT
<i>Esr1</i>	NM_007988	AGTCAGCTATGAAGCAATTGTGA	CACCCAGACGCCAGTGTTC
<i>Gck</i>	NM_010101	AGGAGTCTATAA CCTGCTGGAT	GGTCTTAAGCTGCTGTGAGT
<i>Gpat</i>	NM_0081449	AGAGGAAGCCTCCGAGCA	TGGACATGATAGCGCAGGACT
<i>Ipk1</i>	NM_013631	TGCACTCAGAGCCTGGCC	AGTCGTGCAATGTTCATCCT
<i>Pparγ</i>	NM_001127330	GACCAACAGCCTGACGGG	TGAATATCAGTGTTCACCGCTT
<i>Pepck</i>	NM_011044	GAACCCAGCCCTGCC	GAGCACTCCAAAAACCG
<i>Pnpla2</i>	NM_025802	AGTGTCTTCACCATCCGCTT	GGATATCTTCAGGACATCAGGC
<i>Pnpla3</i>	NM_054088	ACGGGTCACCTTCGTGT	AGCCCTCTCTGATGGACTT
<i>Pnpla5</i>	NM_029427	CTTACTGCCCTGTACTGCC	GATCCCTCTCAATCCATCCAA
<i>Scd1</i>	NM_009127	EAGTCCCGCTACTCTAT	CAGCGGTACTCACTGGAGA
<i>Srebp1c</i>	NM_011480	GGAGCCATGGATTGCATTT	GCCTCCAGAGAGGAGGCCAG
<i>Ttp</i>	NM_013684	ATAGGATGAGGGTCTTAAGCCTGTG	GGTTTGTATATGCTTGGGCCAG
<i>Thrsp-Spor1#</i>	NM_009381	AACGGAGGAGGCCAAGAAG	GTTGATCCACTCGGGTCT
<i>Homo sapiens</i>			
<i>ACC</i>	NM_198834	CAGGCTGGCAGCTATGTTCA	GCCGATCCCATGTTCA
<i>βACTIN</i>	NM_001101	AGGCCCCCTGAAACC	ATCACGATGCCAGTGTACG
<i>ChREBP</i>	NM_032951	TTCTCCGGCCATGACC	AGGAGGAAATCAGAATCGGAAG
<i>CYP2B6</i>	NM_000767	GGAGGAGCGGATTCAGGAG	TGGAATCTTTTCAAGAGC
<i>LPK = PRLK</i>	NM_000298	TCTCTGTCCATCATTGTG	GGTACCGACAGAGGCTGG
<i>PnPLA3</i>	NM_025225	ACCTCTGCCCCAGGCT	CACCTTGTCTTTCATTTCTCACT
<i>PSMB6</i>	NM_001270481	CAGAAGAACCCTGGTCTTACA	AGCAGAAATCGCGTGTG
<i>SEI1</i>	NM_005063	CCTGAAAGTTCTACACTGGCT	CCGAGGGCACTGACAAAATAG
<i>SREBP1C</i>	NM_0041764	GGCGAGCCGTGEGAT	TGCCCACTCCAGCAT



**Fig. 1.** CAR regulates the expression of key genes involved in hepatic glucose metabolism and *de novo* lipogenesis. Hepatic mRNAs from wild-type (WT) and CAR null (CAR<sup>-/-</sup>) male mice (n = 6 mice per group) treated with either corn oil (vehicle) or the CAR agonist, TCPOBOP (3 mg/kg/day) for three days were used to assay by RT-qPCR the relative expression of (A) cytochrome P450 enzymes (*Cyp2b10*, *Cyp2c29*, and *Cyp3a11*), and genes involved in (B) glucose metabolism (*Pepck*, *Gck*, and, *Lpk*), (C) *de novo* lipogenesis (*Fasn*, *Elovl6*, *Gpat*, and *Thrsp-Spot14*) and (D) PNPLA family members (*Pnpla3*, 5, and 2). Data were normalized to TBP mRNA expression levels and to the vehicle-treated mice for each genotype. Statistical significance was evaluated using the unpaired two-tailed Student's *t*-test. Values shown are the mean ± SEM. Asterisk denotes a significant difference compared with control condition of each genotype: \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001.

the French National Ethics Committee. Written or oral informed consent was obtained from each patient or family prior to surgery. The clinical characteristics of the liver donors are presented in Table 2. Primary human hepatocytes were prepared and cultured as described previously (Pichard et al., 2006) and were either treated with 500 μM phenobarbital (PB) dissolved in 0.1% DMSO for 24 h or untreated (0.1% DMSO). Mouse hepatocytes were prepared as described previously (Dentin et al., 2004) and cultured in the presence of TCPOBOP (250 μM in 0.1% DMSO; 24 h) or DMSO (0.1%).

2.11. Statistical analysis

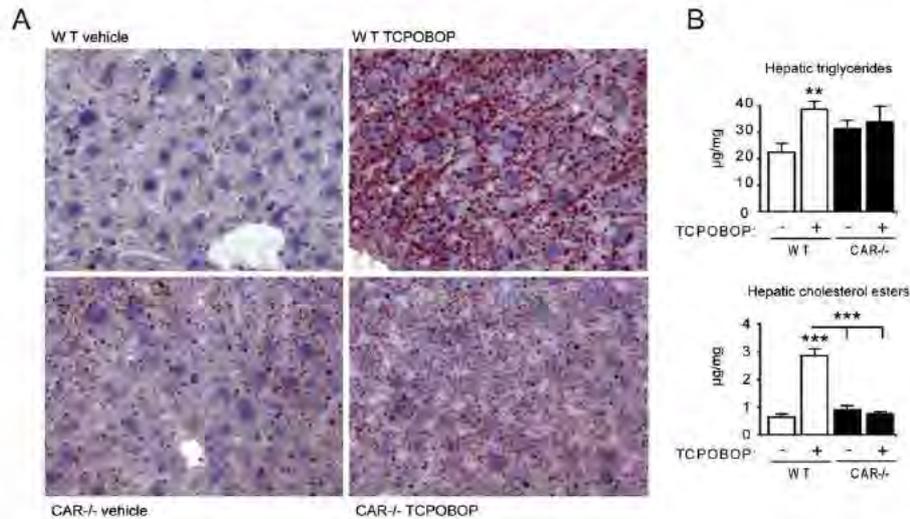
All the data were analyzed using GraphPad Prism 7.0. Significance was assessed by appropriate unpaired two-tailed Student's *t*-tests or

two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison *post hoc* test as indicated. *P*\* < 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. Short-term CAR activation by TCPOBOP induces hepatic expression of genes related to lipid biosynthesis

To investigate the effect of CAR activation on hepatic energy metabolism in healthy mice, CAR<sup>-/-</sup> and control (WT) male mice on chow diet were treated with either corn oil (vehicle) or a CAR-specific ligand, TCPOBOP at 3 mg/kg/day, a dose previously used to investigate the effect of CAR activation on hepatic lipid metabolism (Rezen et al., 2009; Zhal et al., 2010; Tojima et al., 2012). The hepatic mRNA expression of the prototypical CAR target genes (*Cyp2b10*, *Cyp2c29* and *Cyp3a11*)



**Fig. 2.** CAR activation by TCPOBOP increases hepatic triglycerides and cholesterol esters levels. (A) Oil-Red-O-staining of neutral lipids performed on histological sections of livers from WT and CAR-/- mice treated for three days with either corn oil (vehicle) or the CAR agonist, TCPOBOP (3 mg/kg/day). Neutral lipids appear in red [original magnification  $\times 200$ ]. (B) Neutral lipids were extracted from the liver of the same animals. After extraction, lipids were analyzed by gas chromatography. The presence of internal standards enabled to quantify the neutral lipids. Statistical significance was evaluated using two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Asterisk denotes a significant difference compared with control condition for each genotype: \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

was induced by TCPOBOP in WT mice but not in CAR-/- mice (Fig. 1A). Furthermore, CAR activation in WT mice induces a down-regulation of *Pepck* gene expression, while the expression of both glucokinase (*Gck*) and L-type pyruvate kinase (*Lpk*), which catalyse the first and the final step of glycolysis pathway respectively, was increased (Fig. 1B). Moreover CAR activation induced an upregulation of lipogenic genes such as the fatty acid synthase (*Fasn*), elongation of long-chain fatty acids family member 6 (*Elovl6*), and glycerol-3-phosphate acyltransferase (*Gpat*), which incorporates newly synthesized fatty acids into triacylglycerol. The thyroid hormone responsive Spot14 homolog (*Thrsp-Spot14*), which encodes a protein regulating *de novo* lipogenesis through a molecular mechanism still undefined was also upregulated (Fig. 1C). However, the hepatic mRNA expression of all these genes was unaffected in TCPOBOP-treated CAR-/- male mice (Fig. 2), highlighting a CAR-dependent regulation of the glycolytic-lipogenic pathway. No sexual dimorphism was observed in WT mice. Indeed similar gene expression profiles were observed in the liver of TCPOBOP-treated WT females and males compared to their respective vehicle-treated counterparts (Sup. Fig. 1). However, some genes were slightly but significantly induced in TCPOBOP treated CAR-/- females suggesting the activation of other pathways in this particular context (Sup. Fig. 1).

The coordination of lipid metabolism in white adipose tissue and in liver is important for whole-body metabolic homeostasis. Measuring expression of lipogenic genes (*Scd1*, *Elovl6*, and *Gpat*) in adipose tissue showed no induction of expression in this tissue (Sup. Fig. 2).

**Table 3**  
Body weight, relative liver weight and plasma parameters.

	WT vehicle	WT TCPOBOP	CAR-/- vehicle	CAR-/- TCPOBOP
Mean body weight (g)	23.8 $\pm$ 0.60	23.7 $\pm$ 0.63	25.6 $\pm$ 0.77	25.5 $\pm$ 0.89
Liver:body weight ratio	0.041 $\pm$ 0.002	0.069 $\pm$ 0.001 <sup>b</sup>	0.044 $\pm$ 0.002	0.046 $\pm$ 0.001
Plasma glucose (mmol/l)	5.32 $\pm$ 0.30	4.19 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	7.72 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup>	7.65 $\pm$ 0.56
Plasma insulin (ng/ml)	0.39 $\pm$ 0.06	0.30 $\pm$ 0.04	0.56 $\pm$ 0.14	0.49 $\pm$ 0.10
Plasma triglycerides (mmol/l)	0.85 $\pm$ 0.07	0.61 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	1.04 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	1.02 $\pm$ 0.07

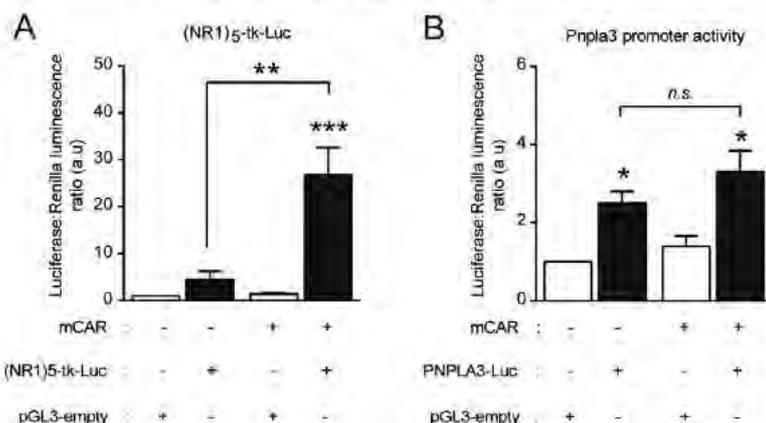
Body weight, relative liver weight and plasma parameters of WT and CAR-/- mice ( $n = 6$  males) treated with either vehicle (corn oil) or TCPOBOP (3 mg/kg/day) for 3 days. The statistical significance was evaluated using two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test (a: treatment effect, TCPOBOP vs vehicle; b: genotype effect, CAR-/- vs WT;  $p < 0.05$ ). Values are mean  $\pm$  SEM.

**3.2. Short-term CAR activation by TCPOBOP upregulates *Pnpla3* and *Pnpla5* expression**

*Pnpla3* gene polymorphism has emerged as a new marker of human hepatic steatosis (Romeo et al., 2008). Initially discovered in the adipose tissue, PNPLA3 is highly regulated by changes in energy balance (Dubuquoy et al., 2011; Qiao et al., 2011; Huang et al., 2010). In the present study, CAR activation by TCPOBOP induced a strong increase in *Pnpla3* expression (Fig. 1D). This was fully abrogated in TCPOBOP-treated CAR-/- males and remained slightly increased in counterpart females (Fig. 1D; Sup. Fig. 1). *Pnpla5* is located immediately upstream of the *Pnpla3* gene and exhibits both lipase and transacylase activities *in vitro* (Lake et al., 2005). In this study, *Pnpla5* gene expression pattern was similar to the one observed for *Pnpla3* (Fig. 1D), whereas the expression of the triglyceride lipase *Pnpla2* did not differ between groups (Fig. 1D).

**3.3. Short-term CAR activation by TCPOBOP increases hepatic lipid accumulation**

We next assessed whether the increased expression of lipogenic genes was correlated with changes in hepatic neutral content. Hepatic neutral lipids were first stained with Oil-Red-O. The representative pictures in Fig. 2 illustrate that the number and size of lipid droplets were increased by TCPOBOP treatment in WT mouse liver (Fig. 2A, top



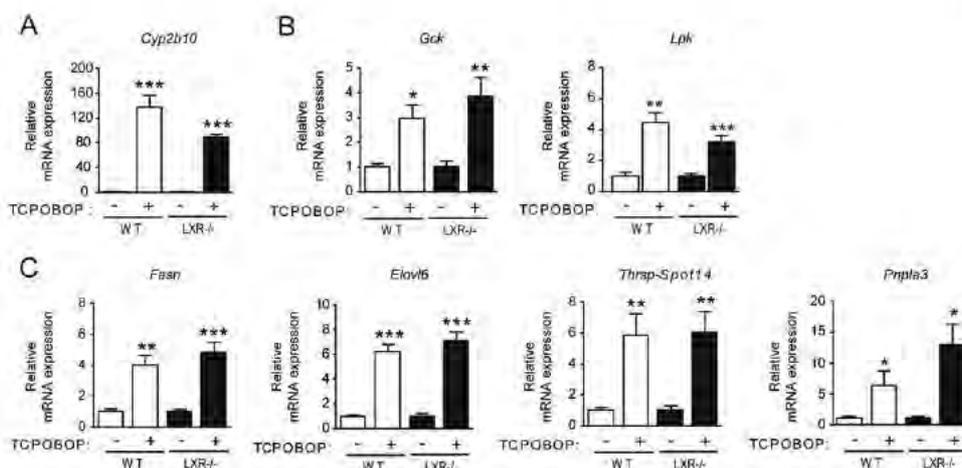
**Fig. 3.** *Pnpla3* promoter activity is not directly regulated by CAR. Luciferase assays were performed in JWZ cells transiently co-transfected with either a pCR3-mCAR vector expressing mCAR (mCAR) or with a control pCR3-empty vector (mCAR), and with (A) a construct containing five copies of the optimal CAR monomer binding motif (DR4-type NR1 sequence) in front of the tk luciferase promoter ((NR1)<sub>5</sub>-tk-luc), or (B) with a reporter containing the mouse *Pnpla3* promoter (–3300 nt upstream of the luciferase ORF). The pGL3-empty basic vector was used as negative control. Firefly luciferase activity of each sample was normalized to *Renilla* luciferase activity. Results are expressed as mean ± SEM from four independent experiments. Statistical significance was evaluated using two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test: \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001.

panels), but did not change in the liver of CAR<sup>-/-</sup> mice (Fig. 2A, bottom panels). Surprisingly we observed a greater accumulation of lipids in the liver of vehicle-treated CAR<sup>-/-</sup> mice compared to vehicle-treated WT mice (Fig. 2A, left panels). Quantification of the liver lipid content by gas chromatography confirmed these observations. TCPOBOP treatment in WT mice did not affect the level of total hepatic cholesterol (data not shown), but hepatic cholesterol esters and triglycerides were significantly increased compared to vehicle treatment (Fig. 2B). These changes were associated with a significant increase in liver weight (Table 3). However, in CAR<sup>-/-</sup> mice hepatic lipid content and liver weight were unchanged in response to TCPOBOP (Fig. 2B, Table 3). Finally, plasma triglyceride and glucose levels were decreased following TCPOBOP-treatment in WT mice but unchanged in CAR<sup>-/-</sup>

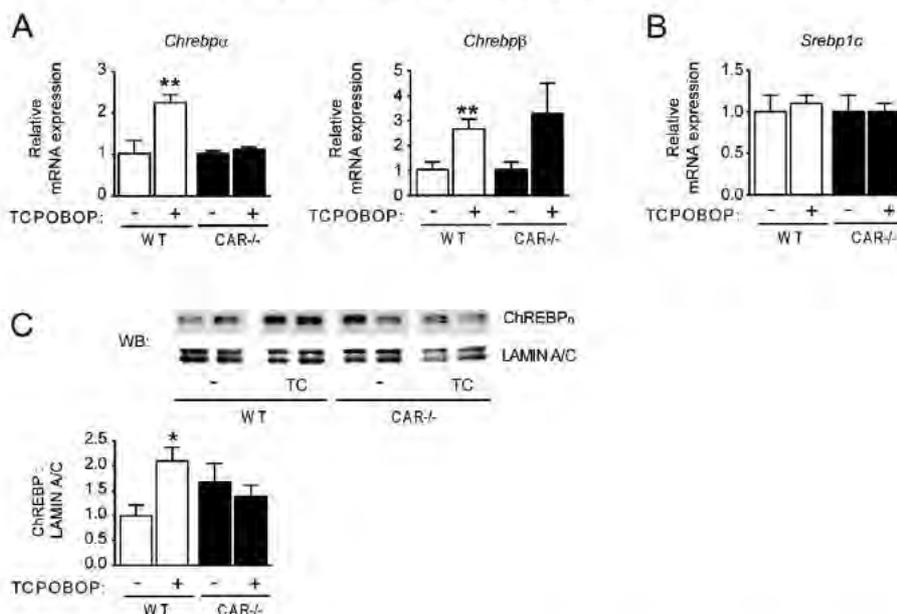
mice, and basal levels of both parameters were higher in vehicle-treated CAR<sup>-/-</sup> mice compared to WT (Table 3).

### 3.4. *Pnpla3* promoter activity is not directly regulated by CAR

To further explore the underlying mechanisms behind CAR's actions, we performed *in silico* analysis which revealed the presence of a CAR-DR4 (Direct Repeat 4) responsive element 2740 bp upstream of the ATG start codon of *Pnpla3* mouse promoter (Sup. Table 1). We next determined whether the effect of CAR activation on *Pnpla3* expression was transcriptionally mediated. As shown in Fig. 3, a reporter luciferase construct containing the mouse *Pnpla3* promoter (–3300 nt upstream of the luciferase ORF) (Dubuquoy et al., 2011) was co-transfected into



**Fig. 4.** TCPOBOP-induced up-regulation of lipogenic genes is not mediated by LXRα5. Hepatic mRNAs from wild-type (WT) and LXR null (LXR<sup>-/-</sup>) male mice (*n* = 6 mice per group) treated with either corn oil (vehicle) or the CAR agonist TCPOBOP (3 mg/kg/day) for three days were used to assay by RT-qPCR the relative expression of (A) the prototypical CAR target gene *Cyp2b10*, and the relative expression of genes involved in (B) glucose metabolism (*G6p* and *Lpl*), and in (C) *de novo* lipogenesis (*Fasn*, *Elovl6*, *Thrsp-Spot14*, and *Pnpla3*). Data were normalized to TBP mRNA expression levels and to the vehicle-treated mice for each genotype. Statistical significance was evaluated using the unpaired two-tailed Student's *t*-test. Values shown are the mean ± SEM. Asterisk denotes a significant difference compared with control condition of each genotype: \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001.



**Fig. 5.** CAR activation by TCPOBOP increased *ChREBP* mRNA expression and nuclear ChREBP content. (A) Quantification of *ChREBP* $\alpha$  and  $\beta$  and *SREBP1c* mRNA levels by RT-qPCR from WT and CAR $^{-/-}$  male mice ( $n = 6$  mice per group) treated with either corn oil (vehicle) or the CAR agonist, TCPOBOP (3 mg/kg/day) for three days. Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Data were normalized to TBP mRNA expression levels and to the vehicle-treated mice for each genotype. Statistical significance was evaluated using the unpaired two-tailed Student's *t*-test. (C) Representative western blot images and quantification of nuclear ChREBP (ChREBPn) content in liver extracts ( $n = 2$  mice per group). LAMIN A/C antibody was used as loading controls. Values shown are the mean  $\pm$  SEM. The statistical significance was evaluated using two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Asterisk denotes a significant difference compared with control condition: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

JWZ cells with either a vector expressing mCAR (pCR3-mCAR), or a control vector (pCR3-empty). Additionally, a construct containing five copies of the optimal CAR monomer binding motif (DR4-type NR1 sequence) upstream of the *tk-luciferase* promoter was used as a positive control. As expected, luciferase activity of the control ((NR1) $_5$ -tk-luc-pGL3) was 22-fold increased upon mCAR overexpression (Fig. 3A) while no significant change was observed for the construct containing the *Pnpla3* promoter (Fig. 3B). Altogether, our data suggest that CAR does not directly regulate *Pnpla3* gene transcription.

**3.5. LXR is not required for TCPOBOP-induced response of lipogenic genes**

Since LXR $\alpha$  and LXR $\beta$  are important transcriptional regulators of lipogenesis (Mitro et al., 2007), we next assessed whether LXR $\alpha$ / $\beta$  could mediate CAR's actions. We treated LXR $\alpha$ / $\beta$  double-deficient (LXR $^{-/-}$ ) mice and control mice with the CAR-specific ligand, TCPOBOP, or corn oil (vehicle), as performed previously. In both WT and LXR $^{-/-}$  mice, TCPOBOP induces a markedly increased hepatic mRNA expression of the prototypical CAR target gene *Cyp2b10* (Fig. 4A). Similarly, the expression of the glycolytic (*Gck* and *Lpk*) and lipogenic enzymes (*Fasn*, *Elovl6*, *Thrsp-Spot14* and *Pnpla3*) was upregulated (Fig. 4B–C). These results suggest that TCPOBOP-mediated activation of CAR-target genes, including *Pnpla3*, is independent of the LXR pathway.

**3.6. CAR activation by TCPOBOP regulates ChREBP mRNA and protein levels**

The transcription factors Carbohydrate-Responsive Element-binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP1c) play a pivotal role in the liver by regulating glycolysis and lipogenesis (Xu et al., 2013). Furthermore PNPLA3 expression is under their direct transcriptional control (Dubuquoy et al., 2011). Thus we

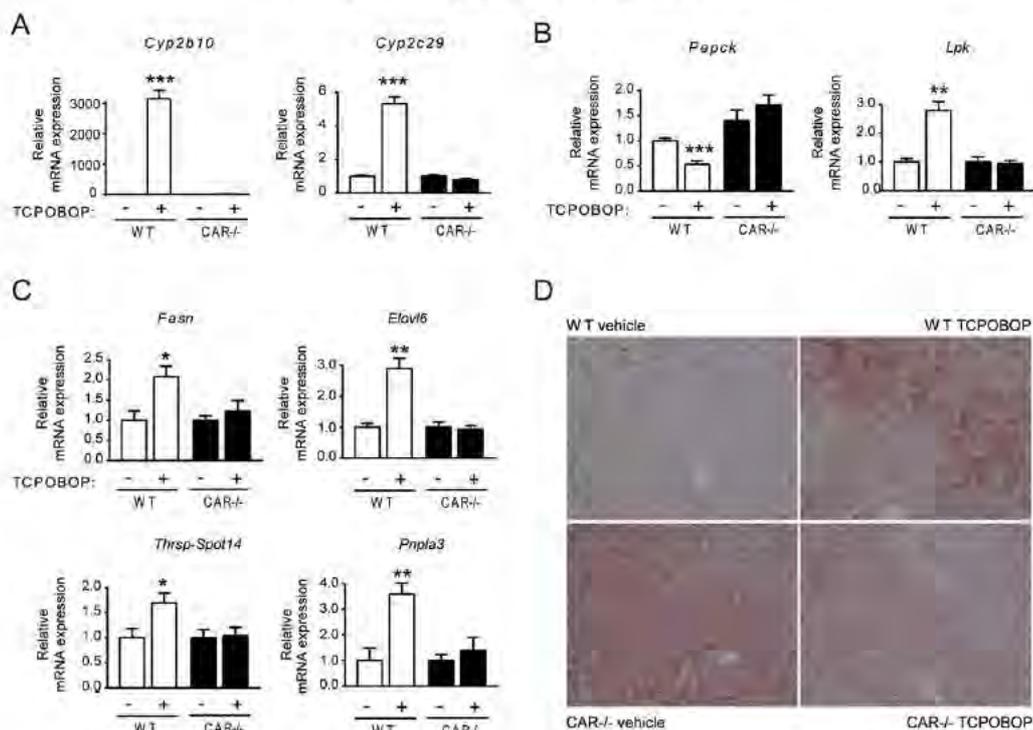
investigated whether these factors could be involved in the CAR-mediated activation of lipogenic genes and lipid accumulation.

In adipocytes, ChREBP $\alpha$  isoform is likely responsible for inducing ChREBP $\beta$  which is transcribed from an alternative promoter (Herman et al., 2012). In this study, the hepatic mRNA expression of both isoforms was significantly induced in response to TCPOBOP in WT mice but unchanged in CAR $^{-/-}$  mice, although a larger variability was observed for *ChREBP* $\beta$  (Fig. 5A). In addition the mRNA expression of *SREBP1c* was unchanged in response to TCPOBOP in the liver of WT and CAR $^{-/-}$  mice (Fig. 5B).

Since the nuclear translocation of ChREBP is a critical step for the activation of its target genes, the ChREBP subcellular localization in response to TCPOBOP was checked. In the liver of TCPOBOP-treated WT mice, an increase of nuclear ChREBP content was observed, but not in TCPOBOP-treated CAR $^{-/-}$  mice (Fig. 5C).

**3.7. Chronic CAR activation by TCPOBOP induces hepatic expression of genes related to lipid biosynthesis and lipid accumulation in the liver**

To determine whether the observed effects are not the result of an acute response to CAR activation, CAR $^{-/-}$  and control (WT) male mice on chow diet were treated with either corn oil or TCPOBOP at 3 mg/kg/day once-weekly during seven consecutive weeks. As observed previously, CAR activation by TCPOBOP induced the up-regulation of the prototypical CAR target genes *Cyp2b10* and *Cyp3a11*, as well as a down-regulation of the *Pepck* and the overexpression of key lipogenic genes including *Pnpla3* (Fig. 6A–C). However, the expression of the same genes was unchanged in TCPOBOP-treated CAR $^{-/-}$  male mice (Fig. 6A–C). The representative pictures in Fig. 6D illustrate an accumulation of lipid droplets induced by TCPOBOP treatment in the liver of WT mice compared to those of vehicle-WT mice (Fig. 6D). Chronic CAR activation also resulted in a greater accumulation of lipids in the liver of vehicle-



**Fig. 6.** Chronic activation of CAR regulates the expression of key genes involved in hepatic glucose metabolism and *de novo* lipogenesis and leads to hepatic triglyceride accumulation. Hepatic mRNAs from wild-type (WT) and CAR null (CAR<sup>-/-</sup>) male mice (n = 6 mice per group) treated with either corn oil (vehicle) or the CAR agonist, TCPOBOP (single i.p. injection of 3 mg/kg/week) for seven weeks were used to assay by RT-qPCR the relative expression of (A) cytochrome P450 (*Cyp2b10* and *Cyp2c29*), and genes involved in (B) glucose metabolism (*Pcpk* and *Lpk*). (C) *de novo* lipogenesis (*Fasn*, *Elovl6*, *Thrsp-Spot 14* and *Pnpla3*). Data were normalized to TBP mRNA expression levels and to the vehicle-treated mice for each genotype. Statistical significance was evaluated using the unpaired two-tailed Student's *t*-test. (D) Oil-Red-O-staining of neutral lipids performed on histological sections of livers from the same animals. Neutral lipids appear in red (original magnification ×200). Asterisk denotes a significant difference compared with control condition for each genotype: \**P* < 0.01; \*\**P* < 0.001.

treated CAR<sup>-/-</sup> mice compared to vehicle-treated WT mice as observed previously after a short term exposure to TCPOBOP (Fig. 2A).

### 3.8. CAR activation induces *Pnpla3* expression in human hepatocytes

*Pnpla3* gene regulation by CAR represents an original result never reported before. Thus we sought to determine whether the CAR-dependent induction of *pnp1a3* was also observed *in vitro*, particularly in human hepatocytes.

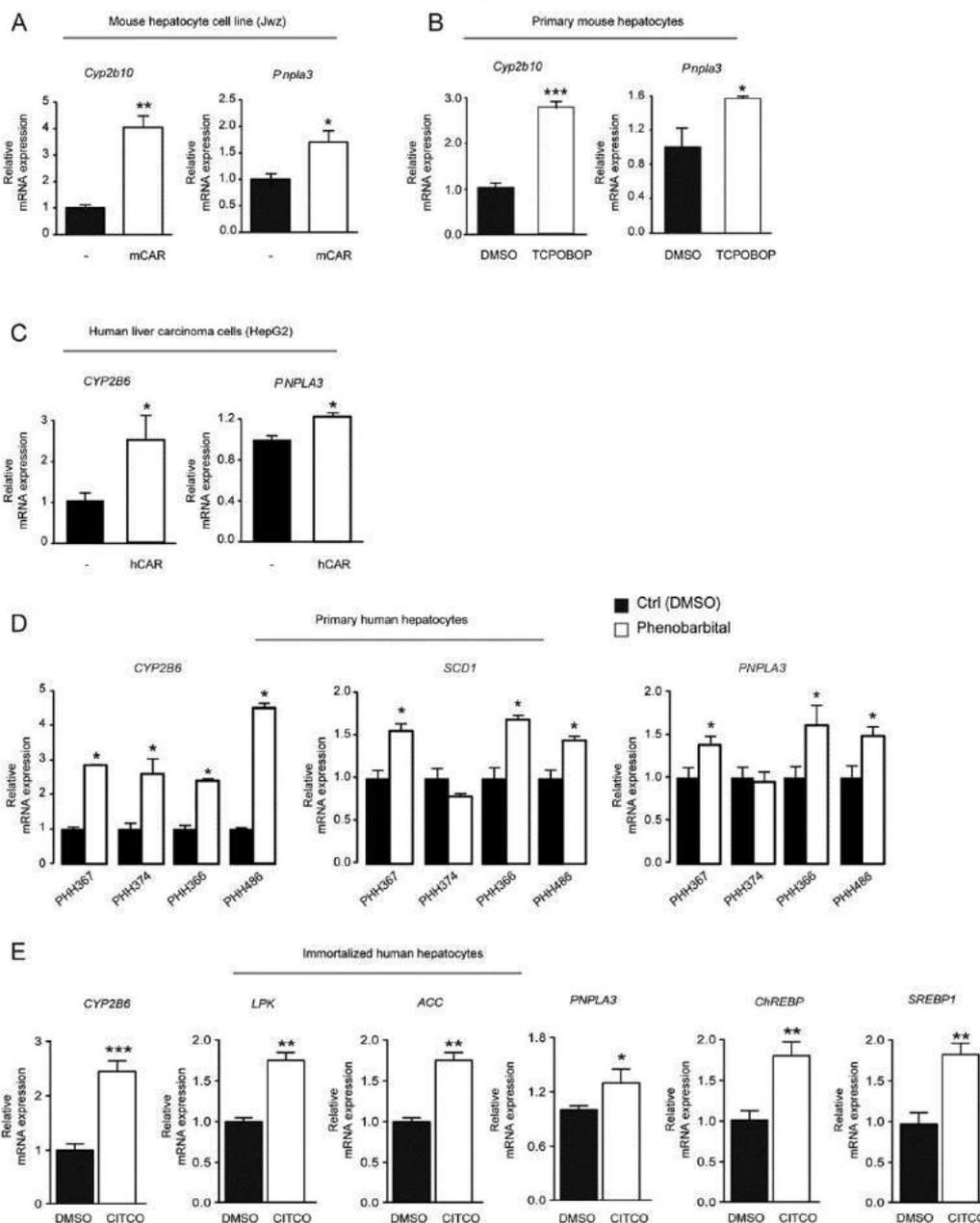
We first overexpressed CAR in human hepatoma HepG2 cells and murine hepatic cell lines using pCR3-hCAR (human CAR isoform) or pCR3-mCAR (murine CAR isoform) expression vector respectively. In these cell lines, both hCAR and mCAR proteins have been shown to be constitutively active (Yang and Wang, 2014). CAR overexpression resulted in significant inductions of the CAR target genes *CYP2B6/Cyp2b10* and *PNPLA3/Pnpla3* (Fig. 7A and C). Furthermore, the mRNA expression of these genes was significantly induced in primary mouse hepatocytes treated 24 h with TCPOBOP (250 μM) compared to the control condition (DMSO) (Fig. 7B). Similar results were obtained using primary human hepatocytes treated with the CAR-activator phenobarbital (PB; 500 μM; 24 h), a barbiturate drug widely used to treat epilepsy (Mutoh et al., 2013). As shown in Fig. 7D, hepatocytes from three of the four donors display an increase of *PNPLA3* expression correlated with inductions of *SCD1* in response to PB treatment. It is known that PB is an indirect CAR activator and is considered to be a mixed CAR/

PXR activator. Consequently, immortalized human hepatocytes were treated with CITCO which is a well-characterized specific direct activator of human CAR (Maglich et al., 2003). CAR activation by CITCO resulted in significant inductions of *CYP2B6*, as well as of the lipogenic genes *Fasn* and *Pnpla3* and an increase in the mRNA levels of *ChREBP* and *SREBP1c* (Fig. 7E).

Overall, these results suggest a possible translation of the results obtained in mice to humans.

## 4. Discussion

In the present study, we showed that CAR activation by TCPOBOP positively regulates genes involved in hepatic glycolysis as well as lipogenesis and induces steatosis in mouse liver. We demonstrated for the first time that CAR regulates *Pnpla3* expression both in mouse liver and human hepatocytes. Subsequent studies of the underpinning mechanisms highlighted that CAR does not act by a direct regulation of *Pnpla3* transcription or *via* the Liver X Receptor. We confirmed the previously reported inhibitory effect of CAR on gluconeogenesis through the repression of *PEPCK* (Miao et al., 2006; Kachaylo et al., 2012; Yarushkin et al., 2013; Yu et al., 2015; Ling et al., 2014). We measured the expression of a large panel of key genes regulating glycolysis and different steps of lipogenesis including fatty acid synthesis (*Fasn*), elongation (*Elovl6*) and esterification (*Gpat*) which had never been assayed before. We showed a clear synergic and CAR-dependent up-regulation of all



**Fig. 7.** CAR activation induces *Cyp2b10/CYP2B6* and *Pnpla3/PNPLA3* gene expression *in vitro*. The hepatic mRNA levels of *Cyp2b10* and *Pnpla3* were examined by RT-qPCR in (A) Jwz cell lines transfected either with a vector expressing mCAR or a control vector (-) and, in (B) primary mouse hepatocytes treated for 24 h with TCPOBOP (0.1% DMSO) or 0.1% DMSO (control). The data were normalized to TBP mRNA expression levels. (C) The hepatic mRNA levels of *CYP2B6* and *PNPLA3* were examined by RT-qPCR in HepG2 cell lines transfected either with a vector expressing hCAR or a control vector (-). (D) Cultured hepatocytes from four donors were exposed to phenobarbital (PB; 500  $\mu$ M) or DMSO (control) for 24 h. The hepatic mRNA levels of *CYP2B6*, *PNPLA3* and *SCD1* were examined by RT-qPCR and normalized to  $\beta$ -actin mRNA expression levels (HepG2/human hepatocytes). (E) Immortalized human hepatocytes (IHH) were treated for 48 h with CITCO (1  $\mu$ M) or DMSO (control). The hepatic mRNA levels of *CYP2B6*, *LPK*, *ACC*, *PNPLA3*, *ChREBP* and *SREBP1c* were examined by RT-qPCR and normalized to *PSMB6* mRNA expression levels. All the data were analyzed by two-tailed Student's *t*-test. Asterisk denotes a significant difference compared with the control condition: \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001.

these genes both in males and females. A slight induction of some genes in CAR -/- female livers suggests the activation of other pathways in this particular context (*Cyp2b10*, *Cyp2c29*, and *Pnpla3*; Sup. Fig. 1).

These results are consistent with those reported by Breuker et al., highlighting a prolipogenic effect of CAR through the up-regulation of Thrsp-Spot14, a regulator of the lipogenic process, in human primary

hepatocytes (Breuker et al., 2010). It is unlikely that the upregulation of lipogenic genes and lipid accumulation are a consequence of acute response to TCPOBOP since longer exposure time to this chemical indicates similar results (Fig. 6).

The Pregnane X receptor (PXR) is another xenosensor closely related to CAR. It is well established that CAR and PXR exhibit similar roles in the regulation of  $\beta$ -oxidation and gluconeogenesis but could display opposing actions on lipid homeostasis (Konno et al., 2008). Indeed PXR is considered as a pro-lipogenic receptor and has a putative role in the pathogenesis of steatohepatitis (Bitter et al., 2015), whereas CAR was originally considered as displaying anti-lipogenic properties (Gao and Xie, 2010; Wada et al., 2009). These assumptions were based on data from mouse models subjected to metabolic/nutritional stress (Dong et al., 2009; Gao et al., 2009). In the present study, healthy mice on a standard chow diet were used. In these conditions, we identified CAR as an enhancer of hepatic *de novo* lipogenesis suggesting an identical role of CAR and PXR in the regulation of lipid metabolism. This assumption is supported by the regulation by CAR of *Pnpla3*, a gene whose polymorphism has recently emerged as an important marker of liver steatosis (Dongiovanni and Valenti, 2015). The rs738409 variant (encoding an amino acid substitution Ile148Met) of PNPLA3 is a strong modifier of the NAFLD etiology by increasing liver fat content and the disease severity and progression (Romeo et al., 2008; Dongiovanni et al., 2013; Smagris et al., 2015). As a lipogenic enzyme, *Pnpla3* was reported to be transcriptionally regulated by SREBP1c, LXR and ChREBP in response to insulin and glucose respectively (Dubuquoy et al., 2011; Qiao et al., 2011; Huang et al., 2010). Our major finding is that *Pnpla3* is also regulated by CAR. This regulation was confirmed in hepatocytes of human donors treated with the anti-epileptic and CAR activator, PB. It was also confirmed in human hepatocytes treated with CITCO which is a well-characterized specific direct activator of human CAR. These results suggest its relevance for humans.

Little is known about the mechanisms underpinning the CAR-mediated regulation of lipogenic genes. Our results highlighted an indirect regulation of the mouse *Pnpla3* promoter by CAR. Since LXR is a central regulator of hepatic *de novo* lipogenesis, and could crosstalk with CAR (Xiao et al., 2010), we next investigated its potential involvement. Gene-expression profiles were similar independently of the presence or absence of LXR, suggesting that the induction of lipogenic genes upon TCPOBOP treatment is not mediated by LXR. Underlying mechanisms of gene regulation by CAR of glycolytic and lipogenic genes are probably more complex and may involve one or more other transcription factors. Most of the genes we found up-regulated by CAR are known to be regulated by SREBP1c, ChREBP or both (Postic and Girard, 2008). While further investigations are ongoing, the preliminary results presented in Fig. 5 highlight that the transcription factor ChREBP could mediate the observed effects in mice and both factors might mediate CITCO-induced responses in immortalized human hepatocytes (Fig. 7E).

CAR activation by TCPOBOP resulted in a hepatic lipid accumulation consisting in triglycerides and cholesterol esters. Thus, the results presented here are in contrast to those showing that CAR activation alleviates hepatic steatosis (Dong et al., 2009; Gao et al., 2009). We showed that this activation could instead have deleterious effects on mouse liver leading to aberrant hepatic *de novo* lipogenesis. The regulation by CAR of energy metabolism is probably more complex, and depends on the metabolic context. However, these results raise the question concerning the impact of drugs and environmental contaminants in lipid-associated metabolic diseases, such as obesity, insulin resistance, and related clinical disorders (type 2 diabetes and cardiovascular diseases), since most of them are CAR regulators. These risks could be particularly important in subjects carrying the PNPLA3 rs738409 C > G variant which could be more vulnerable.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2016.05.006>.

## Conflict of interest

No conflict of interest.

## Financial support

This work was supported by grants from the French National Research Agency (CES PerinaTox program (ANR-10-CESA-005 Perinatox) and CRISALIS (ANR-11 BSV1-031-02)) and by the Région Midi-Pyrénées. Alice Marmugi and Céline Lukowicz are funded by grants from the INRA (3100254) Animal Health Department and the Région Midi-Pyrénées.

## Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found in the online version.

## Acknowledgments

We thank Prof. Dr. Urs A. Meyer (Biocenter, University Basel, Switzerland) for providing the CAR knockout mice, Dr. D.J. Mangelsdorf (Howard Hughes Medical Institute, Dallas, TX) for providing us with LXR-deficient mice and Pr. Bart Staels (UMR Inserm 1011, University of Lille) for providing the IHH cell line. We are very grateful to Colette Bétoulières (INRA Toxalim Toulouse, France) for animal care and technical assistance for animal experiments. We thank the staff members of the following GenoToul core facilities for technical assistance: MetaToul/Lipidomic, Anexplor/Histopathology and Phenotyping.

## References

- Baldwin, W.S., Roling, J.A., 2009. A concentration addition model for the activation of the constitutive androstane receptor by xenobiotic mixtures. *Toxicol. Sci.* 107, 93–105.
- 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.* 13, 5635–5641.
- Bilici, A., Ozguroglu, M., Mihmanli, I., Turna, H., Adalelli, L., 2007. A case-control study of non-alcoholic fatty liver disease in breast cancer. *Med. Oncol.* 24, 367–371.
- Bitter, A., Rummelle, P., Klein, K., Kandel, B.A., Rieger, J.K., Nussler, 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.
- Breuker, C., Moreau, A., Lakhal, L., Tamasi, V., Parmentier, Y., Meyer, U., Maurel, P., Lumbroso, S., Vilarem, M.J., Pascucci, J.M., 2010. Hepatic expression of thyroid hormone-responsive spot 14 protein is regulated by constitutive androstane receptor (NR1H3). *Endocrinology* 151, 1653–1661.
- Calandre, E.P., Rodriguez-Lopez, C., Blazquez, A., Cano, D., 1991. Serum lipids, lipoproteins and apolipoproteins A and B in epileptic patients treated with valproic acid, carbamazepine or phenobarbital. *Acta Neurol. Scand.* 83, 250–253.
- Dentin, R., Pegorier, J.P., Berhamed, F., Foulle, F., Ferre, P., Fauveau, V., Magrison, M.A., Girard, J., Postic, C., 2004. Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. *J. Biol. Chem.* 279, 20314–20326.
- 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., et al., 2009. Activation of nuclear receptor CAR ameliorates diabetes and fatty liver disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 18831–18836.
- Dongiovanni, P., Valenti, L., 2015. Genetics of nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism*.
- Dongiovanni, P., Donati, B., Fares, R., Lombardi, R., Mancina, R.M., Romeo, S., Valenti, L., 2013. PNPLA3 P48M polymorphism and progressive liver disease. *World J. Gastroenterol.* 19, 6969–6978.
- Dubuquoy, C., Robichon, C., Lantier, F., Langlois, C., Dugail, I., Foulle, F., Girard, J., Burnol, A.F., Postic, C., Mokles, M., 2011. Distinct regulation of adiponitrin/PNPLA3 gene expression by the transcription factors ChREBP and SREBP1c in mouse and human hepatocytes. *J. Hepatol.* 55, 145–153.
- Gao, J., Xie, W., 2010. Pregnane X receptor and constitutive androstane receptor at the crossroads of drug metabolism and energy metabolism. *Drug Metab. Dispos.* 38, 2091–2095.
- 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.

Gao, J., Yan, J., Xu, M., Ren, S., Xie, W., 2015. CAR suppresses hepatic gluconeogenesis by facilitating the ubiquitination and degradation of PGC1alpha. *Mol. Endocrinol.* 29, 1558–1570.

Golde, W.T., Gollobin, P., Rodriguez, J.L., 2005. A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. *Lab. Anim. N.Y.* 34, 39–43.

Herman, M.A., Peroni, O.D., Villoria, J., Schon, M.R., Abumrad, N.A., Blüher, M., Klein, S., Kahn, B.B., 2012. A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism. *Nature* 484, 333–338.

Huang, Y., He, S., Li, J.Z., Seo, Y.K., Osborne, T.F., Cohen, J.C., Hobbs, H.H., 2010. A feed-forward loop amplifies nutritional regulation of PNPLA3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 7892–7897.

Kachaylo, E.M., Yarushkin, A.A., Pustyniak, V.O., 2012. Constitutive androstane receptor activation by 2,4,6-triphenyldioxane-1,3 suppresses the expression of the gluconeogenic genes. *Eur. J. Pharmacol.* 679, 139–143.

Kassam, A., Winrow, C.J., Fernandez-Kachubinski, F., Capone, J.P., Kachubinski, R.A., 2000. The peroxisome proliferator response element of the gene encoding the peroxisomal beta-oxidation enzyme enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase is a target for constitutive androstane receptor/beta9-cis-retinoic acid receptor-mediated transactivation. *J. Biol. Chem.* 275, 4345–4350.

Kodama, S., Koike, C., Negishi, M., Yamamoto, Y., 2004. Nuclear receptors CAR and PXR cross talk with FOXO1 to regulate genes that encode drug-metabolizing and gluconeogenic enzymes. *Mol. Cell. Biol.* 24, 7931–7940.

Konno, Y., Negishi, M., Kodama, S., 2008. The roles of nuclear receptors CAR and PXR in hepatic energy metabolism. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 23, 8–13.

Lake, A.C., Sun, Y., Li, J.L., Kim, J.E., Johnson, J.W., Li, D., Reveitt, T., Shih, H.H., Liu, W., Paulsen, J.E., et al., 2005. Expression, regulation, and triglyceride hydrolase activity of Adiponutrin family members. *J. Lipid Res.* 46, 2477–2487.

Lang, H.Y., Yao, Q.X., Qi, Z.Q., Yang, S.S., He, J.Q., Zhang, K.F., Hu, B., 2014. The role of arecoline on hepatic insulin resistance in type 2 diabetes rats. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi* 30, 208–212.

Lomax, P.V., Myllylä, V.V., Soraniemi, E.A., Hokkanen, T.E., 1979. Plasma HDL cholesterol in epileptics with elevated triglyceride and cholesterol. *Acta Neurol. Scand.* 60, 56–63.

Maglich, J.M., Parks, D.J., Moore, L.B., Collins, J.L., Goodwin, B., Billin, A.N., Stoltz, C.A., Kliewer, S.A., Lambert, M.H., Willson, T.M., et al., 2003. Identification of a novel human constitutive androstane receptor (CAR) agonist and its use in the identification of CAR target genes. *J. Biol. Chem.* 278, 17277–17283.

Maglich, J.M., Watson, J., McMillen, P.J., Goodwin, B., Willson, T.M., Moore, J.T., 2004. The nuclear receptor CAR is a regulator of thyroid hormone metabolism during caloric restriction. *J. Biol. Chem.* 279, 19832–19838.

Maglich, J.M., Lobe, D.C., Moore, J.T., 2009. The nuclear receptor CAR (NR1B3) regulates serum triglyceride levels under conditions of metabolic stress. *J. Lipid Res.* 50, 439–445.

Marmugi, A., Duchek, S., Lasserre, F., Polizzi, A., Paris, A., Prymenko, N., Bertrand-Michel, J., Pineau, T., Guillou, H., Martin, P.G., et al., 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.

Masuyama, H., Hiramatsu, Y., 2012a. Treatment with a constitutive androstane receptor ligand ameliorates the signs of pre-eclampsia in high-fat diet-induced obese pregnant mice. *Mol. Cell. Endocrinol.* 348, 120–127.

Masuyama, H., Hiramatsu, Y., 2012b. Treatment with constitutive androstane receptor ligand during pregnancy prevents insulin resistance in offspring from high-fat diet-induced obese pregnant mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 303, E293–E300.

Miao, J., Fang, S., Bae, Y., Kemper, J.K., 2006. Functional inhibitory cross-talk between constitutive androstane receptor and hepatic nuclear factor-4 in hepatic lipid/glucose metabolism is mediated by competition for binding to the DR1 motif and to the common coactivators, GRP-1 and PGC-1alpha. *J. Biol. Chem.* 281, 14537–14546.

Mirre, N., Mak, P.A., Vargas, L., Godio, C., Hampton, E., Molteni, V., Kreusch, A., Saez, E., 2007. The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature* 445, 219–223.

Muroh, S., Sobhany, M., Moore, R., Perera, L., Pedersen, L., Sueyoshi, T., Negishi, M., 2013. Phenobarbital indirectly activates the constitutive active androstane receptor (CAR) by inhibition of epidermal growth factor receptor signaling. *Sci Signal.* 6, ra31.

Pichard, L., Raulat, E., Fabre, G., Ferrini, J.B., Ourlin, J.C., Maurel, P., 2006. Human hepatocyte culture. *Methods Mol. Biol.* 320, 283–293.

Postic, C., Girard, J., 2008. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J. Clin. Invest.* 118, 829–838.

Qiao, A., Liang, J., Ke, Y., Li, C., Cui, Y., Shen, L., Zhang, H., Cui, A., Liu, X., Liu, C., et al., 2011. Mouse patatin-like phospholipase domain-containing 3 influences systemic lipid and glucose homeostasis. *Hepatology* 54, 509–521.

Repa, J.J., Liang, G., Du, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J.M., Shimomura, I., Shan, B., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Mangelsdorf, D.J., 2000. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRA and LXRBeta. *Genes Dev.* 14, 2819–2830.

Rezen, T., Tamasi, V., Lovgren-Sandblom, A., Bjorkhem, I., Meyer, U.A., Kozman, D., 2009. Effect of CAR activation on selected metabolic pathways in normal and hyperlipidemic mouse livers. *BMC Genomics* 10, 384.

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.

Roth, A., Looser, R., Kaufmann, M., Meyer, U.A., 2008. Sterol regulatory element binding protein 1 interacts with pregnane X receptor and constitutive androstane receptor and represses their target genes. *Pharmacogenet. Genomics* 18, 325–337.

Ruijter, J.M., Ramackers, C., Hoogaars, W.M., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M.J., Moorman, A.F., 2009. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* 37, e45.

Schippers, I.J., Moshage, H., Roelofsen, H., Müller, M., Heymans, H.S., Ruijters, M., Kuipers, F., 1997. Immortalized human hepatocytes as a tool for the study of hepatocytic (de-)differentiation. *Cell Biol. Toxicol.* 13, 375–386.

Smagrís, E., BasuRay, S., Li, J., Huang, Y., Lai, K.M., Gromada, J., Cohen, J.C., Hobbs, H.H., 2015. Pnpla3/148M knockin mice accumulate PNPLA3 on lipid droplets and develop hepatic steatosis. *Hepatology* 61, 108–118.

Tien, E.S., Gray, J.P., Peters, J.M., Vanden Heuvel, J.P., 2003. Comprehensive gene expression analysis of peroxisome proliferator-treated immortalized hepatocytes: identification of peroxisome proliferator-activated receptor alpha-dependent growth regulatory genes. *Cancer Res.* 63, 5767–5780.

Tojima, H., Kakizaki, S., Yamazaki, Y., Takizawa, D., Horiguchi, N., Sato, K., Mori, M., 2012. Ligand dependent hepatic gene expression profiles of nuclear receptors CAR and PXR. *Toxicol. Lett.* 212, 288–297.

Ueda, A., Hamadeh, H.K., Webb, H.K., Yamamoto, Y., Sueyoshi, T., Afshari, C.A., Lehmann, J.M., Negishi, M., 2002. Diverse roles of the nuclear orphan receptor CAR in regulating hepatic genes in response to phenobarbital. *Mol. Pharmacol.* 61, 1–6.

Verrotti, A., Agostinelli, S., Parisi, P., Chiarelli, F., Coppola, G., 2011. Nonalcoholic fatty liver disease in adolescents receiving valproic acid. *Epilepsy Behav.* 20, 382–385.

Wada, T., Gao, J., Xie, W., 2009. PXR and CAR in energy metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 20, 273–279.

Wei, P., Zhang, J., Egan-Hafley, M., Liang, S., Moore, D.D., 2000. The nuclear receptor CAR mediates specific xenobiotic induction of drug metabolism. *Nature* 407, 920–923.

Xiao, L., Xie, X., Zhai, Y., 2010. Functional crosstalk of CAR-LXR and ROR-LXR in drug metabolism and lipid metabolism. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62, 1316–1321.

Xu, X., So, J.S., Park, J.G., Lee, A.H., 2013. Transcriptional control of hepatic lipid metabolism by SREBP and ChREBP. *Semin. Liver Dis.* 33, 301–311.

Yamamoto, T., Takahashi, S., Nakaoko, H., Nakazato, M., Suda, M., Moriwaki, Y., Hada, T., Yanagisawa, M., Higashino, K., 1989. The effect of phenobarbital on human plasma lipids. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* 27, 463–466.

Yamazaki, Y., Kakizaki, S., Horiguchi, N., Sahara, 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.

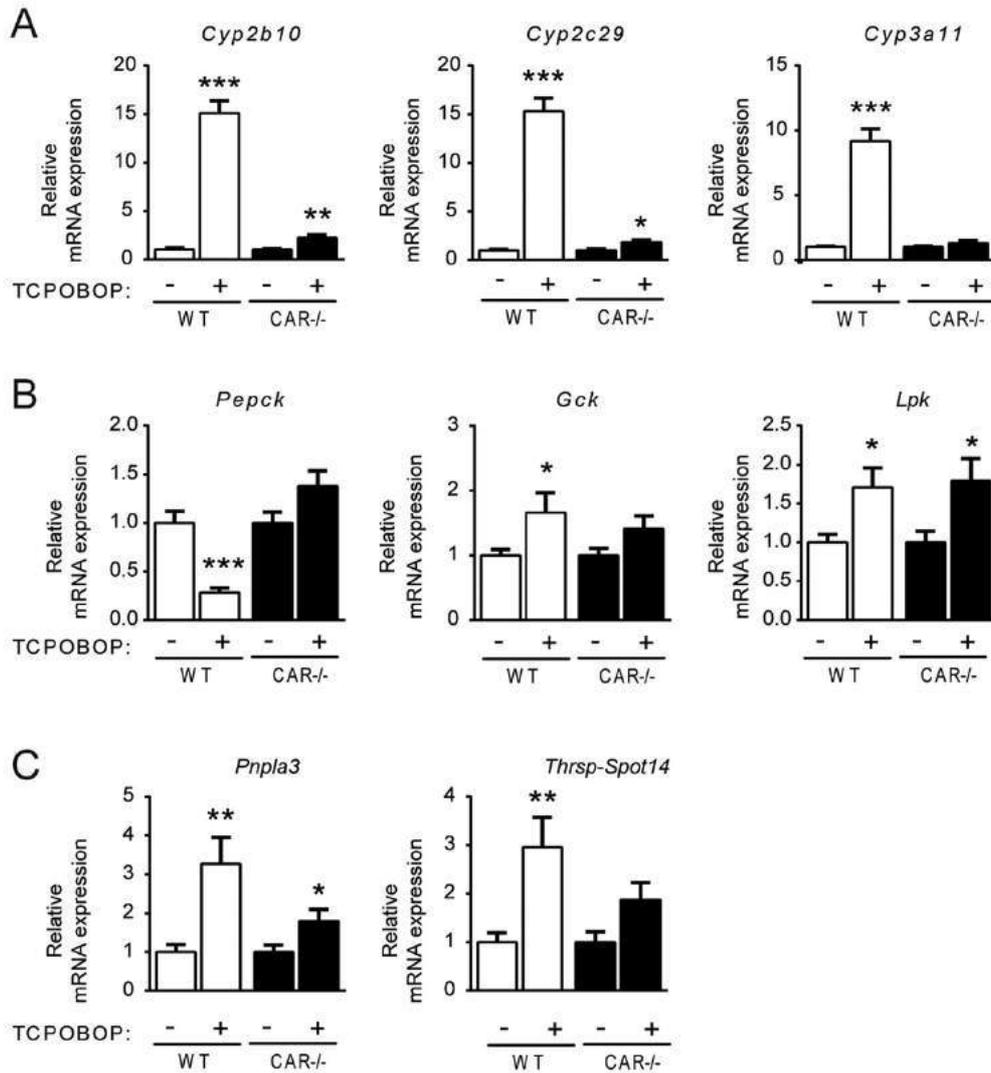
Yang, H., Wang, H., 2014. Signaling control of the constitutive androstane receptor (CAR). *Protein Cell* 5, 113–123.

Yarushkin, A.A., Kachaylo, E.M., Pustyniak, V.O., 2013. The constitutive androstane receptor activator 4-[[4R,6R]-4,6-diphenyl-1,3-dioxan-2-yl]-N,N-dimethylaniline inhibits the gluconeogenic genes PEPCK and G6Pase through the suppression of HNF4alpha and FOXO1 transcriptional activity. *Br. J. Pharmacol.* 168, 1923–1932.

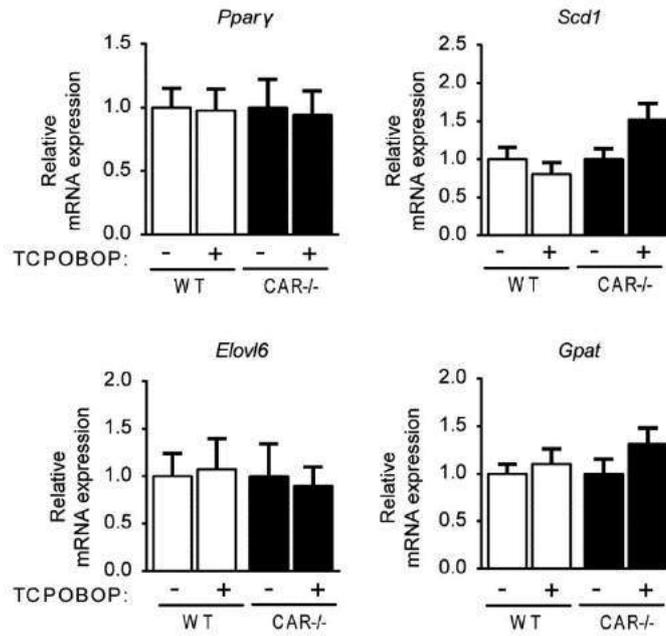
Yu, L., Wang, Z., Huang, M., Li, Y., Zeng, K., Lei, J., Hu, H., Chen, B., Lu, J., Xie, W., et al., 2015. Evodia alkaloids suppress gluconeogenesis and lipogenesis by activating the constitutive androstane receptor. *Biochim. Biophys. Acta*.

Zhai, Y., Wada, T., Zhang, B., Khadem, S., Ren, S., Kuruba, R., Li, S., Xie, W., 2010. A functional cross-talk between liver X receptor-alpha and constitutive androstane receptor links lipogenesis and xenobiotic responses. *Mol. Pharmacol.* 78, 666–674.

Zhang, H., Zhang, Z., Nakanishi, T., Wan, Y., Hiromori, Y., Nagase, H., Hu, J., 2015. Structure-dependent activity of phthalate esters and phthalate monoesters binding to human constitutive androstane receptor. *Chem. Res. Toxicol.* 28, 1196–1204.



Supplemental Fig. 1. CAR regulates the expression of key genes involved in hepatic glucose metabolism and de novo lipogenesis in females. Hepatic mRNAs from wild-type (WT) and CAR null (CAR  $-/-$ ) male mice ( $n = 6$  mice per group) treated with either corn oil (vehicle) or the CAR agonist, TCPOBOP (3 mg/kg/day) for three days were used to assay by RT-qPCR the relative expression of (A) cytochrome P450 enzymes (*Cyp2b10*, *Cyp2c29*, and *Cyp3a11*), and genes involved in (B) glucose metabolism (*Pepck*, *Gck*, and *Lpk*), and (C) de novo lipogenesis (*Pnpla3* and *Thrsp-Spot14*). Data were normalized to TBP mRNA expression levels and to the vehicle-treated mice for each genotype. Statistical significance was evaluated using the unpaired two-tailed Student's t-test. Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Asterisk denotes a significant difference compared with control condition of each genotype: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .



Supplemental Fig. 2. CAR activation does not regulate the expression of key genes involved in de novo lipogenesis in white adipose tissues. mRNA levels in perigonadal white adipose tissues from wild-type (WT) and CAR null (CAR <sup>-/-</sup>) male mice (n = 6 mice per group) treated with either corn oil (vehicle) or the CAR agonist, TCPOBOP (3 mg/kg/day) for three days were used to assay by RT-qPCR the relative expression of genes encoding de novo lipogenesis enzymes (*Scd1*, *Elovl6*, *Gpat*) as well as the lipogenic transcription factor peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*Pparγ*). Data were normalized to TBP mRNA expression levels and to the vehicle-treated mice for each genotype. Statistical significance was evaluated using the unpaired two-tailed Student's t-test. Values shown are the mean  $\pm$  SEM.

## Chapitre II

### ***La délétion du récepteur nucléaire CAR entraîne des perturbations métaboliques dépendante du sexe.***

Dans une seconde partie de ces travaux de thèse nous avons souhaité évaluer les effets de la délétion totale du récepteur CAR sur le phénotype métabolique dans les deux sexes. L'analyse du transcriptome hépatique des souris WT et CAR<sup>-/-</sup> mâles et femelles âgées de 16 semaines révèle une dérégulation de l'expression des gènes dépendantes de CAR et du sexe, seulement 8% des gènes dérégulés sont communs entre les mâles et les femelles CAR<sup>-/-</sup>. Ces modifications d'expression génique au niveau hépatique sont associées à des modifications phénotypiques différentes suivant le sexe des souris. En effet le suivi pendant 1 an des souris WT et CAR<sup>-/-</sup> a permis de mettre en évidence un rôle dimorphique endogène du récepteur CAR dans la régulation du métabolisme énergétique. La délétion de CAR entraîne une obésité, un diabète ainsi qu'une stéatose hépatique uniquement chez les mâles. Les femelles sont protégées. Les hormones sexuelles des femelles apparaissent indispensables pour la protection contre ces perturbations métaboliques. En effet, les ovariectomies des souris femelles CAR<sup>-/-</sup> entraînent les mêmes perturbations métaboliques que celles observées chez les mâles CAR<sup>-/-</sup> : diabète obésité et stéatose hépatique. Des analyses lipidomiques et métaboliques confirment le rôle dimorphique du récepteur nucléaire CAR. Par exemple, des niveaux élevés en métabolites tels que le succinate et le glutathion sont mesurés spécifiquement chez les mâles CAR<sup>-/-</sup>. Par ailleurs, les souris CAR<sup>-/-</sup> présentent une modification de l'expression des gènes impliqués dans le catabolisme des hormones stéroïdiennes, ces modifications d'expression sont dépendantes du sexe. Ainsi l'expression des gènes tels que *Sult2a1* et *Cyp17a1* est induites chez les mâles CAR<sup>-/-</sup> par rapport aux mâles WT, alors que chez les femelles CAR<sup>-/-</sup> leur expression est réprimée par rapport aux femelles WT. De plus, les souris CAR<sup>-/-</sup> présentent une augmentation des niveaux de corticostérone et pour les mâles des niveaux de testostérone, témoignant d'un déséquilibre hormonal chez ces animaux. Ces déséquilibres hormonaux peuvent avoir différentes conséquences sur le métabolisme énergétique des souris CAR<sup>-/-</sup> et expliquer en partie leurs phénotypes.

L'ensemble de ces travaux a permis d'établir un nouveau lien entre la régulation du métabolisme énergétique et l'importance du sexe et ce travail fait l'objet d'une publication en cours de préparation.

## **Constitutive androstane receptor deficiency leads to sexually dimorphic obesity, diabetes, steatosis and endocrine disruptions in mice**

Céline Lukowicz<sup>1</sup>, Sandrine Ellero-Simatos<sup>1</sup>, Marion Régnier<sup>1</sup>, Fabiana Oliviero<sup>1</sup>, Frédéric Lasserre<sup>1</sup>, Arnaud Polizzi<sup>1</sup>, Alexandra Montagner<sup>1</sup>, Sarra Smati<sup>1</sup>, Frédéric Boudou<sup>2</sup>, Françoise Lenfant<sup>2</sup>, Laurence Guzylack<sup>1</sup>, Sandrine Menard<sup>1</sup>, Sharon Baretto<sup>1</sup>, Anne Fougerat<sup>1</sup>, Yannick Lippi<sup>1</sup>, Claire Naylies<sup>1</sup>, Justine Bertrand-Michel<sup>3</sup>, Afifa Ait Belgnaoui<sup>1</sup>, Vassilia Theodorou<sup>1</sup>, Pierre Gourdy<sup>2</sup>, Laurence Gamet-Payrastra<sup>1</sup>, Nicolas Loiseau<sup>1</sup>, Hervé Guillou<sup>1</sup>, Laila Mselli-Lakhal<sup>1,#</sup>

<sup>1</sup> Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France.

<sup>2</sup> I2MC, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)-U 1048, Université de Toulouse 3 and CHU de Toulouse, Toulouse, France.

<sup>3</sup> Metatoul-Lipidomic Facility, MetaboHUB, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMR1048, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Toulouse, France

**Keywords:** Nuclear receptor - metabolic disease - transcriptomic - metabolomic - lipidomic

### **Emails of authors:**

Céline Lukowicz: celine.lukowicz@inra.fr, Sandrine Ellero-Simatos: sandrine.ellero--simatos@inra.fr, Marion Régnier: marion.regnier@inra.fr, Fabiana Oliviero: fabiana.oliviero@inra.fr, Frédéric Lasserre: Frederic.lasserre@inra.fr, Arnaud Polizzi:

arnaud.polizzi@inra.fr, Alexandra Montagner: Alexandra.montagner@inserm.fr, Sarra Smati : sarra.smati@inra.fr, Frédéric Boudou: frederic.boudou@inserm.fr, Françoise Lenfant: Françoise.lenfant@inserm.fr, Laurence Guzylack: Laurence.guzylack@inra.fr, Sandrine Menard: sandrine.memard@inra.fr, Sharon Baretto: sharon.baretto@inra.fr, Anne Fougerat: anne.fougerat@inra.fr, Yannick Lippi: Yannick.lippi@inra.fr, Claire Naylies: Claire.naylies@inra.fr, Justine Bertrand-Michel: justine.bertrand-michel@inserm.fr, Afifa Ait Belgnaoui: afifa.ait.belgnaoui@gmail.com, Vassilia Theodorou: Vassilia.theodorou@inra.fr, Pierre Gourdy: pierre.gourdy@inserm.fr, Laurence Gamet-Payrastre: laurence.payrastre@inra.fr, Nicolas Loiseau: Nicolas.loiseau@inra.fr, Hervé Guillou: herve.guillou@inra.fr, Laila Mselli-Lakhal: laila.lakhal@inra.fr.

# Corresponding author

### **Contact Information**

Laila Mselli-Lakhal, ToxAlim UMR1331 INRA/INPT/UPS, Integrative Toxicology & Metabolism group, 180 chemin de Tournefeuille, BP 93173, 31027 Toulouse Cedex 3, FRANCE. Tel: +33 561285524. Fax: +33 561285310. laila.lakhal@inra.fr.

### **List of abbreviations**

ALT, alanine transaminase; AST, aspartate transaminase; CAR, constitutive androstane receptor; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; Sult1a1, sulfotransferase family 1A member 1, Sult2a1, sulfotransferase family 2A member 1; Srd5a1, steroid 5 alpha-reductase 1.

**Financial support**

This work was supported by grants from the Agence National de la Recherche and from the Midi-Pyrénées region (NEWPOM). Céline Lukowicz is funded by grants from the French National Institute for Agricultural Research, Animal Health, the Région Midi-Pyrénées, and the EI Purpan engineering school.

### **Abstract**

The constitutive androstane receptor (CAR) is a transcription factor involved in detoxification through regulating expression of xenobiotic-metabolizing enzymes. Highly expressed in the liver, it is important in protecting the organism against exogenous and endogenous toxic molecules such as bile acids and bilirubin and in the catabolism of thyroid and steroid hormones. A role has also been assigned to CAR in the regulation of energy metabolism, although related mechanisms have been studied primarily in males and in physiopathological conditions. Here, we compared the impact of CAR deficiency on energy homeostasis regulation between male and female mice in a normal physiological context. Large-scale gene expression analysis in 16-week-old animals revealed significant sexual dimorphism in the hepatic transcriptome of CAR<sup>-/-</sup> mice. We monitored these mice for different physiological parameters to age 68 weeks. CAR<sup>-/-</sup> males developed obesity, fasted hyperglycemia, and hyperinsulinemia associated with glucose and insulin intolerance. They also developed dyslipidemia and important steatosis accompanied by increased alanine transaminase and aspartate transaminase, signs of hepatolysis. In contrast, CAR<sup>-/-</sup> females had a different metabolic profile with overweight, improved glucose tolerance, no dyslipidemia, and no steatosis. Both sexes of CAR<sup>-/-</sup> mice displayed sex-dependent deregulation of gene expression involved in steroid hormone metabolism, leading to alteration of their corticosterone and sexual hormones levels. Ovariectomized CAR<sup>-/-</sup> females developed the same metabolic disorders as CAR<sup>-/-</sup> males, demonstrating that sex-steroid hormones protect female mice against the metabolic disorders observed in CAR<sup>-/-</sup> males. *Conclusion:* This study reveals a sexually dimorphic role for CAR in the regulation of endocrine and metabolic homeostasis.

## Introduction

The constitutive androstane receptor (CAR), a member of the nuclear receptor family, was initially characterized as a xenosensor playing an important role in the transcriptional activation of multiple xenochemical-metabolizing enzymes in response to drugs and environmental chemicals (1,2). It regulates genes involved in xenobiotic metabolism, including Phase I, Phase II, and transporters. CAR regulation of these drug-metabolizing enzymes or drug transporters is important in coordinating cellular responses to exogenous and endogenous chemicals. Indeed, in addition to the detoxification of xenobiotics, this receptor plays a role in the metabolism and elimination of endogenous molecules such as bile acids and bilirubin, which when accumulated are toxic for the liver (3,4). CAR also is involved in endocrine homeostasis by regulating hormone metabolism. Androstane metabolites, estrogens, and progesterone affect CAR activity either positively or negatively (5–7). Some CAR-regulated enzymes are involved in steroid metabolism: the prototypical CAR target gene CYP2B6 metabolizes both estrogen and androgen and CAR regulates a specific UDP glucuronosyltransferase (UGT1A1) that glucuronidates estrogens (6,8,9).

This receptor has also recently been associated with energy homeostasis regulation, but the physiological implication is not fully understood. CAR is induced by long-term fasting (10,11), and CAR-deficient mice (CAR<sup>-/-</sup>) are defective in fasting adaptation and lose more weight than wild-type (WT) mice in response to caloric restriction (12). CAR activation alleviates high fat diet-induced obesity (13), significantly reduces serum glucose levels, and improves glucose tolerance and insulin sensitivity in leptin-deficient (*ob/ob*)/CAR<sup>-/-</sup> double-mutant mice (14). The mechanisms by which CAR regulates energy homeostasis are numerous and include transcriptional control of gene expression belonging to energy metabolic pathways. For example, a role for CAR in repressing genes involved in gluconeogenesis and  $\beta$ -oxidation pathway is established. Several studies have reported CAR

repression of the hepatic gluconeogenesis regulatory enzymes *Pepck* and G6PC (15–18). Also well-established is inhibition of genes like *Cyp4a14*, and *Cpt1a*, which are involved in the  $\beta$ -oxidation process (19,20). The role of CAR in regulating lipogenesis is controversial, as some studies cite it as an “anti-obesogenic” factor (13,14,21) and others as a “pro-lipogenic factor” (22,23). In leptin-deficient (*ob/ob*) or high fat–fed mice, CAR activation alleviates hepatic steatosis by repressing lipogenic genes such as *Scd1*, *Srebp-1c*, and *Acc* (13,14). Other studies, however, report an upregulation of lipogenic genes by CAR in human hepatocytes and mice (23).

CAR regulation of energy homeostasis could also involve regulation of steroid hormone metabolism. Indeed, CAR affects fasting responses through its influence on thyroid hormone metabolism *via* regulation of Phase II TH-metabolizing enzymes, such as *Ugt1a1*, *Sult1a1*, and *Sult2a1* (10,12). CAR regulation of CYP2B, CYP3A, and other steroid hydroxylases may also disrupt normal steroid metabolism. Some hormonal disorders cause metabolic disruptions, as in polycystic ovary syndrome, an ovarian abnormality that results in hyperandrogenism (24), or Cushing’s syndrome, a serious endocrine disease caused by chronic, autonomous, and excessive cortisol secretion (25).

In the present study, we followed WT and CAR<sup>-/-</sup> male and female mice for 68 weeks. We show that CAR<sup>-/-</sup> male mice develop significant metabolic disorders, including obesity, diabetes, and liver steatosis. CAR<sup>-/-</sup> females were protected from these metabolic disorders through a process dependent on sexual steroid hormones.

### **Materials and Methods**

***Animal experiments.*** All *in vivo* experiments were conducted following French national and European laws and regulations relating to the housing and use of animals in research and were approved by an independent ethics committee (Toxcométique, INRA ToxAlim, Toulouse,

France). CAR knockout mice (26) backcrossed on the C57BL/6J background were provided by Dr. Urs A. Meyer (27) (Biocenter, University Basel, Switzerland), and WT C57BL/6J mice were from Janvier Laboratories, France. Eight-week-old female and male WT and CAR<sup>-/-</sup>, 18 per group, were fed with a standard diet prepared by the Animal Feed Preparation Unit at the National Institute of Agricultural Research (INRA). This diet consists of 63% carbohydrate, 5% fat, 22% protein, 2% cellulose, 1% vitamins, and 7% minerals. Mice were allowed *ad libitum* access to food and water with 12-h light/dark cycle (23±2°C). Animals were sacrificed by cervical dislocation at Zeitgeber time 17 (ZT17) (in the fed state), which is the time of the highest hepatic CAR activity (28). One group was sacrificed at age 16 weeks and the other group after age 68 weeks. At ages 12 and 62 weeks, glucose tolerance tests were performed, and an insulin tolerance test was performed at age 13 weeks. To investigate the effect of sex hormones, male and female WT and CAR<sup>-/-</sup> mice were randomized into groups (n=8 per group): sham surgery group (SHAM), ovariectomized group (OVX), or castrated (CAST). Bilateral ovariectomy and castration at 4 weeks of age was performed under anesthesia administered via intraperitoneal injection of xylazine (10 mg/kg) and ketamine (25 mg/kg). Animals were also sacrificed by cervical dislocation at Zeitgeber time 17 (ZT17) (in the fed state). At 66 weeks of age, mice were placed in individual metabolic cages (Tecniplast France) to obtain 24-h urine samples for hormone dosage. Urine corticosterone levels were analysed using a corticosterone ELISA kit (ab108821, Abcam).

**Glucose tolerance test.** All experiments were performed on conscious mice. For the oral glucose tolerance test (OGTT) or intraperitoneal glucose tolerance test, mice were fasted for 6 h and received an oral (2 g/kg body weight) or intraperitoneal (1 g/kg body weight) glucose load. Blood glucose was measured at the tail vein using an AccuCheck Performa glucometer (Roche Diagnostics) at -15, 0, 15, 30, 45, 60, 90, and 120 min.

***Insulin tolerance test.*** Mice received an intraperitoneal injection of insulin (0.6 UI/kg body weight). Blood glucose concentrations were measured at the tail vein using the AccuCheck Performa glucometer before (-15 min) and after (0, 5, 15, 30, 45, 60, 90, and 120 min) insulin load.

***Blood and organ sampling.*** Blood was collected from the submandibular vein with a lancet into lithium-heparin coated tubes (BD Microtainer®). Plasma was prepared by centrifugation (1500 ×g, 10 min, 4°C) and stored at -80°C. Liver, spleen, and subcutaneous and epididymal white adipose tissue samples were collected, weighed, snap-frozen in liquid nitrogen, and kept at -80°C for further analyses. Liver samples (50 mg) were fixed in formaldehyde (4%) for 24 h and embedded in paraffin or kept in tissue TEK.

***Plasma analysis.*** Plasma insulin, corticosterone, testosterone and estradiol levels were assayed using, respectively, the ultrasensitive mouse insulin ELISA kit (Crystal Chem), the corticosterone EIA kit (Immubodiagnosticssystems, UK), testosterone ELISA kit (Diagomics France), the Mouse/Rat Estradiol ELISA kit (Calbiotech - USA) following the manufacturers' instructions. Aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, free fatty acids, and triglycerides were determined using a PENTRA 400 biochemical analyzer (Anexplo facility, Toulouse, France).

***Liver neutral, phospholipid, and sphingolipid analysis.*** Hepatic lipid contents were determined at the end of the experiment as described previously (29).

***<sup>1</sup>H-NMR-based metabolomics of liver extracts.*** Liver polar extract preparations for <sup>1</sup>H-NMR-based metabolic profiling and statistical analysis of metabolomics data were conducted as described previously (30).

***Histology.*** Paraformaldehyde-fixed, paraffin-embedded liver tissue was sliced into 3-µm sections, deparaffinized, rehydrated, and stained with hematoxylin and eosin for histopathological analysis. Staining was visualized with a Leica microscope DM4000 B

equipped with a Leica DFC450 C camera (Leica Microsystems). The scores of steatosis and inflammation were calculated according to the Kleiner method (31).

**Gene expression studies.** Total RNA was extracted with TRIzol® reagent (Sigma-Aldrich). For real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR), total RNA samples (2 µg) were reverse-transcribed using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Primers for SYBR Green assays are presented in Supplementary Table 1. Amplifications were performed on an ABI Prism 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems). qPCR data were normalized by TATA-box binding protein mRNA levels and analyzed with LinRegPCR (2015.3 version).

**Microarray gene expression studies.** Gene expression profiles were obtained for six liver samples per group at the GeT-TRiX facility (GénoToul, Génopole Toulouse Midi-Pyrénées, France) using Sureprint G3Mouse GE v2 microarrays (8×60K; design 074,809; Agilent) as previously described (30).

Microarray data and experimental details are available at the National Center for Biotechnology Information's Gene Expression Omnibus and are accessible through GEO (under submission).

**Statistical analysis.** Statistical analyses were performed using GraphPad Prism for Windows (version 4.00; GraphPad Software). When only two groups were compared and the data were normally distributed, the student's t-test was used;  $p < 0.05$  was considered significant. When more than two groups were analyzed, two-way analysis of variance was performed, followed by an appropriate *post hoc* test (Bonferroni).

## Results

**Sexual dimorphic regulation of hepatic gene expression by CAR.** Because CAR expression is mainly hepatic (32), we compared the hepatic transcriptomes of 16 week-old WT and CAR-

/- male and female mice using microarray analysis. Differentially expressed genes were classified using hierarchical clustering, which illustrates distinct gene expression between male and female *CAR*<sup>-/-</sup> mice compared to WT (Figure 1A). A total of 3214 probes were selected as differentially regulated in response to *CAR* deletion (false discovery rate <5% and fold change >1.5). Eleven clusters were identified; clusters 6 and 7 highlight genes upregulated specifically in *CAR*<sup>-/-</sup> females, whereas cluster 11 shows genes upregulated specifically in *CAR*<sup>-/-</sup> males (Figure 1A). Of note, *CAR* deletion led to different hepatic transcriptomic changes in males and females, suggesting a distinct hepatic function of this receptor between males and females. On the Venn diagrams representing the number of genes significantly up- or downregulated in *CAR*<sup>-/-</sup> male and female mice compared to WT (Figure 1B and 1C, respectively), we observed that female mice had a greater number of significantly differentially expressed genes (487 upregulated and 106 downregulated) than males (100 upregulated and 62 downregulated).

Pathway enrichment analysis allowed us to identify the significant biological functions disrupted by *CAR* invalidation in males and females (Figures 1B and C and supplementary table 2). In males, the upregulated genes are involved in cholesterol transport, endoplasmic reticulum, oxidation reduction process, and membranes (Figure 1B). The downregulated genes are linked to steroid hormone biosynthesis, catalytic activity, and receptor binding (Figure 1C). In females, the hepatic immune system was specifically affected, as suggested by high number of upregulated genes in related pathways (immune system processes, immunoglobulin domain, phagosome, response to virus; Figure 1B). The downregulated genes are related to steroid hormone biosynthesis in both males and females, and to other functions like cell junction, transmembrane region, and carboxylic ester hydrolase specifically in females (Figure 1C). Gene expression involved in steroid hormone biosynthesis was

affected in both CAR<sup>-/-</sup> males and females but differed by sex, as confirmed by the hepatic profile of 31 genes involved in steroid hormone metabolism (Figure 1D).

The qPCR analysis on selected genes involved in steroid hormone metabolism confirmed distinct regulation of gene expression upon CAR deletion in male and females (Figure 1E). For example, *Cyp7a1*, which is the rate-limiting enzyme of bile acid synthesis from cholesterol and involved in the metabolism of dehydroepiandrosterone (DHEA, a precursor of steroid hormones), was induced only in CAR<sup>-/-</sup> females. However, *Cyp7b1*, which is also involved in bile acid synthesis from cholesterol and DHEA metabolism, was repressed only in CAR<sup>-/-</sup> males. *Cyp2c29*, involved in DHEA catabolism, was repressed in both male and female CAR<sup>-/-</sup> mice. Another gene with a role in the metabolism of both testosterone and corticosterone, *Hsd3b5*, was significantly downregulated in CAR<sup>-/-</sup> males, while *Sult1a1*, which metabolizes estrone, was repressed only in CAR<sup>-/-</sup> females.

***CAR<sup>-/-</sup> male mice develop obesity and glucose homeostasis disruption.*** To evaluate the consequences of these hepatic dysregulations on physiological parameters, we followed WT and CAR<sup>-/-</sup> females and males for 68 weeks. The CAR<sup>-/-</sup> males gained more weight than WT mice (Figure 2A) without increased food intake (Supplementary Figure 1). This overweight started early, at 6 weeks of age (Supplementary figure 4), and increased significantly with age to obesity. At the end of the experiment, the CAR<sup>-/-</sup> males weighed 11.02 g more than WT on average, with significantly higher epididymal and subcutaneous white adipose tissue (Figure 2A). Female CAR<sup>-/-</sup> mice showed overweight (Figure 2B) without a significant increase in epididymal and subcutaneous white adipose tissue (Figure 2B).

At 12 and 13 weeks of age, male CAR<sup>-/-</sup> mice presented glucose intolerance and decreased insulin sensitivity compared to WT (Figure 2C and E). At age 62 weeks, these males were still glucose intolerant. In addition, 33-week-old male CAR<sup>-/-</sup> mice exhibited

significantly higher fasting blood glucose ( $153.2 \pm 7.4$  vs  $179.78 \pm 6.16$  mg/dL) and insulin ( $3.57 \pm 0.8$  vs  $9.2 \pm 0.4$  ng/mL) (Figure 2E). Unlike the males, CAR<sup>-/-</sup> female mice presented a better glucose tolerance at age 12 weeks and confirmed at age 62 weeks (Figure 2D). No change in their insulin sensitivity, fasting blood glucose, or insulin levels was observed (Figure 2F).

***CAR<sup>-/-</sup> male mice develop dyslipidemia and steatosis.*** Plasma lipid profiles of 68-week-old mice show higher levels of total cholesterol as well as LDL and HDL-cholesterol in CAR<sup>-/-</sup> males but no difference in triglycerides and free fatty acids (Figure 3A). Hypercholesterolemia was present already in 12-week-old males (Supplementary Figure 2A). With age, CAR<sup>-/-</sup> male mice presented elevated alanine and aspartate aminotransferase (ALT and AST levels, signs of hepatolysis (Figure 3B). Levels of plasma triglycerides and free fatty acids were not altered. The CAR deletion in female mice did not lead to any of these deregulations.

Hematoxylin and eosin staining revealed extensive hepatocellular vacuolizations, which is characteristic of steatosis, in CAR<sup>-/-</sup> males only (Figure 3C). The steatosis and inflammatory scores calculated using the Kleiner method (31) were higher in CAR<sup>-/-</sup> compared to WT males (Figure 3C). Quantification of liver neutral lipid content confirmed these observations. CAR<sup>-/-</sup> mice had five times more hepatic triglycerides ( $59.38 \pm 5.02$  vs  $304.7 \pm 46.02$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  of liver) and cholesterol ester ( $0.65 \pm 0.07$  vs  $2.88 \pm 0.41$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  of liver) than did WT mice (Figure 3D). CAR<sup>-/-</sup> females did not present the same profile: their livers were identical to those of the controls with the exception a higher inflammatory score (Figure 3C).

***CAR deficiency induces hepatic lipid remodeling in males.*** Lipidomic analysis of main neutral lipid, phospholipid, and sphingolipid species are presented in figure 4A as a heatmap and hierarchical clustering of the relative abundance of 100 molecular species that could be

quantified. Overall, the hepatic lipidome strongly discriminated male and female mice. Moreover, this analysis suggested that the effect of CAR deficiency on hepatic lipidome was detectable only in males, mostly because of more abundant lipids in cluster 1 in WT vs. CAR<sup>-/-</sup> males.

We also performed a principal component analysis (PCA) (Figure 4B). This analysis further confirmed that the hepatic lipidome discriminates males from females and that CAR deficiency significantly influences the lipidome in males but not in females. The first component of the principal component analysis discriminated three groups: (1) female mice from both genotypes, (2) CAR<sup>-/-</sup> male mice, and (3) WT male mice. The relative abundance of six selected phospholipids contributing to component 1 and discriminating the three groups are presented in Figure 4C. Overall, this extensive lipid analysis confirmed that sex strongly influences the hepatic lipidome and highlights that the effect of CAR deficiency on the hepatic lipidome depends on sex. In males, CAR deficiency induced not only a quantitative change in neutral lipid content and steatosis in the liver but also marked qualitative changes in the relative abundance of sphingolipids and phospholipids. Moreover, based on this lipid profiling, CAR deficiency in male mice seemed to reduce differences with female mice.

***CAR deletion induces sexually dimorphic changes in hepatic aqueous metabolites.*** We also conducted metabolic <sup>1</sup>H-NMR phenotyping of liver tissues to measure the effects of CAR deletion on hepatic metabolism (Figure 5). Typical <sup>1</sup>H-NMR spectra from liver extracts with identified metabolites are illustrated in Supplementary Figure 3. PCA first identified a strong dimorphic metabolic content of liver extracts, with significant discrimination of males and females independent of genotype on the first principal component (representing 13% of the total variance) (Figure 5A). Clustering of CAR<sup>-/-</sup> vs. WT animals on the second principal component (8% of the variance) demonstrated that CAR deletion significantly affected the liver metabolome in both sexes. Of note, as observed with the lipidomic analysis, CAR

deletion seemed to reduce the constitutive sexual dimorphic differences in hepatic metabolites.

Orthogonal projection on latent-structure-discriminant analysis (O-PLS-DA) models were then fitted and confirmed statistically significant differences in the hepatic metabolites of WT vs. CAR<sup>-/-</sup> animals in males (Figure 5B) and females (Figure 5C). In males, CAR<sup>-/-</sup> deletion significantly increased hepatic levels of succinate, choline, and glutathione while decreasing the glutathione precursors glycine and hypotaurine (Figure 5D). In females, CAR deletion increased succinate content, as observed in males, and affected a number of metabolites related to bile acid metabolism: all bile acid signals detected using <sup>1</sup>H-NMR were decreased in CAR<sup>-/-</sup> females, as were signals from taurine conjugated to bile acids (Figure 5E). The area under the curve for selected metabolites and univariate statistics confirmed these results (Figure 5F-G).

***CAR deletion induces distinct steroid hormone homeostasis disruption between males and females.*** Figure 6A shows a simplified schema of steroid hormone synthesis from cholesterol and the main enzymes involved in their biosynthesis and catabolism. The liver is partly involved in the biosynthesis of steroid hormones and plays an important role in their catabolism (32). We evaluated the consequences of CAR deletion on the expression of enzymes involved in the metabolism of steroid hormones in 68-week-old mice (Figure 6B). This analysis revealed sexual dimorphism of expression of these enzymes in WT mice and confirmed that the steroid biosynthesis pathway is disrupted in both sexes following CAR deletion (Figure 6A). The expression of *Cyp17a1*, which is involved in the synthesis of DHEA and progesterone from pregnenolone, was increased in CAR<sup>-/-</sup> males but decreased in CAR<sup>-/-</sup> females compared to WT. The expression of *Hsd11b1*, which inactivates corticosterone into 11-dehydrocorticosterone, was decreased in both CAR<sup>-/-</sup> males and females compared to WT. *Srd5a1* is involved in 11-deoxycorticosterone and testosterone

metabolism and also was repressed in both CAR<sup>-/-</sup> males and females. The relative expression of estrogen and DHEA-inactivating enzymes such as *Sult2a1* and *Sult1e1* was altered only in CAR<sup>-/-</sup> females. *Hsd3b1*, which plays a role in progesterone synthesis from pregnenolone, was repressed only in CAR<sup>-/-</sup> females, whereas *Hsd3b5*, which is involved in dihydrotestosterone metabolism, was repressed only in CAR<sup>-/-</sup> males. CAR deletion did not affect expression of *Cyp21a1* and *Cyp11a1*. Quantification of circulating levels of steroid hormones revealed elevated levels of testosterone in 68-week-old CAR<sup>-/-</sup> males compared to WT (Figure 6D). Plasmatic estradiol levels were higher in CAR<sup>-/-</sup> female mice compared to WT female mice (Figure 6D). Corticosterone levels were high in CAR<sup>-/-</sup> mice of both sexes compared to WT (Figure 6C). Twenty-four hour urine analysis revealed elevated levels of corticosterone in urine of CAR<sup>-/-</sup> males compared to WT males at 66 weeks of age (Figure 6C).

***Ovariectomy impairs CAR-dependent protection from diabetes and obesity in females.*** To evaluate the effect of sex hormones on the phenotypes observed in CAR<sup>-/-</sup> male and female animals, we performed surgical castration in males and ovariectomy in females at age 5 weeks. Castration led to decreased body weight in both WT and CAR<sup>-/-</sup> compared with the sham-operated control mice. Body-weight gains were similar between the two genotypes (Supplementary figure 4). In contrast, ovariectomy resulted in weight gain in both WT and CAR<sup>-/-</sup> mice compared to their sham-operated controls. However, the weight gain was much greater in CAR<sup>-/-</sup> females, which developed the same obese phenotype as males. At the end of the experiment, CAR<sup>-/-</sup> ovariectomized mice gained  $34.2 \pm 1.63$ g compared to  $23.46 \pm 2.6$ g for the CAR<sup>-/-</sup> sham-operated controls (Figure 7A).

A glucose tolerance test performed when the animals were 14 week-old revealed glucose intolerance in CAR<sup>-/-</sup> ovariectomized mice that was not observed in CAR<sup>-/-</sup> sham-operated controls. The CAR<sup>-/-</sup> sham-operated controls always had a better glucose tolerance.

Ovariectomy in CAR<sup>-/-</sup> mice led to fasted hyperglycemia, which was not observed in WT ovariectomized animals (Figure 7B). CAR<sup>-/-</sup> ovariectomized females also became hypercholesterolemic, with higher total cholesterol and HDL cholesterol levels compared to CAR<sup>-/-</sup> sham-operated controls (Figure 7C). The CAR<sup>-/-</sup> OVX mice also developed hepatic steatosis, as observed in the histological liver sections and the hepatic triglyceride quantification shown in Figure 7D.

### **Discussion**

The present study provides insights into the physiological role of CAR in the regulation of endocrine and metabolic homeostasis in male and female mice. Its deletion results in endocrine disruptions in both sexes but in metabolic disorders only in males, which developed obesity, diabetes, hepatic steatosis, and hypercholesterolemia.

We hypothesize a dimorphic role of the nuclear receptor CAR in energy metabolism since CAR activity is sex-dependent, with CAR target genes being more expressed in the liver of females than in males (33). Moreover, CAR has a high affinity with androstanes which are testosterone metabolites and the first inverse agonist ligands identified, and it plays major role in catabolism and inactivation of steroid hormone (2,5,7). However, the potential role of sex in CAR's regulation of energy metabolism had never been previously studied.

Previous studies realized in male have shown a role for CAR in maintaining energy homeostasis. These studies were performed by activating CAR using its pharmacological agonist, TCPOBOP. Diabetic male mice displayed better glucose tolerance when treated with TCPOBOP (14), and in leptin-deficient (ob/ob) or high fat-fed mice, CAR activation alleviated hepatic steatosis, improved insulin sensitivity and prevented obesity (13). In agreement with these results, we show that CAR deletion leads to severe metabolic disorders in males. We studied here both female and male mice and followed them over a long period,

which allowed us to unravel a significant sexual dimorphism in energy metabolism, which is illustrated by phenotypic data and hepatic transcriptomic, metabolomic, and lipidomic profiles.

Previous authors have suggested that the regulation of energy metabolism by CAR involves a combined effect of inhibition of lipogenesis and gluconeogenesis (13). In the present study, the sexual dimorphism observed in the development of metabolic disorders in CAR<sup>-/-</sup> mice suggests steroid hormone involvement. In contrast with males, females lacking CAR presented better glucose tolerance and no obesity. The ovariectomy experiment demonstrates the involvement of female sex hormones in this metabolic protection. Ovariectomy of CAR<sup>-/-</sup> females led to the same metabolic disorders as observed in males. It is well described that estrogens improve glucose tolerance (34) and protect against the metabolic syndrome through different mechanisms (35). We demonstrate here that sex hormones protect females against the deleterious effects associated with lacking CAR.

CAR<sup>-/-</sup> males had higher testosterone levels than WT animals, which is in agreement with a previously published study (36), but this deregulation cannot explain the energy metabolic disorders observed in males; testosterone deficiency is the disruption associated with metabolic disorders (37). This supposition is confirmed by the results of castration, which did not influence the CAR<sup>-/-</sup> male obesity (Supplementary figure 4).

The hormone that was deregulated in both males and females is corticosterone, which is higher in CAR<sup>-/-</sup> than in WT. Although it has short-term beneficial effects, corticosterone administered chronically results in severe metabolic disorders (38). Cushing's syndrome, which is caused by endogenous or exogenous glucocorticoid excess, results in central obesity, hypertension, hyperlipidemia, and glucose intolerance, collectively reminiscent of the metabolic syndrome (39). In a recent study, Quinn et al. revealed that stress hormones are the primary contributors to metabolic disruption in ovariectomized mice (40). In the same study,

they demonstrated that estradiol protects against hepatic glucocorticoids receptor signaling. These data imply that the metabolic disorders observed in *CAR*<sup>-/-</sup> males are related to elevated corticosterone levels and that females are protected by their sexual hormones. This pattern would explain why ovariectomy impaired this protection, with *CAR*<sup>-/-</sup> ovariectomized females developing the same disorders as males (Figure 7).

The liver is one of the primary site of metabolism for corticosteroids, which are metabolized irreversibly by A-ring reductases and hydroxysteroid dehydrogenases (41,42). Three of these enzymes (*Srd5a1*, *Hsd3b1*, and *Hsd3b5*) were downregulated in males and/or females *CAR*<sup>-/-</sup> (Figure 6A). This downregulation may explain the elevated levels of corticosterone observed in *CAR*<sup>-/-</sup> mice compared to WT (Figure 6D). This hypothesis is supported by data showing that male or female mice lacking the enzyme *Srd5a1* exhibit elevated corticosterone levels and metabolic disorders (43,44). Clinical studies have also demonstrated that administration of SRD5A reductase inhibitor to patients results in faulty corticosteroid clearance and in hepatic lipid accumulation (45).

In the liver, some cytochrome P450 are specifically upregulated in a sex-dependent manner through the GH/Stat5b/HNF4 $\alpha$  axis (46). For example, gene expression of *Cyp7b1* is overexpressed in male liver, however in male *CAR*<sup>-/-</sup> liver, we observed a repression of this gene expression. We can suppose that male *CAR*<sup>-/-</sup> presents an impairment of their liver masculinization. This hypothesis is supported by lipidomic and metabolomic liver analysis indicating that *CAR* deletion decrease difference between male and female hepatic metabolic profiles. Different studies suggests that HNF4 $\alpha$  regulates *CAR* gene expression and allows establishment of sex-specific gene expression, in liver (47,48).

In summary, our findings show a key role for the nuclear receptor *CAR* in regulating energy metabolism and endocrine homeostasis. Its absence results in a sexually dimorphic metabolic phenotype more deleterious in males than in females. Moreover, this work

suggests that CAR plays an important role in controlling some hormone levels, which are involved in maintaining energy homeostasis.

## References

1. Maglich JM, Parks DJ, Moore LB, Collins JL, Goodwin B, Billin AN, et al. Identification of a Novel Human Constitutive Androstane Receptor (CAR) Agonist and Its Use in the Identification of CAR Target Genes. *J. Biol. Chem.* 2003;278:17277–17283.
2. Yamamoto Y, Kawamoto T, Negishi M. The role of the nuclear receptor CAR as a coordinate regulator of hepatic gene expression in defense against chemical toxicity. *Arch. Biochem. Biophys.* 2003;409:207–11.
3. Saini SPS, Sonoda J, Xu L, Toma D, Uppal H, Mu Y, et al. A Novel Constitutive Androstane Receptor-Mediated and CYP3A-Independent Pathway of Bile Acid Detoxification. *Mol. Pharmacol.* 2004;65:292–300.
4. Huang W, Zhang J, Chua SS, Qatanani M, Han Y, Granata R, et al. Induction of bilirubin clearance by the constitutive androstane receptor (CAR). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003;100:4156–61.
5. Forman BM, Tzamei I, Choi HS, Chen J, Simha D, Seol W, et al. Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR-beta. *Nature.* 1998;395:612–5.
6. Kawamoto T, Kakizaki S, Yoshinari K, Negishi M. Estrogen activation of the nuclear orphan receptor CAR (constitutive active receptor) in induction of the mouse *Cyp2b10* gene. *Mol. Endocrinol.* 2000;14:1897–905.
7. Moore LB, Parks DJ, Jones SA, Bledsoe RK, Consler TG, Stimmel JB, et al. Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share

- xenobiotic and steroid ligands. *J. Biol. Chem.* 2000;275:15122–7.
8. Sugatani J, Kojima H, Ueda A, Kakizaki S, Yoshinari K, Gong QH, et al. The phenobarbital response enhancer module in the human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 gene and regulation by the nuclear receptor CAR. *Hepatology.* 2001;33:1232–8.
  9. Swales K, Negishi M. CAR, Driving into the Future. *Mol. Endocrinol.* 2004;18:1589–1598.
  10. Maglich JM, Watson J, McMillen PJ, Goodwin B, Willson TM, Moore JT. The nuclear receptor CAR is a regulator of thyroid hormone metabolism during caloric restriction. *J. Biol. Chem.* 2004;279:19832–8.
  11. Ding X, Lichti K, Kim I, Gonzalez FJ, Staudinger JL. Regulation of constitutive androstane receptor and its target genes by fasting, cAMP, hepatocyte nuclear factor alpha, and the coactivator peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha. *J. Biol. Chem.* 2006;281:26540–51.
  12. Qatanani M, Zhang J, Moore DD. Role of the Constitutive Androstane Receptor in Xenobiotic-Induced Thyroid Hormone Metabolism. *Endocrinology.* 2005;146:995–1002.
  13. Gao J, He J, Zhai Y, Wada T, Xie W. The constitutive androstane receptor is an anti-obesity nuclear receptor that improves insulin sensitivity. *J. Biol. Chem.* 2009;284:25984–92.
  14. Dong B, Saha PK, Huang W, Chen W, Abu-Elheiga LA, Wakil SJ, et al. Activation of nuclear receptor CAR ameliorates diabetes and fatty liver disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2009;106:18831–18836.
  15. Yarushkin AA, Kachaylo EM, Pustyl'nyak VO. The constitutive androstane receptor activator 4-[(4R,6R)-4,6-diphenyl-1,3-dioxan-2-yl]-N,N-dimethylaniline inhibits the

- gluconeogenic genes PEPCK and G6Pase through the suppression of HNF4 $\alpha$  and FOXO1 transcriptional activity. *Br. J. Pharmacol.* 2013;168:1923–32.
16. Gao J, Yan J, Xu M, Ren S, Xie W. CAR Suppresses Hepatic Gluconeogenesis by Facilitating the Ubiquitination and Degradation of PGC1 $\alpha$ . *Mol. Endocrinol.* 2015;29:1558–1570.
  17. Miao J, Fang S, Bae Y, Kemper JK. Functional inhibitory cross-talk between constitutive androstane receptor and hepatic nuclear factor-4 in hepatic lipid/glucose metabolism is mediated by competition for binding to the DR1 motif and to the common coactivators, GRIP-1 and PGC-1alpha. *J. Biol. Chem.* 2006;281:14537–46.
  18. Kodama S, Koike C, Negishi M, Yamamoto Y. Nuclear receptors CAR and PXR cross talk with FOXO1 to regulate genes that encode drug-metabolizing and gluconeogenic enzymes. *Mol. Cell. Biol.* 2004;24:7931–40.
  19. Ueda A, Hamadeh HK, Webb HK, Yamamoto Y, Sueyoshi T, Afshari CA, et al. Diverse roles of the nuclear orphan receptor CAR in regulating hepatic genes in response to phenobarbital. *Mol. Pharmacol.* 2002;61:1–6.
  20. Kassam A, Winrow CJ, Fernandez-Rachubinski F, Capone JP, Rachubinski RA. The peroxisome proliferator response element of the gene encoding the peroxisomal beta-oxidation enzyme enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase is a target for constitutive androstane receptor beta/9-cis-retinoic acid receptor-mediated transactivation. *J. Biol. Chem.* 2000;275:4345–50.
  21. Yu L, Wang Z, Huang M, Li Y, Zeng K, Lei J, et al. Evodia alkaloids suppress gluconeogenesis and lipogenesis by activating the constitutive androstane receptor. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 2016;1859:1100–1111.
  22. Breuker C, Moreau A, Lakhil L, Tamasi V, Parmentier Y, Meyer U, et al. Hepatic Expression of Thyroid Hormone-Responsive Spot 14 Protein Is Regulated by

- Constitutive Androstane Receptor (NR1I3). *Endocrinology*. 2010;151:1653–1661.
23. Marmugi A, Lukowicz C, Lasserre F, Montagner A, Polizzi A, Ducheix S, et al. Activation of the Constitutive Androstane Receptor induces hepatic lipogenesis and regulates Pnpla3 gene expression in a LXR-independent way. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2016;303:90–100.
  24. Delitala AP, Capobianco G, Delitala G, Cherchi PL, Dessole S. Polycystic ovary syndrome, adipose tissue and metabolic syndrome. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2017;296:405–419.
  25. Pivonello R, Isidori AM, De Martino MC, Newell-Price J, Biller BMK, Colao A. Complications of Cushing's syndrome: state of the art. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2016;4:611–629.
  26. Wei P, Zhang J, Egan-Hafley M, Liang S, Moore DD. The nuclear receptor CAR mediates specific xenobiotic induction of drug metabolism. *Nature*. 2000;407:920–923.
  27. Tamasi V, Juvan P, Beer M, Rozman D, Meyer UA. Transcriptional Activation of PPAR $\alpha$  by Phenobarbital in the Absence of CAR and PXR. *Mol. Pharm.* 2009;6:1573–1581.
  28. Montagner A, Korecka A, Polizzi A, Lippi Y, Blum Y, Canlet C, et al. Hepatic circadian clock oscillators and nuclear receptors integrate microbiome-derived signals. *Sci. Rep.* 2016;6:20127.
  29. Régnier M, Polizzi A, Lippi Y, Fouché E, Michel G, Lukowicz C, et al. Insights into the role of hepatocyte PPAR $\alpha$  activity in response to fasting. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2018;471:75-88.
  30. Lukowicz C, Ellero-Simatos S, Régnier M, Polizzi A, Lasserre F, Montagner A, et al. Metabolic Effects of a Chronic Dietary Exposure to a Low-Dose Pesticide Cocktail in Mice: Sexual Dimorphism and Role of the Constitutive Androstane Receptor. *Environ.*

- Health Perspect. 2018;126:067007.
31. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;41:1313–1321.
  32. Kobayashi K, Hashimoto M, Honkakoski P, Negishi M. Regulation of gene expression by CAR: an update. *Arch. Toxicol*. 2015;89:1045–1055.
  33. Hernandez JP, Mota LC, Huang W, Moore DD, Baldwin WS. Sexually dimorphic regulation and induction of P450s by the constitutive androstane receptor (CAR). *Toxicology*. 2009;256:53–64.
  34. Weigt C, Hertrampf T, Flenker U, Hülsemann F, Kurnaz P, Fritzscheier KH, et al. Effects of estradiol, estrogen receptor subtype-selective agonists and genistein on glucose metabolism in leptin resistant female Zucker diabetic fatty (ZDF) rats. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. 2015;154:12–22.
  35. Palmer BF, Clegg DJ. The sexual dimorphism of obesity. *Mol. Cell. Endocrinol*. 2015;402:113–119.
  36. Cho HY, Jung J-Y, Park H, Yang J-Y, Jung S, An JH, et al. In vivo deletion of CAR resulted in high bone mass phenotypes in male mice. *J. Cell. Physiol*. 2014;229:561–71.
  37. Kelly DM, Jones TH. Testosterone and obesity. *Obes. Rev*. 2015;16:581–606.
  38. Wang M. The role of glucocorticoid action in the pathophysiology of the Metabolic Syndrome. *Nutr. Metab. (Lond)*. 2005;2:3.
  39. Pivonello R, De Martino MC, Iacuaniello D, Simeoli C, Muscogiuri G, Carlomagno F, et al. Metabolic Alterations and Cardiovascular Outcomes of Cortisol Excess. In: *Frontiers of hormone research*. 2016. p. 54–65.
  40. Quinn MA, Xu X, Ronfani M, Cidlowski JA. Estrogen Deficiency Promotes Hepatic

- Steatosis via a Glucocorticoid Receptor-Dependent Mechanism in Mice. *Cell Rep.* 2018;22:2690–2701.
41. Berliner DL, Dougherty TF. HEPATIC AND EXTRAHEPATIC REGULATION OF CORTICOSTEROIDS. *Pharmacol. Rev.* 1961;13.
  42. Nixon M, Upreti R, Andrew R. 5 $\alpha$ -Reduced glucocorticoids: a story of natural selection. *J. Endocrinol.* 2012;212:111–27.
  43. Livingstone DEW, Barat P, Di Rollo EM, Rees GA, Weldin BA, Rog-Zielinska EA, et al. 5 $\alpha$ -Reductase Type 1 Deficiency or Inhibition Predisposes to Insulin Resistance, Hepatic Steatosis, and Liver Fibrosis in Rodents. *Diabetes* 2015;64:447–458.
  44. Livingstone DEW, Di Rollo EM, Mak TC-S, Sooy K, Walker BR, Andrew R. Metabolic dysfunction in female mice with disruption of 5 $\alpha$ -reductase 1. *J. Endocrinol.* 2017;232:29–36.
  45. Hazlehurst JM, Opreescu AI, Nikolaou N, Di Guida R, Grinbergs AEK, Davies NP, et al. Dual-5 $\alpha$ -Reductase Inhibition Promotes Hepatic Lipid Accumulation in Man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2016;101:103–113.
  46. Park S-H, Wiwi CA, Waxman DJ. Signalling cross-talk between hepatocyte nuclear factor 4alpha and growth-hormone-activated STAT5b. *Biochem. J.* 2006;397:159–68.
  47. Wiwi CA, Gupte M, Waxman DJ. Sexually dimorphic P450 gene expression in liver-specific hepatocyte nuclear factor 4alpha-deficient mice. *Mol. Endocrinol.* 2004;18:1975–87.
  48. Wortham M, Czerwinski M, He L, Parkinson A, Wan Y-JY. Expression of constitutive androstane receptor, hepatic nuclear factor 4 alpha, and P450 oxidoreductase genes determines interindividual variability in basal expression and activity of a broad scope of xenobiotic metabolism genes in the human liver. *Drug Metab. Dispos.* 2007;35:1700–10.

**Figure legends**

**Figure 1: Sexually dimorphic activity of CAR in the liver: distinct regulation of steroidogenesis genes between males and females.** Analysis of hepatic transcriptome of WT and CAR<sup>-/-</sup> male and female mice at age 16 weeks (n=6 per group). **A.** Averaged gene expression values per condition are represented in a heatmap; the hierarchical clustering was obtained from individual expression values using Pearson correlation coefficient as distance and the Ward's criterion for agglomeration. Red and green indicate values above and below the mean averaged centered and scaled expression values (Z-score), respectively. Black indicates values close to the mean. According to the probe clustering (dendrogram, left panel), 11 probe clusters showed specific gene expression profiles. **B, C.** Venn diagrams representing the number of hepatic genes specifically upregulated (**B**) or downregulated (**C**) in CAR<sup>-/-</sup> mice (p<0.05 and |fold change| > 1.5). Gene ontology pathway analysis of the 100 and 487 significantly induced genes in male and female CAR<sup>-/-</sup> mice, respectively, revealed significant biological functions, as did gene ontology pathway analysis of the 62 and 106 significantly repressed genes in male and female CAR<sup>-/-</sup> mice, respectively. Histograms show the enrichment score for each pathway. Gene number and the corresponding p-value are indicated to the right of the histograms. **D.** Expression profiles of hepatic genes involved in steroidogenesis pathways in CAR<sup>-/-</sup> male and females. A total of 31 probes were selected as differentially regulated in CAR<sup>-/-</sup> male and females, respectively (p-value interaction (genotype–sex) <0.05, n=6 per group) **E.** The relative gene expression of *Cyp7a1*, *Cyp7b1*, *Cyp2c29*, *Hsd3b5*, and *Sult1a1* was confirmed by RT-qPCR in CAR<sup>-/-</sup> male and female mice (n=10 per group). Data represent mean±s.e.m. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

**Figure 2: Sexually dimorphic obesity and diabetes in CAR<sup>-/-</sup> mice.** **A, B.** Body weight monitoring in male (**A**) and female (**B**) CAR<sup>-/-</sup> mice. There was a significant increase in epididymal (ep), subcutaneous (sc) white adipose tissue (WAT) weight in CAR<sup>-/-</sup> male mice compared to WT (n=18 per group). **C, D.** Glucose tolerance was assessed in male (**C**) and female (**D**) mice at age 12 weeks via intraperitoneal glucose administration and at age 62 weeks via oral administration (n=9 per group). **E, G.** Insulin tolerance was assessed in male (**E**) and female (**G**) mice at age 13 weeks (n=6 per group). **F, H.** Fasted glycemia and insulinemia were assessed in male (**F**) and female (**H**) animals at age 33 week (n=9 per group). Data are presented as mean±s.e.m. \*p<0.05, \*\*\*p<0.001.

**Figure 3: Sexually dimorphic dyslipidemia, hepatic injury, and steatosis in CAR<sup>-/-</sup> mice.** **A.** Hypercholesterolemia observed in CAR<sup>-/-</sup> male mice. Plasma analysis was performed in CAR<sup>-/-</sup> males and females at age 68 weeks. **B.** A significant increase in ALT and AST levels was observed with age in CAR<sup>-/-</sup> males. **C.** Histological sections of liver stained with H&E were assessed in male and female WT and CAR<sup>-/-</sup> animals at age 68 weeks, magnification ×100. Steatosis and inflammatory scoring was performed on histological sections using the non-alcoholic fatty liver disease scoring system (31). **D.** Neutral lipids (TG: triglycerides; CE: cholesterol esters) were extracted from the livers of the same animals. After extraction, lipids were analyzed by gas chromatography (GC-FID). Data are presented as mean±s.e.m. \*p<0.05, \*\*\*p<0.001, n=18 per group. ALT: alanine transaminase; AST: aspartate transaminase; FFA: free fatty acid; LDL: low-density lipoprotein; HDL: high-density lipoprotein.

**Figure 4: Specific lipid profiling in male and female mice.** **A.** Heatmap representing data from hepatic lipid analysis of WT and CAR<sup>-/-</sup> male and female mice at age 68 weeks. Hierarchical clustering is also shown, which allows definition of 4 lipid clusters. Cluster 1 lipid species were specifically upregulated in WT male mice; cluster 2 lipid species were

specifically upregulated in CAR<sup>-/-</sup> male mice; cluster 3 lipid species were specifically downregulated in WT male mice; and cluster 4 lipid species were specifically downregulated in CAR<sup>-/-</sup> male mice. **B.** PCA showing a separation between WT and CAR<sup>-/-</sup> male mice. No separation was observed between WT and CAR<sup>-/-</sup> female mice. **C.** The relative SM 18:1/16:0, PS 38:4 abundances for cluster 3; the relative PI 36:1, PI 36:2, and PC 32:1 abundances for cluster 1; and the relative PE 38:4 abundance for cluster 2. Data are presented as the mean of relative abundance in each lipid species ± standard error of the mean. \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001, n=18 mice per group. Cer: ceramide; PS: phosphatidylserine; SM: sphingomyelin; PC: phosphatidylcholine; TG: triglycerides; PI: phosphatidylinositol; PE: phosphatidylethanolamine; EC: esterified cholesterol; M: male; F: female.

**Figure 5: <sup>1</sup>H-NMR-based metabolic profiling of aqueous liver extracts.** **A.** PCA score plots derived from the hepatic <sup>1</sup>H-NMR spectra from liver aqueous extracts of CAR<sup>-/-</sup> and WT males and females age 68 weeks. **B, C.** Cross-validated score plots related to the O-PLS-DA models discriminating between WT and CAR<sup>-/-</sup> males (**B**) or females (**C**). **D, E.** Coefficient plots related to the O-PLS-DA models discriminating between WT (bottom) and CAR<sup>-/-</sup> (top) males (**D**) or females (**E**). Metabolites are color-coded according to their correlation coefficient, and significantly altered metabolites are labeled ( $R^2 > 0.5$ ). The direction of the metabolite indicates the group with which it is positively associated, as labeled on the diagram. **F, G.** Area under the curve (AUC) of the <sup>1</sup>H-NMR signals of selected metabolites. Data are presented as the mean ± s.e.m. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, n=8 mice per group.

**Figure 6: Distinct dysregulation of steroid homeostasis in male and female CAR<sup>-/-</sup> mice.** **A.** The relative gene expression of *Cyp17a1*, *Cyp21a1*, *Cyp11a1*, *Srd5a1*, *Hsd3b1*, *Hsd3b5*,

*Hsd11b1*, *Sult2a1*, and *Sult1e1* was assessed by RT-qPCR in male and female WT and CAR<sup>-/-</sup> mice at age 68 weeks. **B.** Schematic representation of steroidogenic and hormone pathways and key enzymes. Blue arrows show CAR<sup>-/-</sup> male mRNA expression dysregulation compared to WT; red arrows show CAR<sup>-/-</sup> female mRNA expression dysregulation compared to WT. Bold type indicates a biologically active form of the hormone. **D.** Plasma analysis quantification of corticosterone and testosterone in male and female WT and CAR<sup>-/-</sup> at age 68 weeks. Data are mean±s.e.m. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, n=18 mice per group. DHEA: dehydroepiandrosterone.

**Figure 7: Ovariectomy in females leads to severe metabolic disorders in CAR<sup>-/-</sup> mice.**

WT and CAR<sup>-/-</sup> female mice were ovariectomized (OVX) or not (SHAM) at age 5 weeks. **A.** Body weight monitoring and body weight gain in female WT and CAR<sup>-/-</sup> mice. **B.** Glucose tolerance and fasted glycemia were assessed in female WT and CAR<sup>-/-</sup> mice at age 14 weeks. **C.** Hypercholesterolemia was observed in female CAR<sup>-/-</sup> OVX mice. Plasma analysis was performed in female WT and CAR<sup>-/-</sup> mice at age 35 weeks. **D.** Histological sections of liver stained with H&E were assessed in female WT and CAR<sup>-/-</sup> OVX or SHAM at age 35 weeks, magnification ×100. Triglycerides were extracted from the livers of the same animals. After extraction, lipids were analyzed by gas chromatography (GC-FID). Data are presented as mean±s.e.m. \*p<0.05, \*\*\*p<0.001, n=8 per group. LDL: low-density lipoprotein; HDL: high-density lipoprotein; TG: triglycerides.

### **Acknowledgments**

We thank Prof. David Moore (Houston, Texas, USA) and Dr. Urs A. Meyer (Biocenter, University Basel, Switzerland) for providing the CAR knockout mice. We thank all members of the EZOP staff, particularly Colette Bétoulières for her careful help in animal care and technical assistance with animal experiments. We thank the staff members of the following GenoToul core facilities for technical assistance: MetaToul/Lipidomic, Anexplo/Histopathology, and Phenotyping.

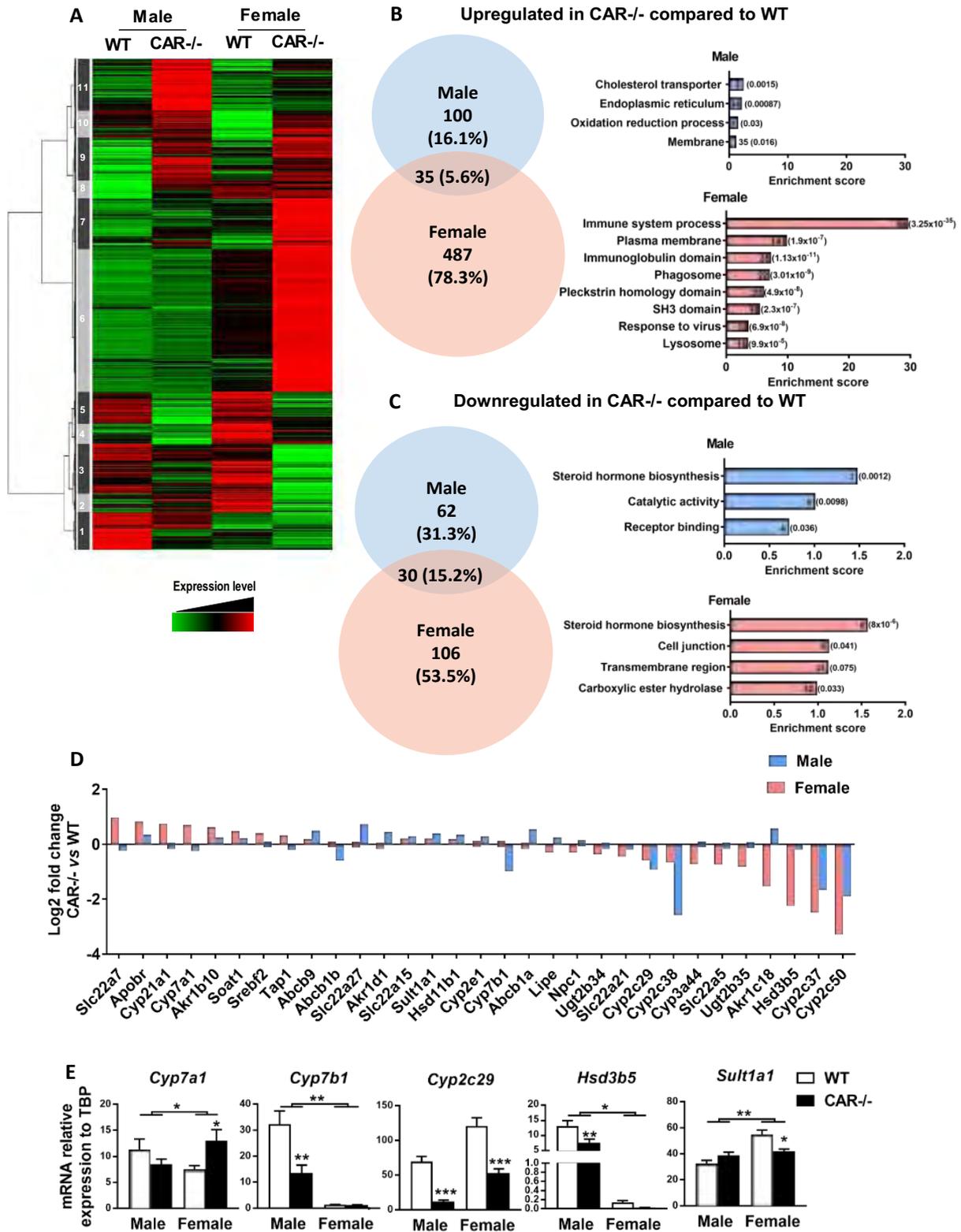


Figure 1

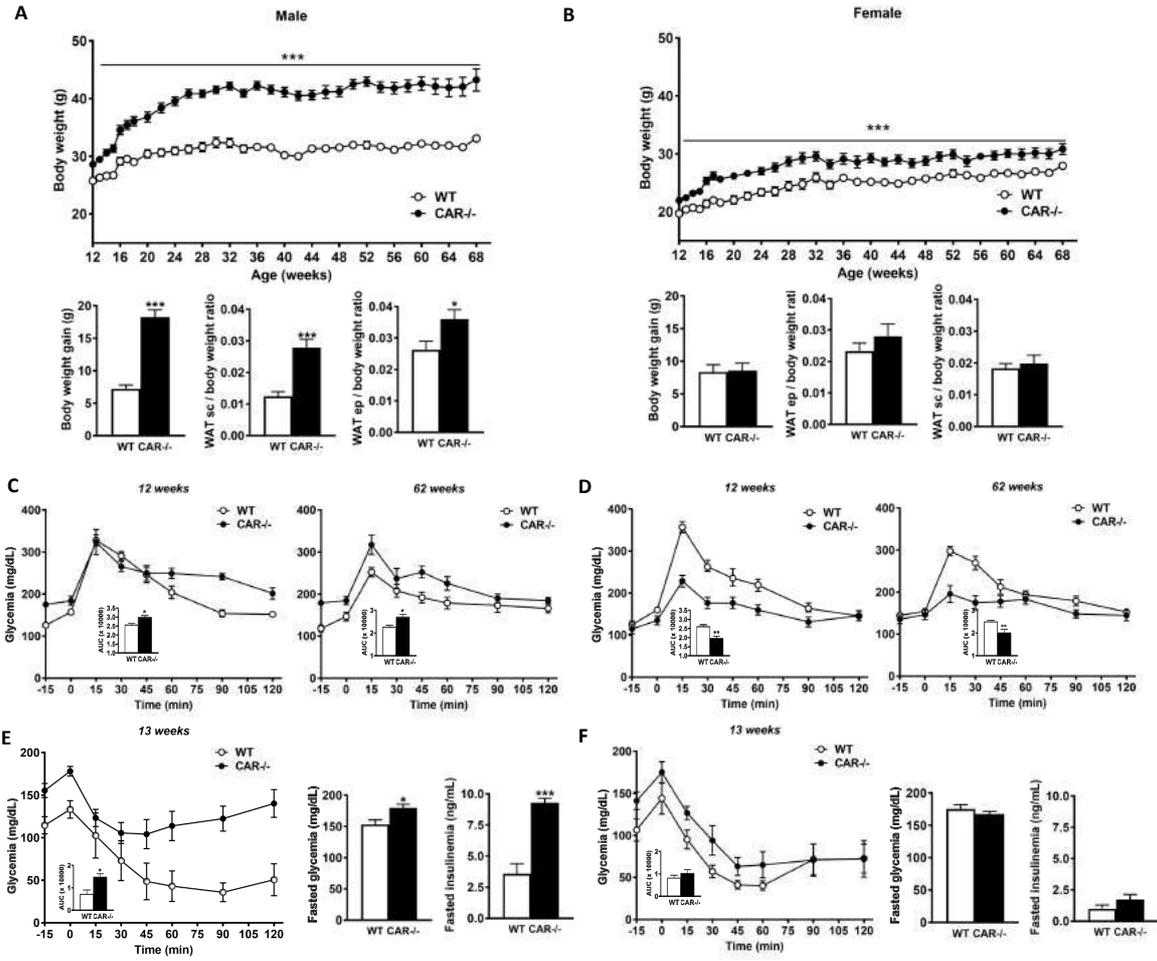


Figure 2

Chapitre II

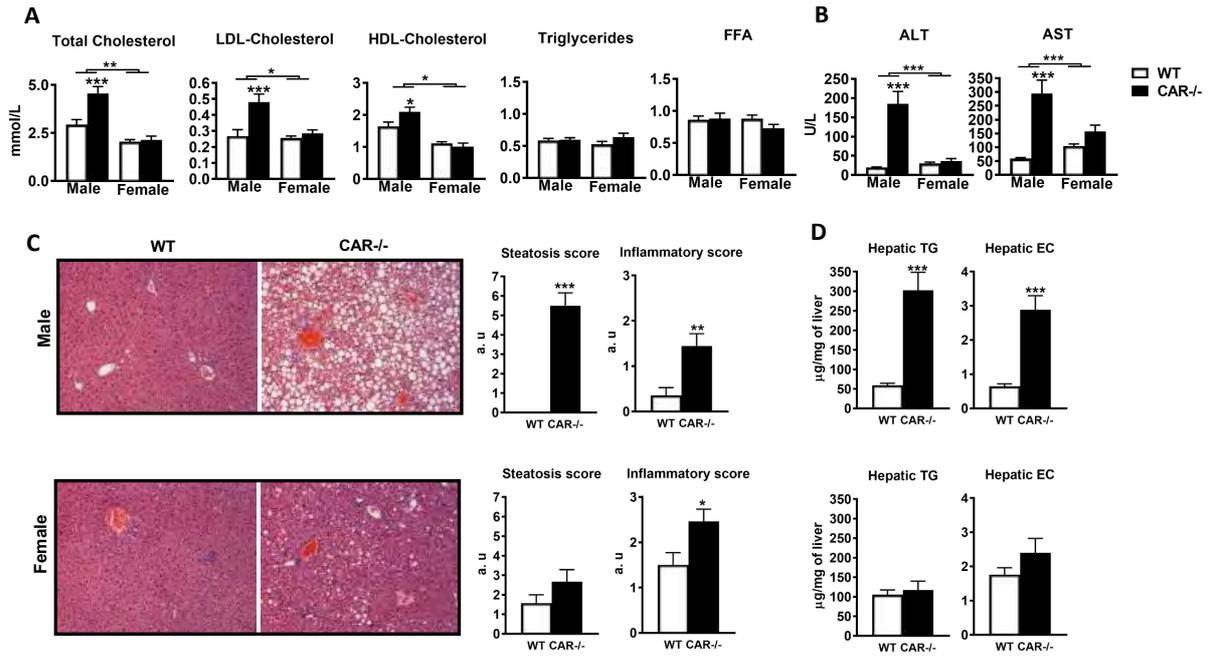


Figure 3

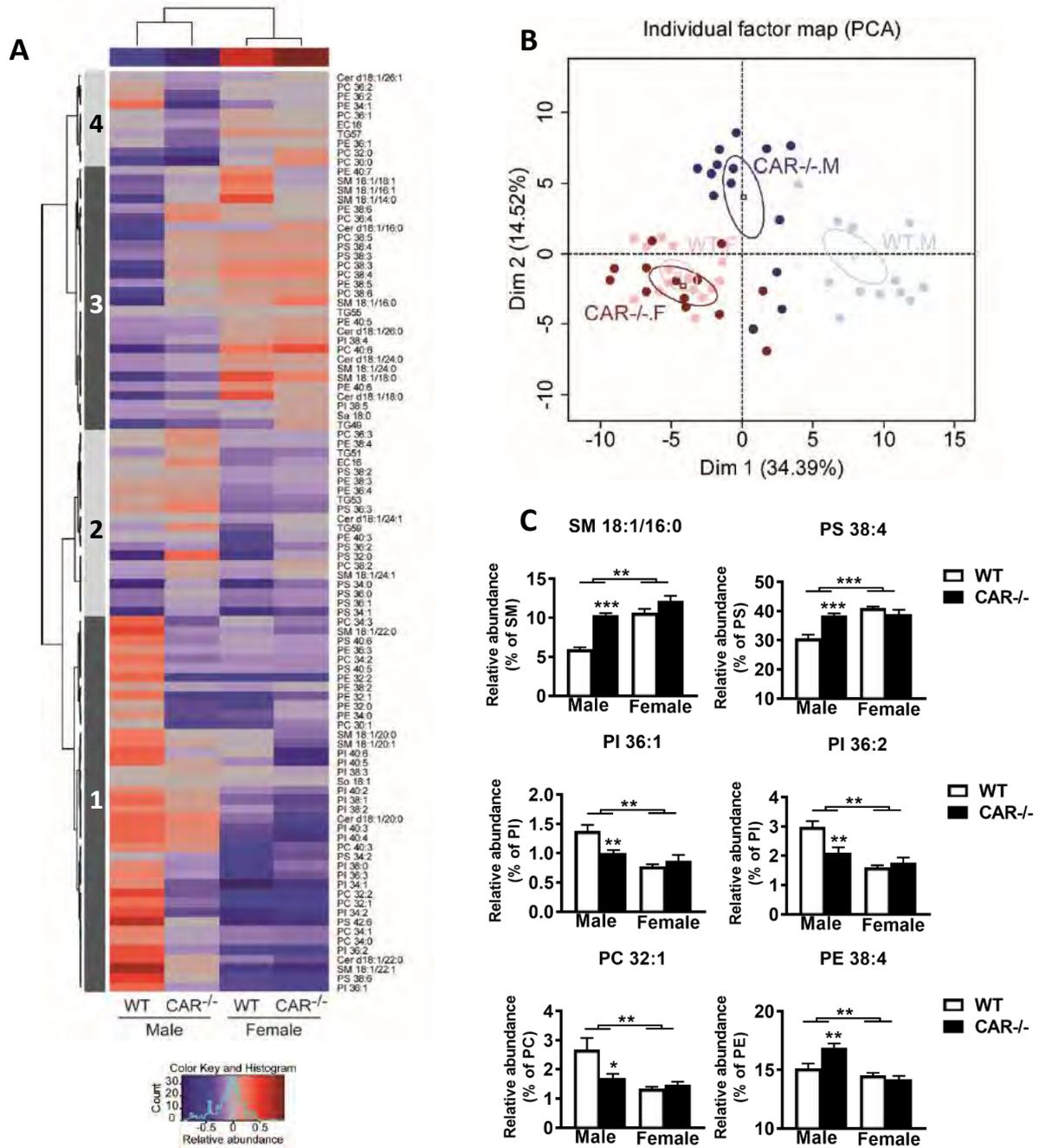


Figure 4

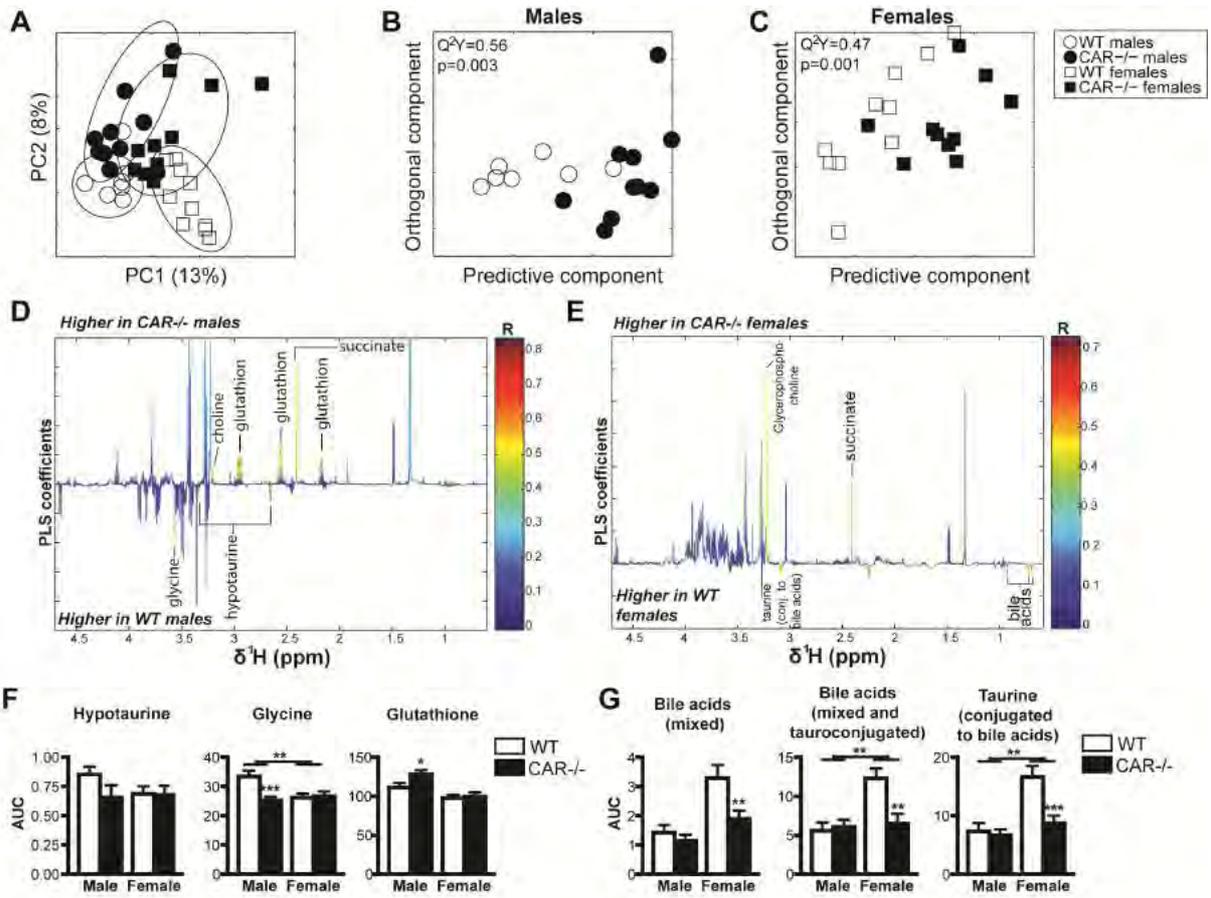


Figure 5

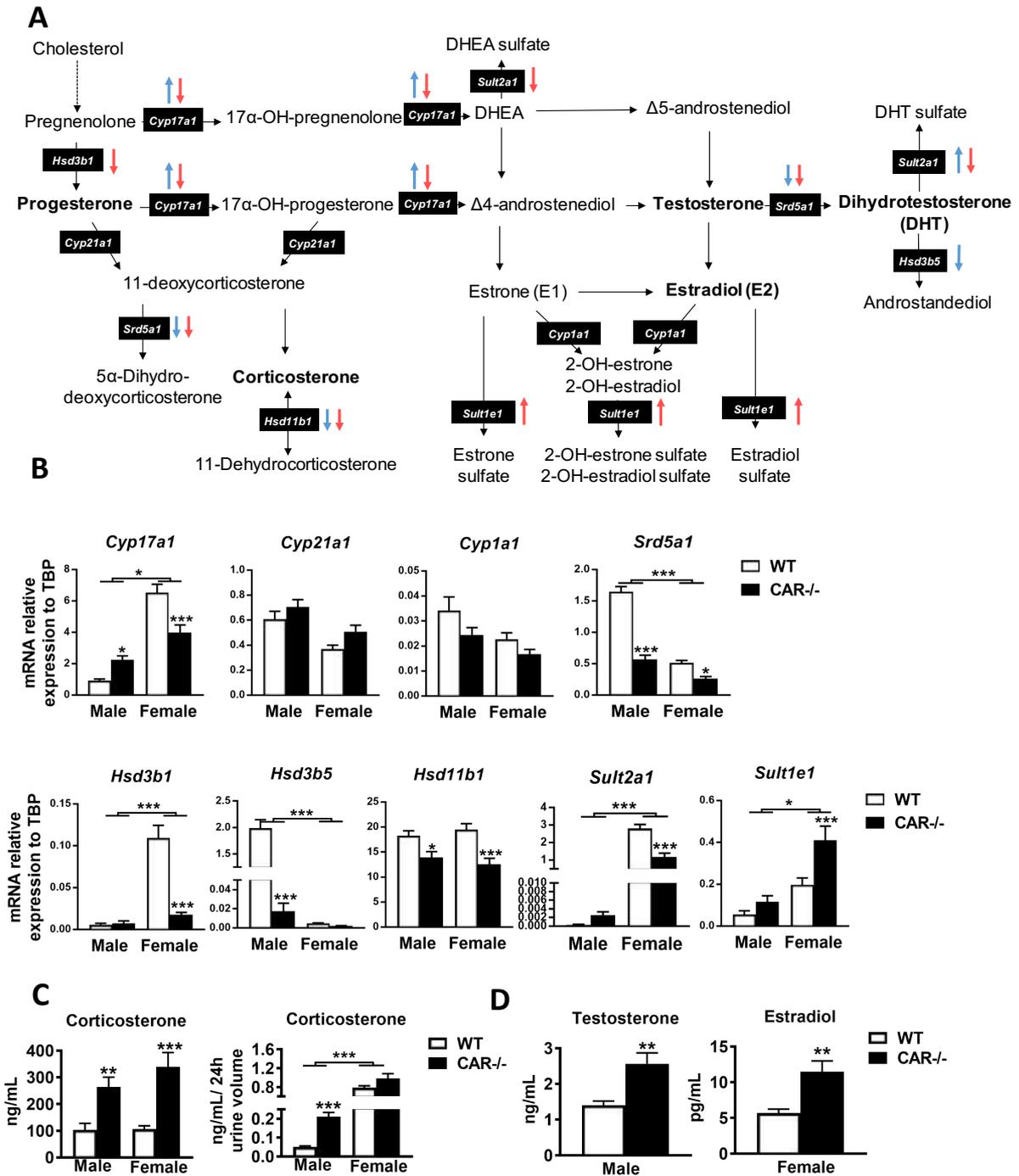


Figure 6

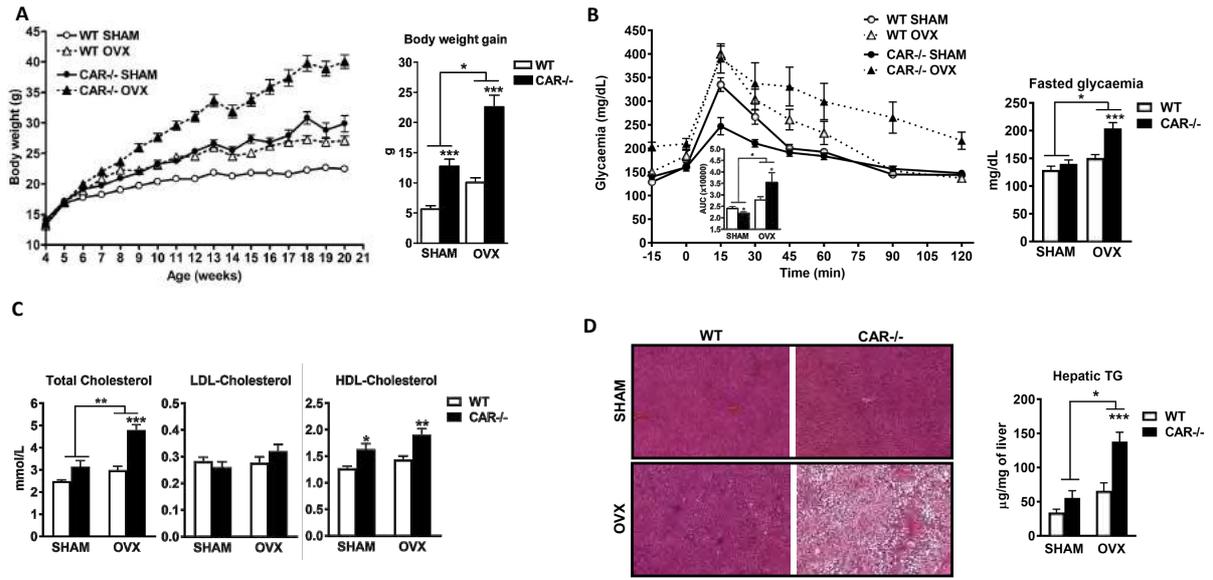


Figure 7

## Chapitre II

**Supplementary table 1:** Oligonucleotide sequences used in real-time qPCR.

Gene	Ref GenBank	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (3'-5')
<i>Cyp7a1</i>	NM_007824	AGCAACTAAACAACCTGCCAGTACTA	GCCGCAGAGCCTCCTTG
<i>Cyp7b1</i>	NM_007825	ACATGGTGACACTTTCACCTGTCTTC	GAACTTCTGAAAGCTTAATTGTTTTGG
<i>Cyp2c29</i>	NM_007815	GCTCAAAGCCTACTGTCA	CATGAGTGTAATCGTCTCA
<i>Hsd3b5</i>	NM_008295.2	TCGAAAACATGAAGAGGAATTGTC	CAGTACTCTCACCTTGGCCTTTG
<i>Sult1a1</i>	NM_133670	GGATCATTAAGACACATCTGCC	CACATCCTTTGCATTTCGGG
<i>Cyp17a1</i>	NM_007809.3	GAGAAGTGCTCGTGAAGAAGGG	CCGACAAGAGGCCTAGAGTCA
<i>Cyp21a1</i>	NM_009995.2	CCTCACTTTTGGAGACAAGGACA	CAGTCGTGAAGGTCTGTACCA
<i>Cyp1a1</i>	NM_001136059	CACTACAGGACATTTGAGAAGGGC	GCTCAATGAGGCTGTCTGTGAT
<i>Srd5a1</i>	NM_175283.3	CTAGCTATGTTTCTGATCCACTACGTG	TCAGAACTGGAAAAACCAGCG
<i>Srd5a3</i>	NM_020611.4	GGCCTTCGATGTCCCA	CAACTGAGATGACGTAGAAGTGAGAAA
<i>Hsd3b1</i>	NM_008293	CAAAGTATTCCGACCAGAAACCA	GTCTCCTTCCAACACTGTCACCTT
<i>Hsd3b5</i>	NM_008295.2	TCGAAAACATGAAGAGGAATTGTC	CAGTACTCTCACCTTGGCCTTTG
<i>Hsd11b1</i>	NM_008288.2	TGCCGTCATCTCCTCCTG	GGAGCAATCATAGGCTGGGTC
<i>Sult2a1</i>	NM_001111296	GATCTCGTCCTCAAGTACAGCTCTT	CAAGCCATTAGTAACCTGATCTTCCT
<i>Sult1e1</i>	NM_023135	ATTTCACTTCTTCCACGGGAAC	CCAAAACTTCATAATACTCAGGCATAG

## Chapitre II

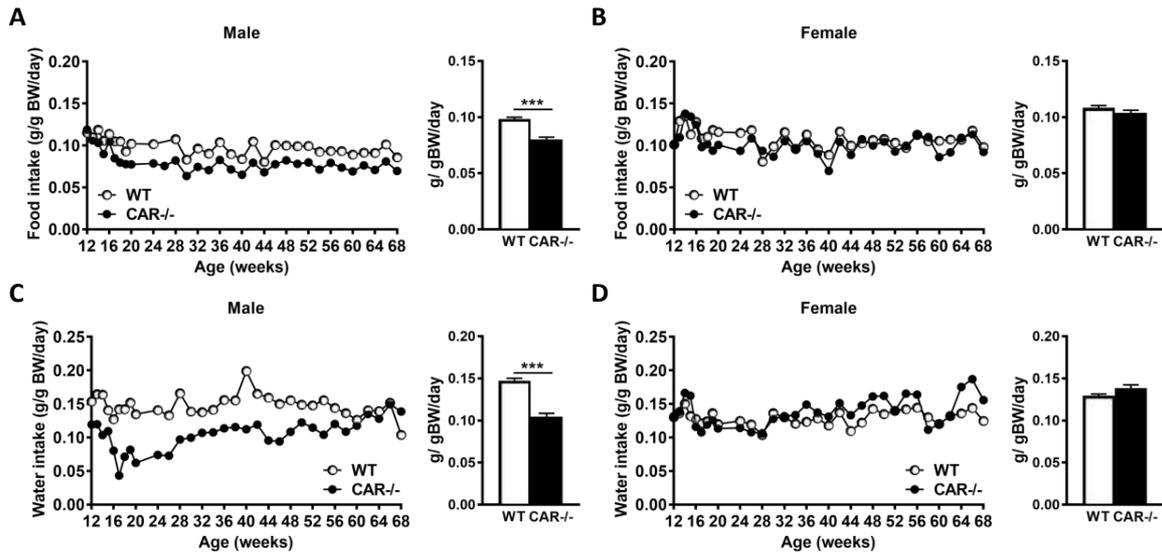
**Supplementary table 2:** Functional annotation clustering ( $p < 0.05$ ; fold change  $> 1.5$ ) using DAVID Bioinformatics Resources 6.7 for the 100 and 487 genes upregulated in CAR<sup>-/-</sup> male and female mice, respectively, at age 16 weeks.

Up-regulated in male CAR <sup>-/-</sup> mice	
Functional categories	Gene name
GO:0017127~cholesterol transporter activity	APOA4, ABCG8, ABCG5
GO:0005783~endoplasmic reticulum	HSD17B10, ERMP1, MOGAT1, SLC16A11, ADORA1, CIDEA, CD36, INSIG2, SULF2, FMO1, AGPAT9, KDSR, CYP2C38, AATK
GO:0055114~oxidation-reduction process	HSD17B10, GPX6, FMO1, CYP3A59, KDSR, CYP2C38, HPGD
GO:0016020~membrane	NRP2, ERMP1, NRG4, SLC16A11, AQP4, CDCP1, ADORA1, CHCHD6, FAM19A5, SLC01A4, INSIG2, FMO1, PPL, PLIN4, AGPAT9, RASGRP2, PLCD3, MAS1, SLC35F2, CNTNAP1, ATP8B5, NT5E, GAL3ST1, AATK, 2010107G23RIK, MOGAT1, ABHD15, PIK3C2G, SLC22A27, ABCG8, ABCG5, CD36, SLC25A10, KDSR, CYP2C38
Up-regulated in female CAR <sup>-/-</sup> mice	
Functional categories	Gene name
GO:0002376~immune system process	LY86, TLR1, PTPN22, LY9, TLR6, C1QC, TLR7, BTK, MARCO, CFP, OASL2, OASL1, MX1, SYK, ARHGEF2, PIK3CD, H2-DMB1, CLEC4N, PRKCB, CD84, C1QA, C1QB, CD86, LRMP, H2-AA, CD300LF, CD300LD, TNFAIP8L2, LST1, FGR, OAS3, IFI30, RSAD2, OAS2, CD74, NAIIP6, MEFV, PYCARD, ZAP70, INPP5D, DHX58, CSF1R, LGALS3, HCK, TLR13, MYO1G, CD300E, AXL, CD5L, H2-AB1, FCGR1, AIM2, PSMB9, MARCH1, IFIT3, IRF7, CD79B, H2-DMA, CD14
GO:0005886~plasma membrane	PRC1, ADCY7, AIF1, TLR1, SLC7A8, CD52, CD53, TLR6, TLR7, IQGAP1, BTK, DMPK, MARCO, CD48, SIRPB1A, CD44, CLEC4F, GNG2, SYK, PTPRJ, NCF1, PIK3CD, SIRPA, CLEC4N, CCR5, RIPK3, CAR9, CD300LF, SLC38A1, EMP3, CD300LD, FGD2, LY6G6E, ITGAL, FGR, CSF2RB2, KCNA2, STK10, OAS3, IFI30, ITGB2, CD74, ADAP1, FAM65B, SLC11A1, P2RY6, CD68, FOLR2, APOBR, ZAP70, FCER1G, CSF1R, TYROBP, CD300E, MYO1G, ITGA4, ABCG3, FCGR1, ABCG1, FCGR3, CORO1A, P2RX7, GNGT2, RGS1, RGS2, NTRK2, PLCG2, CD274, CD79B, CLEC7A, TREML1, KCTD12, KCNJ16, PILRB1, MSR1, PREX1, TRPV2, LY9, FES, SDC3, TNFRSF11A, MSN, FAM129B, TREH, FAM129A, CSF2RA, PARVG, LAIR1, STX3, ATP4A, NFAM1, ALDH3B1, TRPM2, PRKCB, CD84, SIGLEC1, CARD11, CD86, ADRB1, DOK3, H2-AA, GPSM3, CYTH4, FPR1, RHBG, GPR65, FPR2, APBB1IP, VCAM1, LY6A, RGS10, LPXN, RASGRP1, IL10RA, IL2RG, PIK3R5, INPP5D, SELPLG, RASA4, SNX20, EHD4, KLRA2, FYB, PTPRC, FLRT1, SELL, HCK, AXL, RGS19, H2-AB1, ANXA3, P2RY12, MARCH1, SLC16A3, CYBA, P2RY13, CYBB, SLC16A9, RAB39, CD14, GFRA2
mmu04145:Phagosome	MSR1, NCF2, NCF1, NCF4, FCGR4, H2-DMB1, ITGB2, H2-AB1, CTSS, TLR6, FCGR1, FCGR3, MARCO, CYBA, CYBB, CORO1A, TUBA8, TUBB6, H2-AA, CLEC7A, H2-DMA, CD14
GO:0009615~response to virus	BATF3, TLR13, OAS3, RSAD2, OAS2, IFIT3, IRAK3, IFI27L2A, OASL2, OASL1, OAS1A, MX1, DHX58
IPR001849:Pleckstrin homology domain	FGD2, ARHGEF2, PLEKHM2, PLEK, PREX1, FERMT3, CYTH4, APBB1IP, VAV1, ARHGAP26, ADAP1, BTK, ARHGAP25, DOK2, DOK3, PLCG2, FAM129B, DOCK10, RASA4, DOCK11, FGD3, ARHGAP9
SH3 domain	FYB, FGR, NCF2, NCF1, NCF4, HCLS1, HCK, ABI3, MYO1F, SAMSN1, VAV1, ARHGAP26, BTK, SLA, PRAM1, PLCG2, SASH3, ARHGAP9
Lysosome	PLA2G15, HCK, LGMN, IFI30, H2-DMB1, GPR137B, CTSS, TLR7, TRPM2, MARCH1, CD68, LAPTM5, RAB39, H2-DMA, SLC15A3, DRAM1, TM6SF1
Up-regulated in both male and female CAR <sup>-/-</sup> mice	
Functional categories	Gene name
GO:0016020~membrane	PAM, F11R, MTDH, LRTM1, KCNJ10, EXTL1, ACTG1, FMN2, NNT, RGS4, SLC41A3, RGS5, CAMK2B, MMD2, IFI203
GO:0070062~extracellular exosome	ACTG1, F11R, PAM, APCS, BHMT, WFDC2

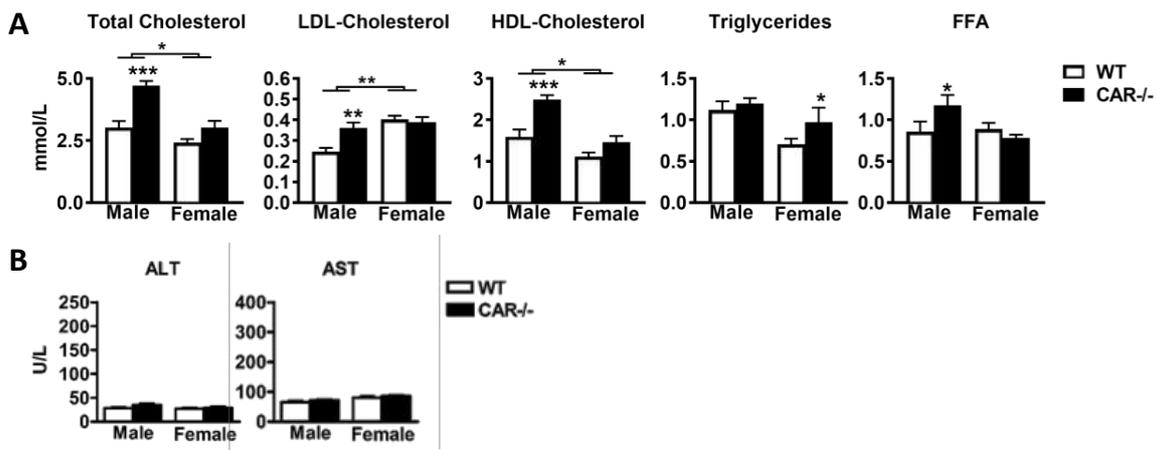
## Chapitre II

**Supplementary table 3:** Functional annotation clustering ( $p < 0.05$ ; fold change  $> 1.5$ ) using DAVID Bioinformatics Resources 6.7 for the 62 and 106 genes downregulated in CAR<sup>-/-</sup> male and female mice, respectively, at age 16 weeks.

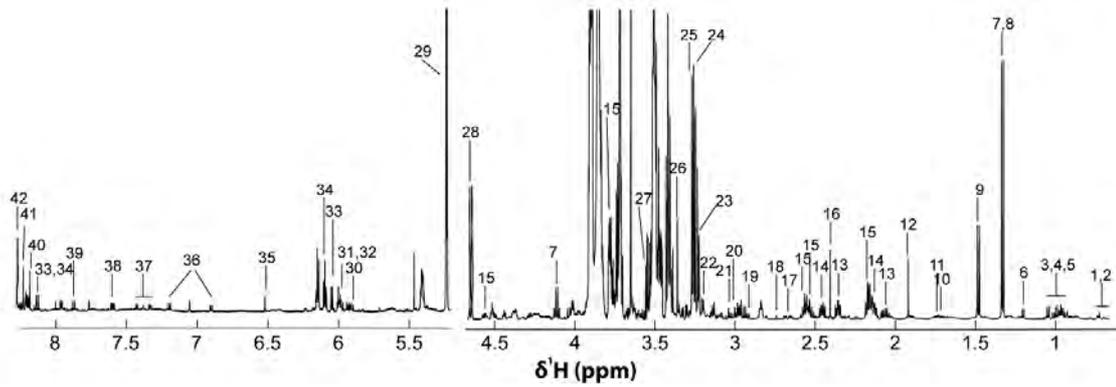
Down-regulated in male CAR <sup>-/-</sup> mice	
Functional categories	Gene name
mmu00140: Steroid hormone biosynthesis	CYP7B1, CYP2C29, CYP2C38
GO:0003824~catalytic activity	ACSM2, MTHFD2, CSAD, IDE, MOXD1
GO:0005102~receptor binding	PTK2B, IDE, HSPA1A, WIP1
Down-regulated in female CAR <sup>-/-</sup> mice	
Functional categories	Gene name
mmu00140: Steroid hormone biosynthesis	UGT2B37, UGT2B35, CYP2C44, AKR1C18, HSD3B5, CYP3A44
Cell junction	NOX4, SYT1, SDCCAG8, CLDN5, SYT6, ECT2
transmembrane region	NOX4, GPR146, SYT1, NCEH1, LEPR, UGCG, HSD3B5, CLDN5, ABCA8A, RNF186, SYT6, DDR2, SLC25A30, UNC79, SLCO1A1, P2RY1, SLC17A2, CLEC2D, SLC25A37, RNF24, CALN1, ADCK5, PQLC3
Down-regulated in both male and female CAR <sup>-/-</sup> mice	
Functional categories	Gene name
GO:0004497~monooxygenase activity	CYP2C37, CYP2C54, KMO, CYP2C39, CYP2C50



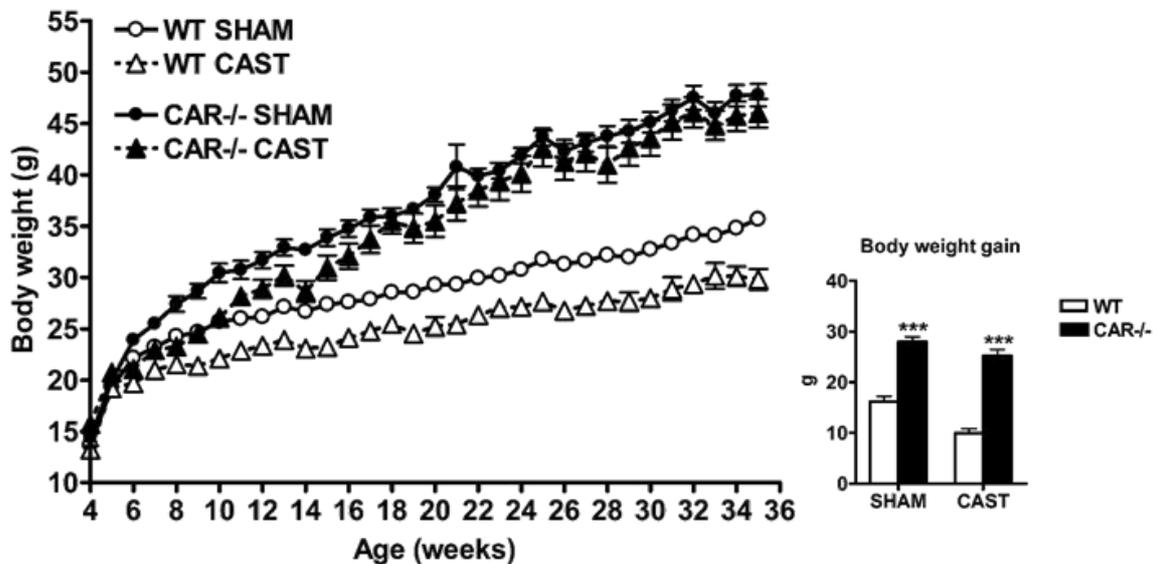
**Supplementary figure 1:** Food and water intake measured once a week was monitored from 12 to 68 weeks of age in WT and CAR-/- males (**A, C**) and females (**B, D**). Data are presented as mean±s.e.m in g of body weight (BW) per day. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.



**Supplementary figure 2:** Plasma analysis was performed in male and female WT and CAR-/- mice at 16 weeks of age (**A**), n=10 per group. **B.** ALT, AST, and ALP levels were assessed in male and female WT and CAR-/- mice at age 16 weeks, n=10 per group. Data represent mean±s.e.m. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001. LDL: low-density lipoprotein; HDL: high-density lipoprotein; FFA: free fatty acid; ALT: alanine transaminase; AST: aspartate transaminase.



**Supplementary figure 3:** Partially assigned 600 MHz  $^1\text{H}$ -NMR spectra of mouse liver aqueous extract. Keys: 1: bile acids (mixed); 2: tauro-conjugated bile acids (mixed); 3: leucine; 4: valine; 5: isoleucine; 6: 3-hydroxybutyrate; 7: lactate; 8: threonine; 9: alanine; 10: ornithine; 11: putrescine; 12: acetate; 13: glutamate; 14: glutamine; 15: glutathione; 16: succinate; 17: aspartate; 18: dimethylamine; 19: dimethylglycine; 20: creatine; 21: taurine conjugated to bile acids; 22: choline; 23: O-phosphocholine; 24: taurine; 25: betaine; 26: methanol; 27: glycine; 28: b-glucose; 29: a-glucose; 30: uridine; 31: UDP-glucose; 32: UDP-glucuronate; 33: NAD; 34: NADP; 35: fumarate; 36: tyrosine; 37: phenylalanine; 38: nicotinurate; 39: uridine; 40: AMP; 41: inosine; 42: formate.



**Supplementary figure 4:** Body weight monitoring and body weight gain in WT and CAR<sup>-/-</sup> male mice, castrated (CAST) at 5 weeks old or not (SHAM) from 4 to 36 weeks of age (n=8 per group). Data represent mean $\pm$ s.e.m. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

## Chapitre III

### ***Effets métaboliques d'une exposition à un mélange de pesticides à faible doses in vivo : dimorphisme sexuel et rôle du récepteur CAR dans ses effets dimorphiques.***

La troisième partie de mes travaux de thèse a consisté à évaluer l'impact d'un facteur environnemental sur l'homéostasie énergétique et l'influence de CAR dans la réponse à une exposition chronique à un mélange de pesticides à faibles doses. Nous avons évalué les conséquences sur le métabolisme énergétique des souris WT et CAR<sup>-/-</sup> mâles et femelles d'une exposition chronique (52 semaines) à un mélange de 6 pesticides à des doses supposées non toxiques (doses tolérables journalières). Afin de mimer l'exposition réelle du consommateur, les pesticides ont été incorporés dans l'aliment des souris.

Ces travaux ont permis de démontrer que l'exposition à un mélange de pesticides à doses supposées non toxiques conduit à des perturbations métaboliques dépendantes du sexe. Les souris mâles exposées présentent un gain de poids accompagné d'une augmentation de leur masse de tissu adipeux blanc ainsi qu'une stéatose hépatique et une intolérance au glucose par rapport aux souris mâles non exposées. Les souris femelles présentent une hyperglycémie à jeun, un stress oxydant au niveau hépatique ainsi qu'une altération de l'activité de leur microbiote intestinal en réponse à l'exposition au mélange de pesticides par rapport aux souris WT non exposées.

Le récepteur CAR semble en partie impliqué dans la réponse dimorphique vis-à-vis de ces perturbations métaboliques. La réponse dimorphique est liée à des capacités de détoxification et métabolisation des pesticides et d'une activation des récepteurs nucléaires distinctes entre les sexes.

Ces travaux ont permis de montrer pour la première fois un effet obésogène et diabétogène sexe-dépendant d'un mélange de pesticides à des doses supposées non toxiques et posent la question de la pertinence des doses journalières tolérables de pesticides lorsqu'ils sont présents en mélange.

Ce projet a fait l'objet d'une publication dans le journal « Environmental Health Perspectives ».

## Metabolic Effects of a Chronic Dietary Exposure to a Low-Dose Pesticide Cocktail in Mice: Sexual Dimorphism and Role of the Constitutive Androstane Receptor

Céline Lukowicz,<sup>1</sup> Sandrine Ellero-Simatos,<sup>1</sup> Marion Régnier,<sup>1</sup> Arnaud Polizzi,<sup>1</sup> Frédéric Lasserre,<sup>1</sup> Alexandra Montagner,<sup>1</sup> Yannick Lippi,<sup>1</sup> Emilien L. Jamin,<sup>1,3</sup> Jean-François Martin,<sup>1</sup> Claire Naylies,<sup>1</sup> Cécile Canlet,<sup>1,3</sup> Laurent Debrauwer,<sup>1,3</sup> Justine Bertrand-Michel,<sup>2</sup> Talal Al Saati,<sup>4</sup> Vassilia Théodorou,<sup>1</sup> Nicolas Loiseau,<sup>1</sup> Laïla Mselli-Lakhal,<sup>1</sup> Hervé Guillou,<sup>1</sup> and Laurence Gamet-Payrastré<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, Université Paul Sabatier, Toulouse, France

<sup>2</sup>Plateforme Lipidomique Inserm/UPS UMR 1048 - I2MC Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, Toulouse, France

<sup>3</sup>Axiom Platform, MetaToul-MetaboHUB, National Infrastructure for Metabolomics and Fluxomics, Toulouse, France

<sup>4</sup>Service d'histopathologie Expérimentale Unité Inserm/UPS/ENVT -US006/CREFRE Inserm, Bât. F, CHU Purpan, Toulouse, France

**BACKGROUND:** Epidemiological evidence suggests a link between pesticide exposure and the development of metabolic diseases. However, most experimental studies have evaluated the metabolic effects of pesticides using individual molecules, often at nonrelevant doses or in combination with other risk factors such as high-fat diets.

**OBJECTIVES:** We aimed to evaluate, in mice, the metabolic consequences of chronic dietary exposure to a pesticide mixture at nontoxic doses, relevant to consumers' risk assessment.

**METHODS:** A mixture of six pesticides commonly used in France, i.e., boscalid, captan, chlorpyrifos, thiofanate, thiacloprid, and ziram, was incorporated in a standard chow at doses exposing mice to the tolerable daily intake (TDI) of each pesticide. Wild-type (WT) and constitutive androstane receptor-deficient (CAR<sup>-/-</sup>) male and female mice were exposed for 52 wk. We assessed metabolic parameters [body weight (BW), food and water consumption, glucose tolerance, urinary metabolome] throughout the experiment. At the end of the experiment, we evaluated liver metabolism (histology, transcriptomics, metabolomics, lipidomics) and pesticide detoxification using liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS).

**RESULTS:** Compared to those fed control chow, WT male mice fed pesticide chow had greater BW gain and more adiposity. Moreover, these WT males fed pesticide chow exhibited characteristics of hepatic steatosis and glucose intolerance, which were not observed in those fed control chow. WT exposed female mice exhibited fasting hyperglycemia, higher reduced glutathione (GSH):oxidized glutathione (GSSG) liver ratio and perturbations of gut microbiota-related urinary metabolites compared to WT mice fed control chow. When we performed these experiments on CAR<sup>-/-</sup> mice, pesticide-exposed CAR<sup>-/-</sup> males did not exhibit BW gain or changes in glucose metabolism compared to the CAR<sup>-/-</sup> males fed control chow. Moreover, CAR<sup>-/-</sup> females fed pesticide chow exhibited pesticide toxicity with higher BWs and mortality rate compared to the CAR<sup>-/-</sup> females fed control chow.

**CONCLUSIONS:** To our knowledge, we are the first to demonstrate a sexually dimorphic obesogenic and diabetogenic effect of chronic dietary exposure to a common mixture of pesticides at TDI levels, and to provide evidence for a partial role for CAR in an *in vivo* mouse model. This raises questions about the relevance of TDI for individual pesticides when present in a mixture. <https://doi.org/10.1289/EHP2877>

### Introduction

The rates of metabolic disorders, including obesity and its complications, such as type 2 diabetes (T2D) and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), have increased dramatically over the past three decades, especially in developed countries. Genetic factors and changes in lifestyle are key factors in the development of metabolic syndrome. Exposure to environmental contaminants is also suspected to be part of the etiological factors. Experimental and epidemiological studies suggest that some environmental pollutants, such as endocrine-disrupting chemicals (EDCs), may contribute to the onset and progression of obesity, diabetes, and NAFLD by interfering with various aspects of metabolism (Hong et al. 2012). Diethylstilbestrol, bisphenol A, phthalates, or tributyltin, which cause perturbations in endogenous hormonal regulation involved

in weight homeostasis, have recently been reviewed as possible risk factors for obesity (De Long and Holloway 2017; Newbold et al. 2009). Moreover, EDCs are known to affect liver function and, therefore, may contribute to increasing the prevalence of NAFLD worldwide (Polyzos et al. 2012). Hepatic metabolic homeostasis is tightly controlled by various transcription factors sensing hormonal, nutritional, and environmental cues. Among transcription factors, nuclear receptors such as constitutive androstane receptor (CAR) (Qatanani and Moore 2005) and peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) (Desvergne et al. 2006) modulate the expression of genes involved in xenobiotic and energy homeostasis (Evans and Mangelsdorf 2014). Nuclear receptor transcriptional activity is regulated upon binding of small lipophilic ligands that include hormone and metabolites as well as endogenous compounds and xenobiotics.

Pesticides represent an increasingly widespread environmental contamination. Much epidemiological evidence has linked pesticides in water sources, groundwater, and/or foodstuffs with obesity, diabetes, insulin resistance (Casals-Casas and Desvergne 2011; Grün and Blumberg 2009), and NAFLD (Al-Eryani et al. 2015; Arciello et al. 2013; Wahlang et al. 2013). In a human cohort, the weight and body mass index of the offspring significantly correlated with the prenatal maternal levels of dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE), a metabolite of the organochlorine (OC) pesticide dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) (Karmaus et al. 2009). A recent systematic review and meta-analysis clearly supports the hypothesis that environmental or occupational exposure to OC pesticides increases the risk of T2D (Evangelou et al. 2016). Similarly, *in vivo* and *in vitro* experimental studies support the notion that nonpersistent pesticides (e.g., pyrethroids,

Address correspondence to L. Gamet-Payrastré, Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), INRA, Toulouse University UMR 1331, Integrative Toxicology and Metabolism, 180 Chemin de Tournefeuille, 31300 Toulouse, France. Telephone: (33) 582 06 63 51. Email: [laurence.payrastré@inra.fr](mailto:laurence.payrastré@inra.fr)

Supplemental Material is available online (<https://doi.org/10.1289/EHP2877>).

The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Received 22 September 2017; Revised 27 April 2018; Accepted 28 April 2018; Published 25 June 2018.

**Note to readers with disabilities:** *EHP* strives to ensure that all journal content is accessible to all readers. However, some figures and Supplemental Material published in *EHP* articles may not conform to 508 standards due to the complexity of the information being presented. If you need assistance accessing journal content, please contact [ehponline@niehs.nih.gov](mailto:ehponline@niehs.nih.gov). Our staff will work with you to assess and meet your accessibility needs within 3 working days.

organophosphorus, neonicotinoids, dithiocarbamates, carbamates, triazines) are potential contributors to general or hepatic metabolic changes (Bhaskar and Mohanty 2014; Jin et al. 2014; Kim et al. 2013; Seidler and Slotkin 2011; Wang et al. 2014) and obesity (De Long and Holloway 2017; Newbold et al. 2009). However, epidemiological studies have mainly focused on OC pesticides, and evidence on other pesticide classes is limited. Most experimental studies assess the effect of individual compounds, using doses that are often far from the environmental levels to which the general population is exposed. Consumers are mainly exposed through the food chain to mixtures of pesticides at low doses (EFSA 2015) throughout their lifetime, and the consequences of such a chronic exposure on metabolic homeostasis have not been well described. Moreover, the metabolic impact of pesticides has often been observed in combination with other risk factors, such as high-fat diets (Adigun et al. 2010b; Howell et al. 2015; Lassiter et al. 2010; Maqbool et al. 2016) and/or after a relatively short exposure period, never exceeding a few months (Mostafalou and Abdollahi 2017). Finally, animals were often exposed to pesticides via oral gavage, an exposure route that is not representative of consumer exposure, which mainly occurs through food intake.

In the present study, we assessed the metabolic consequences of chronic dietary exposure to a cocktail of pesticides in mice. We selected six pesticides among those used for the treatment of apple orchards in the south of France. Therefore, the pesticide cocktail used may be commonly found in apples in the European Union, as recently described in an European Food Safety Authority (EFSA) report (EFSA 2015). Pesticides were incorporated at nontoxic doses in a standard chow and mice exposed to the tolerable daily intake (TDI) for each of these six individual pesticides. We followed the body weight (BW) and metabolic parameters of male and female mice using both the wild-type (WT) and CAR-deficient (CAR<sup>-/-</sup>) strains over a period of 52 wk, determining, to our knowledge, for the first time, the *in vivo* effect of chronic exposure to a mixture of pesticides at very low doses.

## Methods

### Chemicals

High-purity analytical standards of boscalid, captan, chlorpyrifos (99.2%), thiacloprid, thiophanate, and ziram were purchased from Sigma-Aldrich. Information on the toxicity of pesticides was obtained from Agritox (<http://www.agritox.anses.fr/>).

Methanol was liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS) grade and purchased from Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific). Ultrapure water from the Milli-Q<sup>®</sup> system (Millipore) was used for mobile phases.

### Pesticide Chow

Ziram, thiophanate, captan, chlorpyrifos, boscalid, and thiacloprid belong to various chemical families and are either fungicides or insecticides. Mice were exposed at the TDI of each pesticide as

defined in mg/kg BW per day; the TDIs were those defined by the EFSA until 2014 for humans by the Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization Meeting on Pesticide Residues and extrapolated for mice on the basis of mean BW. To calculate the quantity of pesticide needed to incorporate in rodent pellets to achieve TDI, we assumed a BW of 30 g and a daily food intake of 5 g for all mice. The properties and quantities of each pesticide incorporated in the mouse diet are described in Table 1. Pesticides were dissolved individually in a 9:1 volume/volume (v/v) mixture of methanol:acetone and then mixed together. The solution was dispersed over the vitamin powder [vitaminic mixture 200, Scientific Animal Food Engineering (SAFE)] and then homogenized in a rotavapor (Laborota 4000<sup>TM</sup>; BUCHI Switzerland) for 30 min at 45°C to evaporate the solvents and at room temperature for 50 min. The vitamin powder enriched with pesticides was sent to the Animal Feed Preparation Unit [UPAE; National Institute of Agricultural Research (INRA)] and incorporated into the pellets. Control feed was prepared as described above with the 9:1 methanol:acetone mixture alone. Pesticides present in the diet were quantified by Eurofins using gas chromatography–tandem mass spectrometry and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, and the final concentrations were confirmed, except for ziram, which could not be detected at such low concentration (Table 1). Analysis from Eurofins laboratory confirmed that control feed contained none of the pesticides being studied.

### Animal Experiment

The experimental work on animals was conducted in the Toxalim Unit, INRA, in a conventional laboratory animal room following the European Union guidelines for laboratory animal use and care, and was approved by an independent ethics committee (authorization number 05,185,02). The animals were treated humanely with due consideration to the alleviation of distress and discomfort and housed in polycarbonate cages (Charles River Type S, 424 cm<sup>2</sup>). Eight-week-old female and male C57BL/6J mice were purchased from Janvier Laboratories and acclimatized for 4 wk. CAR-deficient mice (backcrossed on the C57BL/6J background) were engineered in Wei et al. laboratory (Figure S1A–B) and are bred for 10 y in our animal room. Figure S1C confirms that mice were deficient in CAR compared the WT C57BL/6J mice (Wei et al. 2000). The C57BL/6J mice served as WT strain for comparison with the CAR<sup>-/-</sup> mice on the same genetic background (C57BL/6J). Both strains were treated in the same manner and experiments conducted concurrently to allow direct comparison of results. After the initial acclimatization period, all mice were maintained on standard chow for 4 wk (weeks –4 through 0), during which time we monitored BW weekly. At 16 wk of age (week 0), diets were switched to either a pesticide-enriched or -free diet, which was continued for a total of 52 wk to mimic a 30-y exposure in humans (Flurkey et al. 2007). Mice were randomly housed five or four per cage at their receipt (72 WT mice) or at their transfer from the breeding house

**Table 1.** Chemical families, functions, and tolerable daily intake (TDI) (mg/kg body weight (BW)/day) of each pesticide and the expected and measured pesticides concentrations (determined level) ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  food) in the animal pellets.

Pesticide name	Chemical family	Function	TDI (mg/kg BW/day)	Expected quantity ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ food) <sup>a</sup>	Determined level ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ food)
Ziram	Dithiocarbamate	Fungicide	0.006	36	ND <sup>b</sup>
Chlorpyrifos	Organophosphorus	Insecticide	0.01	60	47
Thiacloprid	Neonicotinoid	Insecticide	0.01	60	56
Boscalid	Carboxamide	Fungicide	0.04	240	240
Thiophanate	Benzimidazole	Fungicide	0.08	480	205
Captan	Dicarboximide	Fungicide	0.1	600	165

Note: BW, Body weight; ND, not determined; TDI, tolerable daily intake (<http://www.agritox.anses.fr/>).

<sup>a</sup>Expected quantity refers to the incorporated quantities of pesticides in mice pellets.

<sup>b</sup>Ziram was not present at a detectable level (<0.01 mg/kg).

into the animal room (72  $CAR^{-/-}$  mice) and allowed *ad libitum* access to food and water with a 12-h light/dark cycle ( $23 \pm 2^\circ C$ ). Eight groups of 18 animals each were used in this study: WT males exposed, WT males nonexposed, WT females exposed, WT females nonexposed,  $CAR^{-/-}$  males exposed,  $CAR^{-/-}$  males nonexposed,  $CAR^{-/-}$  females exposed, and  $CAR^{-/-}$  females nonexposed. Mice were randomly distributed into unexposed and exposed groups. In this experiment, we used a standard synthetic diet from Animal Feed Preparation Unit (UPAE, INRA). This diet is composed of 63% carbohydrate, 5% fat, 22% protein, 2% cellulose, 1% vitamins (Safe 200, SAFE) and 7% minerals (Safe 205b, Safe France).

During the 6th, 26th, and 48th weeks of exposure, the mice were placed in individual metabolic cages (Tecniplast France) to obtain 24-h urine samples to use for metabolomics and mass spectrometry. The samples were stored at  $-80^\circ C$  until analysis. After 52 wk of exposure, 4 to 5 mice from each experimental group were daily randomly sacrificed (in total, 16 to 20 animals from the four experimental groups were sacrificed per day) by cervical dislocation at Zeitgeber time 17 (i.e., in the fed state) at which hepatic activities are optimal (Lu et al. 2013). Blood was collected from the submandibular vein with a lancet into lithium heparin-coated tubes (BD Microtainer<sup>®</sup>; BD). Plasma was prepared by centrifugation (1,500 g; 10 min;  $4^\circ C$ ) and stored at  $-80^\circ C$  to be used for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), biochemical analysis, and metabolomics. Liver samples were collected, weighed, snap-frozen in liquid nitrogen, and kept at  $-80^\circ C$  for further analyses (liver neutral lipid analyses, lipidomics, microarray, and metabolomics). Subcutaneous and epididymal white adipose tissue (WAT) were collected and weighed. Liver samples (50 mg) were fixed in formaldehyde (4%) for 24 h and embedded in paraffin for histology.

#### Glucose Tolerance Test

All experiments were performed on conscious mice. For the oral glucose tolerance test at weeks 36 and 48 or the intraperitoneal glucose tolerance test at week 16, mice were fasted for 6 h and received an oral (2 g/kg BW) or intraperitoneal (1 g/kg BW) glucose load. Blood glucose was measured at the tail vein using an Accu-Check<sup>®</sup> Performa glucometer (Roche Diagnostics) 15 min prior to and at 0, 15, 30, 45, 60, 90, and 120 min after the glucose load.

#### Plasma Analysis

Plasma insulin was assayed after 52 wk of pesticide exposure using the ultrasensitive mouse insulin ELISA kit (EMD Millipore) following the manufacturer's instructions. Aspartate transaminase, alanine transaminase (ALT), total cholesterol, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, free fatty acids (FFAs), and triglycerides (TGs) were determined using a Pentra 400 biochemical analyzer (HORIBA, Montpellier, France; Anexplo facility, Toulouse, France).

#### Liver Neutral Lipid Analysis

Hepatic lipid contents were determined at the end of the experiment as described elsewhere (Bligh and Dyer 1959). Briefly, following homogenization of tissue samples in 2:1 (v/v) methanol/ethylene glycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ether)- $N,N,N',N'$ -tetraacetic acid (EGTA; 5 mM), lipids corresponding to an equivalent of 2 mg of tissue were extracted according to Bligh and Dyer in chloroform:methanol:water (2.5:2.5:2.1, v/v/v) in the presence of the internal standards glyceryltrimonadecanoate, stigmasterol, and cholesteryl heptadecanoate (Sigma). TGs, free cholesterol, and cholesterol esters were analyzed by gas chromatography on a Focus Thermo Electron system using a Zebron-1 Phenomenex

(Phenomenex Zebron-1, England) fused-silica capillary column [5 m; 0.32 mm internal diameter (i.d.); 0.50  $\mu m$  film thickness]. The oven temperature was programmed from 200 to  $350^\circ C$  at a rate of  $5^\circ C/min$ , and the carrier gas was hydrogen (0.5 bar). The injector and detector were at  $315^\circ C$  and  $345^\circ C$ , respectively.

#### Liver Fatty Acid Analysis

To measure all hepatic fatty acid methyl ester (FAME) molecular species, lipids that corresponded to an equivalent of 1 mg of liver were extracted in the presence of the internal standard glyceryl triheptadecanoate (2  $\mu g$ ). The lipid extract was transmethylated with 1 mL boron trifluoride ( $BF_3$ ) in methanol (14% solution; Sigma) and 1 mL heptane for 60 min at  $80^\circ C$  and evaporated to dryness. The FAMES were extracted with heptane/water (2:1). The organic phase was evaporated to dryness and dissolved in 50  $\mu L$  ethyl acetate. A sample (1  $\mu L$ ) of total FAME was analyzed with gas-liquid chromatography [Clarus 600 system (PerkinElmer), with FAMEWAX fused silica capillary columns (Restek), 30 m  $\times$  0.32 mm i.d., 0.25  $\mu m$  film thickness]. Oven temperature was programmed to increase from  $110^\circ C$  to  $220^\circ C$  at a rate of  $2^\circ C/min$ , and the carrier gas was hydrogen [7.25 pounds per square inch (psi)]. Injector and detector temperatures were  $225^\circ C$  and  $245^\circ C$ , respectively.

#### Liver Phospholipid and Sphingolipid Analysis

The liquid chromatography solvent acetonitrile was high-performance liquid chromatography (HPLC) grade and purchased from Acros Organics. Ammonium formate (>99%) was supplied by Sigma-Aldrich. Synthetic lipid standards [ceramide (Cer) d18:1/18:0, Cer d18:1/15:0, phosphatidylethanolamine (PE) 12:0/12:0, PE 16:0/16:0, phosphatidylcholine (PC) 13:0/13:0, PC 16:0/16:0, sphingomyelin (SM) d18:1/18:0, SM d18:1/12:0] were purchased from Avanti Polar Lipids.

Lipids were extracted from the liver (2 mg) as described by Bligh and Dyer (1959) in dichloromethane/methanol (2% acetic acid)/water (2.5:2.5:2 v/v/v). Internal standards were added (Cer d18:1/15:0, 16 ng; PE 12:0/12:0, 180 ng; PC 13:0/13:0, 16 ng; SM d18:1/12:0, 16 ng; PI 16:0/17:0, 30 ng; PS 12:0/12:0, 156.25 ng). The solution was centrifuged at 1,500 rpm for 3 min. The organic phase was collected and dried under azote, then dissolved in 50  $\mu L$  MeOH. Sample solutions were analyzed with an Agilent 1290 UPLC system coupled to a G6460 triple quadrupole spectrometer (Agilent, version 2.1). MassHunter software was used for data acquisition and analysis. A Kinetex<sup>®</sup> HILIC column (Phenomenex; 50  $\times$  4.6 mm; 2.6  $\mu m$ ) was used for LC separations. The column temperature was maintained at  $40^\circ C$ . The mobile phase, A, was Acetonitrile; and B was 10 mM ammonium formate in water at pH 3.2. The gradient was as follows: from 10% to 30% B in 10 min, 100% B from 10 to 12 min, and then back to 10% B at 13 min for 1 min to re-equilibrate prior to the next injection. The flow rate of the mobile phase was 0.3 mL/min, and the injection volume was 5  $\mu L$ . An electrospray source was employed in positive (for Cer, PE, PC, and SM analysis) or negative ion mode (for PI and PS analysis). The collision gas was nitrogen. Needle voltage was set at +4,000 V. Several scan modes were used. First, to obtain the naturally different masses of different species, we analyzed cell lipid extracts with a precursor ion scan at 184 mass-to-charge ratio ( $m/z$ ), 241  $m/z$ , and 264  $m/z$  for PC/SM, PI, and Cer, respectively. We performed a neutral loss scan at 141  $m/z$  and 87  $m/z$  for PE and PS, respectively. The collision energy optimums for Cer, PE, PC, SM, PI, and PS were 25 eV, 20 eV, 30 eV, 25 eV, 45 eV, and 22 eV, respectively. Then the corresponding Single Reaction Monitoring (SRM) transitions were used to quantify different phospholipid species for each class. Two Multiple Reaction Monitoring (MRM) acquisitions were necessary, due to important differences between

phospholipid classes. Data were treated with QqQ Quantitative (version B.05.00; Agilent) and Qualitative analysis software (version B.04.00; Agilent).

### Histology

Paraformaldehyde-fixed, paraffin-embedded liver tissue was sliced into 3- $\mu\text{m}$  sections, deparaffinized, rehydrated, and then stained with hematoxylin and eosin for histopathological analysis. The staining was visualized with a Leica microscope DM4000 B equipped with a Leica DFC450 C camera (Leica Microsystems). The 72 slides (one slide per animal, 18 slides per groups, and four groups: WT males and females fed control or pesticide chow) were full-blind analyzed by two individuals (C.L. and L.G.P.), and observations were approved by an histopathologist (T.A.S.). The score of steatosis was calculated according to the Kleiner method (Kleiner et al. 2005) and was the sum of three scores using the entire slice field: (a) the first score was defined according to the surface covered by lipid droplets (i.e., a surface of lipid droplet <5% of the entire slice correspond to a score 0; a surface of lipid droplet >66% of the entire slice correspond to a score 3); (b) for the second score, a predominant azonal distribution pattern of lipid droplets was graded with the highest value (score 3); and (c) the third score quantified the presence (score 1) or absence (score 0) of microvesicles.

### Gene Expression Studies

RNAs were extracted from liver samples collected at the end of the exposure in WT and CAR<sup>-/-</sup> females and males fed control or pesticide chow using the method (Chomczynski and Sacchi 1987) with TRI Reagent<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich). RNAs were quantified using nanodrop (NanoDrop<sup>™</sup> 1000; Thermo Scientific). Two micrograms of total RNA were reverse transcribed using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems<sup>™</sup>). The SYBR Green (Applied Biosystems, California) assay primers are presented in Table S1. Amplification was performed using an ABI Prism 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems<sup>™</sup>). Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) data were normalized to TATA-box-binding protein mRNA levels and analyzed with LinRegPCR (version 2015.3; Jan Ruijter) to get mean efficiency (NO), which is calculated as follows:  $\text{NO} = \text{threshold} / (\text{Eff mean}^{\text{Cq}})$  with Eff mean: mean PCR efficiency and CQ: quantification cycle.

### Microarray Gene Expression Studies

Gene expression profiles were obtained for six liver samples per group at the GeT-TRiX facility (GénoToul, Gépole Toulouse Midi-Pyrénées, France) using Sureprint G3 Mouse GE v2 microarrays (8x60K; design 074,809; Agilent) following the manufacturer's instructions. For each sample, Cyanine-3 (Cy3)-labeled complementary RNA (cRNA) was prepared from 200 ng of total RNA using the One-Color Quick Amp Labeling kit (Agilent) according to the manufacturer's instructions, followed by Agencourt RNAClean XP (Beckman Coulter Inc.). Dye incorporation and cRNA yield were checked using a Dropsense<sup>™</sup> 96 ultraviolet/visible (VIS) droplet reader (Trinean). A total of 600 ng of Cy3-labeled cRNA was hybridized on the microarray slides following the manufacturer's instructions. Immediately after washing, the slides were scanned on an Agilent G2505C Microarray Scanner using Agilent Scan Control A.8.5.1 software and the fluorescence signal extracted using Agilent Feature Extraction software (version 10.10.1.1) with default parameters. Microarray data and experimental details are available in National Center for Biotechnology Information's Gene Expression Omnibus (Edgar et al. 2002) and are accessible through GEO Series

accession number GSE (GSE101405; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE101405>).

Microarray data were analyzed using R (version 3.1.2; R Development Core Team) Bioconductor packages (version 3.0) as described in GEO accession GSE 101,405. Raw data (median signal intensity) were filtered,  $\log_2$  transformed, and normalized using the quantile method (Bolstad et al. 2003). A model was fitted using the limma lmf function (Smyth 2004). Pair-wise comparisons between biological conditions were applied using specific contrasts. A correction for multiple testing was applied using the Benjamini-Hochberg procedure (Klipper-Aurbach et al. 1995) for false discovery rate. Hierarchical clustering was applied to the samples and the differentially expressed probes using 1-Pearson correlation coefficient as distance and Ward's criterion for agglomeration. The clustering results are illustrated as a heatmap of expression signals. Functional annotation clustering of GO Biological Process were performed using DAVID Bioinformatics Resources 6.7 (Huang et al. 2009a, 2009b).

### Proton Nuclear Magnetic Resonance (<sup>1</sup>H-NMR) Based Metabolomics

Urine, plasma, and liver polar extracts were prepared for NMR analysis as described previously (Beckonert et al. 2007). All <sup>1</sup>H-NMR spectra were obtained on a Bruker DRX-600-Avance NMR spectrometer (Bruker) using the AXIOM metabolomics platform (MetaToul) operating at 600.13 MHz for <sup>1</sup>H resonance frequency using an inverse detection 5-mm <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-<sup>15</sup>N cryoprobe attached to a cryoplatfom (the preamplifier cooling unit). The <sup>1</sup>H-NMR spectra were acquired at 300 K using a standard one-dimensional noesypr1D pulse sequence with water presaturation and a total spin-echo delay (2  $\pi\tau$ ) of 100 ms. A total of 128 transients were collected into 64,000 data points using a spectral width of 12 pulses/s, a relaxation delay of 2.5 s, and an acquisition time of 2.28 s. <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H TCOSY, and <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC) were obtained for each biological matrix on one representative sample for metabolite identification.

Data were analyzed by applying an exponential window function with a 0.3-Hz line broadening prior to Fourier transformation. The resultant spectra were phased, baseline corrected, and calibrated to trimethylsilylpropanoic acid (TSP) ( $\delta$  0.00 ppm) manually using Mnova NMR (version 9.0; Mestrelab Research S.L.). The spectra were subsequently imported into MatLab (R2014a; MathsWorks, Inc.). All data were analyzed using full-resolution spectra. The region containing the water resonance ( $\delta$  4.6–5.2 ppm) was removed, and the spectra were normalized to the probabilistic quotient (Dieterle et al. 2006) and aligned using a previously published function (Veselkov et al. 2009).

Data were mean-centered and scaled using the unit variance scaling prior to analysis with orthogonal projection on latent structure-discriminant analysis (O-PLS-DA). <sup>1</sup>H-NMR data were used as independent variables (X matrix) and regressed against a dummy matrix (Y matrix) indicating the class of samples (mice fed control or pesticide chow) (Trygg and Wold 2002). The O-PLS-derived model was evaluated for goodness of prediction ( $Q^2$  Y value) using  $n$ -fold cross-validation, where  $n$  depends on the sample size. The parameters of the final models are indicated in the figure legends. To identify metabolites responsible for discrimination between the groups, the O-PLS-DA correlation coefficients ( $r^2$ ) were calculated for each variable and back-scaled into a spectral domain so that the shapes of the NMR spectra and the signs of the coefficients were preserved (Cloarec et al. 2005b, 2005a). The weights of the variables were color-coded according to the square of the O-PLS-DA correlation coefficients. Correlation coefficients extracted from significant models were filtered so that only

significant correlations above the threshold defined by Pearson's critical correlation coefficient ( $p < 0.05$ ;  $|r| > 0.7$ ; for  $n = 8$  per group) were considered significant. For illustration purposes, the area under the curve of several signals of interest was integrated and significance tested with the *t*-test.

NMR data are freely available at MetaboLights (<http://www.ebi.ac.uk/metabolights/>) under the accession number MTBLS602.

### Mass Spectrometry

Urine from seven to eight mice per group was screened for pesticides and their metabolites using liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (HPLC-HRMS). The chromatographic system consisted of a RSLC3000 UHPLC (Thermo Scientific) operating with an Hypersil Gold C18 column (100 × 2.1 mm; 1.9 μm) (Thermo Scientific). A gradient program of (A) H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>3</sub>COOH (95:5:0.1, v/v/v) and (B) CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>3</sub>COOH (1,000:1, v/v) was used at 40°C and a flow rate of 0.3 mL/min as follows: 0 min, 0% B; from 30 to 35 min, 100% B; and from 36 to 45 min, 0% B. A volume of 10 μL of each sample diluted twice with mobile phase A injected. The mass spectrometer was an LTQ Orbitrap XL™ (Thermo Scientific) fitted with an electrospray ionization source (ESI) operating in the negative mode. ESI parameters were set as follows: spray voltage, 4 kV; sheath gas flow rate (N<sub>2</sub>), 55 arbitrary units (a.u.); auxiliary gas flow rate (N<sub>2</sub>), 10 a.u.; capillary temperature, 300°C; capillary voltage, -40 V; and tube lens offset, -200 V. High-resolution mass spectra were acquired between *m/z* 80 and 800 at a resolution of 30,000. The mass spectrometer was calibrated using the Thermo Scientific calibration solution in agreement with their protocol. Tandem mass spectrometry (MS-MS) spectra were obtained using the collision-induced dissociation mode of the ion trap analyzer at low resolution and a normalized collision energy of 25%.

Data were extracted from mass spectrometry acquisition files using *xcms* software, version 3.5 (Scripps Research Institute, La Jolla, CA) (Smith et al. 2006) with centwave algorithm (Tautenhahn et al. 2008). To avoid the effect of urine dilution, variation among sample data was normalized using probabilistic quotient normalization (Dieterle et al. 2006). In the resulting normalized data, univariate analysis of variance was used to study the effect of sex on the different molecule intensities. All these data analysis steps were performed using *workflow4metabolomics*, a collaborative portal dedicated to metabolomics data processing (Giacomini et al. 2015).

HPLC-HRMS data were analyzed using a methodology previously developed for exposomics studies (Jamin et al. 2014). From the six studied pesticides, a list of suspected metabolites was compiled from previously described metabolites of these pesticides, as well as all other putative phase II metabolites (Table S2). Thus, the signals of 16 compounds were monitored for the metabolism of boscalid (15 metabolites + the parent molecule), 13 for thiachlopride (12 metabolites + the parent molecule), 30 for captan (29 metabolites + the parent molecule), 9 for thiophanate (8 metabolites + the parent molecule), 4 for chlorpyrifos (3 metabolites + the parent molecule), and 9 for ziram (9 metabolites). However, standards of these metabolites are not commercially available. In this study, a direct comparison with nonexposed animals was used as a validation strategy. From data extracted with *xcms*, 16 features matched the theoretical *m/z* of monitored compounds with a mass precision <5 ppm. MS-MS experiments were performed to confirm the identity of suspected compounds. Conjugation to glucuronic acid was confirmed by detection of the characteristic loss of 176 unified atomic mass (u), the conjugation to sulphate confirmed by the loss of 80 u, and the conjugation to mercapturic acid confirmed by the loss of 129 u. Concerning captan metabolites, MS-MS spectra of the ion detected at *m/z* 150.0564,

corresponding to the in-source fragmentation of sulfate and glucuronic conjugates of tetrahydrophthalimide (THPI), showed a loss of 43 u corresponding to neutral isocyanic acid CONH, validating the identification of these metabolites. Finally, seven features were confirmed by MS-MS experiments, corresponding to five metabolites: two metabolites of captan {[M-H]<sup>-</sup> and [(M-SO<sub>3</sub>)-H]<sup>-</sup> of THPI conjugated to sulphate and [(M-GlcAc)-H]<sup>-</sup> of THPI conjugated to glucuronic acid}, one metabolite of chlorpyrifos {[M-H]<sup>-</sup> of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol}, and two metabolites of boscalid {[M-H]<sup>-</sup> and [(M-GlcAc)-H]<sup>-</sup> of 2-chloro-*N*-(4'-chloro-5-hydroxybiphenyl-2-yl)nicotinamide conjugated to glucuronic acid and the [M-H]<sup>-</sup> of the mercapturic conjugation of boscalid}. Structures are available in Figure S2A-B. HRMS and MS-MS data are freely available at MetaboLights (<http://www.ebi.ac.uk/metabolights/>) under the accession number MTBLS596.

### Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism for Windows (version 4.00; GraphPad Software). One-way or two-way analysis of variance (ANOVA) was performed, followed by appropriate posthoc tests (Dunn's or Bonferroni) when differences were found statistically significant. When only two groups were compared, the student's *t*-test was used;  $p < 0.05$  was considered significant.

## Results

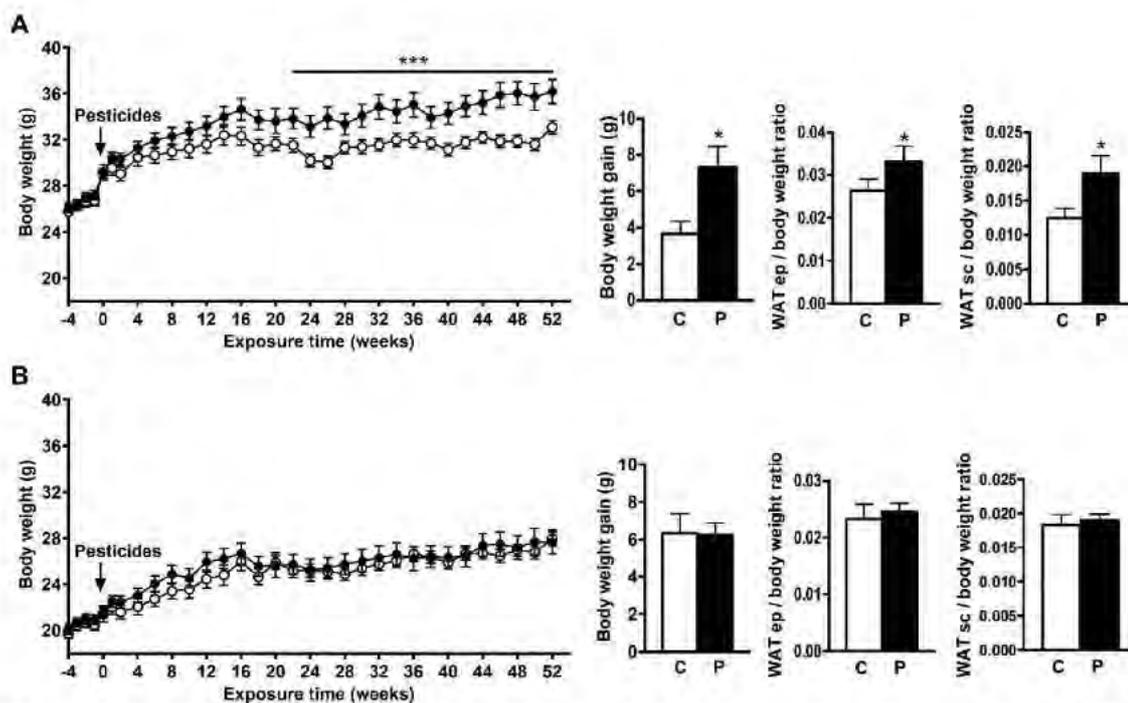
### Body Weight and White Adipose Tissue Gain in Wild-Type Mice Exposed to Pesticide Chow Compared to Those Fed Control Chow

Pesticide levels were assessed in pellets before the beginning of the experiment (Table 1), and we confirmed that pesticides were present in the diet at levels significantly below the expected quantities. We calculated the actual pesticide levels to which mice were exposed after accounting for actual animal BW and food intake during the exposure (Figure S3A). We confirmed that males and females were exposed to similar levels of pesticides and that these levels were below the TDI for each pesticide (Figure S3B).

Beginning at 20 wk postexposure and through the end of the exposure period, male WT mice fed the pesticide mixture gained significantly more weight than those fed the control chow (Figure 1A). After 52 wk of exposure, the BW gain in exposed male mice was twice that of the male mice fed control chow (7.3 ± 1.2 g vs. 3.65 ± 0.7 g, respectively). Epididymal and subcutaneous WAT weights were significantly higher in exposed WT male mice than the WT males fed control chow group (subcutaneous WAT: 0.019 ± 0.003 g vs. 0.012 ± 0.001 g; epididymal WAT: 0.033 ± 0.004 g vs. 0.026 ± 0.003 g; Figure 1A). As shown in Figure S4, WT male and female fed control chow mice had distinct food and water consumption patterns, and specifically female mice fed control chow consumed more food and less water over the period evaluated. Food intake was not different in WT male or female mice fed pesticide chow compared to those fed control chow (Figure S4). WT female mice fed pesticide chow consumed more water than those fed the control chow. In contrast, WT female mice did not exhibit any significant changes in BW or fat mass upon exposure to pesticides (Figure 1B). No cage effect in BW was observed during the experience in WT male fed control or pesticide chow (Figure S5A) and in WT female fed control or pesticide chow (Figure S5B).

### Glucose Tolerance and Fasting Glucose Levels in Mice Fed Control or Pesticide Chow

We evaluated the fasting blood glucose and glucose tolerance of WT male and female mice fed control or pesticide chow (Figure 2).



**Figure 1.** Body weight and white adipose tissue (WAT) weight in male (A) and female (B) wild-type mice. The line graphs show body weight (BW) for pesticide-exposed mice (black circles) and mice fed control chow (white circles) from 4 wk prior to exposure through 52 wk. The bar graphs show the gains in BW and epididymal (ep) and subcutaneous (sc) white adipose tissue (WAT) for pesticide-exposed mice (P) and mice fed control chow (C) after 52 wk. Data are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean. \* $p < 0.05$  compared to mice fed control chow as determined by a student's *t*-test. \*\*\* $p < 0.001$  compared to mice fed control chow as determined by analysis of variance (ANOVA).  $n = 18$  mice per group.

At 16, 36, and 48 wk of exposure, WT male mice fed pesticide chow exhibited significantly higher blood glucose following a glucose load compared to those fed control chow (Figure 2A). In addition, at 36 and 48 wk of exposure, WT male mice fed pesticide chow had significantly higher fasting blood glucose (145  $\pm$  6 mg/dL and 163  $\pm$  8 mg/dL, respectively) compared to those fed control chow (124  $\pm$  4 mg/dL and 118  $\pm$  9 mg/dL, respectively) (Figure 2C). WT female mice fed pesticide chow also exhibited significantly higher fasting blood glucose at 36 and 48 wk (Figure 2D) and significantly higher blood glucose after a glucose load at 48 wk (Figure 2B) (182  $\pm$  8 mg/dL and 172  $\pm$  9 mg/dL at 36 and 48 wk, respectively) compared to those fed control chow (142  $\pm$  6 mg/dL and 144  $\pm$  7 mg/dL at 36 and 48 wk, respectively). After 16, 36, and 48 wk of exposure, WT female mice exhibited significantly higher fasting blood glucose than WT male mice (Table S3). This difference was observed in both mice that were fed pesticide chow and those fed control chow. No significant differences in insulin levels were observed in WT males (Figure S6A) or females (Figure S6B) fed pesticide chow compared to those fed control chow. Further biochemical analyses of serum revealed significantly higher ALT activity in WT males fed pesticide chow than in those fed control chow (Figure 3A).

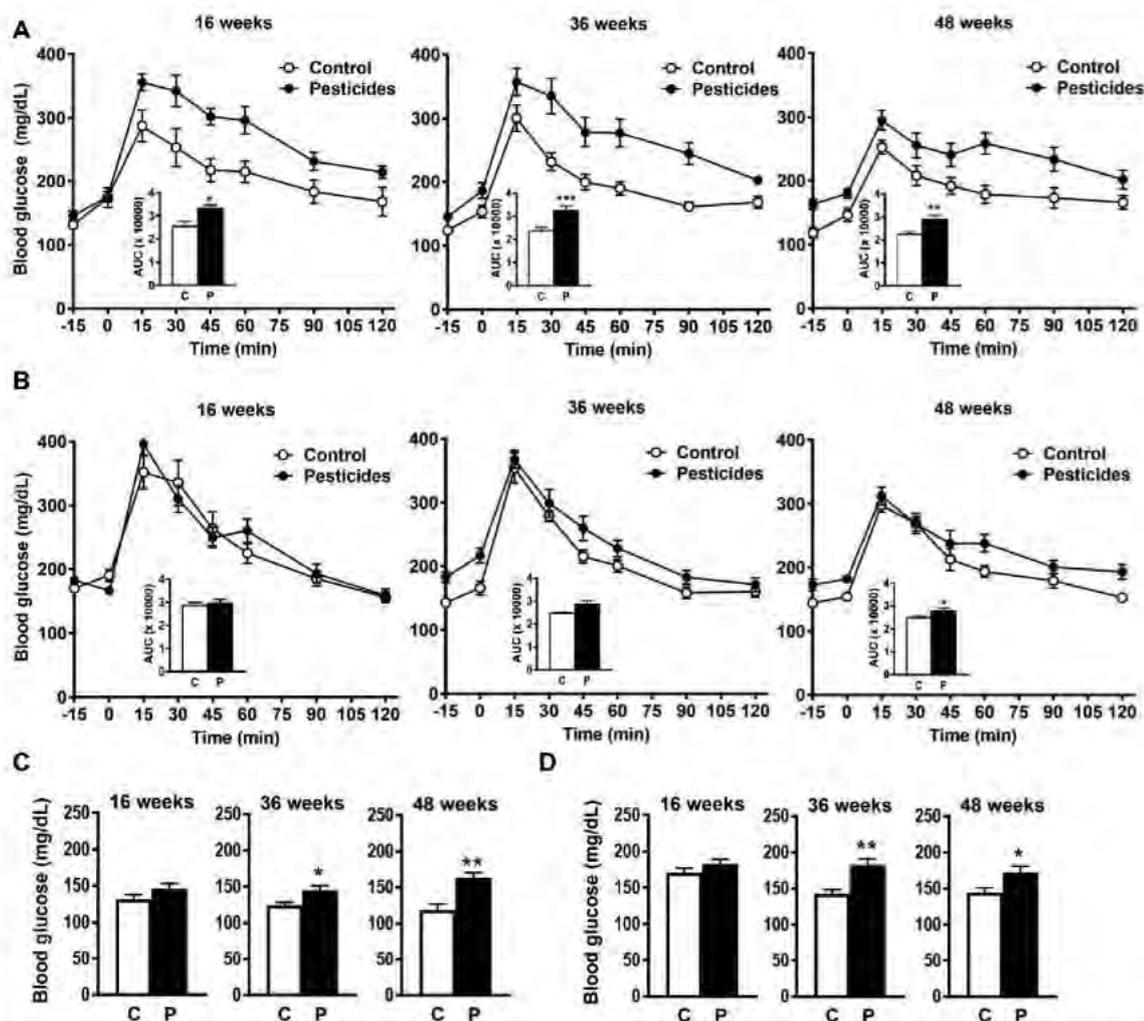
#### Effect of Eating Pesticide Chow on Liver Metabolism

We further investigated pesticide-induced metabolic perturbations in the liver. Hematoxylin and eosin staining revealed that the livers from pesticide-exposed male mice presented hepatocellular vacuolizations localized predominantly in the centrilobular zone, characteristic of an emerging steatosis (Figure 3A). The steatosis score, calculated using the Kleiner method as described

in the "Material and Methods" section (Kleiner et al. 2005), was 0.47  $\pm$  0.32 in WT males fed control chow and 2.56  $\pm$  0.71 in exposed WT male mice. Importantly, exposed male mice had significantly higher levels of hepatic TGs than unexposed male mice (445.7  $\pm$  90.8 vs. 195.9  $\pm$  16.6  $\mu$ g/mg liver) (Figure 3A). This difference in hepatic TGs between exposed and unexposed males (Figure 3A) correlated with weak but significant differences in serum FFAs and TG levels (Figure S7A) between the two groups without significant impact on the plasma metabolome (Figure S8A). Plasma analysis revealed no significant differences in total or HDL and LDL cholesterol (Figure S7B) between male mice fed pesticide and those fed control chow.

By contrast, females fed the pesticide chow did not exhibit observable differences in liver histology, with steatosis scores of 2.53  $\pm$  0.39 compared to 2.23  $\pm$  0.49 for mice fed control chow (Figure 3C). Moreover, female mice fed pesticide chow did not exhibit higher hepatic TGs or ALT than those fed control chow. Plasma analysis revealed no significant differences in FFA or TG (Figure S7C) or total or HDL cholesterol (Figure S7D) between female mice fed pesticide and those fed control chow, and <sup>1</sup>H-NMR showed no significant differences in plasma metabolomics (Figure S8B). Exposed females exhibited a slight decrease of LDL cholesterol compared to animals fed control chow (Figure S7D).

Extensive lipid profiling revealed distinct hepatic lipid profiles for WT male and female mice that were fed control and pesticide chow for 52 wk (Figure S9A). Cluster 5 showed lipid species specifically down-regulated in WT males exposed to pesticides. Exposure to pesticide mixture led in WT males to slight but significant changes in the relative PS32:0, PS34:0, and PS36:1 abundance (Figure S9B). Cluster 4 showed lipid species



**Figure 2.** Fasting blood glucose in male (A and C) and female (B and D) mice after administration of an intraperitoneal [1 g/kg body weight (BW); 16 wk] or an oral (2 g/kg BW; 36 and 48 wk) glucose load. (A and B) Line graphs show blood glucose 15 min before and up to 120 min after administration of glucose load. Inset shows the area under the curve for mice fed control chow (C) and those fed pesticide chow (P). (C and D) Bar graphs show blood glucose before administration of glucose load and after a 6-h fasting period in mice fed control chow (C) and in those fed pesticide chow (P). Results are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean. \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$  \*\*\* $p < 0.001$ .  $p$ -Values represent the difference between mice fed pesticide chow and those fed control chow as determined using a student's  $t$ -test.  $n = 18$  mice per group.

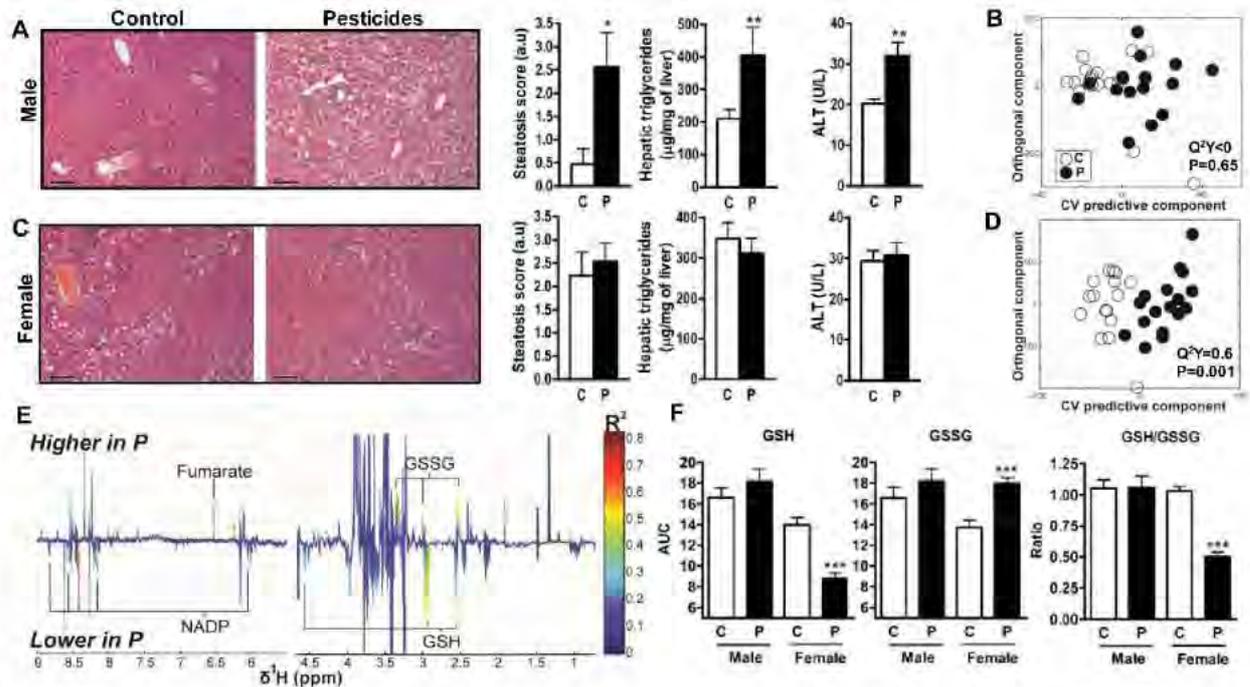
up-regulated in WT males and females exposed to pesticides. It is noteworthy that pesticide exposure led in both WT males and females to increased abundance of SM18:1/16:0, PC30:0, and PC32:0 (Figure S9C). Lipid species down-regulated in WT males and females exposed to pesticides (cluster 2) were C18:2n-6, Cer d18:1/26:1, and SM18:1/24:1 (Figure S9D). The relative TG51, TG53, PI36:0 abundance (Cluster 1) was up-regulated in WT males exposed to pesticides, while exposed WT females exhibited higher PI36:0 (Figure S9E).

### <sup>1</sup>H-NMR Metabolomics

We used <sup>1</sup>H-NMR-based metabolomics of aqueous liver extracts to evaluate the metabolic profiles of WT male (Figure 3B) and female (Figure 3D) mice fed control or pesticide chow for 52 wk. Whereas there was no significant difference detected in male mice (Figure 3B), we observed a clear discrimination between the metabolic profiles of female mice fed control and pesticide chow (see also partially assigned 600 MHz 1D NMR spectra of

aqueous liver extract in Figure S10A and <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C assignments for identified metabolites in Table S4). Analysis of the discriminant metabolites revealed higher levels of fumarate and oxidized glutathione (GSSG) and lower levels of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate and reduced glutathione (GSH) in the livers of pesticide-exposed females (Figures 3E and 3F). Thus, the GSH/GSSG ratio was significantly lower in the livers of exposed females (Figure 3F).

<sup>1</sup>H-NMR metabolomics of urinary samples was performed after 6 wk, 24 wk, and 48 wk of exposure (Figure 4, Figure S10B, and Table S5). We did not observe any significant difference in the endogenous urinary metabolic profiles of exposed and nonexposed males (Figure 4A). In contrast, and confirming our previous metabolomics observations in liver extracts, pesticide exposure induced significant urinary metabolic changes in females. After only 6 wk of exposure, an O-PLS-DA statistical model was fitted that could significantly discriminate exposed females from their nonexposed counterparts (parameters of the O-PLS-DA model:  $Q^2Y = 0.23$ ;  $p = 0.04$ ; Figure 4B). The metabolic profiles were differentiated mainly by the level of



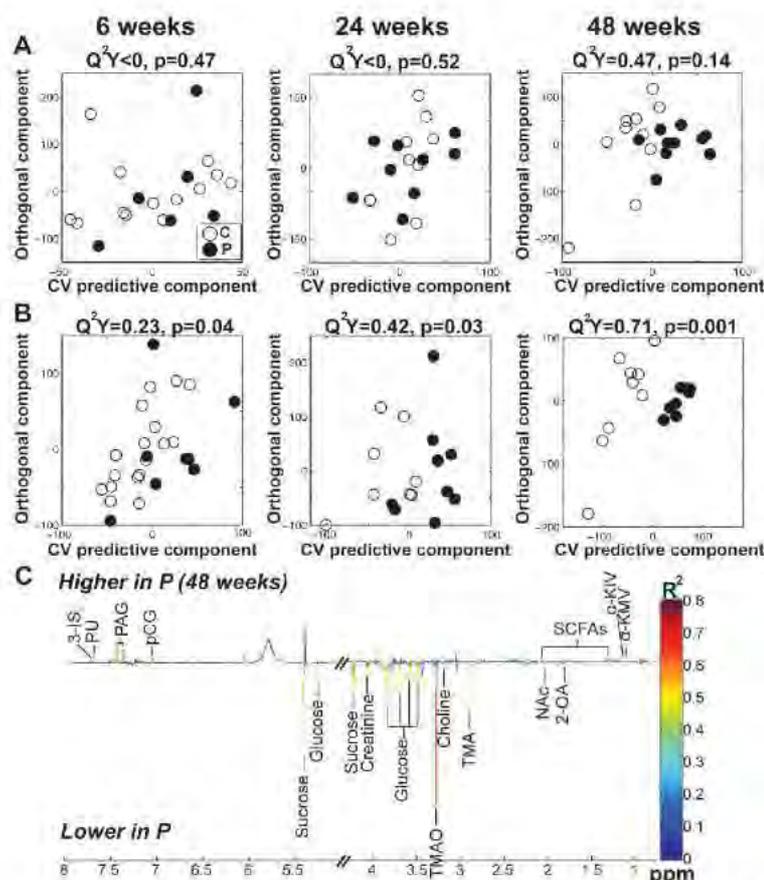
**Figure 3.** Evaluation of hepatic steatosis and oxidative stress in male and female mice fed either control chow (C) or pesticide chow (P) for 52 wk. (A and C) Histopathology, steatosis score, hepatic triglycerides (TGs), and alanine transaminase (ALT) levels in male (A) and female (C) mice. Scale bar represents 100  $\mu\text{m}$ . (B and D) Orthogonal projection on latent structure-discriminant analysis (O-PLS-DA) score plots derived from the liver extract  $^1\text{H-NMR}$ -based spectra of male (B) and female (D) mice.  $Q^2Y$  represents the goodness of fit for the PLS-DA models, and  $p$ -values were derived using 1,000 permutations of the  $Y$  matrix. (E) Coefficient plots related to the O-PLS-DA models discriminating between wild-type (WT) control and WT exposed females. Figure shows the discriminant metabolites that are higher or lower in WT fed pesticide chow (P) compared to WT fed control chow. Metabolites are color-coded according to their correlation coefficient, red indicating a very strong positive correlation ( $R^2 > 0.65$ ). The direction of the metabolite indicates the group with which it is positively associated as labeled on the diagram. (F) Area under the curve of the  $^1\text{H-NMR}$  spectra was integrated for the glutathione signals (GSSG, oxidized form, multiplet at 4.75 ppm; GSH, reduced form, multiplet at 4.56 ppm). Data are presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean. \* $p < 0.05$  \*\*\* $p < 0.001$ .  $p$ -Values represent the difference between mice fed pesticide chow and those fed control chow as determined using a student's  $t$ -test.  $n = 18$  mice per group.

2-ketoacidipic acid (2-KAA), the identification of which was confirmed by additional two dimensional sequences and spike in NMR experiments (Figures S11A and B). This metabolite was undetectable in urine samples from male mice (both those fed control and those fed pesticide chow), whereas females mice (both those fed control and those fed pesticide chow) exhibited high levels of 2-KAA at the beginning of the experiment (e.g., week 6; Figure S12). This metabolite decreased gradually upon pesticide exposure, with a 10-fold difference in 2-KAA levels between exposed and nonexposed female mice at 48 wk (Figure S12). At the end of the experiment, the metabolic profiles of WT females fed control and pesticide chow were distinct (parameters of the PLS-DA model:  $Q^2Y = 0.71$ ;  $p = 0.001$ ; Figure 4C). WT-exposed females clearly exhibited higher urinary levels of branched-chain keto acids ( $\alpha$ -ketoisovalerate,  $\alpha$ -keto- $\beta$ -methyl-N-valerate, and  $\alpha$ -ketoisocaproate) and lower levels of sucrose, glucose, and creatinine than WT females fed control chow (Table S5). We also observed in WT exposed females lower choline levels and its main metabolites, trimethylamine and trimethylamine oxide, which are both derived from dietary choline fermentation by commensal bacteria than in WT females fed control chow (Craciun and Balskus 2012). Other metabolites levels in the urine of pesticide-treated WT females, including the indole derivative 3-indoxyl sulphate and phenyl derivatives phenylacetylglycine and  $p$ -cresol glucuronide, which have been demonstrated to be derived from host gut microbiota co-metabolism, were higher than in WT female fed control chow (Wikoff et al. 2009). These gut microbiota-related metabolites were significantly different between WT females fed pesticide and WT females fed control chow after only 48 wk of pesticide exposure.

### Nuclear Receptor Activation in Female and Male Mice

To further investigate the mechanisms involved in the sexually dimorphic response to pesticides, we examined the hepatic transcriptome through microarray analysis of six samples per group. Differentially expressed genes were classified using hierarchical clustering, which illustrated distinct gene regulation in response to pesticides between the two sexes (Figure 5A). One hundred and two probes were selected as differentially regulated in response to pesticide exposure in males and females ( $p < 0.001$  and  $|\text{fold change}| > 1.5$ ). Six clusters of genes were identified (Figure 5A); clusters 1 and 4 clearly highlight genes down-regulated upon pesticide exposure in WT males and females, respectively. Clusters 5 in WT females and clusters 3 and 6 in WT males show genes whose expression was up-regulated in response to pesticides. The Venn diagram in Figure 5B represents the numbers of hepatic genes specifically upregulated in response to pesticides in male and female mice selected with a  $p$ -value  $< 0.05$  in order to get a larger regulated gene sampling. A total of 536 genes (43%) were significantly up-regulated in females and 670 (54%) in males upon pesticide exposure, among which only 43 were common between the two sexes (Figure 5B). For the down-regulated genes, 511 (36.4%) were significantly altered in females, 853 (60.8%) significantly altered in males, and 38 were common (Figure S13).

Pathway enrichment analysis identified the top biological functions associated with the genes identified as up-regulated in response to pesticide exposure for WT male and female mice (Figure 5C). In WT pesticide-exposed male mice, we observed



**Figure 4.** Orthogonal projection on latent structure-discriminant analysis (O-PLS-DA) score plots derived from the  $^1\text{H-NMR}$  spectra of urine from male (A) and female (B) mice fed control or pesticide chow for 6, 24, and 48 wk and related coefficient plots (C) Coefficient plots related to the O-PLS-DA models discriminating between wild-type (WT) control and WT exposed females. Figure shows the discriminant metabolites that are higher or lower in WT fed pesticide chow (P) compared to WT fed control chow. Metabolites are color-coded according to their correlation coefficient, red indicating a very strong positive correlation ( $R^2 > 0.65$ ). The direction of the metabolite indicates the group with which it is positively associated as labeled on the diagram. Note: 2-OA, 2-oxoadipate; 3-IS, 3-indoxyl sulphate; NAC, *N*-acetyl groups; PAG, phenylacetyl glycine; pCG, *p*-cresol glucuronide; PU, pseudouridine; SCFAs: short-chain fatty acids; TMA, trimethylamine; TMAO, trimethylamine oxide;  $\alpha$ -KIC,  $\alpha$ -ketoisocaproate;  $\alpha$ -KIV,  $\alpha$ -ketoisovalerate;  $\alpha$ -KMV,  $\alpha$ -keto- $\beta$ -methyl-*N*-valerate.

increased expression of genes linked to DNA replication (19 genes), extracellular matrix (25 genes), cytoskeleton (10 genes), endoplasmic reticulum membrane (35 genes), oxidoreductase activity (30 genes), and nucleotide binding (74 genes) compared to WT males fed control chow (Figure 5C). Among the genes involved in the oxidoreductase activity pathway, *Cyp2b9* and *Cyp2b10* exhibited the largest differences in mRNA expression between WT male mice fed control chow and those fed pesticide chow (3.4-fold and 2.5-fold increases, respectively) (Figure 5D).

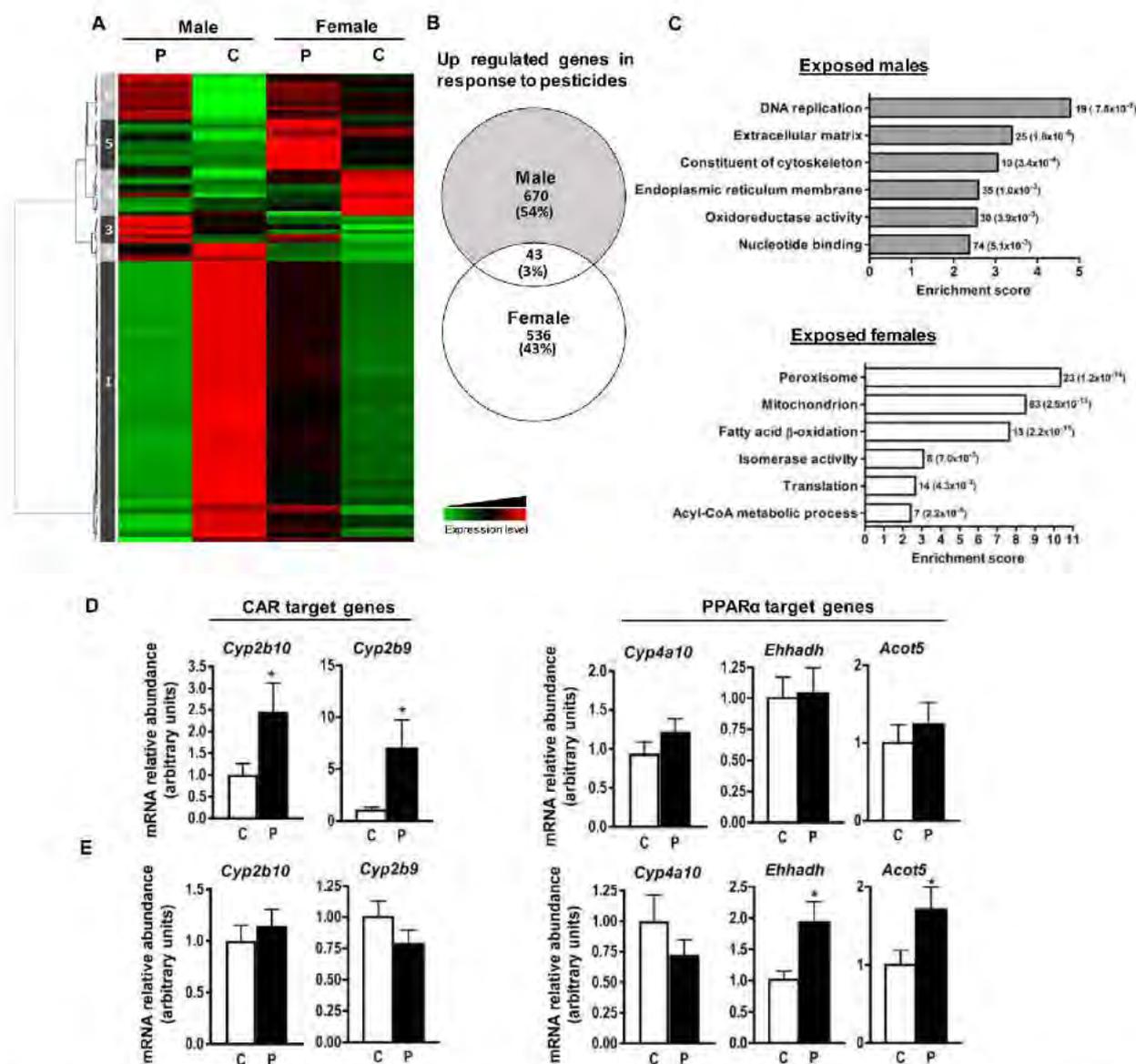
In WT female mice, the genes up-regulated by pesticide exposure were associated primarily with the peroxisome (23 genes), mitochondrion (83 genes), fatty acid oxidation and acyl-coA metabolic processes (20 genes), isomerase activity (8 genes), and translation processes (14 genes) (Figure 5C). The upregulation of *Ehhadh* and *Acot5*, two genes involved in fatty acid oxidation, was confirmed by Quantitative Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) of the 18 liver samples (Figure 5E). Additional comparison of our regulated genes upon exposure to pesticide with previously published lists of PPAR $\alpha$  target genes show that 7.6% of genes regulated in response to pesticides in females are well-described target genes of PPAR $\alpha$  (Figure S14A). Analysis of the expression profile for the 41 hepatic genes identified in our study and reported as related to PPAR $\alpha$ -

dependent pathways revealed that pesticide exposure changed several gene expressions, mainly in WT females (Figure S14B).

### Evaluation of the Pesticide-Detoxifying Capacities of Male and Female Mice

Next, we focused the analysis of the hepatic microarray on genes involved in xenobiotic metabolism in males compared to females. Analysis of 82 genes present in the microarray and involved in this pathway revealed that pesticide exposure significantly affected 14 xenobiotic metabolism enzymes in WT males compared to only three in WT females (Figure 6A). These data show higher xenobiotic metabolic activity in the livers of exposed WT males compared to WT females.

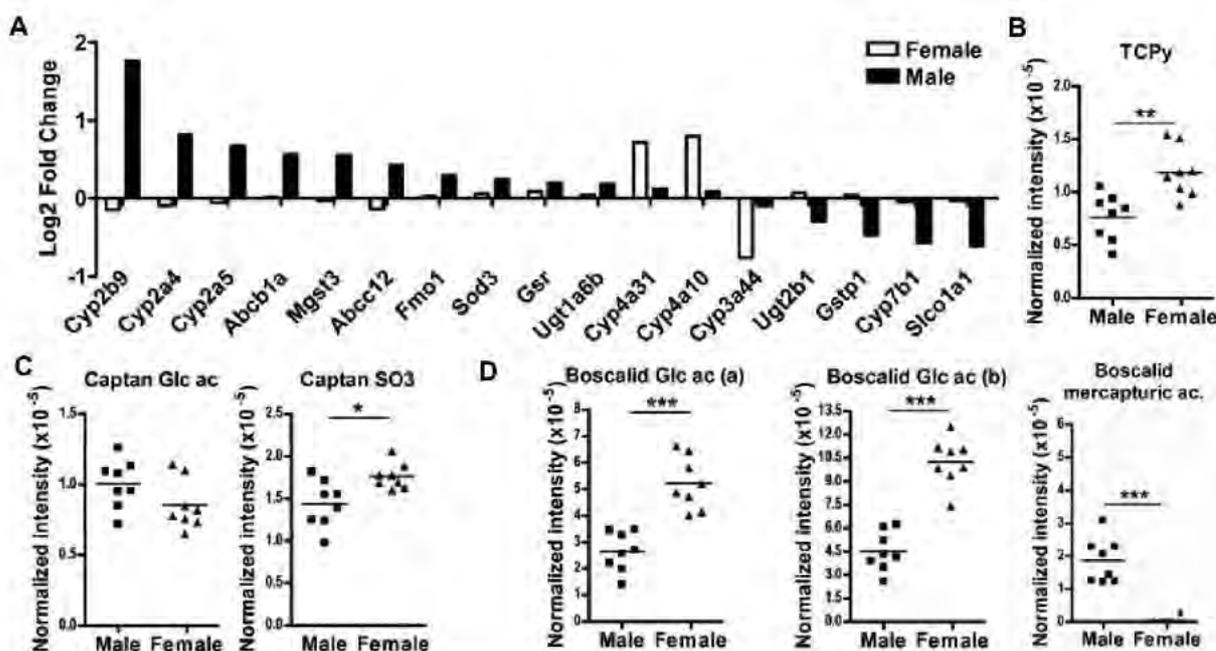
Thus, we used an untargeted LC-MS-based exposomics approach (Jamin et al. 2014) to compare the urinary end products of pesticide metabolism after 52 wk of exposure (Figures 6B–D). Among the six assayed pesticides, only metabolites of boscalid, captan, and chlorpyrifos were clearly identified (Figure S2). Pesticides were confirmed to be absent in controls. Only one suspected metabolite of thiacloprid and two metabolites of thiophanate were detected according to their exact mass (oxazole derivate of thiacloprid, hydroxylated and oxidized derivatives of thiophanate), but could not be confirmed by MS-MS due to their weak



**Figure 5.** Hepatic gene expression profile in male and female mice fed control (C) or pesticide (P) chow for 52 wk. One hundred and two probes were selected as differentially regulated in response to pesticide exposure in males and females ( $p < 0.001$  and  $|\text{fold change}| > 1.5$ ).  $n = 6$  per group. (A) Heat map showing averaged gene expression values per condition, with hierarchical clustering obtained from individual expression values using Pearson correlation coefficient as distance and the Ward's criterion for agglomeration. Red and green indicate values above and below the mean averaged centered and scaled expression values ( $z$ -score), respectively. Black indicates values close to the mean. According to the probe clustering (dendrogram, left panel), six probe clusters showed specific gene expression profiles. (B) Venn diagram representing the numbers of hepatic genes specifically upregulated in response to pesticides in male and female mice ( $p < 0.05$ ). (C) Gene ontology pathway analysis of the 670 and 536 significantly induced genes in male and female mice, respectively. Histograms show the enrichment score for each identified pathway. Gene number and the corresponding  $p$ -value are indicated to the right of the histograms. The relative gene expression of *Cyp2b9*, *Cyp2b10*, *Cyp4a10*, *Ehhadh*, and *Acot5* was confirmed by RT-qPCR in male (D) and female (E) mice ( $n = 18$  per group). Data represent mean  $\pm$  standard error of the mean. \* $p < 0.05$  compared to mice fed control chow as determined using a student's  $t$ -test.

signals. Three suspected metabolites of ziram were detected (dithiocarbamic acid conjugated or not to sulfate or glucuronic acid), but these nonspecific structures were also detected in urine of nonexposed mice. Therefore, metabolites of thiachlopride, thiophanate, and ziram were not further considered for the exposomic data analysis. The metabolism of chlorpyrifos, boscalid, and captan differed between WT male and female mice fed pesticide chow for 52 wk (Figures 6B–D). Exposed WT females exhibited higher levels than exposed WT males of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCPy), a metabolite resulting from either the dearylation of chlorpyrifos

oxon or its oxidation by *Cyp3a11* (Croom et al. 2010). WT Females also presented higher levels of sulfated captan and boscalid-glucuronide metabolites than exposed WT males. Therefore, despite less transcriptional regulation of hepatic xenobiotic metabolizing enzymes in the liver, WT females appeared to efficiently metabolize these three pesticides, suggesting that the metabolism of pesticides did not only occur in the liver. Interestingly, the mercapturic acid metabolite of boscalid was only found in WT males and was almost undetectable in WT females.



**Figure 6.** Expression profiles of hepatic genes and high-performance liquid chromatography (HPLC)–high-resolution mass spectrometry (HRMS) features of pesticide metabolites identified in 24-h urine samples from exposed male and female mice fed pesticide chow for 48 or 52 wk, respectively. (A) Expression profiles of hepatic genes involved in detoxifying pathways in females and males in response to pesticides after 52 wk. A list of 14 and 3 probes was selected as differentially regulated in response to pesticide exposure in males and females, respectively ( $p < 0.05$ ;  $n = 6$  per group). (B–D) Normalized intensities of (B) one feature of one metabolite of chlorpyrifos: [deprotonated molecular ion (M-H)] of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCPy); (C) two features of two metabolites of captan: [M-H] of tetrahydrophthalimide (THPI) conjugated to sulphate (captan SO3) and [(M-GlcAc)-H] of THPI conjugated to glucuronic acid (captan Glc ac); and (D) three features of three metabolites of boscalid: [M-H]- of 2-chloro-N-(4'-chloro-5-hydroxybiphenyl-2-yl)nicotinamide conjugated to glucuronic acid [Boscalid Glc ac (a)], [(M-GlcAc)-H]- of 2-chloro-N-(4'-chloro-5-hydroxybiphenyl-2-yl) nicotinamide conjugated to glucuronic acid [Boscalid Glc ac (b)], and the [M-H]- feature of the mercapturic conjugation of boscalid metabolite (Boscalid mercapturic ac) in male and female mice fed pesticide chow for 48 wk. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .  $p$ -Values represent differences between male and female mice fed pesticide chow for 52 wk.  $n = 8$  mice per group.

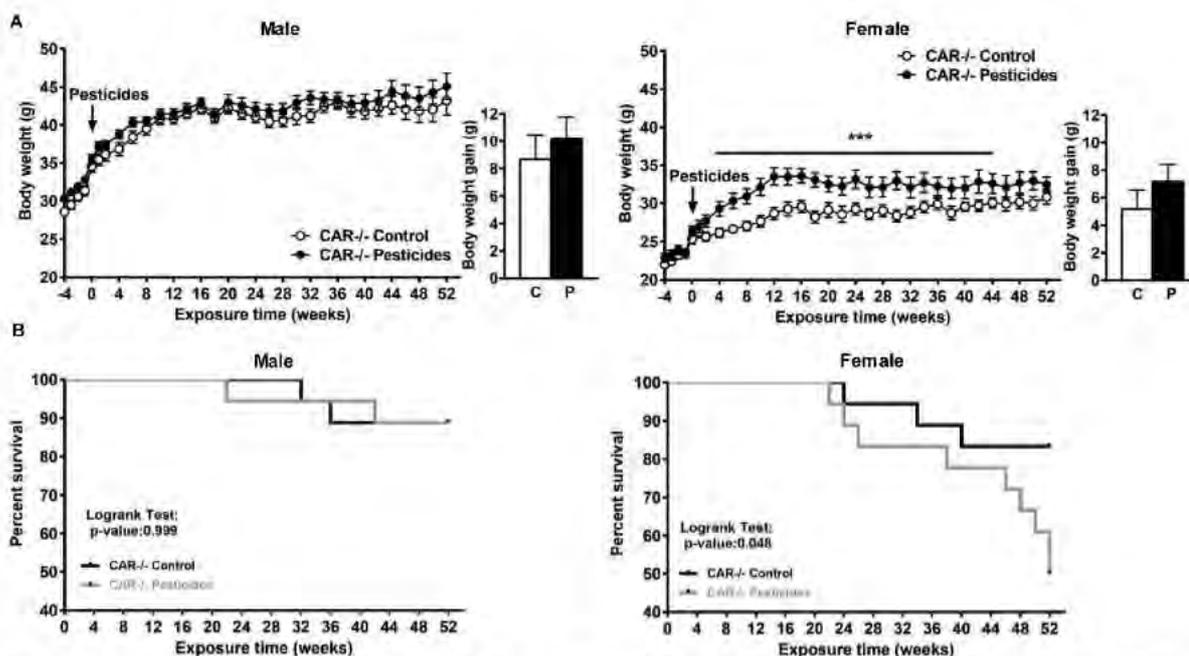
**Role of Constitutive Androstane Receptor in Pesticide-Induced Metabolic Perturbations**

We investigated the involvement of a key player in the transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes, the nuclear receptor CAR. We utilized a constitutive CAR knockout mouse model to evaluate the role of CAR in pesticide-induced metabolic perturbations. We compared male and female CAR<sup>-/-</sup> mice fed pesticide chow for 52 wk with male and female CAR<sup>-/-</sup> mice fed control chow for 52 wk (18 mice per group). Male CAR<sup>-/-</sup> mice fed pesticide chow did not have significantly different BWs than those fed control chow (Figure 7A). Moreover, CAR<sup>-/-</sup> male mice fed control chow and those fed pesticide chow exhibited similar blood glucose levels following a glucose bolus at 16, 36, and 48 wk (Figure S15A). In the liver of CAR<sup>-/-</sup> males, pesticide exposure decreased the expression of *Cyp2b9* and did not alter the expression of *Cyp2b10* (Figure 8C). It is noteworthy that pesticide exposure significantly decreased the prototypical PPAR $\alpha$  target gene (*Cyp4a10*) in the CAR<sup>-/-</sup> male mice, which was not observed in WT male mice (Figure 5D). Finally, in male mice, knock out of CAR did not result in significant differences in the urinary levels of pesticide metabolites (Figure 8A). <sup>1</sup>H-NMR analysis of plasma samples showed no significant differences in serum metabolomics between CAR<sup>-/-</sup> male mice fed control chow and those fed pesticide chow (Figure S8C).

In contrast, female CAR<sup>-/-</sup> mice fed pesticide chow had significantly larger BWs than CAR<sup>-/-</sup> mice fed control chow beginning at 4 wk and lasting through 48 wk (Figure 7A). At week 12, the weight gain of exposed CAR<sup>-/-</sup> females was  $7.49 \pm 1.14$  g

compared to  $3.39 \pm 0.65$  g in unexposed females. This significant difference in BW was maintained over 40 wk (Figure 7A). However, the BW of CAR<sup>-/-</sup> mice fed control chow gradually increased over the duration of the experiment and was not significantly different from that of CAR<sup>-/-</sup> mice fed pesticide chow from week 44 through week 52. As observed in male CAR<sup>-/-</sup> mice fed pesticide chow, female CAR<sup>-/-</sup> mice did not exhibit significantly higher serum glucose levels (either fasting or after a glucose bolus), as was observed for WT animals fed pesticide chow (Figure S15B). Moreover, pesticide exposure led to a high death rate in CAR<sup>-/-</sup> females (Figure 7B). After 52 wk of pesticide exposure, only 50% of CAR<sup>-/-</sup> female mice survived, whereas the survival rate was nearly 88.8% in unexposed CAR<sup>-/-</sup> females. In female WT mice, the survival rate was similar between mice fed control chow and those fed pesticide chow (Figure S16). Knockout of CAR in female mice modified the levels of almost all measured urinary pesticide metabolites (Figure 8B); CAR<sup>-/-</sup> females had lower levels of chlorpyrifos, captan (captan SO3) and boscalid metabolites compared to their WT counterparts, and higher levels of boscalid mercapturic acid. <sup>1</sup>H-NMR analysis of plasma samples showed no significant differences in plasma metabolomics between CAR<sup>-/-</sup> female mice fed control chow and those fed pesticide chow (Figure S8D).

In contrast to WT female mice, for which we identified several PPAR $\alpha$ -associated genes as up-regulated in mice fed pesticide chow compared to those fed control chow (Figure 5E), we detected significantly lower mRNA expression levels of PPAR $\alpha$  target genes in female CAR<sup>-/-</sup> mice fed pesticide chow (*Cyp4a10*, *Acox1*, and *Cpt1*; Figure 8D). Finally, <sup>1</sup>H-NMR-based metabolic profiling of



**Figure 7.** Body weight (A) and survival (B) of male and female constitutive androstane receptor (CAR)<sup>-/-</sup> mice fed control (C) or pesticide (P) chow for 52 wk. (A) The line graphs show body weight (BW) for pesticide-exposed mice (black circles) and mice fed control chow (white circles) from 4 wk prior to exposure through 52 wk. The bar graphs show the gains in BW for pesticide-exposed mice after 52 wk. (B) Kaplan-Meier survival curves.

liver extracts of male CAR<sup>-/-</sup> mice did not show any significant difference between animals fed control chow and those fed pesticide chow (Figure 8E). Similarly, we observed no significant difference in the metabolic profiles of liver extracts for female CAR<sup>-/-</sup> mice fed control chow compared to those fed pesticide chow (Figure 8F), in contrast to the results in WT mice (Figure 3D).

### Discussion

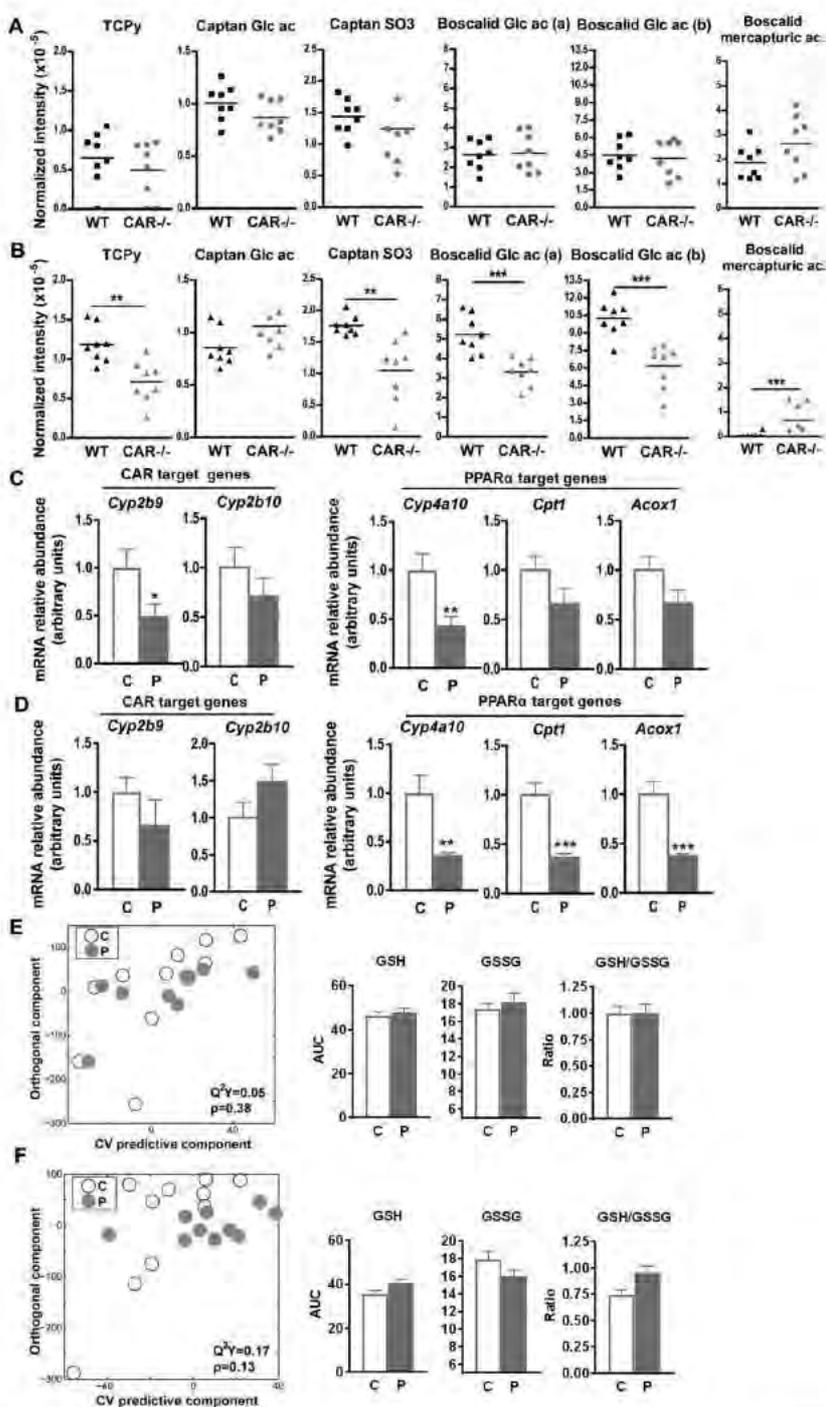
Metabolic diseases have multifactorial origins, often resulting from a combination of sedentary lifestyles and high-energy diets. The involvement of endocrine-disruptive environmental contaminants in the onset of diabetes and obesity is of growing interest. Various epidemiological (Evangelou et al. 2016), animal (Grün and Blumberg 2009), and mechanistic data (Grün and Blumberg 2009; Kim et al. 2013) support the hypothesis that exposure to several classes of pesticides, including organophosphorus and OCs, may be considered a risk factor for obesity and diabetes. However, in previous animal studies, metabolic disruptions were observed with specific individual compounds, such as DDT, DDE, dieldrin, glyphosate, mancozeb, imidacloprid, or chlorpyrifos (Androutsopoulos et al. 2013; Bhaskar and Mohanty 2014; De Long and Holloway 2017), and often at doses that are too high to be relevant for human exposure (Wang et al. 2014). Moreover, most studies investigate the obesogenic effect of pesticides in a context of high-fat diets (Adigun et al. 2010b; Howell et al. 2015; Lasram et al. 2014; Lassiter et al. 2010; Maqbool et al. 2016) or using a genetically induced model of obesity (Ob/Ob mice) (Mulligan et al. 2017; Peris-Sampedro et al. 2015). In our study, we aimed to use a pesticide exposure protocol relevant to consumers' exposure. A mixture of six pesticides was incorporated into a standard rodent diet to mimic the exposure of consumers (EFSA), which occurs mainly as a mixture of several chemicals through food intake. We chose to assess a reference dose, the TDI, an estimated amount of a substance in food or drinking water that

can be consumed over a lifetime without presenting an appreciable risk to health (EFSA).

### Obesogenic Impact of the Pesticide Mixture in Wild-Type Males

We observed that chronic dietary exposure of WT male mice to a mixture of pesticides at levels that are below the TDI resulted in a greater BW gain and adiposity than in WT males fed control chow. This suggests that adipose tissue might be a possible target of pesticides in male mice, as observed previously with several compounds (Chapados et al. 2012). The proadipogenic properties of pesticides has been correlated with their capacity to induce oxidative stress in 3T3-L1 adipocytes *in vitro* (Shen et al. 2017) and in mice (Armstrong et al. 2013). Importantly, adipose PPAR $\gamma$ , a major player in WAT homeostasis, has been reported to be activated by several environmental pollutants, including mono-(2-ethylhexyl)phtalate in COS7, C2C12, and 3T3L1 cell lines (Feige et al. 2007) and trilumizole in mouse 3T3-L1 preadipocytes and human multipotent mesenchymal stromal stem cells (Li et al. 2012).

Hepatic lipid accumulation has also been reported in mice upon exposure to perfluoroalkyl acids (Das et al. 2017), perfluorooctanoic acid (Hui et al. 2017), and cadmium (Zhang et al. 2015), and this raises the question whether the hepatic alterations observed in our study are specific to pesticide exposure. In our study, pesticide exposure led not only to steatosis glucose intolerance and elevated blood glucose, but also resulted in greater WAT mass and BW and more circulating FFAs in WT male mice compared to unexposed WT male mice. Previous studies showed that steatosis induced in mice by perfluoroalkyl acids (Das et al. 2017) and perfluorooctanoic acid (Yan et al. 2015) correlates with an increased expression of lipogenic genes in the liver. In the present work, we did not detect significant differences in the mRNA expression of hepatic genes involved in *de novo* fatty acid synthesis between mice fed control and pesticide chow. It is therefore possible that TGs



**Figure 8.** (A and B) Levels of high-performance liquid chromatography (HPLC)–high-resolution mass spectrometry (HRMS) features of pesticide metabolites identified in urine samples from male (A) and female (B) wild-type (WT) and constitutive androstane receptor (CAR)<sup>-/-</sup> mice fed pesticide chow for 52 wk. \*\**p* < 0.01; \*\*\**p* < 0.001 compared to WT as determined using a student's *t*-test. (C and D) Relative hepatic expression of CAR and peroxisome proliferator–activated receptor (PPAR) $\alpha$  target genes as determined by RT-qPCR in male (C) and female (D) CAR<sup>-/-</sup> mice fed control (C) or pesticide chow (P) for 52 wk. (E and F) Orthogonal projection on latent structure-discriminant analysis (O-PLS-DA) score plots derived from the liver extract <sup>1</sup>H-NMR–based spectra of male (E) and female (F) CAR<sup>-/-</sup> mice fed control or pesticide chow for 52 wk. Q<sup>2</sup>Y represents the goodness of fit for the PLS-DA models, and *p*-values were derived using 1,000 permutations of the Y matrix. Area under the curve of the <sup>1</sup>H-NMR spectra was integrated for the glutathione signals (GSSG, oxidized form, multiplet at 4.75 ppm; GSH, reduced form, multiplet at 4.56 ppm). Data are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean. \**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01; \*\*\**p* < 0.001. *p*-Values represent differences between mice fed control chow and those fed pesticide chow as determined using a student's *t*-test. Note: C, control; P, pesticide mixtures. *n* = 18 mice per group.

accumulating in the liver of WT male mice exposed to pesticides originate from adipose tissue lipolysis rather than from hepatic *de novo* synthesis. Therefore, the molecular mechanism leading to steatosis in our model might be distinct from those described in other studies. However, whether hepatic steatosis is a generic adaptive response of this organ to chronic exposure to pollutants remains an open question. These results demonstrate that chronic low-dose pesticide exposure leads to sex-specific hepatic metabolic disturbances; WT male mice present with significantly increased hepatic TGs, whereas WT females present with metabolic changes related to oxidative stress.

Male WT mice fed pesticide chow exhibited higher mRNA expression of genes involved in hepatic detoxifying pathways compared to those fed control chow, suggesting that pesticide metabolism occurs mainly in the liver. This metabolism was independent of CAR, as male CAR<sup>-/-</sup> mice exhibited the similar urinary pesticide metabolite profiles as WT males. Liver CAR activation may be linked to the observed increased expression of hepatic genes involved in DNA replication, extracellular matrix, and cytoskeleton constituents, intracellular events that could predispose an individual to hepatocellular adenoma or carcinomas (Huang et al. 2005). The organophosphates, pyrethroids, triazole, and carbamate pesticides have been shown to activate CAR *in vitro* (Baldwin and Roling 2009; Tamura et al. 2013) or *in vivo* (Tamura et al. 2013). Thus, it is likely that, at least in our pesticide cocktail, chlorpyrifos (OP) and/or thiophanate (carbamate) may be involved in the activation of CAR in male mice, though one cannot rule out the interaction of the other compounds with CAR.

#### Diabetogenic Effect of Pesticide Exposure in Females

In female WT mice, there were not significant differences in BW or WAT mass between WT mice fed control chow and those fed pesticide chow. Moreover, female WT mice fed pesticide chow did not experience hepatic steatosis as determined by histology and hepatic TG quantification. However, transcriptomics and metabolomics profiling revealed a significant impact of pesticides in female livers, including a marked oxidative status and activation of PPAR $\alpha$  signaling pathways, a transcription factor crucial for liver fatty acid degradation [Montagner et al. 2016; Régnier et al. (In press)]. Therefore, pesticide-induced activation of PPAR $\alpha$  is in good agreement with a reduced hepatic lipid accumulation in the livers of female mice. PPAR $\alpha$  is also involved in controlling the expression of antioxidant defense enzymes (Anderson et al. 2004), such as those leading to the conjugation of GSH, which could explain at least part of the drop in reduced glutathione liver content in exposed female mice.  $\beta$ -oxidation also leads to the production of free radicals, which could also induce significant oxidative stress (Pessayre 2007). Therefore, we can hypothesize that some of the pesticides or their metabolites may interact with PPAR $\alpha$  in WT females, leading to increased hepatic lipid catabolism. Previous studies demonstrated that some pesticides can activate PPAR $\alpha$ . Pyrethrin and diclofop-methyl, for example, has been shown to induce PPAR $\alpha$ -mediated transcriptional activities in *in vitro* reported gene assays using CV-1 monkey kidney cells and in mice (Takenchi et al. 2006). The pesticides methiocarb and carbaryl exhibited PPAR $\alpha$  agonist activities in *in vitro* reporter gene assays using COS1 cells (Abass and Pelkonen 2013; Fujino et al. 2016). The pesticide adjuvant Toximul<sup>®</sup> (Stepan Company) was reported to modulate hepatic metabolism through the activation of PPAR $\alpha$  (Uplham et al. 2007). However, no data are yet available regarding a possible interaction of one of the six pesticides of our study with this nuclear receptor.

Blood metabolomic assay on samples from WT exposed and nonexposed male and female mice displayed similar metabolite profiles. However, urinary metabolic profiling using <sup>1</sup>H-NMR

identified 2-KAA as an early biomarker that discriminates pesticide-treated WT females from WT females fed control chow and that may be linked to the observed increase in blood glucose in WT female exposed to pesticides. There was a trend of lower 2-KAA levels in pesticide-exposed WT females after only 6 wk of exposure and a significant difference after 36 and 48 wk of pesticide exposure. A product of lysine and tryptophan degradation, 2-KAA is further degraded in the mitochondria via the DHTKD1 enzyme, and 2-aminoadipic and 2-KAA aciduria have been linked to mutations in DHTKD1 (Hagen et al. 2015). Wang et al. (2013) identified 2-aminoadipic acid, the immediate precursor of 2-KAA, as a predictor of diabetes development in normoglycemic individuals in observational study in human and demonstrated *in vivo* in mice that it modulates glucose homeostasis, whereas *in vitro* studies in murine and human islets support an effect of 2-aminoadipic acid on insulin secretion (Wang et al. 2013). Using 40 strains of a well-characterized murine genetic reference population and a multilayered omics approach, Wu et al. (2014) identified Dhkd1 as a primary regulator of plasmatic 2-aminoadipic acid, explaining variance in fasted glucose and diabetes status. Changes in 2-aminoadipate levels were highly correlated with changes in the Homeostatic Model Assessment (HOMA) index and therefore with insulin sensitivity. Finally, in a cohort of 835 Caucasian adults in the CoLaus study, including 43 diabetics and 792 nondiabetics males and females, 2-aminoadipic acid levels were also lower in the urine of diabetic patients compared to healthy patients (Wu et al. 2014). In this context, our findings suggest that 2-KAA may be an early biomarker of altered glucose homeostasis in WT female mice, and point out the pancreas as a possible early target of pesticides (Kamath and Rajini 2007).

We also observed significant differences in concentration of gut microbiota-related metabolites in the urine of WT female mice fed pesticide chow compared to those fed control chow. We found lower levels of metabolites from the methylamine pathway; trimethylamine is derived from dietary choline fermentation by commensal bacteria and metabolized into trimethylamine oxide in the liver (Craciun and Balskus 2012). We also observed higher levels of 3-indoxylsulfate, a metabolite derived from the conversion of dietary tryptophan to indole by enteric bacteria and further conversion of indole in the liver (Wikoff et al. 2009). Finally, the phenyl derivatives p-cresol glucuronide and phenylacetylglutamine, which were also lower in the urine of pesticide-treated WT females, are well-described host gut microbiota cometabolites (Wikoff et al. 2009). The gut microbiota possesses extensive xenobiotic metabolizing capacities (Claus et al. 2016) and may be involved in pesticide metabolism in females, thereby modifying their toxicity. A recent study demonstrated that the gut microbiota is involved in organophosphate metabolism, thereby inducing hepatic gluconeogenesis and glucose intolerance (Velmurugan et al. 2017). Our results suggest that pesticide treatment impacted the gut microbiota of WT female mice. However, these perturbations were observed only after 48 wk of pesticide exposure, after metabolic perturbations (such as hyperglycemia) were set up, which could imply that perturbations in the gut microbiota are a consequence of the pesticide-induced metabolic disorders and not the cause. Complementary experiments would be necessary to fully understand the role of the gut microbiota in the diabetogenic impact of our pesticide mixture in females.

#### The Role of Constitutive Androstane Receptor in the Dimorphic Response to Pesticide Exposure

One of the main findings of our experiment was that the response to pesticide exposure was sexually dimorphic. This sexual

dimorphism appeared to be related to CAR activity. Compared to WT male mice fed control chow, those fed pesticide chow exhibited higher expression levels of xenobiotic metabolizing enzymes in the liver, particularly those reflecting increased CAR activity (*Cyp2b9* and *Cyp2b10*) (Maglich et al. 2002). As expected, this difference in the expression CAR-dependent xenobiotic metabolizing enzymes was not seen with  $CAR^{-/-}$  males fed control or pesticide chow. Moreover, pesticide-exposed  $CAR^{-/-}$  males did not exhibit greater BW gains or changes in glucose metabolism compared to those fed control chow. As urinary profiles of pesticide metabolites were similar between  $CAR^{-/-}$  and WT males, we hypothesize that CAR was likely not involved in pesticide metabolism in males and that CAR-dependent changes in pesticide metabolism cannot account for the observed protective effects in  $CAR^{-/-}$  males upon pesticide exposure.

Unlike males, CAR activity and other xenobiotic detoxifying enzymes were not induced in livers from WT females upon pesticide exposure, therefore suggesting extrahepatic pesticide metabolism. However, the urinary pesticide metabolite profile of female  $CAR^{-/-}$  mice was different from that of their WT counterparts, suggesting that CAR played a role in pesticide detoxification in females.  $CAR^{-/-}$  females fed pesticide chow also exhibited larger BWs throughout most of the experiment and exhibited higher mortality than those fed control chow. Reduced metabolic capacities in female  $CAR^{-/-}$  mice may lead to accumulation of the parent compounds and may be more toxic than their metabolites or may accumulate in vital organs, explaining the high rate of mortality. Given our observation that gut microbiota-related metabolites are changed in urine of pesticide-exposed WT females and the fact that CAR is highly expressed in the intestine (Bookout et al. 2006), we speculate that CAR-dependent metabolism occurs in the gut. We additionally found no considerable differences in GSH:GSSG ratios between  $CAR^{-/-}$  mice fed control and pesticide chow, suggesting no significant increase in oxidative stress. This may be attributed to the lack of PPAR $\alpha$  activation, as determined by the similar pattern of expression of its prototypical target genes in  $CAR^{-/-}$  mice fed control and pesticide chow. Moreover, activation of PPAR $\alpha$  has been shown to be involved in the control of the expression of antioxidant defense enzymes, such as those leading to the conjugation of GSH (Anderson et al. 2004). More experiments would be necessary to confirm these hypothesis. Moreover, the findings of altered PPAR $\alpha$  target genes in the  $CAR^{-/-}$  mice after pesticide exposure may reflect cross-talks between these two nuclear receptors as previously reported by others (Anderson et al. 2004; Rosen et al. 2017). The dimorphic effect of pesticides may also be linked to estrogenic protection. A growing body of evidence demonstrates a protective role of estrogenic signaling in the development of metabolic syndrome (Matic et al. 2013; Riant et al. 2009; Zhu et al. 2013, 2014). Thus, we postulate that in our model, females may be protected from pesticide-induced obesity and hepatic fat accumulation through estrogenic signaling.

### A Cocktail Effect of Pesticides

We observed significant metabolic dysregulation in animals fed a pesticide mixture at doses at which each individual pesticide is supposed to not exert any health impact. The observed disturbances may be linked to a cocktail effect resulting from dose addition or a synergistic interaction between two or more compounds. Interactions between the pesticides in the mixture may occur at various levels or on various targets and/or cell signaling pathways (Delfosse et al. 2015; Rizzati et al. 2016). Organophosphates are well known endocrine-metabolic disruptors (Adigun et al. 2010a) acting on liver adenylate cyclase, oxidative status, and proinflammatory markers (Adigun et al. 2010a; Lasram et al. 2015).

Neonicotinoides have been shown to disrupt the thyroid (Bhaskar and Mohanty 2014). Carbamate may alter liver glucose, fat, and oxidative balance (Wang et al. 2014), and dicarboximide (captan) has been shown to reduce liver reduced glutathione (Della Morte et al. 1994). Comparison of the metabolic effects of the pesticide mixture vs. those of each of the single pesticides requires further investigations. Such comparisons are needed to understand whether a synergistic deregulation of metabolic pathways or an additive effect of pesticides on the induction of oxidative stress could explain the observed metabolic disruptions.

### Conclusions

We demonstrated that a pesticide cocktail to which consumers may be exposed through food intake, induced at a nontoxic dose (TDI level as defined for human exposure but adjusted to the BW of mice) in a mouse model, caused metabolic disruption consistent with diabetic status. Moreover, the sexual dimorphic impact of this pesticide cocktail may be governed by distinct xenobiotic metabolic capacities and distinct nuclear receptor activation. Our results thus question the relevance of TDI levels for individual pesticides when present in a mixture.

### Acknowledgments

C.L. is the recipient of a PhD grant from Région Occitanie, INRA (Département Santé Animale), and EI-Purpan. This work was supported by grant from Région Occitanie (subvention number 14054410) and Fonds Européens de Développement Régional (FEDER; No. 12055324). T.L.M. is supported by ANR and region Occitanie. We thank all of the members of the EZOP staff, particularly C. Bétoulières and C. Sommer, for their careful and outstanding help from the start of this project. We thank A. Dequesnes, F. Capilla, and L. Monbrun from Anexplo Genotoul MetaToul for their excellent work on plasma biochemistry and tissue histology. All MS and NMR experiments were performed on the instruments of the MetaToul platform, partner of the national infrastructure of metabolomics and fluxomics: MetaboHUB (MetaboHUB-ANR-11-INBS-0010). We thank L. Peyriga and E. Cahoreau from INSA GenoToul MetaToul for their technical support with the NMR analysis. We thank X. Blanc from INRA UPAE (Jouy-en-Josas) for his technical support for the pellets preparation. We thank S. Claus from Reading University for help in metabolite identification. We thank Professor D. Moore (Baylor College of Medicine, Houston, Texas, United States) for providing us with the CAR-deficient mice.

### References

- Abass K, Pelkonen O. 2013. The inhibition of major human hepatic cytochrome P450 enzymes by 18 pesticides: comparison of the N-in-one and single substrate approaches. *Toxicol In Vitro* 27(5):1584–1588. PMID: 22634058, <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.05.003>.
- Adigun AA, Ryde IT, Seidler FJ, Slotkin TA. 2010a. Organophosphate exposure during a critical developmental stage reprograms adenylyl cyclase signaling in PC12 cells. *Brain Res* 1329:36–44. PMID: 20298678, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.03.025>.
- Adigun AA, Wrench N, Levin ED, Seidler FJ, Slotkin TA. 2010b. Neonatal parathion exposure and interactions with a high-fat diet in adulthood: adenylyl cyclase-mediated cell signaling in heart, liver and cerebellum. *Brain Res Bull* 81(6):605–612. PMID: 20074626, <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2010.01.003>.
- Al-Eryani L, Wahlang B, Falkner KC, Guardiola JJ, Clair HB, Prough RA, et al. 2015. Identification of environmental chemicals associated with the development of toxicant-associated fatty liver disease in rodents. *Toxicol Pathol* 43(4):482–497. PMID: 25326588, <https://doi.org/10.1177/0192623314549960>.
- Anderson SP, Howroyd P, Liu J, Qian X, Bahnemann R, Swanson C, et al. 2004. The transcriptional response to a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist includes increased expression of proteome maintenance genes. *J Biol Chem* 279(50):52390–52398. PMID: 15375163, <https://doi.org/10.1074/jbc.MA09347200>.

- Androustopoulos VP, Hernandez AF, Liesivuori J, Tsatsakis AM. 2013. A mechanistic overview of health associated effects of low levels of organochlorine and organophosphorus pesticides. *Toxicology* 307:89–94, PMID: 23041710, <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.09.011>.
- Arciello M, Gori M, Maggio R, Barbaro B, Tarocchi M, Galli A, et al. 2013. Environmental pollution: a tangible risk for NAFLD pathogenesis. *Int J Mol Sci* 14(11):22052–22066, PMID: 24213605, <https://doi.org/10.3390/ijms141122052>.
- Armstrong LE, Driscoll MV, Donepudi AC, Xu J, Baker A, Aleksunes LM, et al. 2013. Effects of developmental deltamethrin exposure on white adipose tissue gene expression. *J Biochem Mol Toxicol* 27(2):165–171, PMID: 23401056, <https://doi.org/10.1002/jbt.21477>.
- Baldwin WS, Roling JA. 2009. A Concentration addition model for the activation of the constitutive androstane receptor by xenobiotic mixtures. *Toxicol Sci* 107(1):93–105, PMID: 18832183, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn206>.
- Beckonert D, Keun HC, Ebbels TM, Bundy J, Holmes E, Lindon JC, et al. 2007. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat Protoc* 2(11):2692–2703, PMID: 18007604, <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.376>.
- Bhaskar R, Mahanty B. 2014. Pesticides in mixture disrupt metabolic regulation: in silico and in vivo analysis of cumulative toxicity of mancozeb and imidacloprid on body weight of mice. *Gen Comp Endocrinol* 205:226–234, PMID: 24530807, <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.02.007>.
- Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37(8):911–917, PMID: 13671378, <https://doi.org/10.1139/o59-099>.
- Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. 2003. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 19(2):185–193, PMID: 12538238, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg192.185>.
- Bookout AL, Jeong Y, Downes M, Yu RT, Evans RM, Mangelsdorf DJ. 2006. Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell* 126(4):789–799, PMID: 16923397, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.043>.
- Casals-Casas C, Desvergne B. 2011. Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annu Rev Physiol* 73:135–162, PMID: 21054169, <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-012110-142200>.
- Chapados NA, Casimiro C, Robidoux MA, Haman F, Batal M, Blais JM, et al. 2012. Increased proliferative effect of organochlorine compounds on human preadipocytes. *Mol Cell Biochem* 365(1–2):275–278, PMID: 22350817, <https://doi.org/10.1007/s11010-012-1268-0>.
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1):156–159, PMID: 2440339, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90021-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021-2).
- Claus SP, Guillou H, Eljero-Simatos S. 2016. The gut microbiota: a major player in the toxicity of environmental pollutants? *NPJ Biofilms Microbiomes* 2:16003, PMID: 28721242, <https://doi.org/10.1038/njbiofilms.2016.3>.
- Cloarec O, Dumas M-E, Craig A, Barton RH, Trygg J, Hudson J, et al. 2005a. Statistical total correlation spectroscopy: an exploratory approach for latent biomarker identification from metabolic  $^1\text{H}$  NMR data sets. *Anal Chem* 77(5):1282–1289, PMID: 15732908, <https://doi.org/10.1021/ac048630x>.
- Cloarec O, Dumas ME, Trygg J, Craig A, Barton RH, Lindon JC, et al. 2005b. Evaluation of the orthogonal projection on latent structure model limitations caused by chemical shift variability and improved visualization of biomarker changes in  $^1\text{H}$  NMR spectroscopic metabonomic studies. *Anal Chem* 77(2):517–526, PMID: 15649048, <https://doi.org/10.1021/ac048803i>.
- Craclun S, Balskus EP. 2012. Microbial conversion of choline to trimethylamine requires a glycol radical enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(52):21307–21312, PMID: 23151509, <https://doi.org/10.1073/pnas.1215689109>.
- Croom EL, Wallace AD, Hodgson E. 2010. Human variation in CYP-specific chlorpyrifos metabolism. *Toxicology* 276(3):184–191, PMID: 20709133, <https://doi.org/10.1016/j.tox.2010.08.005>.
- Das KP, Wood CR, Lin MT, Starkov AA, Lau C, Wallace KB, et al. 2017. Perfluoroalkyl acids-induced liver steatosis: effects on genes controlling lipid homeostasis. *Toxicology* 378:37–52, PMID: 28049043, <https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.12.007>.
- De Long NE, Holloway AC. 2017. Early-life chemical exposures and risk of metabolic syndrome. *Diabetes Metab Syndr Obes* 10:101–109, PMID: 28367067, <https://doi.org/10.2147/DMSO.S95296>.
- Delfosse V, Dendele B, Huet T, Grimaldi M, Boulahtouf A, Gerbal-Chaloin S, et al. 2015. Synergistic activation of human pregnane X receptor by binary cocktails of pharmaceutical and environmental compounds. *Nat Commun* 6:8089, PMID: 26333997, <https://doi.org/10.1038/ncomms9089>.
- Della Morte R, Villani GR, Di Martino E, Squillaciotti C, De Marco L, Vuotto P, et al. 1994. Glutathione depletion induced in rat liver fractions by seven pesticides. *Boll Soc Ital Biol Sper* 70(8–9):185–192, PMID: 7893475.
- Desvergne B, Michalik L, Wahli W. 2006. Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol Rev* 86(2):485–514, PMID: 16601267, <https://doi.org/10.1152/physrev.00025.2005>.
- Dieterle F, Ross A, Schlotterbeck G, Senn H. 2006. Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in  $^1\text{H}$  NMR metabolomics. *Anal Chem* 78(13):4281–4290, PMID: 16808434, <https://doi.org/10.1021/ac051632c>.
- Edgar R, Domrachev M, Lash AE. 2002. Gene expression omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* 30(1):207–210, PMID: 11752295, <https://doi.org/10.1093/nar/30.1.207>.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2015. The 2013 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA J* 13(3):4038, <https://doi.org/10.2903j.efsa.2015.4038>.
- Evangelou E, Ntritsos G, Chondrogiorgi M, Kavvoura FK, Hernández AF, Ntzani EE, et al. 2016. Exposure to pesticides and diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Environ Int* 91:60–68, PMID: 26909814, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.02.013>.
- Evans RM, Mangelsdorf DJ. 2014. Nuclear receptors, RXR, and the big bang. *Cell* 157(1):255–266, PMID: 24679540, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.012>.
- Felge JN, Gelman L, Rossi D, Zoete V, Méthivier R, Tudor C, et al. 2007. The endocrine disruptor monoethyl-hexyl-phthalate is a selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulator that promotes adipogenesis. *J Biol Chem* 282(26):19152–19166, PMID: 17468099, <https://doi.org/10.1074/jbc.M702724200>.
- Flurkey K, Currier J, Harrison D. 2007. "Mouse models in aging research." In: *Faculty Research 2006–2009*. [https://mouseion.jax.org/stfb2000\\_2009/1685](https://mouseion.jax.org/stfb2000_2009/1685).
- Fujino C, Tamura Y, Tange S, Nakajima H, Sanoh S, Watanabe Y, et al. 2016. Metabolism of methiocarb and carbaryl by rat and human livers and plasma, and effect on their PXR, CAR and PPAR $\alpha$  activities. *J Toxicol Sci* 41(5):677–691, PMID: 27665777, <https://doi.org/10.2131/jts.41.677>.
- Giacomini F, Le Corquillé G, Monsaor M, Landi M, Pericard P, Pétara M, et al. 2015. Workflow4Metabolomics: a collaborative research infrastructure for computational metabolomics. *Bioinformatics* 31(9):1493–1495, PMID: 25527831, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu813>.
- Grün F, Blumberg B. 2009. Endocrine disruptors as obesogens. *Mol Cell Endocrinol* 304(1–2):19–29, PMID: 19433244, <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.02.018>.
- Hagen J, te Brinke H, Wanders RJ, Kneeg AC, Oussoren E, Hoogbeem AJ, et al. 2015. Genetic basis of alpha-aminoacidip and alpha-ketoacidip aciduria. *J Inher Metab Dis* 38(5):873–879, PMID: 25860818, <https://doi.org/10.1007/s10545-015-9801-9>.
- Hong NS, Kim KS, Lee IK, Lind PM, Lind L, Jacobs DR, et al. 2012. The association between obesity and mortality in the elderly differs by serum concentrations of persistent organic pollutants: a possible explanation for the obesity paradox. *Int J Obes (Lond)* 36(9):1170–1175, PMID: 21946706, <https://doi.org/10.1038/ijo.2011.187>.
- Howell GE III, Mulligan C, Meek E, Chambers JE. 2015. Effect of chronic p, p'-dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) exposure on high fat diet-induced alterations in glucose and lipid metabolism in male C57BL/6H mice. *Toxicology* 328:112–122, PMID: 25541407, <https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.12.017>.
- Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. 2009a. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* 37(1):1–13, PMID: 19033363, <https://doi.org/10.1093/nar/gkn923>.
- Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. 2009b. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVIS bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4(1):44–57, PMID: 19131956, <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>.
- Huang W, Zhang J, Washington M, Liu J, Parant JM, Lozano G, et al. 2005. Xenobiotic stress induces hepatomegaly and liver tumors via the nuclear receptor constitutive androstane receptor. *Mol Endocrinol* 19(6):1646–1653, PMID: 15831521, <https://doi.org/10.1210/me.2004-0520>.
- Hui Z, Li R, Chen L. 2017. The impact of exposure to environmental contaminant on hepatocellular lipid metabolism. *Gene* 622:67–71, PMID: 28431976, <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.04.024>.
- Jamin EL, Bonvallet N, Tremblay-Franco M, Cravedi JP, Chevrier C, Corder S, et al. 2014. Untargeted profiling of pesticide metabolites by LC-HRMS: an exposomics tool for human exposure evaluation. *Anal Bioanal Chem* 406(4):1149–1161, PMID: 23892877, <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7136-2>.
- Jin Y, Lin X, Miao W, Wu T, Shen H, Chen S, et al. 2014. Chronic exposure of mice to environmental endocrine-disrupting chemicals disturbs their energy metabolism. *Toxicol Lett* 225(3):392–400, PMID: 24440342, <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.01.006>.
- Kamath V, Rajini P. 2007. Altered glucose homeostasis and oxidative impairment in pancreas of rats subjected to dimethoate intoxication. *Toxicology* 231(2–3):137–146, PMID: 17197067, <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.11.072>.
- Karmaus W, Osuch JR, Eneli I, Mudd LM, Zhang J, Mikucki D, et al. 2009. Maternal levels of dichlorodiphenyl-dichloroethylene (DDE) may increase weight and body mass index in adult female offspring. *Occup Environ Med* 66(3):143–149, PMID: 19060027, <https://doi.org/10.1136/oem.2008.041921>.

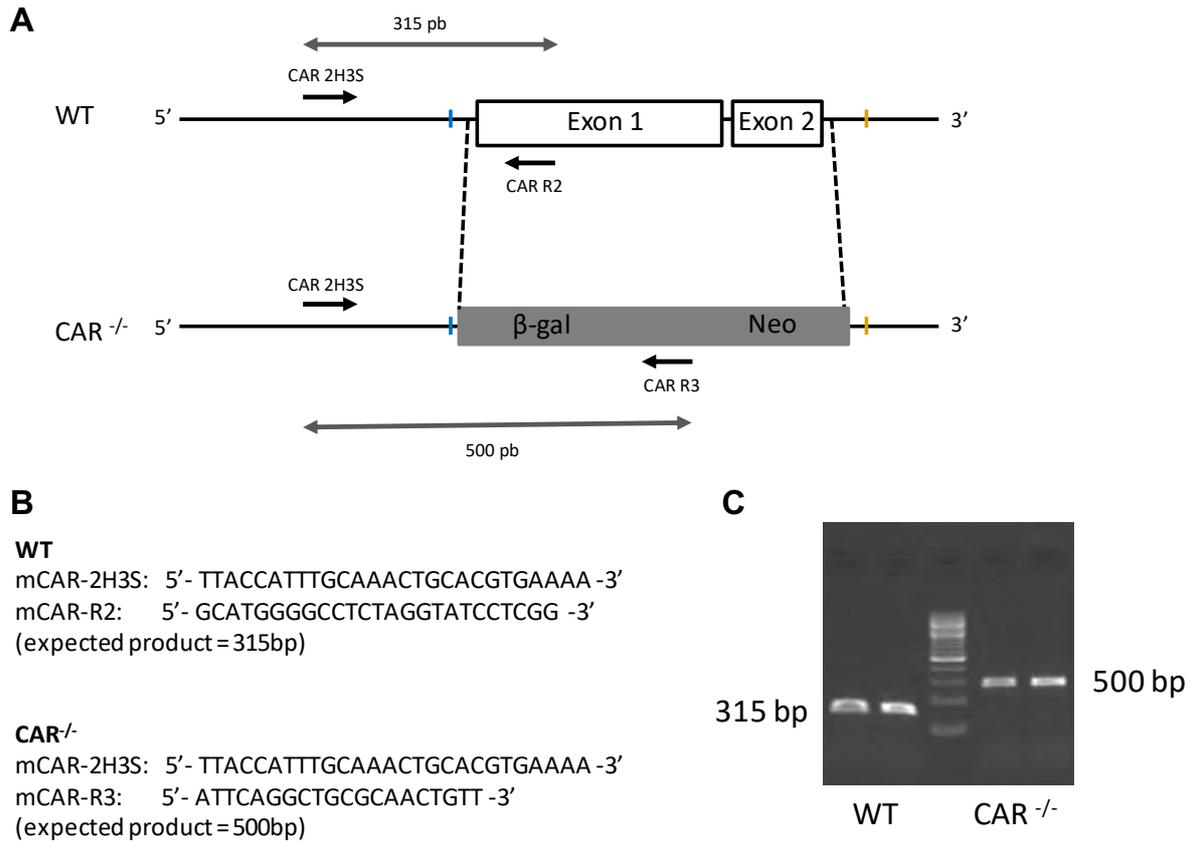
- Kim J, Park Y, Yoon KS, Clark JM, Park Y. 2013. Imidacloprid, a neonicotinoid insecticide, induces insulin resistance. *J Toxicol Sci* 38(5):655–660, PMID: 24025781, <https://doi.org/10.2131/jts.38.655>.
- Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Comas MJ, Cummings DW, et al. 2005. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 41(6):1313–1321, PMID: 15915481, <https://doi.org/10.1002/hep.20701>.
- Klipper-Aurbach Y, Wasserman M, Braunspeigel-Weintrob N, Borstein D, Peleg S, Assa S, et al. 1995. Mathematical formulae for the prediction of the residual beta cell function during the first two years of disease in children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus. *Med Hypotheses* 45(5):486–490, PMID: 8748093, [https://doi.org/10.1016/0306-9877\(95\)90228-7](https://doi.org/10.1016/0306-9877(95)90228-7).
- Lasram MM, Dhoubib IB, Bouzid K, Lamine AJ, Annabi A, Belhadjmidia N, et al. 2014. Association of inflammatory response and oxidative injury in the pathogenesis of liver steatosis and insulin resistance following subchronic exposure to malathion in rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 38(2):542–553, PMID: 25180440, <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.08.007>.
- Lasram MM, El-Golli N, Lamine AJ, Douib IB, Bouzid K, Annabi A, et al. 2015. Changes in glucose metabolism and reversion of genes expression in the liver of insulin-resistant rats exposed to malathion. The protective effects of N-acetylcysteine. *Gen Comp Endocrinol* 215:88–97, PMID: 25449180, <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.10.002>.
- Lassiter TL, Ryde IT, Levin ED, Seidler FJ, Slotkin TA. 2010. Neonatal exposure to parathion alters lipid metabolism in adulthood: interactions with dietary fat intake and implications for neurodevelopmental deficits. *Brain Res Bull* 81(1):85–91, PMID: 19615431, <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2009.07.002>.
- Li X, Pham HT, Janesick AS, Blumberg B. 2012. Triflumizole is an obesogen in mice that acts through peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ). *Environ Health Perspect* 120(12):1720–1726, PMID: 23086663, <https://doi.org/10.1289/ehp.1205283>.
- Lu YF, Jin T, Xu Y, Zhang D, Wu Q, Zhang YK, et al. 2013. Sex differences in the circadian variation of cytochrome p450 genes and corresponding nuclear receptors in mouse liver. *Chronobiol Int* 30(9):1135–1143, PMID: 23926955, <https://doi.org/10.3109/07420526.2013.805782>.
- Maglich JM, Stoltz CM, Goodwin B, Hawkins-Brown D, Moore JT, Kiewer SA. 2002. Nuclear pregnane x receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification. *Mol Pharmacol* 62(3):638–646, PMID: 12181440, <https://doi.org/10.1124/mol.62.3.638>.
- Maqbool F, Mostafalou S, Bahadar H, Abdollahi M. 2016. Review of endocrine disorders associated with environmental toxicants and possible involved mechanisms. *Life Sci* 145:265–273, PMID: 26497928, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.10.022>.
- Matic M, Bryzgalova G, Gao H, Antonson P, Humire P, Omoto Y, et al. 2013. Estrogen signalling and the metabolic syndrome: targeting the hepatic estrogen receptor alpha action. *PLoS One* 8(2):e57458, PMID: 23451233, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057458>.
- Montagner A, Polizzi A, Fouché E, Ducheix S, Lippi Y, Lasserre F, et al. 2016. Liver PPAR $\alpha$  is crucial for whole-body fatty acid homeostasis and is protective against NAFLD. *Gut* 65(7):1202–1214, PMID: 26838599, <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310798>.
- Mostafalou S, Abdollahi M. 2017. Pesticides: an update of human exposure and toxicity. *Arch Toxicol* 91(2):549–599, PMID: 27722929, <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1849-x>.
- Mulligan C, Kondakala S, Yang EJ, Stokes JV, Stewart JA, Kaplan BL, et al. 2017. Exposure to an environmentally relevant mixture of organochlorine compounds and polychlorinated biphenyls promotes hepatic steatosis in male Ob/Ob mice. *Environ Toxicol* 32(4):1399–1411, PMID: 27533883, <https://doi.org/10.1002/tox.22334>.
- Newbold RR, Padilla-Banks E, Jefferson WN. 2009. Environmental estrogens and obesity. *Mol Cell Endocrinol* 304(1–2):84–89, PMID: 19433252, <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.02.024>.
- Peris-Sampedro F, Cabré M, Basaure P, Reverte I, Domingo JL, Teresa Colomina M. 2015. Adulthood dietary exposure to a common pesticide leads to an obese-like phenotype and a diabetic profile in apoE3 mice. *Environ Res* 142:169–176, PMID: 26162960, <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.06.036>.
- Pessayre D. 2007. Role of mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 22 (suppl 1):S20–S27, PMID: 17567459, <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2006.04640.x>.
- Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C, Deretzi G. 2012. Nonalcoholic fatty liver disease: multimodal treatment options for a pathogenetically multiple-hit disease. *J Clin Gastroenterol* 46(4):272–284, <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e31824587e0>.
- Qatanani M, Moore DD. 2005. CAR, the continuously advancing receptor, in drug metabolism and disease. *Curr Drug Metab* 6(4):329–339, PMID: 16101572, <https://doi.org/10.2174/1389200054633899>.
- Régner M, Polizzi A, Lippi Y, Fouché E, Michel G, Lukowicz C, et al. In press. Insights into the role of hepatocyte PPAR $\alpha$  activity in response to fasting. *Mol Cell Endocrinol*, PMID: 28774777, <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.07.035>.
- Riant E, Waget A, Cogo H, Amal J-F, Burcelin R, Gourdy P. 2009. Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. *Endocrinology* 150(5):2109–2117, PMID: 19164473, <https://doi.org/10.1210/en.2008-0971>.
- Rizzati V, Briand O, Guillou H, Garnet-Payastre L. 2016. Effects of pesticide mixtures in human and animal models: an update of the recent literature. *Chem Biol Interact* 254:231–246, PMID: 27312199, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.06.003>.
- Rosen MB, Das KP, Rooney J, Abbott B, Lau C, Corton JC. 2017. PPAR $\alpha$ -independent transcriptional targets of perfluoroalkyl acids revealed by transcript profiling. *Toxicology* 387:95–107, PMID: 28558994, <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.05.013>.
- Seidler FJ, Slotkin TA. 2011. Developmental neurotoxicity targeting hepatic and cardiac sympathetic innervation: effects of organophosphates are distinct from those of glucocorticoids. *Brain Res Bull* 85(3–4):225–230, PMID: 21453761, <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.03.021>.
- Shen P, Hsieh TH, Yue Y, Sun Q, Clark JM, Park Y. 2017. Deltamethrin increases the fat accumulation in 3T3-L1 adipocytes and *Caenorhabditis elegans*. *Food Chem Toxicol* 101:149–156, PMID: 28119079, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.01.015>.
- Smith CA, Want EJ, O'Maille G, Abagyan R, Siuzdak G. 2006. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal Chem* 78(3):779–787, PMID: 16448051, <https://doi.org/10.1021/ac051437y>.
- Smyth GK. 2004. Linear Models and Empirical Bayes Methods for Assessing Differential Expression in Microarray Experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 3(1):1–25, PMID: 16646809, <https://doi.org/10.2202/1544-6115.1027>.
- 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) $\alpha$  and PPAR $\gamma$  and quantitative analysis of in vivo induction pathway. *Toxicol Appl Pharmacol* 217(3):235–244, PMID: 17084873, <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.08.011>.
- Tamura K, Inoue K, Takahashi M, Matsuo S, Irie K, Kodama Y, et al. 2013. Dose-response involvement of constitutive androstane receptor in mouse liver hypertrophy induced by triazole fungicides. *Toxicol Lett* 221(1):47–56, PMID: 23721867, <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.05.011>.
- Tautenhahn R, Böttcher C, Neumann S. 2008. Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS. *BMC Bioinformatics* 9:504, PMID: 19040729, <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-504>.
- Trygg J, Wold S. 2002. Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). *J Chemom* 16(3):119–128, <https://doi.org/10.1002/cem.695>.
- Ugham J, Acott PD, O'Regan P, Sinal CJ, Crocker JF, Geldenhuys L, et al. 2007. The pesticide adjuvant, Toximul<sup>TM</sup>, alters hepatic metabolism through effects on downstream targets of PPAR $\alpha$ . *Biochim Biophys Acta* 1772(9):1057–1064, PMID: 17643967, <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2007.06.003>.
- Velmurugan G, Ramarasath T, Swaminathan K, Mithieux G, Rajendran J, Dhivakar M, et al. 2017. Gut microbial degradation of organophosphate insecticides induces glucose intolerance via gluconeogenesis. *Genome Biol* 18(1):8, PMID: 28115622, <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1134-6>.
- Veselkov KA, Linton JC, Ebbels TM, Crocford D, Volynkin VV, Holmes E, et al. 2009. Recursive segment-wise peak alignment of biological <sup>1</sup>H NMR spectra for improved metabolic biomarker recovery. *Anal Chem* 81(1):56–66, PMID: 19045366, <https://doi.org/10.1021/ac801154a>.
- Wahlberg B, Falkner KC, Gregory B, Ansett D, Young D, Conkin DJ, et al. 2013. Polychlorinated biphenyl 153 is a diet-dependent obesogen that worsens nonalcoholic fatty liver disease in male C57BL/6J mice. *J Nutr Biochem* 24(9):1587–1595, PMID: 23618531, <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.01.009>.
- Wang TJ, Ngo D, Psychogios N, Dejam A, Larson MG, Vasan RS, et al. 2013. 2-Aminoadipic acid is a biomarker for diabetes risk. *J Clin Invest* 123(10):4309–4317, PMID: 24091325, <https://doi.org/10.1172/JCI64801>.
- Wang P, Wang HP, Xu MY, Liang YJ, Sun YJ, Yang L, et al. 2014. Combined subchronic toxicity of dichlorvos with malathion or pirimicarb in mice liver and serum: a metabolomic study. *Food Chem Toxicol* 70:222–230, PMID: 24907623, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.05.027>.
- Wei P, Zhang J, Egan-Hafley M, Liang S, Moore DD. 2000. The nuclear receptor CAR mediates specific xenobiotic induction of drug metabolism. *Nature* 407(6806):920–923, PMID: 11057673, <https://doi.org/10.1038/35038112>.
- Wikoff WR, Anfora AT, Liu J, Schultz PG, Lesley SA, Peters EC, et al. 2009. Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(10):3698–3703, PMID: 19234110, <https://doi.org/10.1073/pnas.0812874106>.
- Wu Y, Williams EG, Dubuis S, Morris A, Jovaisais V, Houten SM, et al. 2014. Multilayered genetic and omics dissection of mitochondrial activity in a mouse reference population. *Cell* 158(6):1415–1430, PMID: 25215496, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.039>.
- 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(9):1569–1578, PMID: 25092180, <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1322-7>.

- Zhang S, Jin Y, Zeng Z, Liu Z, Fu Z. 2015. Subchronic exposure of mice to cadmium perturbs their hepatic energy metabolism and gut microbiome. *Chem Res Toxicol* 28(10):2000–2009, PMID: 26352046, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00237>.
- Zhu L, Brown WC, Cai Q, Krust A, Chambon P, McGuinness OP, et al. 2013. Estrogen treatment after ovariectomy protects against fatty liver and may improve pathway-selective insulin resistance. *Diabetes* 62(2):424–434, PMID: 22986069, <https://doi.org/10.2337/db11-1718>.
- Zhu L, Martinez MN, Emfinger CH, Palmisano BT, Stafford JM. 2014. Estrogen signaling prevents diet-induced hepatic insulin resistance in male mice with obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 306(10):E1188–E1197, PMID: 24691030, <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00579.2013>.

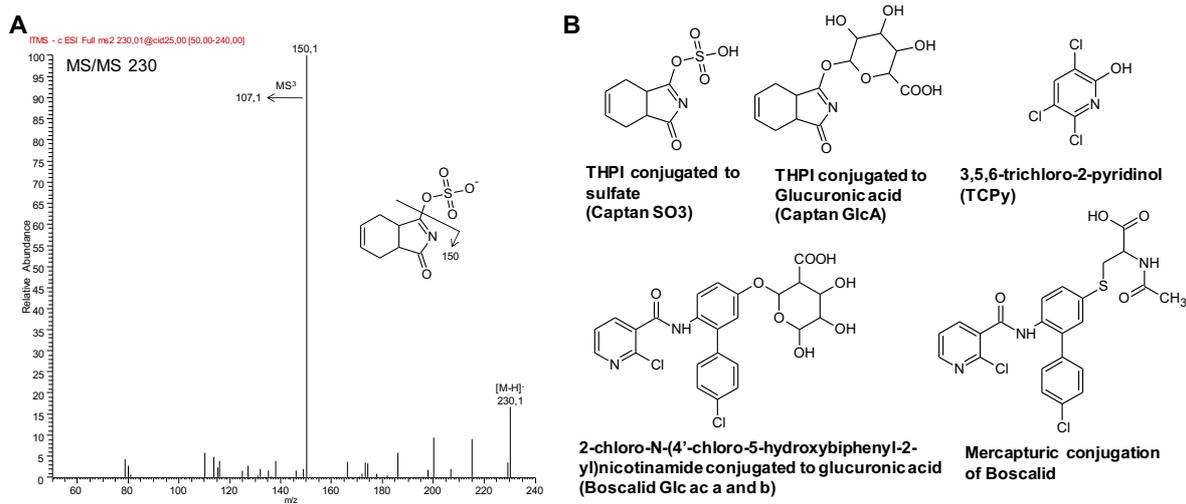
Supplemental Material

Metabolic effects of a chronic dietary exposure to a low-dose pesticide cocktail in mice: sexual dimorphism and role of the Constitutive Androstane Receptor.

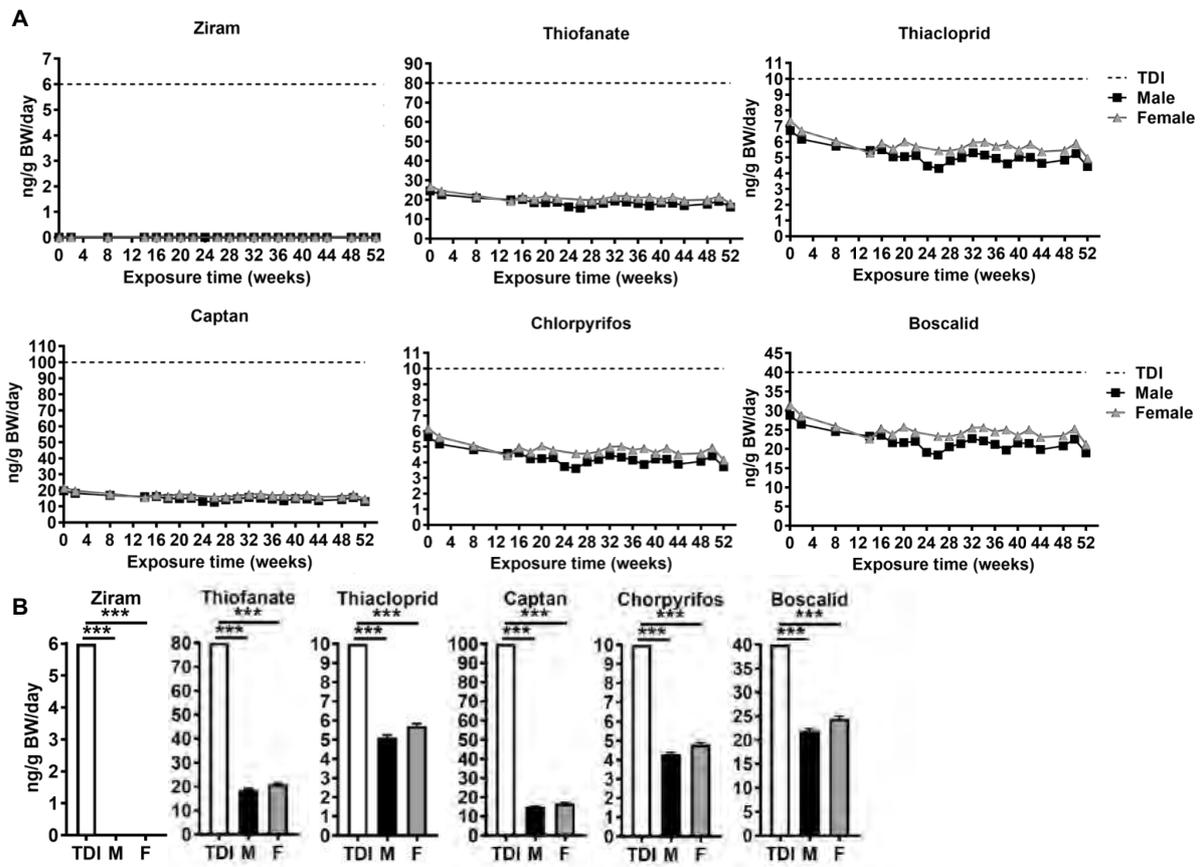
Céline Lukowicz, Sandrine Ellero-Simatos, Marion Régner, Arnaud Polizzi, Frédéric Lasserre, Alexandra Montagner, Yannick Lippi, Emilien L. Jamin, Jean-François Martin, Claire Naylies, Cécile Canlet, Laurent Debrauwer, Justine Bertrand-Michel, Talal Al Saati, Vassilia Théodorou, Nicolas Loiseau, Laïla Mselli-Lakhal, Hervé Guillou, Laurence Gamet-Payrastre.



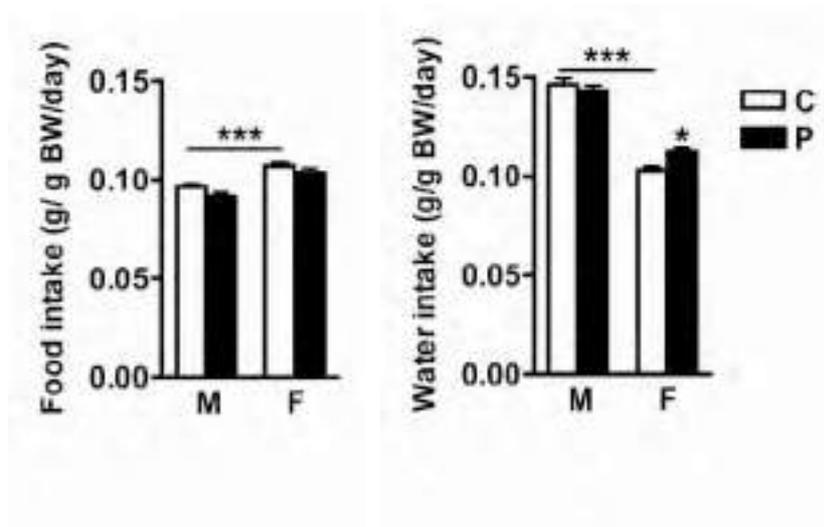
**Figure S1.** Diagram of the murine CAR gene. (A) Boxes represent exons 1 and 2 and arrows the forward and reverse primers CAR 2H3S and CAR R2 in WT animal, CAR 2H3S and CAR R3 in CAR<sup>-/-</sup> mice. Homologous recombination resulted in replacement of exon 1 and 2 with the  $\beta$ -gal and neo resistance genes. (B) Primer Sequences for the 5' strand mCAR 2H3S, and for the 3' strand mCAR R2 in WT and mCAR-R3 in CAR<sup>-/-</sup> animals. (C) The sizes of the generated DNA sequences using PCR were 315 and 500 bp in WT and CAR<sup>-/-</sup> mice respectively.



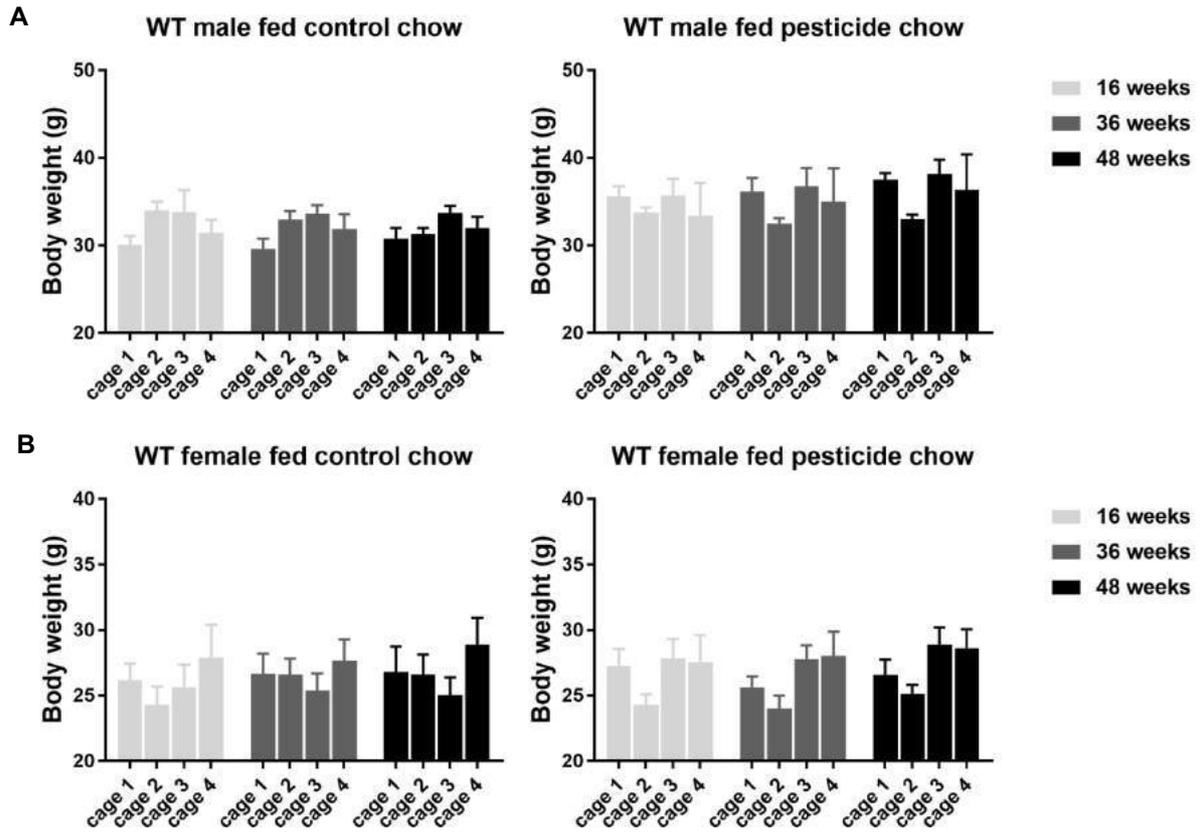
**Figure S2.** Pesticide metabolites identified in urine samples from male and female mice exposed for 48 weeks. **(A)** An example MS/MS spectrum of m/z 230 corresponding to [M-H] of THPI conjugated to sulphate (Captan SO<sub>3</sub>). **(B)** Chemical structures of pesticide metabolites identified in urine samples. Position of glucuronide. Boscalid Glc ac (a and b) and mercapturic conjugation of boscalid are undetermined.



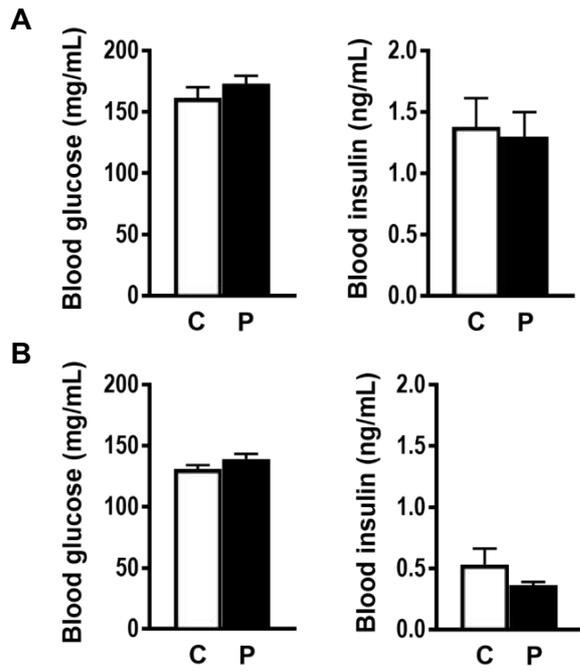
**Figure S3.** Quantity of ingested pesticides per gram of WT mouse. **(A)** Level of exposure based on pesticide levels in pellets as determined by GC/MS LC/MS/MS and measured food consumption as a function of exposure duration; **(B)** Mean  $\pm$  standard error of the mean pesticide exposure in male (M) and female (F) mice over the 52-week exposure period. \*\*\*  $P < 0.001$  compared to respective TDI as determined using the Student's t-test.  $n = 18$  mice per group. TDI, Tolerable Daily Intake; BW body weight.



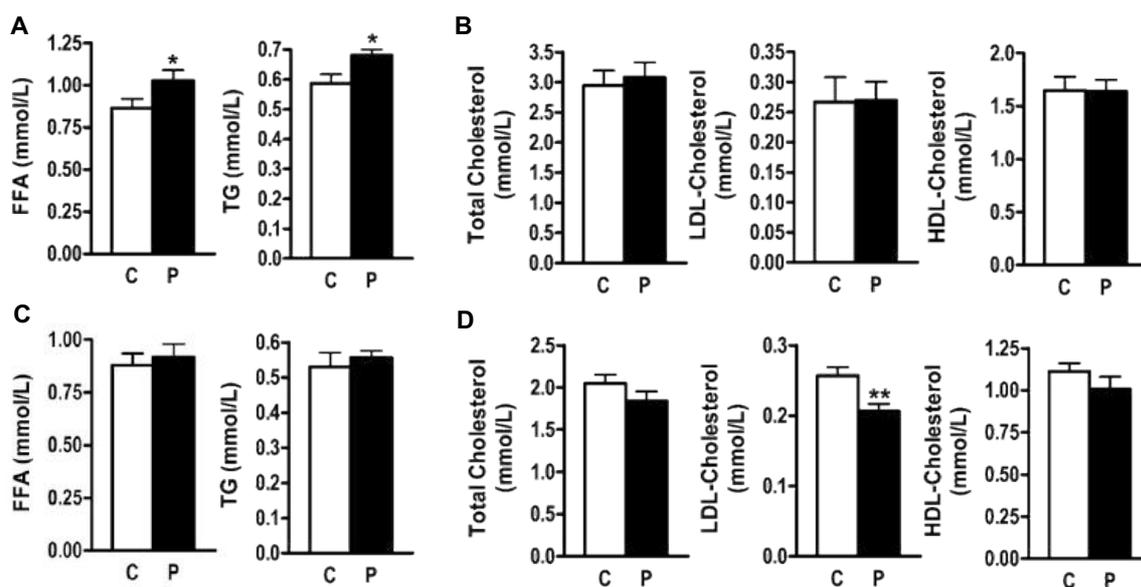
**Figure S4.** Food and water intake in WT male (M) and female (F) mice who were fed pesticide chow (P) or control chow (C). Data are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean. \* $P < 0.05$  compared to mice fed control chow as determined using a two-way ANOVA. \*\*\* $P < 0.001$  between male and female mice fed control chow as determined using a two-way ANOVA.



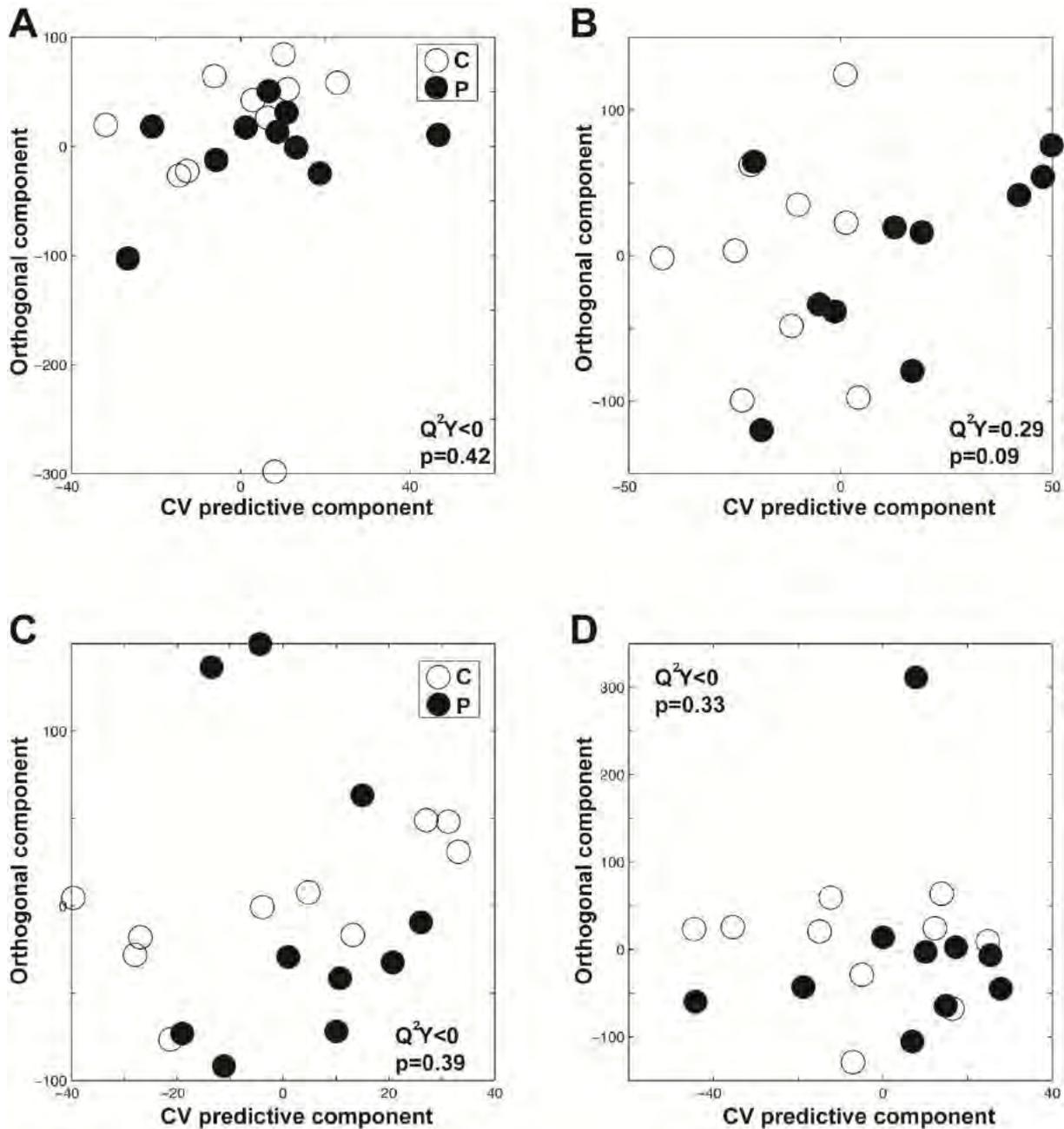
**Figure S5.** Body weight of WT males (**A**) fed control and pesticide chow and of females (**B**) fed control and pesticide chow after 16, 36 and 48 weeks of exposure. Results are the mean  $\pm$  standard error of the mean with  $n=5$  (cages 1 and 2) and  $n=4$  (cages 3 and 4).



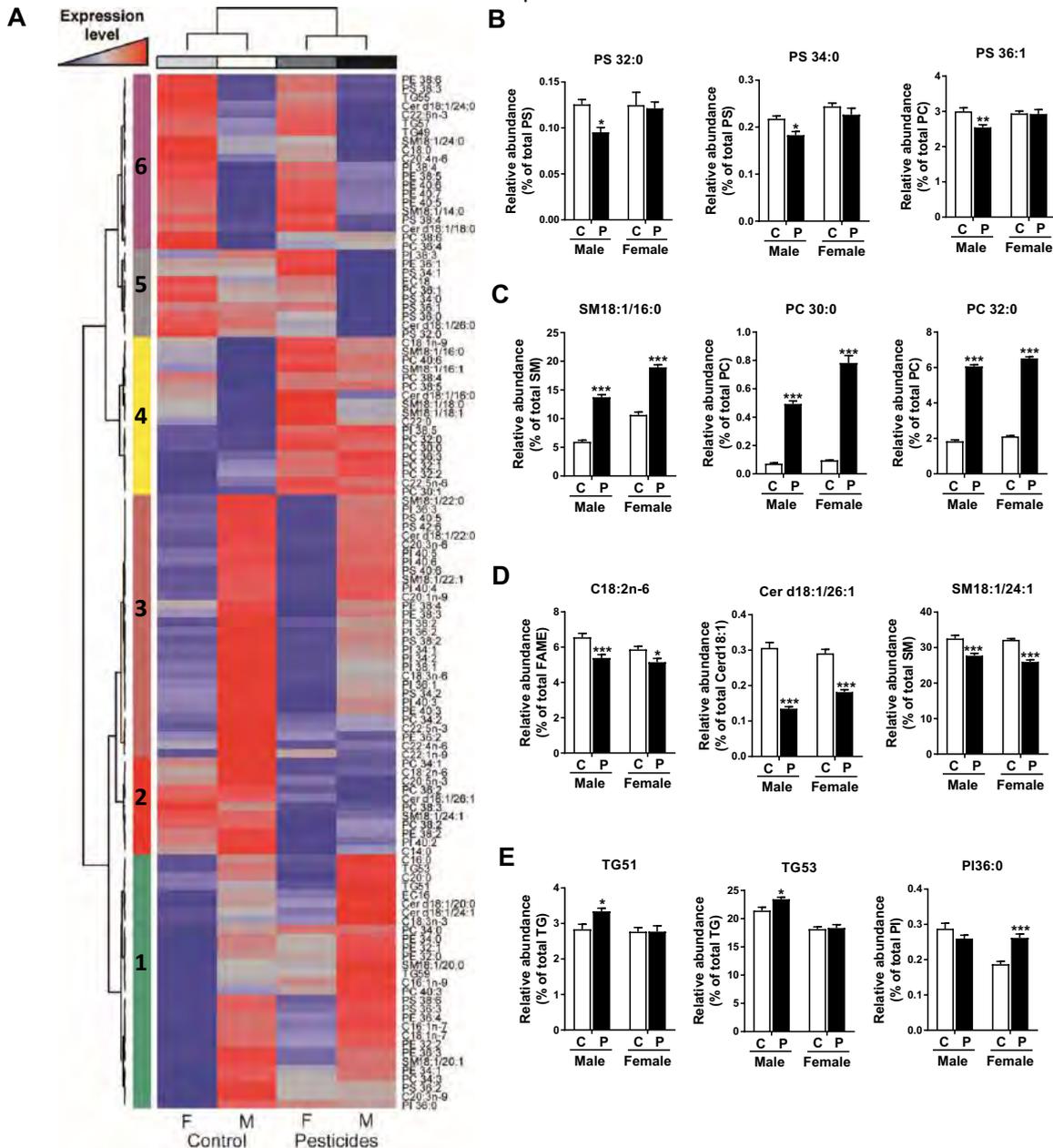
**Figure S6.** Blood glucose and blood insulin measured in WT male (A) and female (B) mice after 52 weeks of control (C) or pesticide (P) chow. Data are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean.  $n = 18$  mice per group.



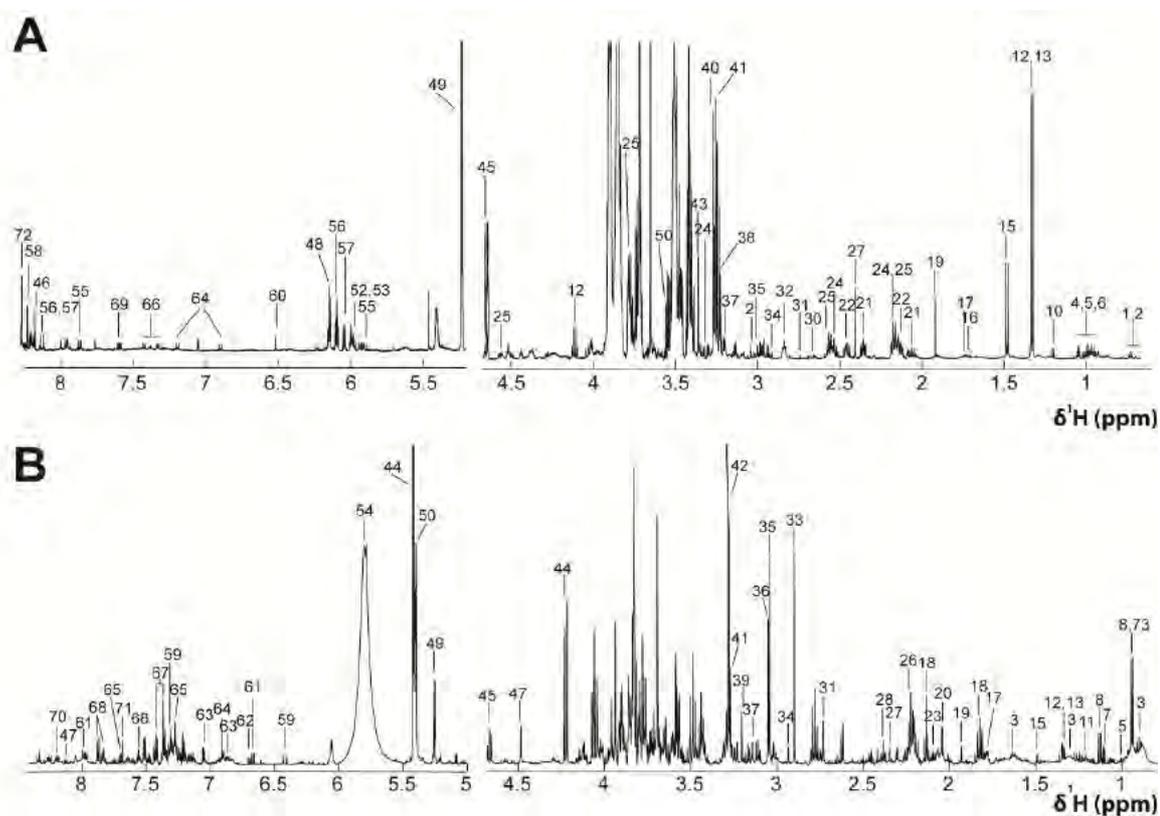
**Figure S7.** Analysis of plasma from WT male (**A, B**) and female (**C, D**) mice fed control (C) or pesticide (P) for 52 weeks. Data are presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean. \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ . P-values represent the difference between mice fed control chow and those fed pesticide chow as determined using a Student's t-test;  $n = 18$  mice per group. FFA, free fatty acid; TG, triglyceride; LDL, low density lipoprotein; HDL, high density lipoprotein



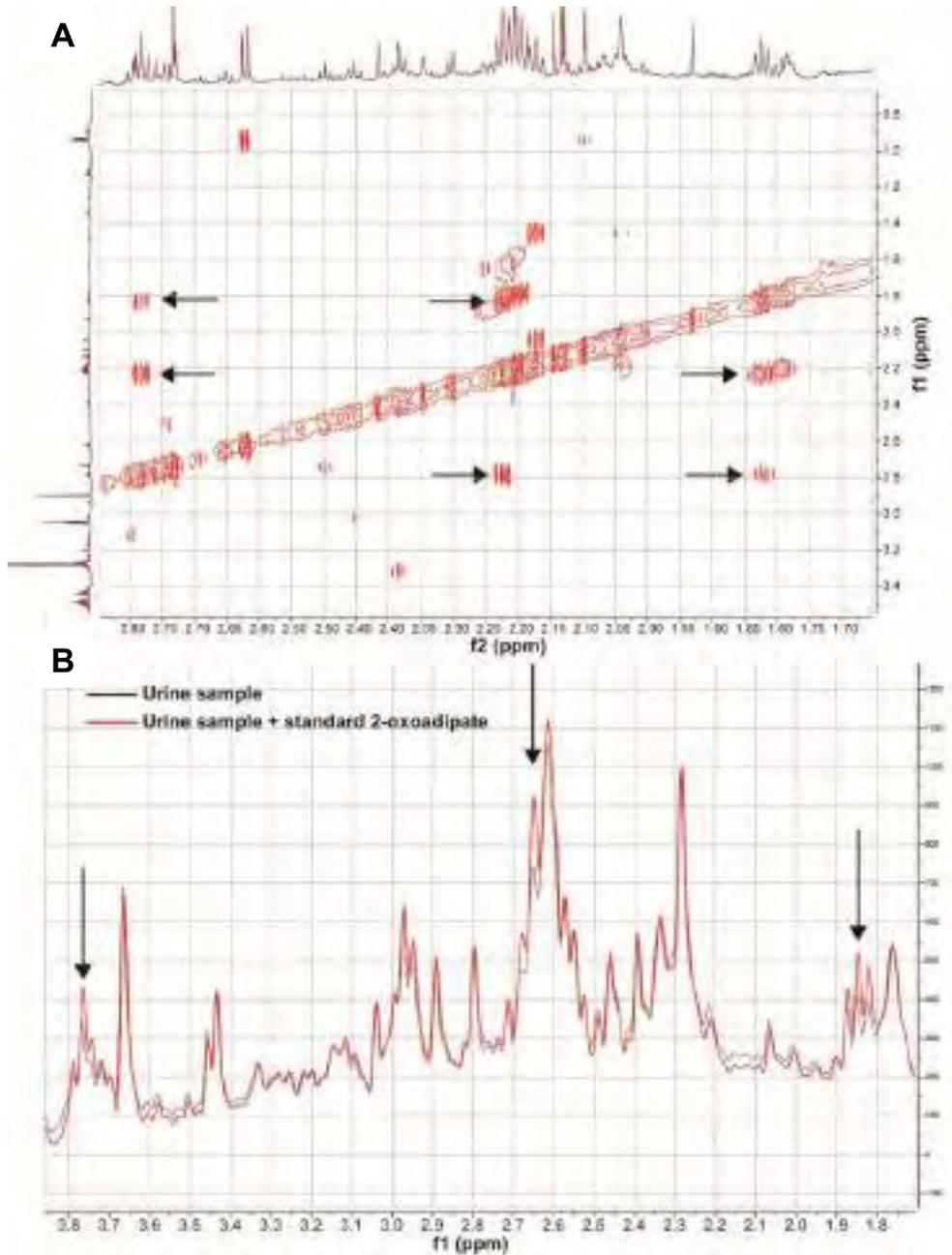
**Figure S8.** O-PLS-DA score plots derived from the plasma spectra of WT males (A), WT females (B),  $CAR^{-/-}$  males (C) and  $CAR^{-/-}$  females (D) after 48 weeks of either control (C) or pesticide (P) chow. Plasmatic biomarkers of pesticide exposure were investigated using  $^1H$ -NMR based metabolomics.  $Q^2Y$  represents the goodness of fit for the PLS-DA models and p-values were derived using 1000 permutations of the Y matrix.



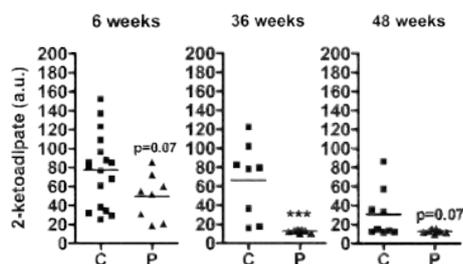
**Figure S9.** Hepatic lipid analysis of WT male (M) and female (F) mice after 52 weeks of eating either control (C) or pesticide (P) chow. **(A)** Heat map with hierarchical clustering, allowing the definition of 6 lipid clusters, as labeled on the left side of the map. **(B)** The relative PS32:0, PS34:0, PS36:1 abundances for cluster 5 (lipid species specifically down-regulated in males exposed to pesticides). **(C)** The relative SM18:1/16:0, PC30:0, PC 32:0 abundances for cluster 4 (lipid species up-regulated in males and females exposed to pesticides). **(D)** The relative C18:2n-6, Cer d18:1/C26:1, SM18:1/24:1 abundances for cluster 2 (lipid species down-regulated in males and females exposed to pesticides). **(E)** The relative TG51, TG53, PI36:0 abundances for cluster 1 (lipid species specifically up-regulated either in males or in females exposed to pesticides). Data are presented as the mean of relative abundance in each lipid species  $\pm$  standard error of the mean. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . P-values represent the difference between mice fed control chow and those fed pesticide chow as determined using a Student's t-test;  $n = 18$  mice per group. PS, Phosphatidylserin; SM Sphingomyelin; PC, Phosphatidylcholine; FAME, Fatty acid methyl ester, TG triglycerides; PI, phosphatidylinositols, PE, phosphatidylethanolamine.



**Figure S10.** Partially assigned 600 MHz 1D NMR spectra of (A) aqueous liver extract and (B) urine from mice. Numerical keys are described in Table S4.

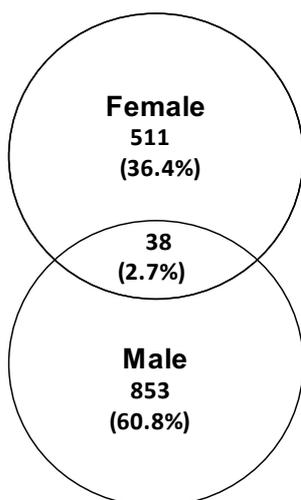


**Figure S11.** Identification of 2-ketoadipate in urine from WT female fed pesticide chow. (A)  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  800MHz TOCSY spectra of a representative female urine sample showing the cross-peaks between the different signals of 2-oxoadipate (multiplet at 1.84 ppm, triplet at 2.22 ppm, and triplet at 2.79 ppm). (B) A spike-in experiment was performed in a representative urine sample using the standard of 2-oxoadipate and confirmed an increase of the three above-described signals (as pointed by black arrows) in the spiked-in sample.

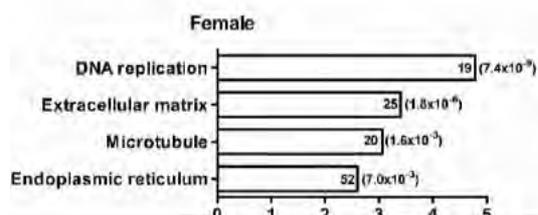


**Figure S12.** Area under the curve integrated for the 1.81-1.84 ppm (triplet) signal of 2-ketoadipate obtained from <sup>1</sup>H NMR urine samples analysis of WT female mice fed control (C) or pesticide (P) chow for 6, 36, or 48 weeks

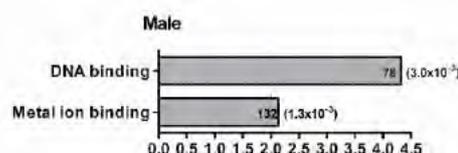
**Down regulated genes in response to pesticides**



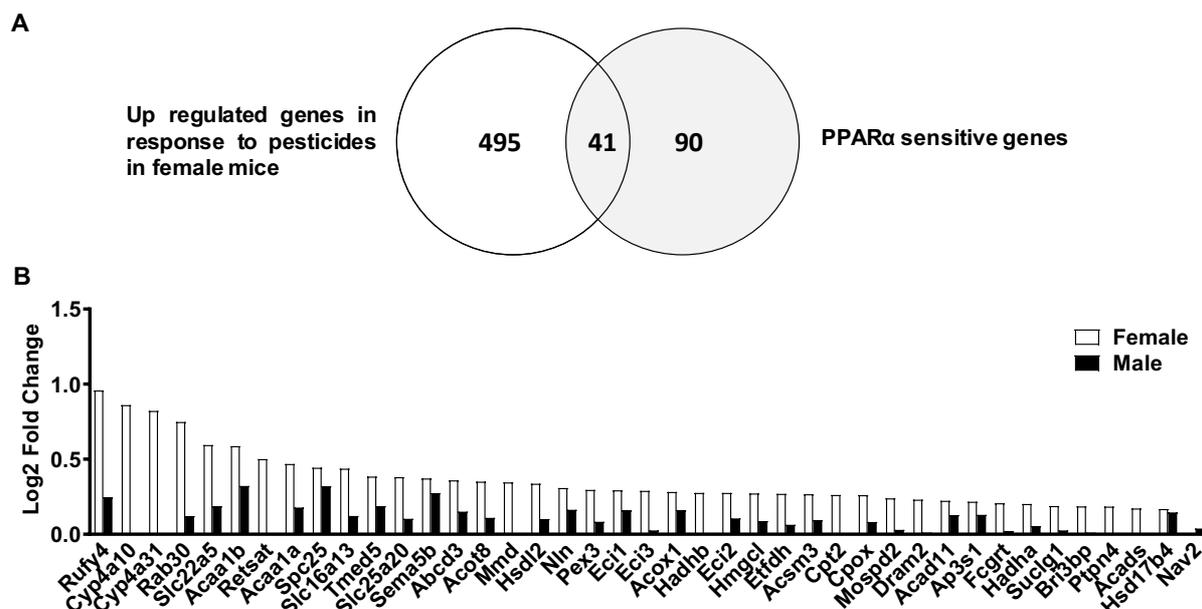
**Exposed females**



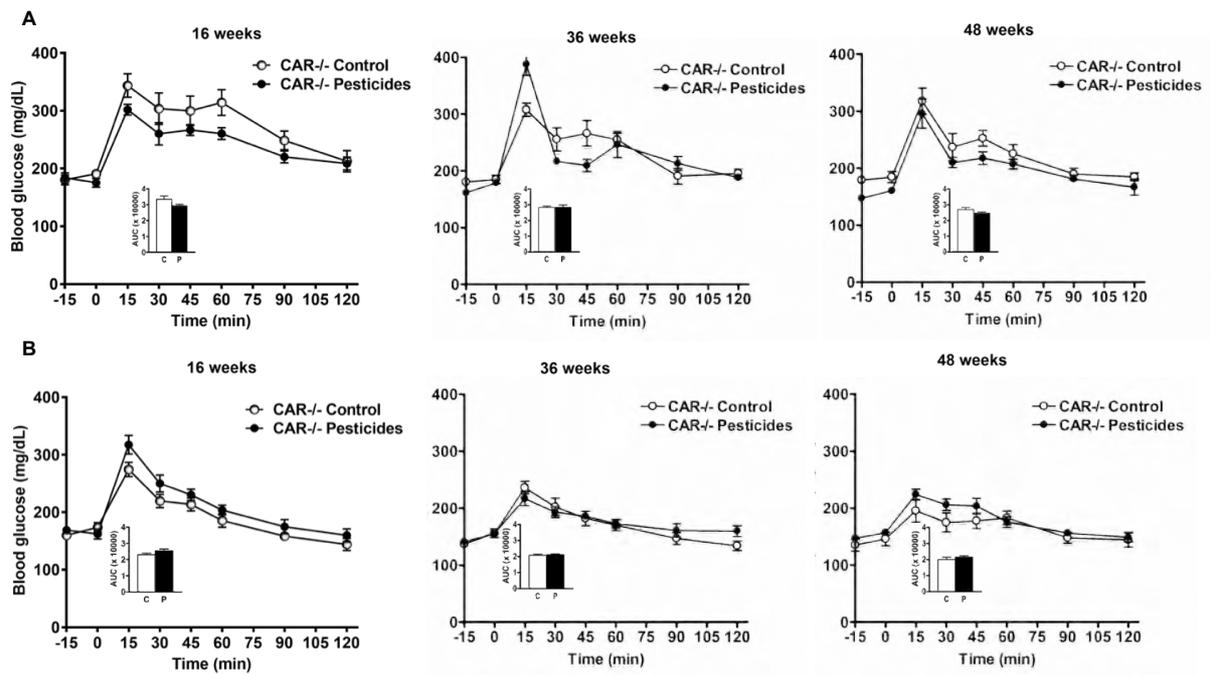
**Exposed males**



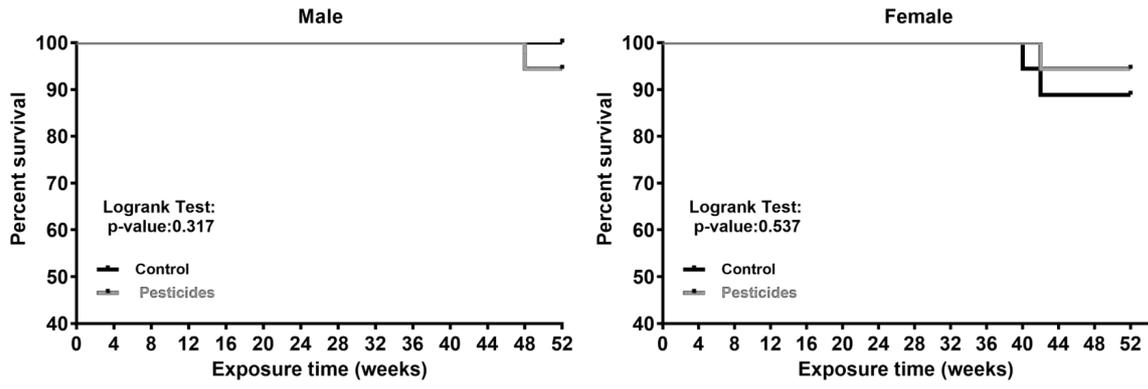
**Figure S13.** Venn diagram representing the number of hepatic genes specifically down-regulated after 52 weeks of pesticide exposure in male and female mice (n=6 mice per group). A total of 511 genes were specifically down-regulated in female mice ( $p < 0.05$ ), whereas 853 genes were significantly down-regulated in male mice. Using the David Bioinformatic resource, different GO terms were identified in female and male mice. Histograms show the enrichment score for each pathway. Gene number and the corresponding p-value are indicated to the right of the histograms.



**Figure S14.** Comparison of genes identified as upregulated in response to pesticide exposure in female mice with PPAR $\alpha$ -sensitive genes as identified from Montagner et al. (2016) and Régnier et al. (2017). **(A)** Venn diagram showing the numbers of hepatic genes specifically up-regulated in response to pesticides in female mice ( $p < 0.05$ ) in this study, the number PPAR $\alpha$ -sensitive genes, and the number of genes shared between them. Genes were considered PPAR $\alpha$ -sensitive when up-regulated ( $p < 0.05$ ) in response to pharmacological agonist (fenofibrate) in the liver of PPAR $\alpha$ hep<sup>+/+</sup> but not in PPAR $\alpha$ hep<sup>-/-</sup> mice (Montagner et al., 2016) and down-regulated ( $p < 0.05$ ) in the liver of fed PPAR $\alpha$ hep<sup>-/-</sup> mice when compared to fed PPAR $\alpha$ hep<sup>+/+</sup> mice (Régnier et al, 2017). **(B)** Expression profile for the 41 hepatic genes identified in our study and reported as related to PPAR $\alpha$  – dependent pathways by Montagner et al. (2016) and Régnier et al. (2017) in females and males fed pesticide chow for 52 weeks.



**Figure S15.** Glucose tolerance was assessed in (A) male and (B) female  $CAR^{-/-}$  mice at 16 weeks *via* i.p. glucose administration, at 36 and 48 weeks *via* oral glucose administration in the pesticide exposed (P) and control (C) groups. n=9 mice per group. Data are presented as mean  $\pm$  s.e.m.



**Figure S16.** Kaplan-Meier survival curve for male and female WT mice fed control or pesticide chow for 52 weeks.

**Table S1: Oligonucleotide sequences used in real-time PCR**

<b>Gene</b>	<b>NCBI Refseq</b>	<b>Forward primer (5' 3')</b>	<b>Reverse primer (5' 3')</b>
<i>TBP</i>	NM_013684	ACTTCGTGCAAGAAATGCTGAA	GCAGTTGTCCGTGGCTCTCT
<i>Cyp2b10</i>	NM_009999	TTTCTGCCCTTCTCAACAGGAA	ATGGACGTGAAGAAAAGGAACAAC
<i>Cyp2b9</i>	NM_010000	CTTTGCTGGAAGTGAAGACCACA	GATCTGAAAATCTCTGAATCTCATGG
<i>Cyp4a10</i>	NM_010011	TCCAGCAGTTCCCATCACCT	TTGCTTCCCAGAACCATCT
<i>Ehhadh</i>	NM_023737	CGTCTCCTCGGTTGGTGTTT	ATTATCTTCTTTGCAGTATCTAGCTGCTT
<i>Acot5</i>	NM_145444	CATGGCTCTGGCTTATTATAAATATGAT	CCTTTGGAAATCCCTAGCAGG
<i>Cpt1</i>	NM_013495	GAAGAAGAAGTTCATCCGATTCAAG	GATATCACACCCACCACCACG
<i>Acox1</i>	NM_015729	CAGACCCTGAAGAAATCATGTGG	CAGGAACATGCCCAAGTGAAG

**Table S2. List of the metabolites of pesticides screened by UHPL-HRMS**

<b>Pesticide</b>	<b>Metabolite</b>	<b>Raw formula</b>
Boscalid	parent	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O
Boscalid	glucuronide conjugate	C <sub>24</sub> H <sub>20</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>
Boscalid	sulfate conjugate	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S
Boscalid	glutathione conjugate	C <sub>28</sub> H <sub>27</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> S
Boscalid	Cys-Gly conjugate	C <sub>23</sub> H <sub>20</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S
Boscalid	mercapturate conjugate	C <sub>23</sub> H <sub>19</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S
Boscalid	cysteine conjugate	C <sub>21</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S
Boscalid	hydroxy	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Boscalid	hydroxyglucuronide	C <sub>24</sub> H <sub>20</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>
Boscalid	hydroxysulfate	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S
Boscalid	hydroxydiglucuronide	C <sub>30</sub> H <sub>28</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>14</sub>
Boscalid	hydroxydisulfate	C <sub>24</sub> H <sub>20</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>11</sub> S
Boscalid	hydrolyzed	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>2</sub> Cl
Boscalid	hydrolyzed and glucuronide conjugate	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>8</sub> Cl
Boscalid	hydrolyzed and sulfate conjugate	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>5</sub> ClS
Boscalid	dihydroxy	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Captan	parent	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>2</sub> S
Captan	Glucuronide conjugate	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>8</sub> S
Captan	Sulfate conjugate	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>5</sub> S <sub>2</sub>
Captan	THPI	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>
Captan	THPI glucuronide conjugate	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>8</sub>
Captan	THPI sulfate conjugate	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>5</sub> S
Captan	5-OH THPI	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>
Captan	5-OH THPI glucuronide conjugate	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>9</sub>
Captan	5-OH THPI sulfate conjugate	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>6</sub> S
Captan	3-OH THPI	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>
Captan	3-OH THPI glucuronide conjugate	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>9</sub>
Captan	3-OH THPI sulfate conjugate	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>6</sub> S
Captan	THPAM	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>
Captan	THPAM glucuronide conjugate	C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>9</sub>
Captan	THPAM sulfate conjugate	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>6</sub> S
Captan	THPI epoxide	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>
Captan	THPI epoxide glucuronide conjugate	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>9</sub>
Captan	THPI epoxide sulfate conjugate	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>6</sub> S
Captan	5-OH THPAM	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>4</sub>
Captan	5-OH THPAM glucuronide conjugate	C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>10</sub>
Captan	5-OH THPAM sulfate conjugate	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>7</sub> S
Captan	3-OH THPAM	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>4</sub>
Captan	3-OH THPAM glucuronide conjugate	C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>10</sub>
Captan	3-OH THPAM sulfate conjugate	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>7</sub> S
Captan	diOH HHPAM	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>5</sub>
Captan	diOH HHPAM glucuronide conjugate	C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>11</sub>
Captan	diOH HHPAM sulfate conjugate	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>8</sub> S
Captan	4,5-diOH HHPI	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>4</sub>
Captan	diOH HHPI glucuronide conjugate	C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>10</sub>
Captan	4,5-diOH HHPI sulfateconjugate	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>7</sub> S
ChlorpyrifosEt	parent	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> PS

Chapitre III

ChlorpyrifosEt	TCPy	C <sub>5</sub> H <sub>2</sub> Cl <sub>3</sub> NO
ChlorpyrifosEt	TCPy glucuronide conjugate	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>7</sub>
ChlorpyrifosEt	TCPy sulfate conjugate	C <sub>5</sub> H <sub>2</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>4</sub> S
Thiacloprid	parent	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> ClN <sub>4</sub> S
Thiacloprid	4-OH	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> ClN <sub>4</sub> OS
Thiacloprid	4-OH glucuronide conjugate	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>7</sub> S
Thiacloprid	4-OH sulfate conjugate	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S
Thiacloprid	6-CN-glycine conjugate	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Thiacloprid	6-CN-glycine glucuronide conjugate	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>9</sub>
Thiacloprid	6-CN-glycine sulfate conjugate	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S
Thiacloprid	hydroxylamide	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S
Thiacloprid	hydroxylamide glucuronide conjugate	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>8</sub>
Thiacloprid	hydroxylamide sulfate conjugate	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>5</sub> S <sub>2</sub>
Thiacloprid	O-analogue	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> ClN <sub>4</sub> O
Thiacloprid	hydrolyzed	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ClNO <sub>2</sub>
Thiacloprid	Hydrolyzed and glucuronide conjugate	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> ClNO <sub>8</sub>
Thiacloprid	Hydrolyzed and sulfate conjugate	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ClNO <sub>5</sub> S
Thiophanate-Me	parent	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>
Thiophanate-Me	glucuronide conjugate	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>10</sub> S <sub>2</sub>
Thiophanate-Me	sulfate conjugate	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> S <sub>3</sub>
Thiophanate-Me	carbendazime	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>
Thiophanate-Me	carbendazime glucuronide conjugate	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub>
Thiophanate-Me	carbendazime sulfate conjugate	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S
Thiophanate-Me	5-OH-carbendazime	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>
Thiophanate-Me	5-OH-carbendazime glucuronide conjugate	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub>
Thiophanate-Me	5-OH-carbendazime sulfate conjugate	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S
Ziram	dithiocarbamic acid	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> S <sub>2</sub>
Ziram	dithiocarbamic glucuronide conjugate	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub>
Ziram	dithiocarbamic glutathione conjugate	C <sub>14</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub>
Ziram	dithiocarbamic Cys-Gly conjugate	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>
Ziram	dithiocarbamic mercapturate conjugate	C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub> S <sub>2</sub>
Ziram	dithiocarbamic cysteine conjugate	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub> S <sub>2</sub>
Ziram	carbamic acid	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>
Ziram	carbamic acid glucuronide conjugate	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>
Ziram	carbamic acid sulfate conjugate	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub> S

**Table S3. Fasting blood glucose (mg/dL) in male and female mice fed either pesticide or control chow after 16, 36, and 48 weeks.**

Exposure	Male mice	Female mice	P-value <sup>a</sup>
Control chow			
16 weeks	131.5	170.1	0.001
36 weeks	124.0	142.7	0.019
48 weeks	118.1	144.3	0.035
Pesticide chow			
16 weeks	145.8	182.6	0.002
36 weeks	145.4	182.8	0.003
48 weeks	163.0	172.2	0.045

Note: n=9 mice per group.

<sup>a</sup>P values represent difference between male and female mice as determined using a Student's t-test.

### Chapitre III

**Table S4. <sup>1</sup>H and partial <sup>13</sup>C assignments for identified metabolites. U, urine; L, liver.**

Number	Metabolite	Metabolic pathway	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicity	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	Matrix
1	Bile acids (mixed)	Bile component	0,6-0,75	s		L
			0,92	s		
2	Bile acids (tauroconjugated)	Bile component	0,72	s		L
			0,92	s		
			3,08	t		
			0,87	t	16	
3	Short and Medium Chain Fatty ac	Energy metabolism	1,3	m	31,8	U
			1,59	m	28,4	
			2,3	m		
			0,96	t	23,6	
4	Leucine	Amino acid	1,72	m		L
			3,74	m		
			0,99	d	19,5	
5	Valine	Amino acid metabolism	1,05	d	20,8	U, L
			2,29			
			3,62			
			0,94	t		
6	Isoleucine	Amino acid	1,01	d		L
			1,26	m		
			1,48	m		
			2	m		
			3,65	d		
7	$\alpha$ -keto- $\beta$ -methyl-N-valerate	$\alpha$ -keto acids	0,88			U
			1,1	d	16,5	
			1,71			
			2,94			
8	2-ketoisocaproate	$\alpha$ -keto acids	0,94	d	24,6	U
			2,12			
			2,62	d	51	
			1,13	d	19,3	
9	$\alpha$ -ketoisovalerate	$\alpha$ -keto acids	3,03	m		U
			1,19	d	24,4	
			2,32	dd		
10	3-hydroxybutyrate	Ketone body	2,4	dd		L
			4,14	m		
			1,21	s	30,4	
			2,6			
11	$\beta$ -hydroxyisovalerate	Amino acid metabolism				U
12	Lactate	Organic acids - Energy metabolism	1,33	d	22,8	U,L
			4,11	q		
13	Threonine	Amino acid metabolism	1,33	d	22,3	U,L
			3,61			
			4,23			
14	$\alpha$ -hydroxyisobutyrate	Amino acid metabolism	1,36	s	29,4	U
15	Alanine	Amino acid metabolism	1,49	d	19,1	U,L
			3,79			
16	Ornithine	Amino acid metabolism	1,72	m		L
			1,93	m		
			3,03	t	41,9	
			3,77	t		
17	Putrescine	Amino acid metabolism	1,78	m	25,2	U
			3,07	t		
18	2-oxoadipate	Amino acid metabolism	1,84	m	22,5	U
			2,22	t	22,5	
			2,79		41,6	
19	Acetate	Organic acids - Energy metabolism	1,93	s		U,L
20	N-acetyl groups	N-acetylated glycoproteins	2,06	s	25,2	U
21	L- glutamate	Amino acid metabolism	2,06	m	29,8	L
			2,35	m	36,4	
			3,76	dd		
22	L- glutamine	Amino acid metabolism	2,13	m	29,3	L
			2,45	m		
			3,77	t		
			2,14	s	17,15	
23	Methionine	Amino acid metabolism	3,79			U
24	Glutathion (oxidized)	Glutathion metabolism	2,17	t	29,1	L
			2,53	m	34,2	
			2,98	dd		
			3,31	m	41,6	
			3,76	m		
			4,75	m		
25	Glutathion (reduced)	Glutathion metabolism	2,17	m		L
			2,56	m		
			2,95	m		
			3,76	m		
			4,56	dd		
26	Ureidopropionate	Nucleotide metabolism	2,38	t	40,3	U
			3,31	q		

### Chapitre III

27	Succinate	Organic acids - Energy metabolism	2,42	s	36,8	U,L
28	$\alpha$ -ketoglutarate	Organic acids - Energy metabolism	2,45 3,02	t t	33,4	U
29	Methylamine	Choline metabolism - Host-gut microbiota cometabolism	2,61	s	26,7	U
30	L-aspartic acid	Amino acid metabolism	2,66 2,8 3,89	dd dd dd		L
31	Dimethylamine	Choline metabolism - Host-gut microbiota cometabolism	2,72	s	37,6	U,L
32	Unknown 1		2,84 3,62	t m	60,4	L
33	Trimethylamine	Choline metabolism - Host-gut microbiota cometabolism	2,9	s	47,6	U
34	Dimethylglycine	Choline-betaine metabolism - One carbon metabolism	2,93	s	46,5	U,L
35	Creatine	Muscle energy metabolism	3,04 3,94	s s	39,9 56,6	U,L
36	Creatinine	Muscle energy metabolism - renal fonction marker	3,05 4,07	s s	33,1 59,2	U
37	Choline	Choline-betaine metabolism - One carbon metabolism	3,2 3,55	s	56,7	U,L
38	O-phosphocholine	Choline-betaine metabolism - One carbon metabolism	3,21 3,58 4,13	s m m	56,6	L
39	Carnitine	Energy metabolism	3,23	s	56,8	U
40	Betaine	Amino acid metabolism	3,27 3,88	s s	55,9	L
41	Taurine	Amino acid metabolism	3,28 3,44	t t	50,4 38,5	U,L
42	Trimethylamine N-oxide	Choline metabolism - Host-gut microbiota cometabolism	3,28	s	62,3	U
43	Methanol		3,36	s	51,7	L
44	Sucrose	Carbohydrate metabolism	3,49 3,61 3,7			U
			5,4 3,81 4,05 4,23	d	95,1	
45	$\beta$ -glucose	Carbohydrate metabolism	3,51 3,75			U,L
46	AMP		4,66 4,01 4,36 4,5 6,14 8,27 8,62	d dd dd dd d s s	98,7 89,6	L
47	N-methylnicotinamide	Nicotinate - nicotinamide metabolism	4,48 8,19 8,97 9,28	s t d s	51,5	U
48	$\beta$ -arabinose	Carbohydrate metabolism	3,52 3,77 3,95	d		U
49	$\alpha$ -glucose	Carbohydrate metabolism	4,53 3,45 3,56 3,72 3,84 3,97 5,25	d	94,8	U,L
50	Glycine	Amino acid metabolism	3,56	s	44,4	L
51	Allantoin	Nucleotide metabolism	5,4	s	66,2	U
52	UDP-glucose	Carbohydrate metabolism	5,6 5,95 7,93	dd d d		L
53	UDP-glucuronate	Carbohydrate metabolism	5,6 5,98 7,96	dd d d		L
54	Urea	Amino acid metabolism	5,8			U
55	Uridine		5,89 5,9 7,89	d d d		L

### Chapitre III

56	NADP+	Coenzyme	6,03 6,1 8,15 8,42 8,584 8,82 9,12 9,3	s d d s s s d s		L
57	NAD+	Coenzyme	6,04 6,09 8,18 8,2 8,44 8,84 9,15 9,34	d d s dd s d d s	89,5 102,6	L
58	Inosine	Purine metabolism	6,11 8,23 8,34	d s s	91,1	L
59	3-hydroxycinnamate	Amino acid metabolism - Host-gut microbiota cometabolism	6,43 6,9 7,16 7,31	d dd t t	118,4	U
60	Fumarate	Energy metabolism	6,52	s		L
61	N-methyl-2-pyridone-5-carboxan	Nicotinate - nicotinamide metabolism	6,67 7,96 8,33	d dd d	120,9 132,8 145,3	U
62	N-methyl-4-pyridone-5-carboxan	Nicotinate - nicotinamide metabolism	6,7 7,83 8,54	d m d	122,9	U
63	p-cresol glucuronide	Amino acid metabolism - Host-gut microbiota cometabolism	6,84 7,05 7,22	d d d	119,5	U
64	Tyrosine	Amino acid metabolism	6,87 7,19	d	132,5	U,L
65	3-indoxylsulfate	Amino acid metabolism - Host-gut microbiota cometabolism	7,2 7,27 7,5 7,7	t t d d	124,3 120,1	U
66	Phenylalanine	Amino acid metabolism	3,12 3,26 7,33 7,38 7,43	dd dd m m m		L
67	Phenylacetylglucine	Amino acid metabolism - Host-gut microbiota cometabolism	3,68 7,36 7,42	s m m	131 131,8	U
68	Hippurate	Amino acid metabolism - Host-gut microbiota cometabolism	7,56 7,65 7,88	t t dd	135	U
69	Nicotinurate	Nicotinate - nicotinamide metabolism	3,99 7,6 8,25 8,72 8,94	s dd m dd s		L
70	Nicotinamide	Nicotinate - nicotinamide metabolism	7,61 8,23 8,7 8,95	dd dd dd s		U
71	Pseudouridine	Nucleotide metabolism	7,68	s	144,5	U
72	Formate	Organic acids - One-carbon metabolism	8,45	s		U,L
73	Isovalerate	Energy metabolism	0,9 1,94 2,02	d m d		U

**Table S5. OPLS correlation coefficients determined for discriminate treatment models constructed from <sup>1</sup>H-NMR spectra for urine obtained from untreated mice and mice treated with pesticides at 6 weeks, 24 weeks, and 48 weeks.** Metabolites with correlation coefficients greater than Rcrit at the 5% ( $p=0.05$ ) level were selected as the discriminant biomarkers. A positive correlation coefficient corresponds to a relative increase in the concentration of metabolite in the pesticide-treated group and a corresponding decrease in the control group.



## DISCUSSION

La première partie de mes travaux de thèse converge vers un rôle déterminant de CAR dans le contrôle du maintien de l'homéostasie énergétique en conditions physiologiques.

Les données de la littérature montrent que l'activation pharmacologique du récepteur CAR dans un contexte pathologique (souris mâles ob/ob ou soumises à un régime riche en graisse) améliore le diabète, réduit la prise de poids ainsi que la stéatose hépatique en participant au contrôle de l'expression de gènes clés du métabolisme (Dong et al., 2009c; Gao et al., 2009). Ainsi, l'activation pharmacologique de CAR limite la production hépatique de glucose en inhibant les gènes de la néoglucogénèse, et participe ainsi à limiter l'hyperglycémie. Par ailleurs, l'activation de CAR limite l'accumulation des acides gras hépatiques par activation de leur catabolisme ( $\beta$ -oxydation) et inhibition de leur synthèse (lipogénèse *de novo*). Cet effet anti-obésogène de CAR est aussi lié à un effet favorable sur la lipolyse du tissu adipeux blanc et sur la thermogénèse dans le tissu adipeux brun (Dong et al., 2009c; Gao et al., 2009).

Grâce à une approche pharmacologique nous avons confirmé le rôle de CAR dans la régulation de l'expression des gènes impliqués dans la néoglucogénèse et mis en évidence par contre une régulation positive de l'expression des gènes de la glycolyse (*Gck*, *Lpk*) et de la lipogénèse *de novo* tels que *Fasn*, *Elovl6*, *Gpat* et *Pnpla3*, gène dont le polymorphisme (rs738409, I148M) est associé à la survenue de la NAFLD (Mitsche et al., 2018; Romeo et al., 2008). Ces régulations transcriptionnelles sont dépendantes du récepteur CAR et indépendantes de la voie LXR/SREBP-1c.

### **Limites de l'activation pharmacologique du récepteur CAR**

L'approche pharmacologique présente des limites, elle peut masquer l'activité physiologique et circadienne du récepteur (Lu et al., 2013; Montagner et al., 2016b). La question de la spécificité de l'agoniste, le TCPOBOP classiquement utilisé sur les espèces murines peut se poser aussi. Ainsi, chez les souris femelles une induction de l'expression des gènes tels que *Cyp2b10*, *Lpk*, *Pnpla3* et *Spot14* est observée aussi bien chez les WT et les CAR<sup>-/-</sup> suite à un traitement par le TCPOBOP. Cela pose la question de la spécificité de cet agoniste pharmacologique (*cf* Etude expérimentale, Chapitre I).

Aussi, nous avons réalisé une étude *in vivo* des effets de la délétion totale du récepteur nucléaire CAR chez les souris des deux sexes. Nous avons ainsi confirmé son rôle dans le maintien de l'homéostasie énergétique en condition physiologique. Par ailleurs, cette approche a permis de mettre en évidence un rôle endogène dimorphique du récepteur CAR. En effet, la délétion de CAR entraîne une obésité, un diabète ainsi qu'une stéatose hépatique uniquement chez les mâles. Les femelles sont protégées.

## DISCUSSION

Les hormones sexuelles des femelles sont impliquées dans cette protection contre ces perturbations métaboliques.

### **Rôle potentiel des hormones stéroïdiennes dans l'activité dimorphique du récepteur CAR : la corticostérone et les oestrogènes des acteurs clés ?**

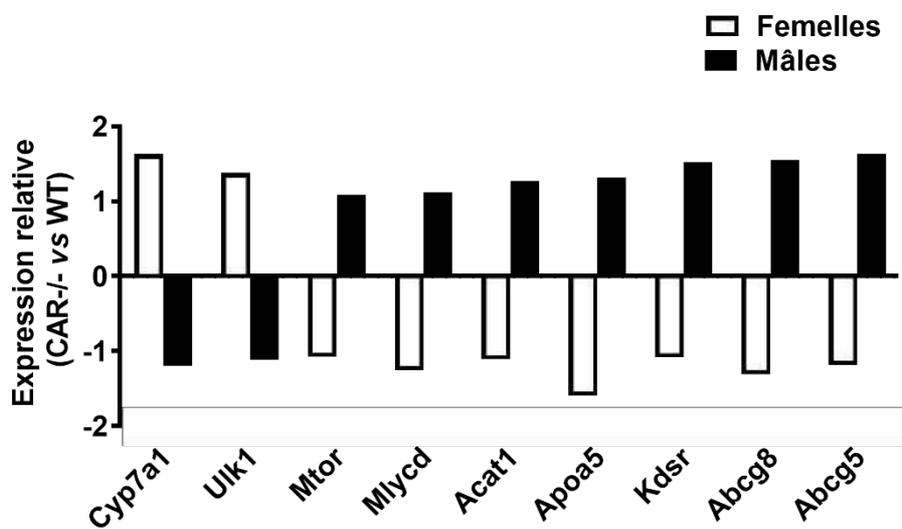
Le rôle dimorphique du récepteur CAR pouvait être envisagé étant donné l'affinité de ce récepteur pour les androstanes, métabolites de la testostérone et premiers ligands agonistes inverses identifiés de ce récepteur et par son rôle majeur dans le catabolisme et l'inactivation des hormones stéroïdiennes (Chen et al., 2007a; Forman et al., 1998a; Yamamoto et al., 2006; Yu et al., 2005). De plus, l'activité de ce récepteur présente aussi un dimorphisme sexuel important avec une expression des gènes cibles de CAR plus importante chez les femelles par rapport aux mâles (Hernandez et al., 2009a). Cependant, l'influence et l'importance du sexe sur le métabolisme énergétique et sa dépendance au récepteur CAR n'ont jamais été étudiées ni soulevées.

Pourtant, dans la littérature d'autres récepteurs nucléaires présentent un important dimorphisme sexuel vis-à-vis du métabolisme énergétique. Ainsi les souris femelles présentant une délétion au niveau hépatique du récepteur aux androgènes soumises à un régime riche en graisse sont protégées de la stéatose et de l'insulino-résistance retrouvées chez les mâles (Lin et al., 2008). Seules les souris mâles déficientes pour le récepteur PPAR $\alpha$  présentent une sévère stéatose tandis que les femelles déficientes pour ce récepteur présentent une obésité avec l'âge plus sévère que les mâles (Costet et al., 1998). La résistance à la survenue de la stéatose chez ces femelles serait liée à une capacité plus importante de sécrétion des TG dans les VLDL par rapport aux mâles (Lewitt and Brismar, 2002). Des souris déficientes pour la synthèse endogène d'oestrogène (déficientes pour l'aromatase (ARKO)) dont les récepteurs ER sont ainsi inactivés présentent un dimorphisme sexuel, avec un développement d'une stéatose hépatique uniquement chez les mâles (Hewitt et al., 2004).

Nous proposons comme première hypothèse que l'effet dimorphique de l'absence de CAR sur le contrôle de l'homéostasie énergétique est lié à un déséquilibre hormonal. Plus précisément, l'absence du récepteur CAR conduit à des effets contrastés sur les niveaux d'hormones stéroïdiennes avec des conséquences pathologiques distinctes selon le sexe. Les souris CAR<sup>-/-</sup> mâles et femelles présentent des niveaux élevés en corticostérone par rapport aux souris de type sauvage. Les glucocorticoïdes sont de puissants régulateurs de la différenciation adipocytaire (Pantoja et al., 2008). Sur des souris présentant une surexpression de l'enzyme de synthèse des glucocorticoïdes uniquement au niveau adipocytaire, la 11 $\beta$  hydroxystéroïde déshydrogénase de type 1 (11 $\beta$ HSD1), les niveaux élevés de corticostérone induisent une obésité viscérale ainsi qu'une insulino-résistance, un diabète et une hyperlipidémie (Masuzaki et al., 2001). La dexaméthasone, ligand synthétique du récepteur aux

## DISCUSSION

glucocorticoïdes (GR) induit la dégradation du transporteur GLUT2 et l'inhibition de la sécrétion d'insuline dans des cellules  $\beta$ -pancréatiques isolées (Gremlich et al., 1997). L'apparition d'une stéatose hépatique suite à un traitement chronique aux glucocorticoïdes est un effet secondaire couramment observé (Vegiopoulos and Herzig, 2007) et les patients atteints du syndrome de Cushing sont aussi confrontés à cette pathologie (Pivonello et al., 2016). De façon intéressante, LXR $\beta$  semble impliqué dans l'effet pro-stéatogénique des glucocorticoïdes, les souris déficientes pour LXR $\beta$  sont protégées de la stéatose hépatique induite par un traitement aux glucocorticoïdes (Patel et al., 2011). Dans ce sens la délétion de CAR induit l'expression des gènes cibles de LXR, *Abcg5* et *Abcg8* uniquement chez les mâles et pourrait de ce fait potentialiser l'effet pro-stéatogénique des glucocorticoïdes (**Figure 18**).



**Figure 18: Exemple de gènes hépatiques différentiellement exprimés entre mâles et femelles déficients pour le récepteur CAR.** Profil d'expression de 9 gènes hépatiques des souris CAR $^{-/-}$  âgées de 16 semaines différentiellement exprimés en fonction du sexe ( $p$ -value $<0.05$ ,  $n=6$ ).

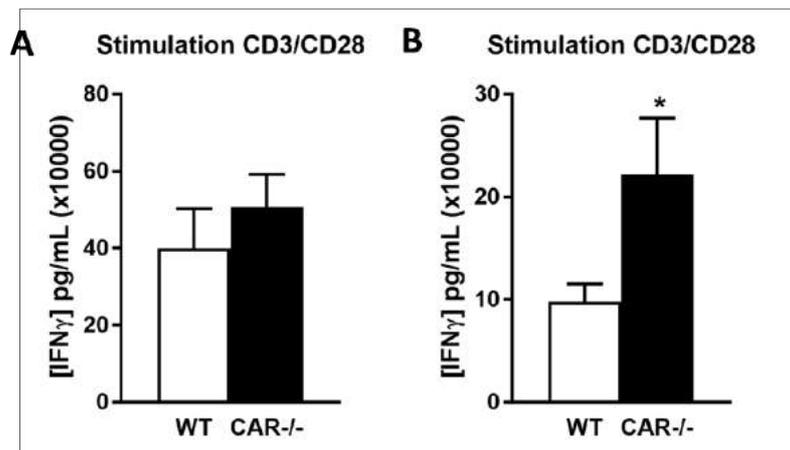
L'absence de phénotype métabolique chez les femelles déficientes pour le récepteur CAR peut être liée à leur niveau d'œstrogènes. Le rôle protecteur des œstrogènes vis-à-vis des perturbations métaboliques est bien connu (Bryzgalova et al., 2006; Riant et al., 2009b). De plus, une étude récente a montré une interaction potentielle entre le récepteur GR et les œstrogènes. Notamment, la déplétion en œstrogènes (E2) par la réalisation d'ovariectomies induit une stéatose hépatique dépendante du récepteur GR *via* son activation par l'hormone FSH (Quinn et al., 2018). Ainsi chez les femelles CAR $^{-/-}$  les conséquences délétères de niveaux élevés de corticostérone seraient atténuées par les niveaux élevés en œstrogènes. Les œstrogènes limiteraient la sécrétion de FSH et donc l'activation de GR et de ses effets délétères.

La protection des femelles CAR $^{-/-}$  contre les troubles métaboliques observés chez les mâles CAR $^{-/-}$  est dépendante des hormones sexuelles et semble plus particulièrement dépendre des œstrogènes. En

## DISCUSSION

effet, les ovariectomies réalisées sur ces souris lèvent cette protection et entraînent les mêmes perturbations métaboliques que celles observées chez les mâles  $CAR^{-/-}$  (diabète, obésité, stéatose hépatique). Il serait intéressant de soumettre ces souris  $CAR^{-/-}$  à un régime riche en graisse pour savoir si leurs hormones sexuelles leur confèrent aussi une protection contre l'effet obésogène et diabétogène de ce régime.

D'autres observations apportent des arguments en faveur d'un niveau élevé en œstrogènes chez les souris femelles  $CAR^{-/-}$ , notamment au niveau de leur réponse immunologique. En effet, les souris femelles  $CAR^{-/-}$  présentent une altération de la réponse immunologique adaptative, la stimulation de leurs splénocytes mis en culture avec les anticorps anti-CD3/CD28 augmente de façon significative les niveaux de cytokines  $IFN\gamma$ , et ceci n'est pas retrouvé chez les souris mâles  $CAR^{-/-}$  (**Figure 19**). Cette observation est en accord avec l'hypothèse selon laquelle les souris femelles  $CAR^{-/-}$  présenteraient des niveaux élevés en œstrogènes, les œstrogènes jouant un rôle dans la modulation de la réponse adaptative (Beagley and Gockel, 2003; Fox et al., 1991)



**Figure 19: Etude de la réponse immunologique systémique des souris WT et  $CAR^{-/-}$ .** Les splénocytes issus de souris mâles (A) et femelles (B) WT et  $CAR^{-/-}$  sont mis en culture et stimulés au CD3/CD28. Les concentrations en  $IFN\gamma$  dans le milieu de culture sont mesurées par un dosage ELISA.

Ces souris femelles  $CAR^{-/-}$  présentent également une diminution de la perméabilité paracellulaire au niveau du jéjunum, or dans la littérature le potentiel rôle des œstrogènes comme facteur diminuant la perméabilité intestinale a été décrit (Braniste et al., 2009). Ceci conforte l'hypothèse d'une implication des œstrogènes dans l'effet dimorphique de CAR.

Pour poursuivre ces travaux et vérifier l'ensemble des hypothèses, différentes perspectives sont envisagées. Diminuer les niveaux de corticostérone chez les souris  $CAR^{-/-}$  par une ablation des surrénales ou en utilisant la thermoneutralité (30°C) (Giles et al., 2017), ou limiter leur production en utilisant un inhibiteur pharmacologique de l'enzyme la  $11\beta$ HSD1 (par exemple le Métyrapone) sont

## DISCUSSION

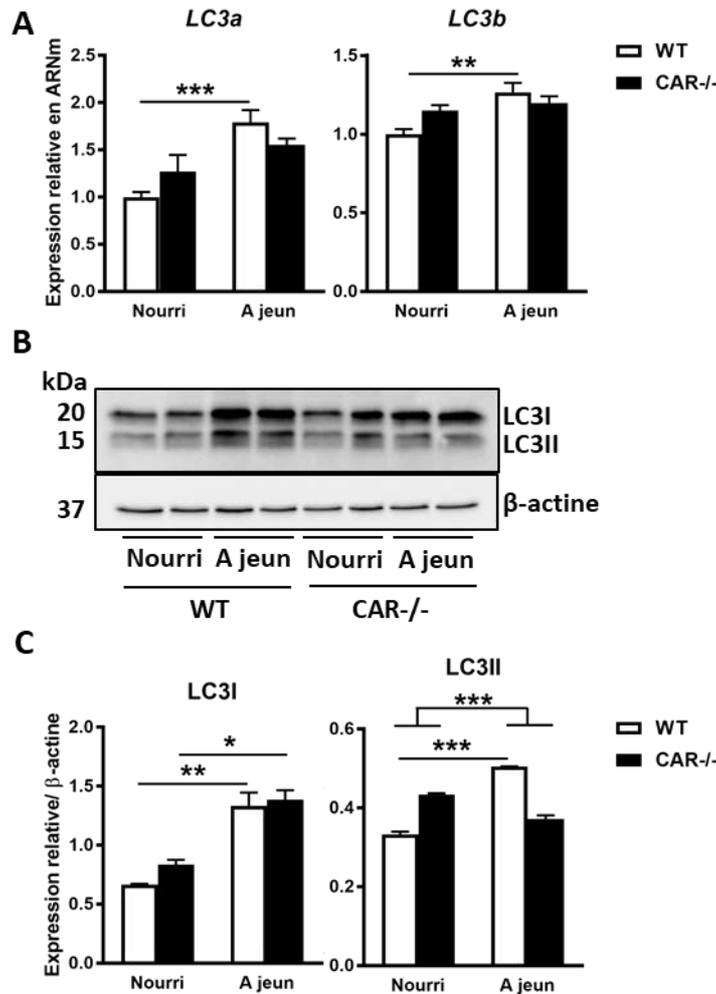
des stratégies qui permettraient de confirmer ou non le rôle des corticostéroïdes dans les troubles métaboliques observés chez les souris *CAR*<sup>-/-</sup>. De plus, il serait intéressant de réaliser un dosage par spectrométrie de masse de toutes les hormones (Analyse stéroïdienne globale) sur les souris âgées *CAR*<sup>-/-</sup> mâles et femelles afin d'établir le profil précis des dérégulations hormonales engendrées dans chaque sexe par la déficience de ce récepteur. En effet, des niveaux élevés d'une autre hormone, la testostérone ont été retrouvés uniquement chez les souris mâles *CAR*<sup>-/-</sup>, ce résultat est en accord avec les données de la littérature montrant que des niveaux élevés en testostérone chez les souris *CAR*<sup>-/-</sup> sont responsables d'une élévation de la densité osseuse chez ses souris (Cho et al., 2014). Il serait intéressant de ce fait de mesurer chez ces souris *CAR*<sup>-/-</sup> mâles les niveaux d'ostéocalcine, hormone sécrétée par les ostéoblastes et exerçant des effets métaboliques importants comme par exemple une augmentation de la sécrétion et de l'expression de l'insuline dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques (Bilotta et al., 2018; Booth et al., 2013).

### Rôle de l'autophagie dans l'effet dimorphique du récepteur CAR

L'analyse du transcriptome hépatique par microarray a permis d'établir une autre hypothèse impliquant le processus d'autophagie pour expliquer l'effet stéatogénique de la délétion de CAR chez les mâles. L'autophagie est définie comme un processus de recyclage permettant l'autolyse de composants cytoplasmiques par le lysosome. La dérégulation de l'autophagie contribue au développement de troubles métaboliques (Kim and Lee, 2014). Il a en effet été montré, chez la souris, que des délétions hépatocytaires de gènes impliqués dans la régulation de l'autophagie (*Atg7* et *Vps34*) entraînent une augmentation du contenu lipidique hépatique (Jaber et al., 2012; Singh et al., 2009b). Une étude récente montre une régulation du processus de l'autophagie impliquant le récepteur nucléaire FXR et le facteur de transcription CREB (Seok et al., 2014). Un des gènes cibles du facteur de transcription CREBP est le facteur de transcription ATF5 (Impey et al., 2004) et il a été démontré une coopération entre ATF5 et le récepteur nucléaire CAR pour la transactivation du gène *CYP2B6* (Pascual et al., 2008).

Dans notre étude, l'analyse du transcriptome hépatique par microarray des souris mâles et femelles WT et *CAR*<sup>-/-</sup>, âgées de 16 semaines a permis de révéler une régulation différentielle de certains gènes impliqués dans l'autophagie en fonction du sexe des souris *CAR*<sup>-/-</sup>. Par exemple, les gènes *Atg16l1* et *Atg2b* sont surexprimés chez les souris mâles *CAR*<sup>-/-</sup> par rapport aux WT mâles alors que, chez les souris femelles *CAR*<sup>-/-</sup>, l'expression de ces gènes est réprimée par rapport aux WT femelles. Des résultats préliminaires obtenus récemment sont encourageants, et témoignent d'une dérégulation de l'induction de l'autophagie en réponse à un jeûne chez les souris mâles *CAR*<sup>-/-</sup> (**Figure 20**). Ceci représenterait une possible explication de la stéatose observée uniquement chez les souris mâles *CAR*<sup>-/-</sup>.

## DISCUSSION



**Figure 20: Dérégulation des gènes et des protéines LC3 en réponse à un jeûne chez les souris mâles *CAR*<sup>-/-</sup>** A. Expression relative des ARNm hépatiques impliqués dans la voie de l'autophagie de souris mâles WT ou *CAR*<sup>-/-</sup> sacrifiées à l'état nourri ou mises à jeun 12 heures avant le sacrifice (n=8 par groupe). B. Protéines hépatiques LC3I et LC3II de souris mâles WT ou *CAR*<sup>-/-</sup> sacrifiées à l'état nourri ou mises à jeun 12 heures avant le sacrifice. (C) Quantification du Western Blot et normalisation par rapport à l'expression de β-actine pour chaque échantillon (n=2 par groupe). \* ; p<0.05, \*\* ; p<0.01, \*\*\* ; p<0.001

### Cytochrome P450 et dimorphisme sexuel

Comme vu dans l'introduction bibliographique, certains cytochromes P450 sont spécifiquement régulés dans un sexe *via* l'axe GH/Stat5b/Hnf4α (Clodfelter et al., 2006; Park et al., 2006). *Cyp7b1* est par exemple un gène spécifique des mâles, pourtant chez les souris mâles *CAR*<sup>-/-</sup> on observe une répression de ce gène au niveau hépatique par rapport aux souris WT mâles. On peut supposer que les mâles *CAR*<sup>-/-</sup> présentent une altération de la « masculinisation » de leur foie. En accord avec cette hypothèse, nos analyses lipidomiques montrent que certaines espèces lipidiques, dont SM18 :1/16 :0

## DISCUSSION

et PI36 :1, présentent des niveaux significativement plus élevés chez les mâles WT par rapport aux femelles WT, sont au contraire similaires chez les mâles et femelles CAR<sup>-/-</sup>. Nos analyses métabolomiques rejoignent cette hypothèse selon laquelle la délétion de CAR diminue les différences dimorphiques hépatiques. Sur l'analyse en composante principale la séparation entre les mâles et femelles WT est plus marquée que la séparation entre mâles et femelles CAR<sup>-/-</sup>. Il serait intéressant d'étudier l'axe GH/Stat5b/Hnf4α chez ces souris, en réalisant pour commencer un dosage de l'hormone de croissance sur différents temps. De plus, plusieurs données sur l'Homme et la souris suggèrent que HNF4α régulerait l'expression de CAR qui régulerait à son tour l'expression des CYPs (Wiwi et al., 2004; Wortham et al., 2007).

La principale difficulté à laquelle toutes ces hypothèses sont confrontées est de savoir si les dérégulations de l'expression de certains gènes observées sont directement liées à la délétion de CAR ou sont liées au phénotype engendré par la délétion de CAR. Pour mieux caractériser la succession d'évènements liés à la délétion de CAR et qui conduit aux phénotypes observés, une analyse ChIP séq peut être envisagée pour identifier les gènes régulés directement ou indirectement au niveau hépatique par le récepteur CAR. Le récepteur CAR est exprimé dans différents tissus autres que le foie, notamment dans l'intestin et les reins. Afin de déterminer si son rôle dans l'apparition des troubles métaboliques dimorphiques est lié uniquement à son activité hépatique ou à son activité périphérique, la création d'une lignée présentant une invalidation hépato-spécifique de CAR va être réalisée. Elle permettra de préciser la contribution de l'activité hépatocytaire du récepteur au phénotype observé et à son dimorphisme sexuel.

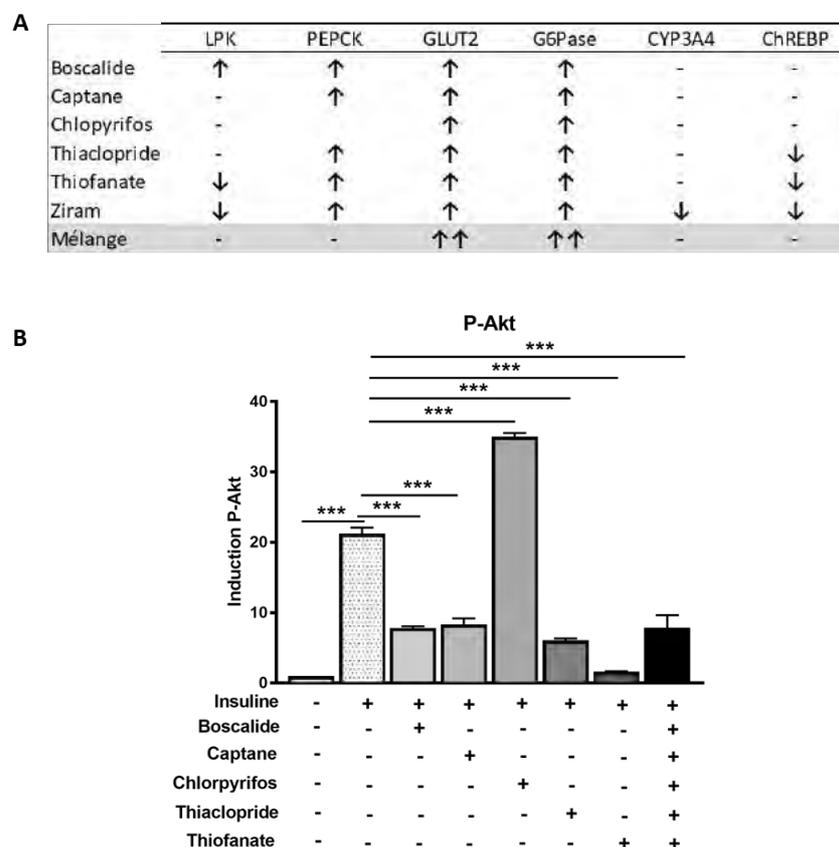
### **Effets des pesticides sur le métabolisme énergétique**

Même si le maintien de l'homéostasie énergétique est finement contrôlé et régulé par différents facteurs de transcription, ce fragile équilibre peut être modifié par le mode de vie et l'exposition à certains polluants environnementaux. Dans une seconde partie de mes travaux de thèse, nous avons évalué l'impact d'un facteur environnemental sur l'homéostasie énergétique et l'influence de CAR dans la réponse à une exposition chronique à un mélange de pesticides à faibles doses.

Mes travaux ont permis de démontrer que l'exposition par l'alimentation de souris à un mélange de pesticides à des doses supposées non toxiques (doses tolérables journalières) conduit à des perturbations métaboliques dépendantes du sexe. Le récepteur nucléaire CAR semble en partie responsable de ces effets dimorphiques. En effet, nous avons montré que la réponse dimorphique à l'exposition au mélange de pesticides dépend des capacités de détoxification et métabolisation des pesticides et d'une activation des récepteurs nucléaires distinctes entre les sexes.

## DISCUSSION

Des travaux préliminaires effectués dans l'équipe sur une lignée d'hépatocytes humains immortalisés nous ont permis d'évaluer les effets des pesticides seuls ou en mélange à différentes concentrations sur l'expression de gènes impliqués dans la régulation des voies métaboliques et sur la phosphorylation de la protéine AKT en réponse à une stimulation à l'insuline (**Figure 21**). Les résultats indiquent que chaque pesticide affecte l'expression des gènes du métabolisme énergétique et impacte la voie de signalisation de l'insuline de façon différente. De plus, l'effet du mélange de pesticides sur ces paramètres n'apparaît pas attribuable à l'effet d'un seul pesticide ni être prévisible à partir de l'effet des pesticides seuls. Ces résultats laissent supposer qu'*in vivo* il en soit de même et que les pesticides interagissent à différents niveaux cellulaire et moléculaire (expression des gènes, voie de signalisation, stress oxydant) ainsi qu'à l'échelle de l'organisme entier (impact sur différents organes) pour conduire aux perturbations observées dans notre étude *in vivo*.



**Figure 21: Effet des pesticides seuls ou en mélange sur l'expression des gènes du métabolisme et la voie de signalisation de l'insuline.** **A.** Expression des gènes du métabolisme en réponse à une exposition chronique (3 semaines) aux pesticides seuls ou en mélange (concentration 1,6  $\mu$ M et 10  $\mu$ M) **B.** Phosphorylation de la protéine AKT en réponse à l'insuline dans les cellules exposées pendant 14 jours aux pesticides seuls ou en mélange.

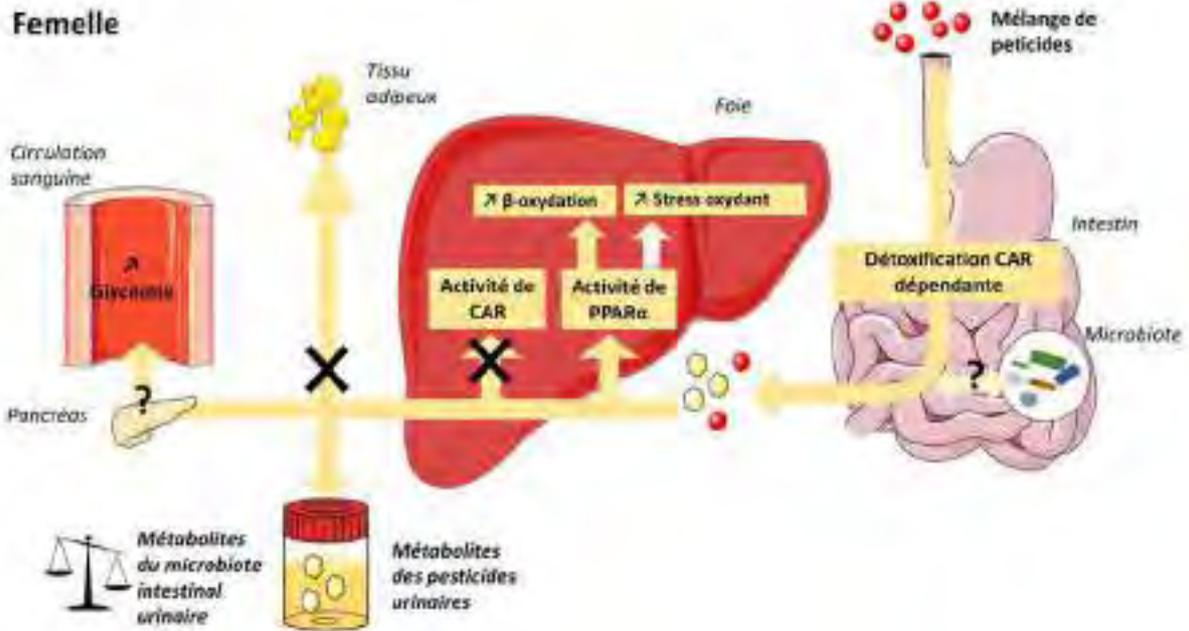
Chez les souris femelles (**Figure 22**), l'activité du récepteur nucléaire CAR semble essentielle pour la métabolisation des pesticides. En effet, le profil urinaire des métabolites de pesticides des femelles

## DISCUSSION

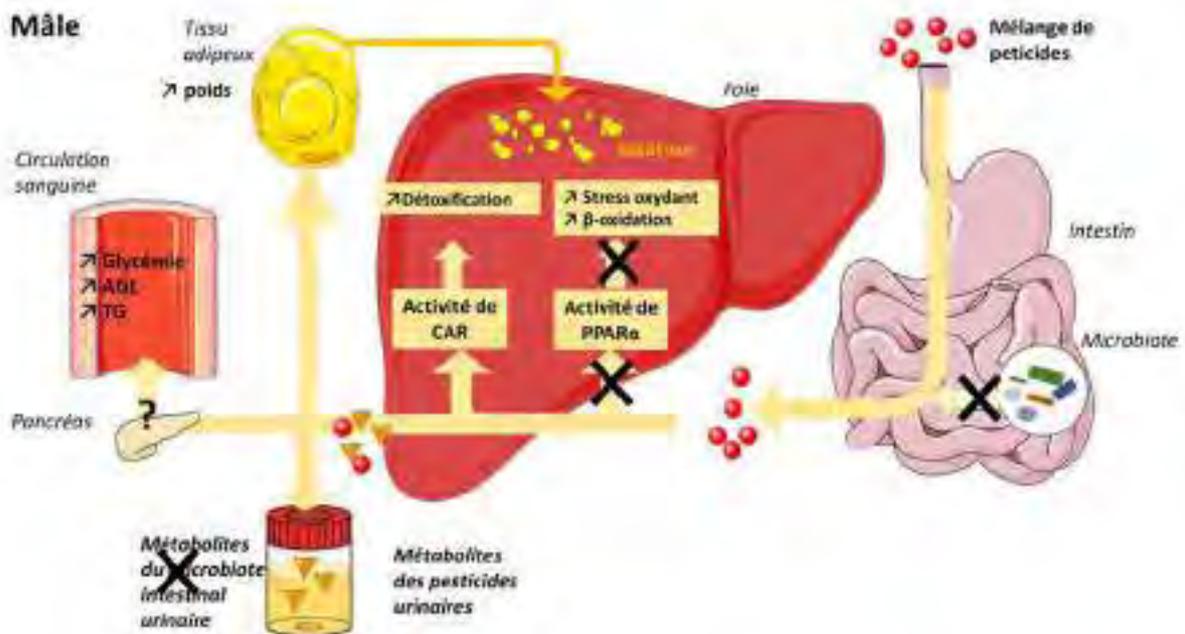
CAR<sup>-/-</sup> exposées est différent de celui des femelles WT exposées. Cependant, au niveau hépatique, l'expression des gènes cibles du récepteur CAR n'est pas induite en réponse aux pesticides. Nous pouvons supposer que les pesticides ne sont pas métabolisés dans le foie. Nous proposons l'hypothèse selon laquelle ils seraient métabolisés dans l'intestin et/ou par le microbiote intestinal de manière dépendante du récepteur CAR. Dans nos études du métabolome urinaire, nous avons observé la dérégulation d'un nombre important de métabolites issus du métabolisme hôte-microbiote chez les femelles exposées aux pesticides par rapport aux femelles contrôles, synonyme d'une activité du microbiote modifiée. De nombreuses études récentes montrent une interaction entre polluants environnementaux et microbiote (Claus et al., 2016). Dans notre étude, on peut alors supposer que les métabolites des pesticides (issus de l'activité métabolique intestinale ou du microbiote de manière dépendante de CAR) activeraient le récepteur PPAR $\alpha$ , induisant ainsi la  $\beta$ -oxydation hépatique. L'activation de PPAR $\alpha$  par des polluants environnementaux est décrite dans plusieurs études (LeBaron et al., 2014; Takeuchi et al., 2006). La qualité du microbiote entre mâles et femelles ou après délétion du récepteur CAR est une question importante pour approfondir ces résultats et fait l'objet d'une étude en cours dans l'équipe (Barretto S et Ellero-Simatos S).

Par ailleurs l'hypothèse d'un impact des pesticides sur les fonctions pancréatiques peut être émise. En effet, les souris femelles présentent une hyperglycémie à jeun et une diminution progressive des taux de kétoadipate, un produit de dégradation de la lysine et du tryptophane. Son précurseur le 2-aminoadipate est considéré comme un marqueur de diabète pouvant perturber la sécrétion d'insuline au niveau pancréatique (Wang et al., 2013). Ainsi nos résultats laissent supposer que le pancréas peut être une cible des pesticides chez les souris femelles. Cette hypothèse est confortée par différentes études montrant un impact de certains pesticides sur la fonction pancréatique (Ghafour-Rashidi et al., 2007; Panahi et al., 2006b; Romero-Navarro et al., 2006).

Au contraire, chez les souris mâles (**Figure 23**), les pesticides semblent majoritairement métabolisés au niveau hépatique. L'expression de nombreux gènes impliqués dans la détoxification sont en effet induits en réponse aux pesticides au niveau hépatique. Parmi les gènes induits, on retrouve des gènes cibles du récepteur nucléaire CAR, témoignant de son activation en réponse à une exposition aux pesticides. Chez les souris mâles WT exposées aux pesticides, nous avons observé un gain de poids associé à une accumulation du tissu adipeux blanc. Un impact de certains pesticides sur la régulation des gènes de l'adipogenèse *via* l'activation du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  a été montré dans différentes études (Feige et al., 2007; Li et al., 2012b). L'hypothèse d'un impact des pesticides sur l'adipogenèse est envisagée dans les perspectives de ces travaux.



**Figure 22: Mécanismes possibles de l'effet du mélange de pesticides sur le métabolisme général chez les souris femelles.**



**Figure 23: Mécanismes possibles de l'effet du mélange pesticides sur le métabolisme général chez les souris mâles**

## DISCUSSION

Dans le cadre de ce projet nous avons voulu mimer l'exposition du consommateur qui est soumis *via* son alimentation à une exposition à des mélanges de pesticides à faibles doses. Les pesticides ont donc été incorporés dans l'aliment et les souris ont été exposées pendant 52 semaines ce qui correspond à une durée d'exposition de 30 ans chez l'Homme (Flurkey et al., 2007).

Les questions se posent de la transposition des effets observés à l'Homme et le rôle de chacun des pesticides dans ces effets. Nos résultats sont en accord avec des études épidémiologiques réalisées chez l'Homme montrant d'une part que l'exposition professionnelle ou environnementale aux pesticides est associée à une augmentation du risque de développer des troubles métaboliques et d'autre part qu'une consommation importante d'aliments issus de l'agriculture biologique est inversement corrélée à la probabilité de développer un syndrome métabolique (Baudry et al., 2017; Evangelou et al., 2016; Kesse-Guyot et al., 2017; Mostafalou, 2016). De plus, des expériences *in vitro* réalisées au laboratoire permettent de confirmer que les pesticides choisis dans notre étude sont des composés biologiquement actifs dans des hépatocytes humains (**Figure 21**).

Ces résultats ouvrent de nombreuses perspectives. Il serait ainsi intéressant de définir quelle est l'interaction entre le microbiote intestinal et les pesticides en fonction du sexe, de définir si l'effet obésogène est dépendant de l'activation de PPAR $\gamma$  dans le tissu adipeux blanc. Par ailleurs, l'étude du dialogue entre le foie, le cerveau et le microbiote dans la réponse dimorphique aux pesticides est aussi envisagée. Enfin, certaines périodes critiques d'exposition comme la gestation et la lactation seront considérées dans les futures études.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abass, K., and Pelkonen, O. (2013). The inhibition of major human hepatic cytochrome P450 enzymes by 18 pesticides: Comparison of the N-in-one and single substrate approaches. *Toxicol. Vitr.* *27*, 1584–1588.
- Abe, T., Takahashi, M., Kano, M., Amaike, Y., Ishii, C., Maeda, K., Kudoh, Y., Morishita, T., Hosaka, T., Sasaki, T., et al. (2017). Activation of nuclear receptor CAR by an environmental pollutant perfluorooctanoic acid. *Arch. Toxicol.* *91*, 2365–2374.
- Abel, S.M., Maggs, J.L., Back, D.J., and Park, B.K. (1992). Cortisol metabolism by human liver in vitro--I. Metabolite identification and inter-individual variability. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *43*, 713–719.
- Abu-Elheiga, L., Brinkley, W.R., Zhong, L., Chirala, S.S., Woldegiorgis, G., and Wakil, S.J. (2000). The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 1444–1449.
- Adamis, Z., Antal, A., Fűzesi, I., Molnár, J., Nagy, L., and Susán, M. (1985). Occupational exposure to organophosphorus insecticides and synthetic pyrethroid. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* *56*, 299–305.
- Adeva-Andany, M.M., González-Lucán, M., Donapetry-García, C., Fernández-Fernández, C., and Ameneiros-Rodríguez, E. (2016). Glycogen metabolism in humans. *BBA Clin.* *5*, 85–100.
- Agius, L. (2008). Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. *Biochem. J.* *414*, 1–18.
- Aguilar, M., Bhuket, T., Torres, S., Liu, B., and Wong, R.J. (2015). Prevalence of the Metabolic Syndrome in the United States, 2003-2012. *JAMA* *313*, 1973.
- Al-Lahham, R., Deford, J.H., and Papaconstantinou, J. (2016). Mitochondrial-generated ROS down regulates insulin signaling via activation of the p38MAPK stress response pathway. *Mol. Cell. Endocrinol.* *419*, 1–11.
- Alaynick, W.A. (2008). Nuclear receptors, mitochondria and lipid metabolism. *Mitochondrion* *8*, 329–337.
- Altarejos, J.Y., and Montminy, M. (2011). CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 141–151.
- Amemiya-Kudo, M., Shimano, H., Hastay, A.H., Yahagi, N., Yoshikawa, T., Matsuzaka, T., Okazaki, H., Tamura, Y., Iizuka, Y., Ohashi, K., et al. (2002). Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterologenic genes. *J. Lipid Res.* *43*, 1220–1235.
- Anderson, G.D. (2005). Sex and racial differences in pharmacological response: where is the evidence? Pharmacogenetics, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *J. Womens. Health (Larchmt).* *14*, 19–29.
- Andrew Parkinson; Brian W. Ogilvie; David B. Buckley; Faraz Kazmi; Maciej Czerwinski; Oliver Parkinson (2001). Biotransformation of Xenobiotics | Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 8e | AccessPharmacy | McGraw-Hill Medical.
- Armstrong, L.E., Driscoll, M. V., More, V.R., Donepudi, A.C., Xu, J., Baker, A., Aleksunes, L.M., Richardson, J.R., and Slitt, A.L. (2013). Effects of Developmental Deltamethrin Exposure on White Adipose Tissue Gene Expression. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* *27*, 165–171.
- Arrebola, J.P., Pumarega, J., Gasull, M., Fernandez, M.F., Martin-Olmedo, P., Molina-Molina, J.M., Fernández-Rodríguez, M., Porta, M., and Olea, N. (2013). Adipose tissue concentrations of persistent organic pollutants and prevalence of type 2 diabetes in adults from Southern Spain. *Environ. Res.* *122*, 31–37.
- Assenat, E., Gerbal-Chaloin, S., Larrey, D., Saric, J., Fabre, J.-M., Maurel, P., Vilarem, M.-J., and Pascussi, J.M. (2004). Interleukin 1beta inhibits CAR-induced expression of hepatic genes involved in drug and bilirubin clearance. *Hepatology* *40*, 951–960.
- Auerbach, S.S., Ramsden, R., Stoner, M.A., Verlinde, C., Hassett, C., and Omiecinski, C.J. (2003). Alternatively spliced isoforms of the human constitutive androstane receptor. *Nucleic Acids Res.* *31*, 3194–3207.
- Auerbach, S.S., Stoner, M.A., Su, S., and Omiecinski, C.J. (2005). Retinoid X receptor-alpha-dependent

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- transactivation by a naturally occurring structural variant of human constitutive androstane receptor (NR1I3). *Mol. Pharmacol.* **68**, 1239–1253.
- Auerbach, S.S., DeKeyser, J.G., Stoner, M.A., and Omiecinski, C.J. (2006). CAR2 Displays Unique Ligand Binding and RXR Heterodimerization Characteristics. *Drug Metab. Dispos.* **35**, 428–439.
- Aynaci, F.M., Orhan, F., Orem, A., Yildirmis, S., and Gedik, Y. (2001). Effect of Antiepileptic drugs on plasma lipoprotein (a) and other lipid levels in childhood. *J. Child Neurol.* **16**, 367–369.
- Backhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Koh, G.Y., Nagy, A., Semenkovich, C.F., and Gordon, J.I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 15718–15723.
- Bäckhed, F., Manchester, J.K., Semenkovich, C.F., and Gordon, J.I. (2007). Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 979–984.
- Bae, Y., Kemper, J.K., and Kemper, B. (2004). Repression of CAR-mediated transactivation of CYP2B genes by the orphan nuclear receptor, short heterodimer partner (SHP). *DNA Cell Biol.* **23**, 81–91.
- Baes, M., Gulick, T., Choi, H.S., Martinoli, M.G., Simha, D., and Moore, D.D. (1994). A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily that interacts with a subset of retinoic acid response elements. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1544–1552.
- Bajaj, J.S., Heuman, D.M., Hylemon, P.B., Sanyal, A.J., White, M.B., Monteith, P., Noble, N.A., Unser, A.B., Daita, K., Fisher, A.R., et al. (2014). Altered profile of human gut microbiome is associated with cirrhosis and its complications. *J. Hepatol.* **60**, 940–947.
- Baldi, I., Lebailly, P., Jean, S., Rougetet, L., Dulaurent, S., and Marquet, P. (2006). Pesticide contamination of workers in vineyards in France. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* **16**, 115–124.
- Baldwin, W.S., and Roling, J.A. (2009). A Concentration Addition Model for the Activation of the Constitutive Androstane Receptor by Xenobiotic Mixtures. *Toxicol. Sci.* **107**, 93–105.
- Ballestri, S., Nascimbeni, F., Baldelli, E., Marrazzo, A., Romagnoli, D., and 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.
- Balmer, M.L., Slack, E., de Gottardi, A., Lawson, M.A.E., Hapfelmeier, S., Miele, L., Grieco, A., Van Vlierberghe, H., Fahrner, R., Patuto, N., et al. (2014). The Liver May Act as a Firewall Mediating Mutualism Between the Host and Its Gut Commensal Microbiota. *Sci. Transl. Med.* **6**, 237ra66-237ra66.
- Barton, M. (2013). Cholesterol and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* **24**, 214–220.
- Basantani, M.K., Sitnick, M.T., Cai, L., Brenner, D.S., Gardner, N.P., Li, J.Z., Schoiswohl, G., Yang, K., Kumari, M., Gross, R.W., et al. (2011). Pnpla3/Adiponutrin deficiency in mice does not contribute to fatty liver disease or metabolic syndrome. *J. Lipid Res.* **52**, 318–329.
- Basilicata, P., Simonelli, A., Silvestre, A., Lamberti, M., Pedata, P., Feola, D., Acampora, A., Pieri, M., Sannolo, N., and Miraglia, N. (2013). Evaluation by environmental monitoring of pesticide absorption in farm workers of 18 Italian tomato cultivations. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **26**, 517–523.
- Baudry, J., Allès, B., Péneau, S., Touvier, M., Méjean, C., Hercberg, S., Galan, P., Lairon, D., and Kesse-Guyot, E. (2017). Dietary intakes and diet quality according to levels of organic food consumption by French adults: cross-sectional findings from the NutriNet-Santé Cohort Study. *Public Health Nutr.* **20**, 638–648.
- Beagley, K.W., and Gockel, C.M. (2003). Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **38**, 13–22.
- Beigneux, A.P., Moser, A.H., Shigenaga, J.K., Grunfeld, C., and Feingold, K.R. (2002). Reduction in cytochrome P-450 enzyme expression is associated with repression of CAR (constitutive androstane receptor) and PXR (pregnane X receptor) in mouse liver during the acute phase response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 145–149.
- Beilke, L.D., Aleksunes, L.M., Holland, R.D., Besselsen, D.G., Beger, R.D., Klaassen, C.D., and Cherrington, N.J.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (2009). Constitutive androstane receptor-mediated changes in bile acid composition contributes to hepatoprotection from lithocholic acid-induced liver injury in mice. *Drug Metab. Dispos.* *37*, 1035–1045.
- Bellentani, S. (2017). The epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* *37*, 81–84.
- Berlit, P., Krause, K.H., Heuck, C.C., and Schellenberg, B. (1982). Serum lipids and anticonvulsants. *Acta Neurol. Scand.* *66*, 328–334.
- Bhaskar, R., and Mohanty, B. (2014). Pesticides in mixture disrupt metabolic regulation: In silico and in vivo analysis of cumulative toxicity of mancozeb and imidacloprid on body weight of mice. *Gen. Comp. Endocrinol.* *205*, 226–234.
- Bilotta, F.L., Arcidiacono, B., Messineo, S., Greco, M., Chiefari, E., Britti, D., Nakanishi, T., Foti, D.P., and Brunetti, A. (2018). Insulin and osteocalcin: further evidence for a mutual cross-talk. *Endocrine* *59*, 622–632.
- Bing, Y., Zhu, S., Jiang, K., Dong, G., Li, J., Yang, Z., Yang, J., and Yue, J. (2014). Reduction of thyroid hormones triggers down-regulation of hepatic CYP2B through nuclear receptors CAR and TR in a rat model of acute stroke. *Biochem. Pharmacol.* *87*, 636–649.
- Blizard, D., Sueyoshi, T., Negishi, M., Dehal, S.S., and Kupfer, D. (2001). Mechanism of induction of cytochrome p450 enzymes by the proestrogenic endocrine disruptor pesticide-methoxychlor: interactions of methoxychlor metabolites with the constitutive androstane receptor system. *Drug Metab. Dispos.* *29*, 781–785.
- Boobis, A.R., Doe, J.E., Heinrich-Hirsch, B., (Bette) Meek, M.E., Munn, S., Ruchirawat, M., Schlatter, J., Seed, J., and Vickers, C. (2008). IPCS Framework for Analyzing the Relevance of a Noncancer Mode of Action for Humans. *Crit. Rev. Toxicol.* *38*, 87–96.
- Booth, S.L., Centi, A., Smith, S.R., and Gundberg, C. (2013). The role of osteocalcin in human glucose metabolism: marker or mediator? *Nat. Rev. Endocrinol.* *9*, 43–55.
- Bosma, P.J., Seppen, J., Goldhoorn, B., Bakker, C., Oude Elferink, R.P., Chowdhury, J.R., Chowdhury, N.R., and Jansen, P.L. (1994). Bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 is the only relevant bilirubin glucuronidating isoform in man. *J. Biol. Chem.* *269*, 17960–17964.
- Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Moras, D. (1995). Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha. *Nature* *375*, 377–382.
- 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., et al. (2016). The severity of nonalcoholic fatty liver disease is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota. *Hepatology* *63*, 764–775.
- Bouvier, G., Seta, N., Vigouroux-Villard, A., Blanchard, O., and Momas, I. (2005). Insecticide Urinary Metabolites in Nonoccupationally Exposed Populations. *J. Toxicol. Environ. Heal. Part B* *8*, 485–512.
- Boyer, J.L. (2013). Bile Formation and Secretion. In *Comprehensive Physiology*, (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), pp. 1035–1078.
- Bradman, A., Quirós-Alcalá, L., Castorina, R., Schall, R.A., Camacho, J., Holland, N.T., Barr, D.B., and Eskenazi, B. (2015). Effect of Organic Diet Intervention on Pesticide Exposures in Young Children Living in Low-Income Urban and Agricultural Communities. *Environ. Health Perspect.* *123*, 1086–1093.
- Braet, F., and Wisse, E. (2002). Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comp. Hepatol.* *1*, 1.
- Braeuning, A., Ittrich, C., Köhle, C., Hailfinger, S., Bonin, M., Buchmann, A., and Schwarz, M. (2006a). Differential gene expression in periportal and perivenous mouse hepatocytes. *FEBS J.* *273*, 5051–5061.
- Braeuning, A., Ittrich, C., Köhle, C., Hailfinger, S., Bonin, M., Buchmann, A., and Schwarz, M. (2006b). Differential gene expression in periportal and perivenous mouse hepatocytes. *FEBS J.* *273*, 5051–5061.
- Braniste, V., Leveque, M., Buisson-Brenac, C., Bueno, L., Fioramonti, J., and Houdeau, E. (2009). Oestradiol decreases colonic permeability through oestrogen receptor  $\beta$ -mediated up-regulation of occludin and junctional adhesion molecule-A in epithelial cells. *J. Physiol.* *587*, 3317–3328.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Brent, G.A. (2008). Clinical practice. Graves' disease. *N. Engl. J. Med.* *358*, 2594–2605.
- Brent, G.A. (2012). Mechanisms of thyroid hormone action. *J. Clin. Invest.* *122*, 3035–3043.
- Breuker, C., Moreau, A., Lakhal, L., Tamasi, V., Parmentier, Y., Meyer, U., Maurel, P., Lumbroso, S., Vilarem, M.-J., and Pascussi, J.-M. (2010). Hepatic expression of thyroid hormone-responsive spot 14 protein is regulated by constitutive androstane receptor (NR1I3). *Endocrinology* *151*, 1653–1661.
- Bricambert, J., Miranda, J., Benhamed, F., Girard, J., Postic, C., and Dentin, R. (2010). Salt-inducible kinase 2 links transcriptional coactivator p300 phosphorylation to the prevention of ChREBP-dependent hepatic steatosis in mice. *J. Clin. Invest.* *120*, 4316–4331.
- Browning, J.D., and Horton, J.D. (2004). Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J. Clin. Invest.* *114*, 147–152.
- Browning, J.D., Szczepaniak, L.S., Dobbins, R., Nuremberg, P., Horton, J.D., Cohen, J.C., Grundy, S.M., and Hobbs, H.H. (2004a). Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: Impact of ethnicity. *Hepatology* *40*, 1387–1395.
- Browning, J.D., Kumar, K.S., Saboorian, M.H., and Thiele, D.L. (2004b). Ethnic differences in the prevalence of cryptogenic cirrhosis. *Am. J. Gastroenterol.* *99*, 292–298.
- Brownsey, R.W., Boone, A.N., Elliott, J.E., Kulpa, J.E., and Lee, W.M. (2006). Regulation of acetyl-CoA carboxylase. *Biochem. Soc. Trans.* *34*, 223–227.
- Brun, P., Castagliuolo, I., Leo, V. Di, Buda, A., Pinzani, M., Palù, G., and Martines, D. (2007). Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* *292*, G518–G525.
- Bryzgalova, G., Gao, H., Ahren, B., Zierath, J.R., Galuska, D., Steiler, T.L., Dahlman-Wright, K., Nilsson, S., Gustafsson, J.-Å., Efendic, S., et al. (2006). Evidence that oestrogen receptor- $\alpha$  plays an important role in the regulation of glucose homeostasis in mice: insulin sensitivity in the liver. *Diabetologia* *49*, 588–597.
- Burgess, S.C., Hausler, N., Merritt, M., Jeffrey, F.M.H., Storey, C., Milde, A., Koshy, S., Lindner, J., Magnuson, M.A., Malloy, C.R., et al. (2004). Impaired tricarboxylic acid cycle activity in mouse livers lacking cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J. Biol. Chem.* *279*, 48941–48949.
- Burk, O., Arnold, K.A., Nussler, A.K., Schaeffeler, E., Efimova, E., Avery, B.A., Avery, M.A., Fromm, M.F., and Eichelbaum, M. (2005). Antimalarial Artemisinin Drugs Induce Cytochrome P450 and MDR1 Expression by Activation of Xenosensors Pregnane X Receptor and Constitutive Androstane Receptor. *Mol. Pharmacol.* *67*, 1954–1965.
- Caldwell, S.H., Harris, D.M., Patrie, J.T., and Hespeneide, E.E. (2002). Is NASH underdiagnosed among African Americans? *Am. J. Gastroenterol.* *97*, 1496–1500.
- Calkin, A.C., and Tontonoz, P. (2012). Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 213–224.
- Campbell, K., Baker, B., Tovar, A., Economos, E., Williams, B., and McCauley, L. (2017). The Association Between Skin Rashes and Work Environment, Personal Protective Equipment, and Hygiene Practices Among Female Farmworkers. *Workplace Health Saf.* *65*, 313–321.
- Campos, É., and Freire, C. (2016). Exposure to non-persistent pesticides and thyroid function: A systematic review of epidemiological evidence. *Int. J. Hyg. Environ. Health* *219*, 481–497.
- Casals-Casas, C., and Desvergne, B. (2011). Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annu. Rev. Physiol.* *73*, 135–162.
- Casida, J.E. (2011). Curious about Pesticide Action. *J. Agric. Food Chem.* *59*, 2762–2769.
- Cervený, L., Svecová, L., Anzenbacherová, E., Vrzal, R., Staud, F., Dvorak, Z., Ulrichová, J., Anzenbacher, P., and Pavek, P. (2007). Valproic Acid Induces CYP3A4 and MDR1 Gene Expression by Activation of Constitutive Androstane Receptor and Pregnane X Receptor Pathways ABSTRACT : *35*, 1032–1041.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Chawla, A., Repa, J.J., Evans, R.M., and Mangelsdorf, D.J. (2001). Nuclear Receptors and Lipid Physiology: Opening the X-Files. *Science* (80- ). *294*, 1866–1870.
- Chen, W., Chen, G., Head, D.L., Mangelsdorf, D.J., and Russell, D.W. (2007a). Enzymatic reduction of oxysterols impairs LXR signaling in cultured cells and the livers of mice. *Cell Metab.* *5*, 73–79.
- Chen, W., Chang, B., Li, L., and Chan, L. (2010). Patatin-like phospholipase domain-containing 3/adiponutrin deficiency in mice is not associated with fatty liver disease. *Hepatology* *52*, 1134–1142.
- Chen, X., Maiti, S., Zhang, J., and Chen, G. (2006). Nuclear receptor interactions in methotrexate induction of human dehydroepiandrosterone sulfotransferase (hSULT2A1). *J. Biochem. Mol. Toxicol.* *20*, 309–317.
- Chen, X., Zhang, J., Baker, S.M., and Chen, G. (2007b). Human constitutive androstane receptor mediated methotrexate induction of human dehydroepiandrosterone sulfotransferase (hSULT2A1). *Toxicology* *231*, 224–233.
- Chen, Y., McCommis, K.S., Ferguson, D., Hall, A.M., Harris, C.A., and Finck, B.N. (2018). Inhibition of the Mitochondrial Pyruvate Carrier by Tolyfluanid. *Endocrinology* *159*, 609–621.
- Cheng, X., and Klaassen, C.D. (2008). Perfluorocarboxylic acids induce cytochrome P450 enzymes in mouse liver through activation of PPAR-alpha and CAR transcription factors. *Toxicol. Sci.* *106*, 29–36.
- Cheng, Z., and White, M.F. (2012). The AKTion in non-canonical insulin signaling. *Nat. Med.* *18*, 351–353.
- Cheng, S., Zou, M., Liu, Q., Kuang, J., Shen, J., Pu, S., Chen, L., Li, H., Wu, T., Li, R., et al. (2017). Activation of Constitutive Androstane Receptor Prevents Cholesterol Gallstone Formation. *Am. J. Pathol.* *187*, 808–818.
- Cherrington, N.J., Hartley, D.P., Li, N., Johnson, D.R., and Klaassen, C.D. (2002). Organ distribution of multidrug resistance proteins 1, 2, and 3 (Mrp1, 2, and 3) mRNA and hepatic induction of Mrp3 by constitutive androstane receptor activators in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *300*, 97–104.
- Cho, H.Y., Jung, J.-Y., Park, H., Yang, J.-Y., Jung, S., An, J.H., Cho, S.W., Kim, S.W., Kim, S.Y., Kim, J.E., et al. (2014). In vivo deletion of CAR resulted in high bone mass phenotypes in male mice. *J. Cell. Physiol.* *229*, 561–571.
- Choi, H.-S., Chung, M., Tzamelis, I., Simha, D., Lee, Y.-K., Seol, W., and Moore, D.D. (1997). Differential Transactivation by Two Isoforms of the Orphan Nuclear Hormone Receptor CAR. *J. Biol. Chem.* *272*, 23565–23571.
- Clark, J.M., Brancati, F.L., and Diehl, A.M. (2003). The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am. J. Gastroenterol.* *98*, 960–967.
- Claus, S.P., Guillou, H., Ellero-Simatos, S., Cerniglia, C.E., and Chen, H. (2016). The gut microbiota: a major player in the toxicity of environmental pollutants? *Npj Biofilms Microbiomes* *2*, 16003.
- Clodfelter, K.H., Holloway, M.G., Hodor, P., Park, S.-H., Ray, W.J., and Waxman, D.J. (2006). Sex-dependent liver gene expression is extensive and largely dependent upon signal transducer and activator of transcription 5b (STAT5b): STAT5b-dependent activation of male genes and repression of female genes revealed by microarray analysis. *Mol. Endocrinol.* *20*, 1333–1351.
- Clodfelter, K.H., Miles, G.D., Wauthier, V., Holloway, M.G., Zhang, X., Hodor, P., Ray, W.J., and Waxman, D.J. (2007). Role of STAT5a in regulation of sex-specific gene expression in female but not male mouse liver revealed by microarray analysis. *Physiol. Genomics* *31*, 63–74.
- Cohen, J.C., Horton, J.D., and Hobbs, H.H. (2011). Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science* *332*, 1519–1523.
- Cole, S.P.C. (2014). Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1, ABCC1), a “Multitasking” ATP-binding Cassette (ABC) Transporter. *J. Biol. Chem.* *289*, 30880–30888.
- Costet, P., Legendre, C., Moré, J., Edgar, A., Galtier, P., and Pineau, T. (1998). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha-isoform deficiency leads to progressive dyslipidemia with sexually dimorphic obesity and steatosis. *J. Biol. Chem.* *273*, 29577–29585.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Cotter, D.G., Ercal, B., Huang, X., Leid, J.M., d'Avignon, D.A., Graham, M.J., Dietzen, D.J., Brunt, E.M., Patti, G.J., and Crawford, P.A. (2014). Ketogenesis prevents diet-induced fatty liver injury and hyperglycemia. *J. Clin. Invest.* *124*, 5175–5190.
- Coumoul, X., Diry, M., and Barouki, R. (2002). PXR-dependent induction of human CYP3A4 gene expression by organochlorine pesticides. *Biochem. Pharmacol.* *64*, 1513–1519.
- Cox, S., Niskar, A.S., Narayan, K.M.V., and Marcus, M. (2007). Prevalence of Self-Reported Diabetes and Exposure to Organochlorine Pesticides among Mexican Americans: Hispanic Health and Nutrition Examination Survey, 1982–1984. *Environ. Health Perspect.* *115*, 1747–1752.
- Csaki, L.S., and Reue, K. (2010). Lipins: multifunctional lipid metabolism proteins. *Annu. Rev. Nutr.* *30*, 257–272.
- Curl, C.L., Fenske, R.A., Kissel, J.C., Shirai, J.H., Moate, T.F., Griffith, W., Coronado, G., and Thompson, B. (2002). Evaluation of take-home organophosphorus pesticide exposure among agricultural workers and their children. *Environ. Health Perspect.* *110*, A787-92.
- Curl, C.L., Fenske, R.A., and Elgethun, K. (2003). Organophosphorus pesticide exposure of urban and suburban preschool children with organic and conventional diets. *Environ. Health Perspect.* *111*, 377–382.
- Curl, C.L., Beresford, S.A.A., Fenske, R.A., Fitzpatrick, A.L., Lu, C., Nettleton, J.A., and Kaufman, J.D. (2015). Estimating Pesticide Exposure from Dietary Intake and Organic Food Choices: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Environ. Health Perspect.* *123*, 475–483.
- Curran, P.G., and DeGroot, L.J. (1991). The effect of hepatic enzyme-inducing drugs on thyroid hormones and the thyroid gland. *Endocr. Rev.* *12*, 135–150.
- Currie, R.A., Peffer, R.C., Goetz, A.K., Omiecinski, C.J., and Goodman, J.I. (2014). Phenobarbital and propiconazole toxicogenomic profiles in mice show major similarities consistent with the key role that constitutive androstane receptor (CAR) activation plays in their mode of action. *Toxicology* *321*, 80–88.
- Daryani, N.E., Daryani, N.E., Alavian, S.M., Zare, A., Fereshtehnejad, S.-M., Keramati, M.R., Pashaei, M.R., and Habibollahi, P. (2010). Non-alcoholic steatohepatitis and influence of age and gender on histopathologic findings. *World J. Gastroenterol.* *16*, 4169–4175.
- Dashty, M. (2013). A quick look at biochemistry: Carbohydrate metabolism. *Clin. Biochem.* *46*, 1339–1352.
- Debost-Legrand, A., Warembourg, C., Massart, C., Chevrier, C., Bonvallot, N., Monfort, C., Rouget, F., Bonnet, F., and Cordier, S. (2016). Prenatal exposure to persistent organic pollutants and organophosphate pesticides, and markers of glucose metabolism at birth. *Environ. Res.* *146*, 207–217.
- DeKeyser, J.G., Stagliano, M.C., Auerbach, S.S., Prabhu, K.S., Jones, A.D., and Omiecinski, C.J. (2009). Di(2-ethylhexyl) phthalate is a highly potent agonist for the human constitutive androstane receptor splice variant CAR2. *Mol. Pharmacol.* *75*, 1005–1013.
- Delfosse, V., Grimaldi, M., Cavallès, V., Balaguer, P., and Bourguet, W. (2014). Structural and functional profiling of environmental ligands for estrogen receptors. *Environ. Health Perspect.* *122*, 1306–1313.
- Delfosse, V., Dendele, B., Huet, T., Grimaldi, M., Boulahtouf, A., Gerbal-Chaloin, S., Beucher, B., Roecklin, D., Muller, C., Rahmani, R., et al. (2015). Synergistic activation of human pregnane X receptor by binary cocktails of pharmaceutical and environmental compounds. *Nat. Commun.* *6*, 8089.
- Denechaud, P., Bossard, P., Lobaccaro, J.A., Millatt, L., Staels, B., Girard, J., and Postic, C. (2008). ChREBP, but not LXRs, is required for the induction of glucose-regulated genes in mouse liver. *J. Clin. Invest.* *118*.
- Dentin, R., Tomas-Cobos, L., Fougelle, F., Leopold, J., Girard, J., Postic, C., and Ferré, P. (2012). Glucose 6-phosphate, rather than xylulose 5-phosphate, is required for the activation of ChREBP in response to glucose in the liver. *J. Hepatol.* *56*, 199–209.
- Desvergne, B., Michalik, L., and Wahli, W. (2006). Transcriptional Regulation of Metabolism. *Physiol. Rev.* *86*, 465–514.
- Desvergne, B., Feige, J.N., and Casals-Casas, C. (2009). PPAR-mediated activity of phthalates: A link to the obesity

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

epidemic? *Mol. Cell. Endocrinol.* *304*, 43–48.

Diehl, A.M., and Day, C. (2018). Nonalcoholic Steatohepatitis. *N. Engl. J. Med.* *378*, 779–781.

Ding, X., Lichti, K., Kim, I., Gonzalez, F.J., and Staudinger, J.L. (2006). Regulation of constitutive androstane receptor and its target genes by fasting, cAMP, hepatocyte nuclear factor  $\alpha$ , and the coactivator peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* *281*, 26540–26551.

Dixon, L.J., Barnes, M., Tang, H., Pritchard, M.T., and Nagy, L.E. (2013). Kupffer Cells in the Liver. In *Comprehensive Physiology*, (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), pp. 785–797.

Domingos, M.M., Rodrigues, M.F.C., Stotzer, U.S., Bertucci, D.R., Souza, M.V.C., Marine, D.A., Gatto, C. do V.G., de Araújo, H.S.S., and de Andrade Perez, S.E. (2012). Resistance training restores the gene expression of molecules related to fat oxidation and lipogenesis in the liver of ovariectomized rats. *Eur. J. Appl. Physiol.* *112*, 1437–1444.

Donato, M.T., Gómez-Lechón, M.J., Jover, R., Nakamura, T., and Castell, J. V (1998). Human hepatocyte growth factor down-regulates the expression of cytochrome P450 isozymes in human hepatocytes in primary culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *284*, 760–767.

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., et al. (2009a). Activation of nuclear receptor CAR ameliorates diabetes and fatty liver disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 18831–18836.

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., et al. (2009b). Activation of nuclear receptor CAR ameliorates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*.

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., et al. (2009c). Activation of nuclear receptor CAR ameliorates diabetes and fatty liver disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 18831–18836.

Donnelly, K.L., Smith, C.I., Schwarzenberg, S.J., Jessurun, J., Boldt, M.D., and 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.

Döring, B., and Petzinger, E. (2014). Phase 0 and phase III transport in various organs: Combined concept of phases in xenobiotic transport and metabolism. *Drug Metab. Rev.* *46*, 261–282.

Dourson, M.L., Felter, S.P., and Robinson, D. (1996). Evolution of science-based uncertainty factors in noncancer risk assessment. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* *24*, 108–120.

Du, G., Shen, O., Sun, H., Fei, J., Lu, C., Song, L., Xia, Y., Wang, S., and Wang, X. (2010). Assessing hormone receptor activities of pyrethroid insecticides and their metabolites in reporter gene assays. *Toxicol. Sci.* *116*, 58–66.

Ducheix, S., Lobaccaro, J.M.A., Martin, P.G., and Guillou, H. (2011). Liver X Receptor: an oxysterol sensor and a major player in the control of lipogenesis. *Chem. Phys. Lipids* *164*, 500–514.

Durazzo, M., Belci, P., Collo, A., Prandi, V., Pistone, E., Martorana, M., Gambino, R., and Bo, S. (2014). Gender specific medicine in liver diseases: a point of view. *World J. Gastroenterol.* *20*, 2127–2135.

Duret, C., Daujat-Chavanieu, M., Pascussi, J.-M., Pichard-Garcia, L., Balaguer, P., Fabre, J.-M., Vilarem, M.-J., Maurel, P., and Gerbal-Chaloin, S. (2006). Ketoconazole and miconazole are antagonists of the human glucocorticoid receptor: Consequences on the expression and function of the constitutive androstane receptor and the pregnane X receptor. *Mol. Pharmacol.* *70*, 329–339.

Eberlé, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferré, P., and Foufelle, F. (2004). SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* *86*, 839–848.

Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., and Relman, D.A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* *308*, 1635–1638.

Eirís, J., Novo-Rodríguez, M.I., Del Río, M., Meseguer, P., Del Río, M.C., and Castro-Gago, M. (2000). The effects on lipid and apolipoprotein serum levels of long-term carbamazepine, valproic acid and phenobarbital therapy

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

in children with epilepsy. *Epilepsy Res.* *41*, 1–7.

Eirís, J.M., Lojo, S., Del Río, M.C., Novo, I., Bravo, M., Pavón, P., and Castro-Gago, M. (1995). Effects of long-term treatment with antiepileptic drugs on serum lipid levels in children with epilepsy. *Neurology* *45*, 1155–1157.

Elcombe, C.R., Elcombe, B.M., Foster, J.R., Chang, S.-C., Ehresman, D.J., and Butenhoff, J.L. (2012). Hepatocellular hypertrophy and cell proliferation in Sprague–Dawley rats from dietary exposure to potassium perfluorooctanesulfonate results from increased expression of xenosensor nuclear receptors PPAR $\alpha$  and CAR/PXR. *Toxicology* *293*, 16–29.

Elvevold, K.H., Nedredal, G.I., Revhaug, A., and Smedsrød, B. (2004). Scavenger properties of cultivated pig liver endothelial cells. *Comp. Hepatol.* *3*, 4.

Evangelou, E., Ntritsos, G., Chondrogiorgi, M., Kavvoura, F.K., Hernández, A.F., Ntzani, E.E., and Tzoulaki, I. (2016). Exposure to pesticides and diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Environ. Int.* *91*, 60–68.

Everett, C.J., and Matheson, E.M. (2010). Biomarkers of pesticide exposure and diabetes in the 1999-2004 national health and nutrition examination survey. *Environ. Int.* *36*, 398–401.

Faessel, L., and Prospective, T. (2016). Notes et études socio-économiques. 7–39.

Falany, C.N., Xie, X., Wang, J., Ferrer, J., and Falany, J.L. (2000). Molecular cloning and expression of novel sulphotransferase-like cDNAs from human and rat brain. *Biochem. J.* *346 Pt 3*, 857–864.

Farrell, G.C., and Larter, C.Z. (2006). Nonalcoholic fatty liver disease: From steatosis to cirrhosis. *Hepatology* *43*, S99–S112.

Feige, J.N., Gelman, L., Rossi, D., Zoete, V., Métivier, R., Tudor, C., Anghel, S.I., Grosdidier, A., Lathion, C., Engelborghs, Y., et al. (2007). The endocrine disruptor monoethyl-hexyl-phthalate is a selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulator that promotes adipogenesis. *J. Biol. Chem.* *282*, 19152–19166.

Fenske, R.A., Lu, C., Simcox, N.J., Loewenherz, C., Touchstone, J., Moate, T.F., Allen, E.H., and Kissel, J.C. Strategies for assessing children's organophosphorus pesticide exposures in agricultural communities. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* *10*, 662–671.

Fenske, R.A., Hamburger, S.J., and Guyton, C.L. (1987). Occupational exposure to fosetyl-Al fungicide during spraying of ornamentals in greenhouses. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* *16*, 615–621.

Ferré, P., and Foufelle, F. (2007). SREBP-1c Transcription Factor and Lipid Homeostasis: Clinical Perspective. *Horm. Res. Paediatr.* *68*, 72–82.

Filhoulaud, G., Guilmeau, S., Dentin, R., Girard, J., and Postic, C. (2013). Novel insights into ChREBP regulation and function. *Trends Endocrinol. Metab.* *24*, 257–268.

Flurkey, K., Curren, J., and Harrison, D. (2007). Mouse models in aging research. *Fac. Res.* 2000 - 2009.

Foretz, M., Guichard, C., Ferré, P., and Foufelle, F. (1999). Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 12737–12742.

Forman, B.M., Tzameli, I., Choi, H.S., Chen, J., Simha, D., Seol, W., Evans, R.M., and Moore, D.D. (1998a). Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR-beta. *Nature* *395*, 612–615.

Forman, B.M., Tzameli, I., Choi, H.S., Chen, J., Simha, D., Seol, W., Evans, R.M., and Moore, D.D. (1998b). Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR-beta. *Nature* *395*, 612–615.

Foufelle, F., and Ferré, P. (2002). New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem. J.* *366*, 377–391.

Foufelle, F., Girard, J., and Ferré, P. (1996). Regulation of lipogenic enzyme expression by glucose in liver and adipose tissue: a review of the potential cellular and molecular mechanisms. *Adv. Enzyme Regul.* *36*, 199–226.

Fox, H.S., Bond, B.L., and Parslow, T.G. (1991). Estrogen regulates the IFN-gamma promoter. *J. Immunol.* *146*,

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

4362–4367.

Galgani, J., and Ravussin, E. (2008). Energy metabolism, fuel selection and body weight regulation. *Int. J. Obes.* *32*, S109–S119.

Gao, B., Bian, X., Mahbub, R., and Lu, K. (2016). Sex-Specific Effects of Organophosphate Diazinon on the Gut Microbiome and Its Metabolic Functions. *Environ. Health Perspect.* *125*, 198–206.

Gao, J., He, J., Zhai, Y., Wada, T., and Xie, W. (2009). The constitutive androstane receptor is an anti-obesity nuclear receptor that improves insulin sensitivity. *J. Biol. Chem.* *284*, 25984–25992.

Gao, J., Yan, J., Xu, M., Ren, S., and Xie, W. (2015). CAR Suppresses Hepatic Gluconeogenesis by Facilitating the Ubiquitination and Degradation of PGC1 $\alpha$ . *Mol. Endocrinol.* *29*, 1558–1570.

Gastaldelli, A., Cusi, K., Pettiti, M., Hardies, J., Miyazaki, Y., Berria, R., Buzzigoli, E., Sironi, A.M., Cersosimo, E., Ferrannini, E., et al. (2007). Relationship Between Hepatic/Visceral Fat and Hepatic Insulin Resistance in Nondiabetic and Type 2 Diabetic Subjects. *Gastroenterology* *133*, 496–506.

Gaylor, D.W. (1983). The use of safety factors for controlling risk. *J. Toxicol. Environ. Health* *11*, 329–336.

Gebhardt, R., Alber, J., Wegner, H., and Mecke, D. (1994). Different drug metabolizing capacities in cultured periportal and pericentral hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* *48*, 761–766.

Ged, C., Rouillon, J.M., Pichard, L., Combalbert, J., Bressot, N., Bories, P., Michel, H., Beaune, P., and Maurel, P. (1989). The increase in urinary excretion of 6 beta-hydroxycortisol as a marker of human hepatic cytochrome P450III<sub>A</sub> induction. *Br. J. Clin. Pharmacol.* *28*, 373–387.

Gerbal-Chaloin, S., Daujat, M., Pascussi, J.-M., Pichard-Garcia, L., Vilarem, M.-J., and Maurel, P. (2002). Transcriptional Regulation of *CYP2C9* Gene. *J. Biol. Chem.* *277*, 209–217.

Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M., and Laudet, V. (2006). Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol. Rev.* *58*, 685–704.

Ghafour-Rashidi, Z., Dermenaki-Farahani, E., Aliahmadi, A., Esmaily, H., Mohammadirad, A., Ostad, S.N., and Abdollahi, M. (2007). Protection by cAMP and cGMP phosphodiesterase inhibitors of diazinon-induced hyperglycemia and oxidative/nitrosative stress in rat Langerhans islets cells: Molecular evidence for involvement of non-cholinergic mechanisms. *Pestic. Biochem. Physiol.* *87*, 261–270.

Ghose, R., Omoluabi, O., Gandhi, A., Shah, P., Strohacker, K., Carpenter, K.C., McFarlin, B., and Guo, T. (2011). Role of high-fat diet in regulation of gene expression of drug metabolizing enzymes and transporters. *Life Sci.* *89*, 57–64.

Giles, D.A., Moreno-Fernandez, M.E., Stankiewicz, T.E., Graspentner, S., Cappelletti, M., Wu, D., Mukherjee, R., Chan, C.C., Lawson, M.J., Klarquist, J., et al. (2017). Thermoneutral housing exacerbates nonalcoholic fatty liver disease in mice and allows for sex-independent disease modeling. *Nat. Med.* *23*, 829–838.

Ginès, P., Kamath, P.S., and Arroyo, V. (2011). *Chronic liver failure : mechanisms and management* (Humana Press).

Goetz, A.K., Bao, W., Ren, H., Schmid, J.E., Tully, D.B., Wood, C., Rockett, J.C., Narotsky, M.G., Sun, G., Lambert, G.R., et al. (2006). Gene expression profiling in the liver of CD-1 mice to characterize the hepatotoxicity of triazole fungicides. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *215*, 274–284.

Gómez-Lechón, M.J., Donato, T., Jover, R., Rodriguez, C., Ponsoda, X., Glaise, D., Castell, J. V, and Guguen-Guillouzo, C. (2001). Expression and induction of a large set of drug-metabolizing enzymes by the highly differentiated human hepatoma cell line BC2. *Eur. J. Biochem.* *268*, 1448–1459.

Goodwin, B., Hodgson, E., and Liddle, C. (1999). The orphan human pregnane X receptor mediates the transcriptional activation of *CYP3A4* by rifampicin through a distal enhancer module. *Mol. Pharmacol.* *56*, 1329–1339.

Goodwin, M., Herath, C., Jia, Z., Leung, C., Coughlan, M.T., Forbes, J., and Angus, P. (2013). Advanced glycation end products augment experimental hepatic fibrosis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *28*, 369–376.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Gremlich, S., Roduit, R., and Thorens, B. (1997). Dexamethasone induces posttranslational degradation of GLUT2 and inhibition of insulin secretion in isolated pancreatic beta cells. Comparison with the effects of fatty acids. *J. Biol. Chem.* *272*, 3216–3222.
- Grün, F., and Blumberg, B. (2009). Endocrine disrupters as obesogens. *Mol. Cell. Endocrinol.* *304*, 19–29.
- Guengerich, F.P., Wu, Z.-L., and Bartleson, C.J. (2005). Function of human cytochrome P450s: Characterization of the orphans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *338*, 465–469.
- Guinez, C., Filhoulaud, G., Rayah-Benhamed, F., Marmier, S., Dubuquoy, C., Dentin, R., Moldes, M., Burnol, A.-F., Yang, X., Lefebvre, T., et al. (2011). O-GlcNAcylation Increases ChREBP Protein Content and Transcriptional Activity in the Liver. *Diabetes* *60*, 1399–1413.
- Gunier, R.B., Ward, M.H., Airola, M., Bell, E.M., Colt, J., Nishioka, M., Buffler, P.A., Reynolds, P., Rull, R.P., Hertz, A., et al. (2011). Determinants of Agricultural Pesticide Concentrations in Carpet Dust. *Environ. Health Perspect.* *119*, 970–976.
- Guo, D., Sarkar, J., Suino-Powell, K., Xu, Y., Matsumoto, K., Jia, Y., Yu, S., Khare, S., Haldar, K., Rao, M.S., et al. (2007). Induction of Nuclear Translocation of Constitutive Androstane Receptor by Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\alpha$  Synthetic Ligands in Mouse Liver. *J. Biol. Chem.* *282*, 36766–36776.
- Guo, G.L., Choudhuri, S., and Klaassen, C.D. (2002). Induction profile of rat organic anion transporting polypeptide 2 (oatp2) by prototypical drug-metabolizing enzyme inducers that activate gene expression through ligand-activated transcription factor pathways. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *300*, 206–212.
- Guo, G.L., Lambert, G., Negishi, M., Ward, J.M., Brewer, H.B., Kliewer, S. a, Gonzalez, F.J., and Sinal, C.J. (2003). Complementary roles of farnesoid X receptor, pregnane X receptor, and constitutive androstane receptor in protection against bile acid toxicity. *J. Biol. Chem.* *278*, 45062–45071.
- Guyton, K.Z., Barone, S., Brown, R.C., Euling, S.Y., Jinot, J., and Makris, S. (2008). Mode of Action Frameworks: A Critical Analysis. *J. Toxicol. Environ. Heal. Part B* *11*, 16–31.
- Hager, G.L., Lim, C.S., Elbi, C., and Baumann, C.T. (2000). Trafficking of nuclear receptors in living cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *74*, 249–254.
- Handschin, C., and Meyer, U.A. (2003). Induction of Drug Metabolism: The Role of Nuclear Receptors. *Pharmacol. Rev.* *55*, 649–673.
- Handschin, C., Podvinec, M., Amherd, R., Looser, R., Ourlin, J.-C., and Meyer, U.A. (2002). Cholesterol and Bile Acids Regulate Xenosensor Signaling in Drug-mediated Induction of Cytochromes P450. *J. Biol. Chem.* *277*, 29561–29567.
- Hardie, D.G., and Ashford, M.L.J. (2014). AMPK: regulating energy balance at the cellular and whole body levels. *Physiology (Bethesda)*. *29*, 99–107.
- Harnly, M.E., Bradman, A., Nishioka, M., McKone, T.E., Smith, D., McLaughlin, R., Kavanagh-Baird, G., Castorina, R., and Eskenazi, B. (2009). Pesticides in dust from homes in an agricultural area. *Environ. Sci. Technol.* *43*, 8767–8774.
- Harrison, S.A., and Day, C.P. (2007). Benefits of lifestyle modification in NAFLD. *Gut* *56*, 1760–1769.
- Haughton, E.L., Tucker, S.J., Marek, C.J., Durward, E., Leel, V., Bascal, Z., Monaghan, T., Koruth, M., Collie-Duguid, E., Mann, D.A., et al. (2006). Pregnane X receptor activators inhibit human hepatic stellate cell transdifferentiation in vitro. *Gastroenterology* *131*, 194–209.
- Hebbard, L., and George, J. (2011). Animal models of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *8*, 35–44.
- Heinzel, T., Lavinsky, R.M., Mullen, T.M., Söderstrom, M., Laherty, C.D., Torchia, J., Yang, W.M., Brard, G., Ngo, S.D., Davie, J.R., et al. (1997). A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature* *387*, 43–48.
- Hernandez, J.P., Huang, W., Chapman, L.M., Chua, S., Moore, D.D., and Baldwin, W.S. (2007). The Environmental

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Estrogen, Nonylphenol, Activates the Constitutive Androstane Receptor. *Toxicol. Sci.* **98**, 416–426.
- Hernandez, J.P., Mota, L.C., Huang, W., Moore, D.D., and Baldwin, W.S. (2009a). Sexually dimorphic regulation and induction of P450s by the constitutive androstane receptor (CAR). *Toxicology* **256**, 53–64.
- Hernandez, J.P., Mota, L.C., and Baldwin, W.S. (2009b). Activation of CAR and PXR by Dietary, Environmental and Occupational Chemicals Alters Drug Metabolism, Intermediary Metabolism, and Cell Proliferation. *Curr. Pharmacogenomics Person. Med.* **7**, 81–105.
- Hernandez, J.P., Mota, L.C., and Baldwin, W.S. (2009c). Activation of CAR and PXR by Dietary, Environmental and Occupational Chemicals Alters Drug Metabolism, Intermediary Metabolism, and Cell Proliferation. *Curr. Pharmacogenomics Person. Med.* **7**, 81–105.
- Herrington, J., and Carter-Su, C. (2001). Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. *Trends Endocrinol. Metab.* **12**, 252–257.
- Hewitt, K.N., Pratis, K., Jones, M.E.E., and Simpson, E.R. (2004). Estrogen replacement reverses the hepatic steatosis phenotype in the male aromatase knockout mouse. *Endocrinology* **145**, 1842–1848.
- Holloway, M.G., Miles, G.D., Dombkowski, A.A., and Waxman, D.J. (2008). Liver-specific hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$  deficiency: greater impact on gene expression in male than in female mouse liver. *Mol. Endocrinol.* **22**, 1274–1286.
- Hong, N.-S., Kim, K.-S., Lee, I.-K., Lind, P.M., Lind, L., Jacobs, D.R., and Lee, D.-H. (2012). The association between obesity and mortality in the elderly differs by serum concentrations of persistent organic pollutants: a possible explanation for the obesity paradox. *Int. J. Obes.* **36**, 1170–1175.
- Howe, K., Sanat, F., Thumser, A.E., Coleman, T., and Plant, N. (2011). The statin class of HMG-CoA reductase inhibitors demonstrate differential activation of the nuclear receptors PXR, CAR and FXR, as well as their downstream target genes. *Xenobiotica* **41**, 519–529.
- Huang, P.L. (2009). A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Dis. Model. Mech.* **2**, 231–237.
- Huang, C., and Freake, H.C. (1998). Thyroid hormone regulates the acetyl-CoA carboxylase PI promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **249**, 704–708.
- Huang, W., Zhang, J., Chua, S.S., Qatanani, M., Han, Y., Granata, R., and Moore, D.D. (2003). Induction of bilirubin clearance by the constitutive androstane receptor (CAR). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 4156–4161.
- Huang, W., Zhang, J., Wei, P., Schrader, W.T., and Moore, D.D. (2004). Meclizine Is an Agonist Ligand for Mouse Constitutive Androstane Receptor (CAR) and an Inverse Agonist for Human CAR. *Mol. Endocrinol.* **18**, 2402–2408.
- Impey, S., McCorkle, S.R., Cha-Molstad, H., Dwyer, J.M., Yochum, G.S., Boss, J.M., McWeeney, S., Dunn, J.J., Mandel, G., and Goodman, R.H. (2004). Defining the CREB Regulon: A Genome-Wide Analysis of Transcription Factor Regulatory Regions. *Cell* **119**, 1041–1054.
- Ishimoto, K., Nakamura, H., Tachibana, K., Yamasaki, D., Ota, A., Hirano, K., Tanaka, T., Hamakubo, T., Sakai, J., Kodama, T., et al. (2009). Sterol-mediated regulation of human lipin 1 gene expression in hepatoblastoma cells. *J. Biol. Chem.* **284**, 22195–22205.
- Jaber, N., Dou, Z., Chen, J.-S., Catanzaro, J., Jiang, Y.-P., Ballou, L.M., Selinger, E., Ouyang, X., Lin, R.Z., Zhang, J., et al. (2012). Class III PI3K Vps34 plays an essential role in autophagy and in heart and liver function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 2003–2008.
- Jackson, J.P., Ferguson, S.S., Moore, R., Negishi, M., and Goldstein, J.A. (2004). The Constitutive Active/Androstane Receptor Regulates Phenytoin Induction of Cyp2c29. *Mol. Pharmacol.* **65**, 1397–1404.
- Jackson, J.P., Ferguson, S.S., Negishi, M., and Goldstein, J.A. (2006). Phenytoin Induction of the Cyp2c37 Gene Is Mediated by the Constitutive Androstane Receptor. *Drug Metab. Dispos.* **34**, 2003–2010.
- Jakubowski, M., and Trzcinka-Ochocka, M. (2005). Biological monitoring of exposure: trends and key developments. *J. Occup. Health* **47**, 22–48.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Jamshidi, H.R., Ghahremani, M.H., Ostad, S.N., Sharifzadeh, M., Dehpour, A.R., and Abdollahi, M. (2009). Effects of diazinon on the activity and gene expression of mitochondrial glutamate dehydrogenase from rat pancreatic Langerhans islets. *Pestic. Biochem. Physiol.* *93*, 23–27.
- Jandhyala, S.M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., and Nageshwar Reddy, D. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World J. Gastroenterol.* *21*, 8787–8803.
- JANSSON, J.-O., EDÉN, S., and ISAKSSON, O. (1985). Sexual Dimorphism in the Control of Growth Hormone Secretion\*. *Endocr. Rev.* *6*, 128–150.
- Jin, Y., Lin, X., Miao, W., Wu, T., Shen, H., Chen, S., Li, Y., Pan, Q., and Fu, Z. (2014). Chronic exposure of mice to environmental endocrine-disrupting chemicals disturbs their energy metabolism. *Toxicol. Lett.* *225*, 392–400.
- Jinno, H., Tanaka-Kagawa, T., Hanioka, N., Ishida, S., Saeki, M., Soyama, A., Itoda, M., Nishimura, T., Saito, Y., Ozawa, S., et al. (2004). Identification of Novel Alternative Splice Variants of Human Constitutive Androstane Receptor and Characterization of Their Expression in the Liver. *Mol. Pharmacol.* *65*, 496–502.
- Jitrapakdee, S. (2012). Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *44*, 33–45.
- Joly, C., Gay-Quéheillard, J., Léké, A., Chardon, K., Delanaud, S., Bach, V., and Khorsi-Cauet, H. (2013). Impact of chronic exposure to low doses of chlorpyrifos on the intestinal microbiota in the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®) and in the rat. *Environ. Sci. Pollut. Res.* *20*, 2726–2734.
- Jones, M.W., and Deppen, J.G. (2018). *Physiology, Gallbladder* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL)).
- Jungermann, K. (1992). Role of intralobular compartmentation in hepatic metabolism. *Diabetes Metab.* *18*, 81–86.
- Jungermann, K., and Keitzmann, T. (1996). Zonation of Parenchymal and Nonparenchymal Metabolism in Liver. *Annu. Rev. Nutr.* *16*, 179–203.
- Junquero, D., and Rival, Y. (2005). Syndrome métabolique : quelle définition pour quel(s) traitement(s) ? *Médecine/sciences* *21*, 1045–1053.
- Kabashima, T., Kawaguchi, T., Wadzinski, B.E., and Uyeda, K. (2003). Xylulose 5-phosphate mediates glucose-induced lipogenesis by xylulose 5-phosphate-activated protein phosphatase in rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 5107–5112.
- Kakizaki, S., Yamazaki, Y., Kosone, T., Horiguchi, N., Horiguchi, N., Sohara, N., Sato, K., Takagi, H., Yoshinari, K., and Mori, M. (2007). Gene expression profiles of drug-metabolizing enzymes and transporters with an overexpression of hepatocyte growth factor. *Liver Int.* *27*, 109–119.
- KAMATH, V., and RAJINI, P. (2007). Altered glucose homeostasis and oxidative impairment in pancreas of rats subjected to dimethoate intoxication. *Toxicology* *231*, 137–146.
- Kamiyama, Y., Matsubara, T., Yoshinari, K., Nagata, K., Kamimura, H., and Yamazoe, Y. (2007). Role of human hepatocyte nuclear factor 4alpha in the expression of drug-metabolizing enzymes and transporters in human hepatocytes assessed by use of small interfering RNA. *Drug Metab. Pharmacokinet.* *22*, 287–298.
- Karami-Mohajeri, S., and Abdollahi, M. (2011). Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates. *Hum. Exp. Toxicol.* *30*, 1119–1140.
- Karmaus, W., Osuch, J.R., Eneli, I., Mudd, L.M., Zhang, J., Mikucki, D., Haan, P., and 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.
- Kassam, A., Winrow, C.J., Fernandez-Rachubinski, F., Capone, J.P., and Rachubinski, R.A. (2000). The peroxisome proliferator response element of the gene encoding the peroxisomal beta-oxidation enzyme enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase is a target for constitutive androstane receptor beta/9-cis-retinoic acid receptor-mediated transac. *J. Biol. Chem.* *275*, 4345–4350.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Kast, H.R., Goodwin, B., Tarr, P.T., Jones, S.A., Anisfeld, A.M., Stoltz, C.M., Tontonoz, P., Kliewer, S., Willson, T.M., and Edwards, P.A. (2002). Regulation of Multidrug Resistance-associated Protein 2 (ABCC2) by the Nuclear Receptors Pregnane X Receptor, Farnesoid X-activated Receptor, and Constitutive Androstane Receptor. *J. Biol. Chem.* *277*, 2908–2915.
- Kawaguchi, T., Takenoshita, M., Kabashima, T., and Uyeda, K. (2001). Glucose and cAMP regulate the L-type pyruvate kinase gene by phosphorylation/dephosphorylation of the carbohydrate response element binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *98*, 13710–13715.
- Kawamoto, T., Sueyoshi, T., Zelko, I., Moore, R., Washburn, K., and Negishi, M. (1999). Phenobarbital-responsive nuclear translocation of the receptor CAR in induction of the CYP2B gene. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 6318–6322.
- Kawamoto, T., Kakizaki, S., Yoshinari, K., and Negishi, M. (2000a). Estrogen Activation of the Nuclear Orphan Receptor CAR (Constitutive Active Receptor) in Induction of the Mouse *Cyp2b10* Gene. *Mol. Endocrinol.* *14*, 1897–1905.
- Kawamoto, T., Kakizaki, S., Yoshinari, K., and Negishi, M. (2000b). Estrogen activation of the nuclear orphan receptor CAR (constitutive active receptor) in induction of the mouse *Cyp2b10* gene. *Mol. Endocrinol.* *14*, 1897–1905.
- Keating, N.L., O'Malley, A.J., Freedland, S.J., and Smith, M.R. (2012). Diabetes and cardiovascular disease during androgen deprivation therapy: observational study of veterans with prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* *104*, 1518–1523.
- Kesse-Guyot, E., Baudry, J., Assmann, K.E., Galan, P., Hercberg, S., and Lairon, D. (2017). Prospective association between consumption frequency of organic food and body weight change, risk of overweight or obesity: results from the NutriNet-Santé Study. *Br. J. Nutr.* *117*, 325–334.
- Kiernan, F. (1833). The Anatomy and Physiology of the Liver. *Philos. Trans. R. Soc. London* *123*, 711–770.
- Kim, K.H., and Lee, M.-S. (2014). Autophagy—a key player in cellular and body metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.* *10*, 322–337.
- Kim, J., Park, Y., Yoon, K.S., Clark, J.M., and Park, Y. (2013). Imidacloprid, a neonicotinoid insecticide, induces insulin resistance. *J. Toxicol. Sci.* *38*, 655–660.
- Kim, J., Park, Y., Yoon, K.S., Clark, J.M., and Park, Y. (2014). Permethrin Alters Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes and Causes Insulin Resistance in C2C12 Myotubes. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* *28*, 418–424.
- 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., et al. (2001). Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 7522–7527.
- Klaassen, C.D., Liu, L., and Dunn, R.T. (1998). Regulation of sulfotransferase mRNA expression in male and female rats of various ages. *Chem. Biol. Interact.* *109*, 299–313.
- Kliewer, S.A., Umesono, K., Mangelsdorf, D.J., and Evans, R.M. (1992). Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. *Nature* *355*, 446–449.
- Ko, Y.-H., Wong, T.-C., Hsu, Y.-Y., Kuo, K.-L., and Yang, S.H. (2017). The Correlation Between Body Fat, Visceral Fat, and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* *15*, 304–311.
- Kobayashi, K., Sueyoshi, T., Inoue, K., Moore, R., and Negishi, M. (2003). Cytoplasmic accumulation of the nuclear receptor CAR by a tetratricopeptide repeat protein in HepG2 cells. *Mol. Pharmacol.* *64*, 1069–1075.
- Kodama, S., Koike, C., Negishi, M., and Yamamoto, Y. (2004). Nuclear receptors CAR and PXR cross talk with FOXO1 to regulate genes that encode drug-metabolizing and gluconeogenic enzymes. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 7931–7940.
- Kodama, S., Moore, R., Yamamoto, Y., and Negishi, M. (2007). Human nuclear pregnane X receptor cross-talk with CREB to repress cAMP activation of the glucose-6-phosphatase gene. *Biochem. J.* *407*, 373–381.
- Koh, K.H., Jurkovic, S., Yang, K., Choi, S.-Y., Jung, J.W., Kim, K.P., Zhang, W., and Jeong, H. (2012). Estradiol induces

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- cytochrome P450 2B6 expression at high concentrations: implication in estrogen-mediated gene regulation in pregnancy. *Biochem. Pharmacol.* *84*, 93–103.
- Kohalmy, K., Tamási, V., Kóbori, L., Sárváry, E., Pascussi, J.-M., Porrogi, P., Rozman, D., Prough, R.A., Meyer, U.A., and Monostory, K. (2007). Dehydroepiandrosterone induces human CYP2B6 through the constitutive androstane receptor. *Drug Metab. Dispos.* *35*, 1495–1501.
- Koike, C., Moore, R., and Negishi, M. (2007). Extracellular signal-regulated kinase is an endogenous signal retaining the nuclear constitutive active/androstane receptor (CAR) in the cytoplasm of mouse primary hepatocytes. *Mol. Pharmacol.* *71*, 1217–1221.
- Kojima, H., Sata, F., Takeuchi, S., Sueyoshi, T., and Nagai, T. (2011). Comparative study of human and mouse pregnane X receptor agonistic activity in 200 pesticides using in vitro reporter gene assays. *Toxicology* *280*, 77–87.
- Kotani, K., Tokunaga, K., Fujioka, S., Kobatake, T., Keno, Y., Yoshida, S., Shimomura, I., Tarui, S., and Matsuzawa, Y. (1994). Sexual dimorphism of age-related changes in whole-body fat distribution in the obese. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* *18*, 207–2.
- Kuiper, G.G.J.M., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., van der Saag, P.T., van der Burg, B., and Gustafsson, J.-Å. (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor  $\beta$ . *Endocrinology* *139*, 4252–4263.
- Lahtela, J.T., Arranto, a J., and Sotaniemi, E. a (1985). Enzyme inducers improve insulin sensitivity in non-insulin-dependent diabetic subjects. *Diabetes* *34*, 911–916.
- Lai, K.K.Y., Kolippakkam, D., and Beretta, L. (2008). Comprehensive and quantitative proteome profiling of the mouse liver and plasma. *Hepatology* *47*, 1043–1051.
- Lake, B.G., Price, R.J., and Osimitz, T.G. (2015). Mode of action analysis for pesticide-induced rodent liver tumours involving activation of the constitutive androstane receptor: relevance to human cancer risk. *Pest Manag. Sci.* *71*, 829–834.
- Lam, D.W., and LeRoith, D. (2000). Metabolic Syndrome (MDText.com, Inc.).
- LAMBA, V., Yasuda, K., Lamba, J.K., Assem, M., Davila, J., Strom, S., and Schuetz, E.G. (2004). PXR (NR1I2): splice variants in human tissues, including brain, and identification of neurosteroids and nicotine as PXR activators. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *199*, 251–265.
- Lambert, J.E., Ramos-Roman, M.A., Browning, J.D., and Parks, E.J. (2014). Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* *146*, 726–735.
- Lasram, M.M., Dhouib, I.B., Annabi, A., El Fazaa, S., and Gharbi, N. (2014a). A review on the molecular mechanisms involved in insulin resistance induced by organophosphorus pesticides. *Toxicology* *322*, 1–13.
- Lasram, M.M., Dhouib, I.B., Bouzid, K., Lamine, A.J., Annabi, A., Belhadjhmida, N., Ahmed, M. Ben, Fazaa, S. El, Abdelmoula, J., and Gharbi, N. (2014b). Association of inflammatory response and oxidative injury in the pathogenesis of liver steatosis and insulin resistance following subchronic exposure to malathion in rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* *38*, 542–553.
- Lassiter, T.L., and Brimijoin, S. (2008). Rats gain excess weight after developmental exposure to the organophosphorothionate pesticide, chlorpyrifos. *Neurotoxicol. Teratol.* *30*, 125–130.
- Lassiter, T.L., Ryde, I.T., MacKillop, E.A., Brown, K.K., Levin, E.D., Seidler, F.J., and Slotkin, T.A. (2008). Exposure of Neonatal Rats to Parathion Elicits Sex-Selective Reprogramming of Metabolism and Alters the Response to a High-Fat Diet in Adulthood. *Environ. Health Perspect.* *116*, 1456–1462.
- Laurenzana, E.M., Chen, T., Kannuswamy, M., Sell, B.E., Strom, S.C., Li, Y., and Omiecinski, C.J. (2012). The orphan nuclear receptor DAX-1 functions as a potent corepressor of the constitutive androstane receptor (NR1I3). *Mol. Pharmacol.* *82*, 918–928.
- Laurenzana, E.M., Coslo, D.M., Vigilar, M.V., Roman, A.M., and Omiecinski, C.J. (2016). Activation of the Constitutive Androstane Receptor by Monophthalates. *Chem. Res. Toxicol.* *29*, 1651–1661.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- LeBaron, M.J., Rasoulpour, R.J., Gollapudi, B.B., Sura, R., Kan, H.L., Schisler, M.R., Pottenger, L.H., Papineni, S., and Eisenbrandt, D.L. (2014). Characterization of Nuclear Receptor-Mediated Murine Hepatocarcinogenesis of the Herbicide Pronamide and Its Human Relevance. *Toxicol. Sci.* *142*, 74–92.
- Ledda-Columbano, G.M., Pibiri, M., Concas, D., Molotzu, F., Simbula, G., Cossu, C., and Columbano, A. (2003). Sex difference in the proliferative response of mouse hepatocytes to treatment with the CAR ligand, TCPOBOP. *Carcinogenesis* *24*, 1059–1065.
- Lee, A.J., Cai, M.X., Thomas, P.E., Conney, A.H., and Zhu, B.T. (2003a). Characterization of the oxidative metabolites of 17beta-estradiol and estrone formed by 15 selectively expressed human cytochrome p450 isoforms. *Endocrinology* *144*, 3382–3398.
- Lee, D.-H., Steffes, M.W., Sjödin, A., Jones, R.S., Needham, L.L., and Jacobs, D.R. (2010). Low Dose of Some Persistent Organic Pollutants Predicts Type 2 Diabetes: A Nested Case–Control Study. *Environ. Health Perspect.* *118*, 1235–1242.
- Lee, M., Hwang, J.-T., Lee, H.-J., Jung, S.-N., Kang, I., Chi, S.-G., Kim, S.-S., and Ha, J. (2003b). AMP-activated protein kinase activity is critical for hypoxia-inducible factor-1 transcriptional activity and its target gene expression under hypoxic conditions in DU145 cells. *J. Biol. Chem.* *278*, 39653–39661.
- Lee, Y.-H., Kim, S.H., Kim, S.-N., Kwon, H.-J., Kim, J.-D., Oh, J.Y., and Jung, Y.-S. (2016). Sex-specific metabolic interactions between liver and adipose tissue in MCD diet-induced non-alcoholic fatty liver disease. *Oncotarget* *7*, 46959–46971.
- Lemaire, G., Mnif, W., Pascussi, J.-M., Pillon, A., Rabenoelina, F., Fenet, H., Gomez, E., Casellas, C., Nicolas, J.-C., Cavailles, V., et al. (2006). Identification of New Human Pregnane X Receptor Ligands among Pesticides Using a Stable Reporter Cell System. *Toxicol. Sci.* *91*, 501–509.
- Lemke, U., Krones-Herzig, A., Berriel Diaz, M., Narvekar, P., Ziegler, A., Vegiopoulos, A., Cato, A.C.B., Bohl, S., Klingmüller, U., Screaton, R.A., et al. (2008). The glucocorticoid receptor controls hepatic dyslipidemia through Hes1. *Cell Metab.* *8*, 212–223.
- Lempiäinen, H., Molnár, F., Macias Gonzalez, M., Peräkylä, M., and Carlberg, C. (2005). Antagonist- and inverse agonist-driven interactions of the vitamin D receptor and the constitutive androstane receptor with corepressor protein. *Mol. Endocrinol.* *19*, 2258–2272.
- Lenzen, S. (2014). A Fresh View of Glycolysis and Glucokinase Regulation: History and Current Status. *J. Biol. Chem.* *289*, 12189–12194.
- Lewis, D.F.V., Jacobs, M.N., and Dickins, M. (2004). Compound lipophilicity for substrate binding to human P450s in drug metabolism. *Drug Discov. Today* *9*, 530–537.
- Lewitt, M.S., and Brismar, K. (2002). Gender difference in the leptin response to feeding in peroxisome-proliferator-activated receptor-alpha knockout mice. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* *26*, 1296–1300.
- Ley, R.E., Turnbaugh, P.J., Klein, S., and Gordon, J.I. (2006). Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature* *444*, 1022–1023.
- Li, J.Z., Huang, Y., Karaman, R., Ivanova, P.T., Brown, H.A., Roddy, T., Castro-Perez, J., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H. (2012a). Chronic overexpression of PNPLA3I148M in mouse liver causes hepatic steatosis. *J. Clin. Invest.* *122*, 4130–4144.
- Li, L., Chen, T., Stanton, J.D., Sueyoshi, T., Negishi, M., and Wang, H. (2008). The peripheral benzodiazepine receptor ligand 1-(2-chlorophenyl-methylpropyl)-3-isoquinoline-carboxamide is a novel antagonist of human constitutive androstane receptor. *Mol. Pharmacol.* *74*, 443–453.
- Li, L., Bao, X., Zhang, Q.-Y., Negishi, M., and Ding, X. (2017). Role of CYP2B in Phenobarbital-Induced Hepatocyte Proliferation in Mice. *Drug Metab. Dispos.* *45*, 977–981.
- Li, M. V., Chen, W., Harmancey, R.N., Nuotio-Antar, A.M., Imamura, M., Saha, P., Taegtmeier, H., and Chan, L. (2010). Glucose-6-phosphate mediates activation of the carbohydrate responsive binding protein (ChREBP). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *395*, 395–400.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Li, X., Pham, H.T., Janesick, A.S., and Blumberg, B. (2012b). Triflumizole is an obesogen in mice that acts through peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ). *Environ. Health Perspect.* *120*, 1720–1726.
- Li, Y., Xu, S., Mihaylova, M.M., Zheng, B., Hou, X., Jiang, B., Park, O., Luo, Z., Lefai, E., Shyy, J.Y.-J., et al. (2011). AMPK Phosphorylates and Inhibits SREBP Activity to Attenuate Hepatic Steatosis and Atherosclerosis in Diet-Induced Insulin-Resistant Mice. *Cell Metab.* *13*, 376–388.
- Lim, S., Ahn, S.Y., Song, I.C., Chung, M.H., Jang, H.C., Park, K.S., Lee, K.-U., Pak, Y.K., and Lee, H.K. (2009). Chronic exposure to the herbicide, atrazine, causes mitochondrial dysfunction and insulin resistance. *PLoS One* *4*, e5186.
- Lima, L.O., Almeida, S., Hutz, M.H., and Fiegenbaum, M. (2013). PPARA, RXRA, NR1I2 and NR1I3 gene polymorphisms and lipid and lipoprotein levels in a Southern Brazilian population. *Mol. Biol. Rep.* *40*, 1241–1247.
- Lin, H.-Y., Yu, I.-C., Wang, R.-S., Chen, Y.-T., Liu, N.-C., Altuwajri, S., Hsu, C.-L., Ma, W.-L., Jokinen, J., Sparks, J.D., et al. (2008). Increased hepatic steatosis and insulin resistance in mice lacking hepatic androgen receptor. *Hepatology* *47*, 1924–1935.
- Liu, Y.-Y., Heymann, R.S., Moatamed, F., Schultz, J.J., Sobel, D., and Brent, G.A. (2007). A mutant thyroid hormone receptor alpha antagonizes peroxisome proliferator-activated receptor alpha signaling in vivo and impairs fatty acid oxidation. *Endocrinology* *148*, 1206–1217.
- Lizcano, F., and Guzmán, G. (2014). Estrogen Deficiency and the Origin of Obesity during Menopause. *Biomed Res. Int.* *2014*, 757461.
- Loewenherz, C., Fenske, R.A., Simcox, N.J., Bellamy, G., and Kalman, D. (1997). Biological monitoring of organophosphorus pesticide exposure among children of agricultural workers in central Washington State. *Environ. Health Perspect.* *105*, 1344–1353.
- Lonardo, A., Carani, C., Carulli, N., and Loria, P. (2006). “Endocrine NAFLD” a hormonocentric perspective of nonalcoholic fatty liver disease pathogenesis. *J. Hepatol.* *44*, 1196–1207.
- Lonardo, A., Bellentani, S., Argo, C.K., Ballestri, S., Byrne, C.D., Caldwell, S.H., Cortez-Pinto, H., Grieco, A., Machado, M. V., Miele, L., et al. (2015). Epidemiological modifiers of non-alcoholic fatty liver disease: Focus on high-risk groups. *Dig. Liver Dis.* *47*, 997–1006.
- López-Velázquez, J.A., Carrillo-Córdova, L.D., Chávez-Tapia, N.C., Uribe, M., and Méndez-Sánchez, N. (2012). Nuclear Receptors in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J. Lipids* *2012*, 1–10.
- Lu, C., Toepel, K., Irish, R., Fenske, R.A., Barr, D.B., and Bravo, R. (2006). Organic diets significantly lower children’s dietary exposure to organophosphorus pesticides. *Environ. Health Perspect.* *114*, 260–263.
- Lu, M., Du, J., Zhou, P., Chen, H., Lu, C., and Zhang, Q. (2015). Endocrine disrupting potential of fipronil and its metabolite in reporter gene assays. *Chemosphere* *120*, 246–251.
- Lu, Y.-F., Jin, T., Xu, Y., Zhang, D., Wu, Q., Zhang, Y.-K.J., and Liu, J. (2013). Sex Differences in the Circadian Variation of Cytochrome P450 Genes and Corresponding Nuclear Receptors in Mouse Liver. *Chronobiol. Int.* *30*, 1135–1143.
- Lundholm, L., Zang, H., Hirschberg, A.L., Gustafsson, J.-Å., Arner, P., and Dahlman-Wright, K. (2008). Key lipogenic gene expression can be decreased by estrogen in human adipose tissue. *Fertil. Steril.* *90*, 44–48.
- Luz, A.L., Kassotis, C.D., Stapleton, H.M., and Meyer, J.N. (2018). The high-production volume fungicide pyraclostrobin induces triglyceride accumulation associated with mitochondrial dysfunction, and promotes adipocyte differentiation independent of PPAR $\gamma$  activation, in 3T3-L1 cells. *Toxicology* *393*, 150–159.
- Lynch, C., Pan, Y., Li, L., Heyward, S., Moeller, T., Swaan, P.W., and Wang, H. (2014). Activation of the constitutive androstane receptor inhibits gluconeogenesis without affecting lipogenesis or fatty acid synthesis in human hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *279*, 33–42.
- Ma, L., Tsatsos, N.G., and Towle, H.C. (2005). Direct role of ChREBP.Mlx in regulating hepatic glucose-responsive genes. *J. Biol. Chem.* *280*, 12019–12027.
- MABUCHI, A., Mullaney, I., Sheard, P.W., Hessian, P.A., Mallard, B.L., Tawadrous, M.N., Zimmermann, A., Senoo,

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- H., and Wheatley, A.M. (2004). Role of hepatic stellate cell/hepatocyte interaction and activation of hepatic stellate cells in the early phase of liver regeneration in the rat. *J. Hepatol.* *40*, 910–916.
- MacIntosh, D.L., Kabiru, C.W., and Ryan, P.B. (2001). Longitudinal investigation of dietary exposure to selected pesticides. *Environ. Health Perspect.* *109*, 145–150.
- MacLeod, J.N., Pampori, N.A., and Shapiro, B.H. (1991). Sex differences in the ultradian pattern of plasma growth hormone concentrations in mice. *J. Endocrinol.* *131*, 395–399.
- Macsween, R.M.N., Burt, A.D., Portmann, B.C., Ishak, K.G., Scheurer, P.J., Anthony, P.P., and Weisenberg, E. (2003). Pathology of the liver, 4th edition. *Diagn. Cytopathol.* *29*, 43–43.
- Maglich, J.M., Watson, J., McMillen, P.J., Goodwin, B., Willson, T.M., and Moore, J.T. (2004). The nuclear receptor CAR is a regulator of thyroid hormone metabolism during caloric restriction. *J. Biol. Chem.* *279*, 19832–19838.
- Maglich, J.M., Lobe, D.C., and Moore, J.T. (2009). The nuclear receptor CAR (NR113) regulates serum triglyceride levels under conditions of metabolic stress. *J. Lipid Res.* *50*, 439–445.
- Mahdessian, H., Taxiarchis, A., Popov, S., Silveira, A., Franco-Cereceda, A., Hamsten, A., Eriksson, P., and van't Hooft, F. (2014). TM6SF2 is a regulator of liver fat metabolism influencing triglyceride secretion and hepatic lipid droplet content. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 8913–8918.
- Malaplate-Armand, C., Ferrari, L., Masson, C., Visvikis-Siest, S., Lambert, H., and Batt, A.M. (2005). Down-regulation of astroglial CYP2C, glucocorticoid receptor and constitutive androstane receptor genes in response to cocaine in human U373 MG astrocytoma cells. *Toxicol. Lett.* *159*, 203–211.
- Malarkey, D.E., Johnson, K., Ryan, L., Boorman, G., and Maronpot, R.R. (2005). New Insights into Functional Aspects of Liver Morphology. *Toxicol. Pathol.* *33*, 27–34.
- Mall, F.P. (1906). A study of the structural unit of the liver. *Am. J. Anat.* *5*, 227–308.
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., et al. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* *83*, 835–839.
- Mangum, L.H., Howell, G.E., and Chambers, J.E. (2015). Exposure to p,p'-DDE enhances differentiation of 3T3-L1 preadipocytes in a model of sub-optimal differentiation. *Toxicol. Lett.* *238*, 65–71.
- Marie, I.J., Dalet, C., Blanchard, J.M., Astre, C., Szawlowski, A., Saint Aubert, B., Joyeux, H., and Maurel, P. (1988). Inhibition of cytochrome P-450p (P450III<sub>A1</sub>) gene expression during liver regeneration from two-thirds hepatectomy in the rat. *Biochem. Pharmacol.* *37*, 3515–3521.
- Marinou, K., Adiels, M., Hodson, L., Frayn, K.N., Karpe, F., and Fielding, B.A. (2011). Young women partition fatty acids towards ketone body production rather than VLDL-TAG synthesis, compared with young men. *Br. J. Nutr.* *105*, 857–865.
- Martin, S., and Parton, R.G. (2006). Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 373–378.
- Martini, C.N., Gabrielli, M., Brandani, J.N., and Vila, M.D.C. (2016). Glyphosate Inhibits PPAR Gamma Induction and Differentiation of Preadipocytes and is able to Induce Oxidative Stress. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* *30*, 404–413.
- Masson, D., Qatanani, M., Sberna, A.L., Xiao, R., Pais de Barros, J.P., Grober, J., Deckert, V., Athias, A., Gamber, P., Lagrost, L., et al. (2008). Activation of the constitutive androstane receptor decreases HDL in wild-type and human apoA-I transgenic mice. *J. Lipid Res.* *49*, 1682–1691.
- Mastropasqua, F., Girolimetti, G., and Shoshan, M. (2018). PGC1 $\alpha$ : Friend or Foe in Cancer? *Genes (Basel)*. *9*, 48.
- Masuyama, H., Nakatsukasa, H., and Hiramatsu, Y. (2010). Effect of oncostatin M on uridine diphosphate-5'-glucuronosyltransferase 1A1 through cross talk with constitutive androstane receptor. *Mol. Endocrinol.* *24*, 745–753.
- Masuzaki, H., Paterson, J., Shinyama, H., Morton, N.M., Mullins, J.J., Seckl, J.R., and Flier, J.S. (2001). A Transgenic

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Model of Visceral Obesity and the Metabolic Syndrome. *Science* (80- ). *294*, 2166–2170.
- Matsumoto, M., Pocai, A., Rossetti, L., DePinho, R.A., and Accili, D. (2007). Impaired Regulation of Hepatic Glucose Production in Mice Lacking the Forkhead Transcription Factor Foxo1 in Liver. *Cell Metab.* *6*, 208–216.
- Matsuzaka, T., Shimano, H., Yahagi, N., Amemiya-Kudo, M., Yoshikawa, T., Hasty, A.H., Tamura, Y., Osuga, J., Okazaki, H., Iizuka, Y., et al. (2002). Dual regulation of mouse Delta(5)- and Delta(6)-desaturase gene expression by SREBP-1 and PPARalpha. *J. Lipid Res.* *43*, 107–114.
- McKenna, N.J., Cooney, A.J., DeMayo, F.J., Downes, M., Glass, C.K., Lanz, R.B., Lazar, M.A., Mangelsdorf, D.J., Moore, D.D., Qin, J., et al. (2009). Minireview: Evolution of NURSA, the Nuclear Receptor Signaling Atlas. *Mol. Endocrinol.* *23*, 740–746.
- Medjakovic, S., Zochling, A., Gerster, P., Ivanova, M.M., Teng, Y., Klinge, C.M., Schildberger, B., Gartner, M., and Jungbauer, A. (2014). Effect of nonpersistent pesticides on estrogen receptor, androgen receptor, and aryl hydrocarbon receptor. *Environ. Toxicol.* *29*, 1201–1216.
- Meex, R.C.R., and Watt, M.J. (2017). Hepatokines: linking nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Nat. Rev. Endocrinol.* *13*, 509–520.
- Mendez, M.A., Garcia-Esteban, R., Guxens, M., Vrijheid, M., Kogevinas, M., Goñi, F., Fochs, S., and Sunyer, J. (2010). Prenatal Organochlorine Compound Exposure, Rapid Weight Gain, and Overweight in Infancy. *Environ. Health Perspect.* *119*, 272–278.
- Merla, G., Howald, C., Antonarakis, S.E., and Reymond, A. (2004). The subcellular localization of the ChoRE-binding protein, encoded by the Williams-Beuren syndrome critical region gene 14, is regulated by 14-3-3. *Hum. Mol. Genet.* *13*, 1505–1514.
- Miao, J., Fang, S., Bae, Y., and Kemper, J.K. (2006). Functional inhibitory cross-talk between constitutive androstane receptor and hepatic nuclear factor-4 in hepatic lipid/glucose metabolism is mediated by competition for binding to the DR1 motif and to the common coactivators, GRIP-1 and PGC-1alpha. *J. Biol. Chem.* *281*, 14537–14546.
- Min, G. (2010). Estrogen modulates transactivations of SXR-mediated liver X receptor response element and CAR-mediated phenobarbital response element in HepG2 cells. *Exp. Mol. Med.* *42*, 731–738.
- Min, G., Kemper, J.K., and Kemper, B. (2002a). Glucocorticoid receptor-interacting protein 1 mediates ligand-independent nuclear translocation and activation of constitutive androstane receptor in vivo. *J. Biol. Chem.* *277*, 26356–26363.
- Min, G., Kim, H., Bae, Y., Petz, L., and Kemper, J.K. (2002b). Inhibitory cross-talk between estrogen receptor (ER) and constitutively activated androstane receptor (CAR). CAR inhibits ER-mediated signaling pathway by sequestrating p160 coactivators. *J. Biol. Chem.* *277*, 34626–34633.
- Miners, J.O., Attwood, J., and Birkett, D.J. (1983). Influence of sex and oral contraceptive steroids on paracetamol metabolism. *Br. J. Clin. Pharmacol.* *16*, 503–509.
- Mitsche, M.A., Hobbs, H.H., and Cohen, J.C. (2018). Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 promotes transfers of essential fatty acids from triglycerides to phospholipids in hepatic lipid droplets. *J. Biol. Chem.* *293*, 6958–6968.
- Mokhtari, Z., Gibson, D.L., and Hekmatdoost, A. (2017). Nonalcoholic Fatty Liver Disease, the Gut Microbiome, and Diet. *Adv. Nutr. An Int. Rev. J.* *8*, 240–252.
- Montagner, A., Polizzi, A., Fouché, E., Ducheix, S., Lippi, Y., Lasserre, F., Barquissau, V., Régnier, M., Lukowicz, C., Benhamed, F., et al. (2016a). Liver PPAR $\alpha$  is crucial for whole-body fatty acid homeostasis and is protective against NAFLD. *Gut* *65*, 1202–1214.
- Montagner, A., Korecka, A., Polizzi, A., Lippi, Y., Blum, Y., Canlet, C., Tremblay-Franco, M., Gautier-Stein, A., Burcelin, R., Yen, Y.-C., et al. (2016b). Hepatic circadian clock oscillators and nuclear receptors integrate microbiome-derived signals. *Sci. Rep.* *6*, 20127.
- Montgomery, M.P., Kamel, F., Saldana, T.M., Alavanja, M.C.R., and Sandler, D.P. (2008). Incident diabetes and

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- pesticide exposure among licensed pesticide applicators: Agricultural Health Study, 1993–2003. *Am. J. Epidemiol.* **167**, 1235–1246.
- Montoya, G.A., Strauss, V., Fabian, E., Kamp, H., Mellert, W., Walk, T., Looser, R., Herold, M., Krennrich, G., Peter, E., et al. (2014). Mechanistic analysis of metabolomics patterns in rat plasma during administration of direct thyroid hormone synthesis inhibitors or compounds increasing thyroid hormone clearance. *Toxicol. Lett.* **225**, 240–251.
- Moon, Y.-A., Liang, G., Xie, X., Frank-Kamenetsky, M., Fitzgerald, K., Koteliansky, V., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Horton, J.D. (2012). The Scap/SREBP Pathway Is Essential for Developing Diabetic Fatty Liver and Carbohydrate-Induced Hypertriglyceridemia in Animals. *Cell Metab.* **15**, 240–246.
- Moore, D.D., Wei, P., Zhang, J., Egan-Hafley, M., and Liang, S. (2000a). The nuclear receptor CAR mediates specific xenobiotic induction of drug metabolism. *Nature* **407**, 920–923.
- Moore, L.B., Parks, D.J., Jones, S.A., Bledsoe, R.K., Consler, T.G., Stimmel, J.B., Goodwin, B., Liddle, C., Blanchard, S.G., Willson, T.M., et al. (2000b). Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands. *J. Biol. Chem.* **275**, 15122–15127.
- Moreno-Aliaga, M.J., and Matsumura, F. (1999). Endrin inhibits adipocyte differentiation by selectively altering expression pattern of CCAAT/enhancer binding protein- $\alpha$  in 3T3-L1 cells. *Mol. Pharmacol.* **56**, 91–101.
- Morigny, P., Houssier, M., Mouisel, E., and Langin, D. (2016). Adipocyte lipolysis and insulin resistance. *Biochimie* **125**, 259–266.
- Mostafalou, S. (2016). Persistent Organic Pollutants and Concern Over the Link with Insulin Resistance Related Metabolic Diseases. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, pp. 69–89.
- Mouzaki, M., and Allard, J.P. (2012). The Role of Nutrients in the Development, Progression, and Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J. Clin. Gastroenterol.* **46**, 457–467.
- Mouzaki, M., Comelli, E.M., Arendt, B.M., Bonengel, J., Fung, S.K., Fischer, S.E., McGilvray, I.D., and Allard, J.P. (2013). Intestinal microbiota in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **58**, 120–127.
- Mueckler, M., and Thorens, B. (2013). The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol. Aspects Med.* **34**, 121–138.
- Mueller, N.T., Pereira, M.A., Demerath, E.W., Dreyfus, J.G., MacLehose, R.F., Carr, J.J., Terry, J.G., Jacobs, D.R., and Jr (2015). Earlier menarche is associated with fatty liver and abdominal ectopic fat in midlife, independent of young adult BMI: The CARDIA study. *Obesity (Silver Spring)*. **23**, 468–474.
- Murray, M., Fiala-Beer, E., and Sutton, D. (2003). Upregulation of cytochromes *P* 450 2B in rat liver by orphenadrine. *Br. J. Pharmacol.* **139**, 787–796.
- Mutel, E., Abdul-Wahed, A., Ramamonjisoa, N., Stefanutti, A., Houberdon, I., Cavassila, S., Pilleul, F., Beuf, O., Gautier-Stein, A., Penhoat, A., et al. (2011). Targeted deletion of liver glucose-6 phosphatase mimics glycogen storage disease type 1a including development of multiple adenomas. *J. Hepatol.* **54**, 529–537.
- Mutoh, S., Osabe, M., Inoue, K., Moore, R., Pedersen, L., Perera, L., Reboloso, Y., Sueyoshi, T., and Negishi, M. (2009). Dephosphorylation of threonine 38 is required for nuclear translocation and activation of human xenobiotic receptor CAR (NR1I3). *J. Biol. Chem.* **284**, 34785–34792.
- Mutoh, S., Sobhany, M., Moore, R., Perera, L., Pedersen, L., Sueyoshi, T., and Negishi, M. (2013). Phenobarbital indirectly activates the constitutive active androstane receptor (CAR) by inhibition of epidermal growth factor receptor signaling. *Sci. Signal.* **6**, ra31.
- Naderer, O.J., Dupuis, R.E., Heinzen, E.L., Wiwattanawongsa, K., Johnson, M.W., and Smith, P.C. (2005). The influence of norfloxacin and metronidazole on the disposition of mycophenolate mofetil. *J. Clin. Pharmacol.* **45**, 219–226.
- Nagaraju, R., Joshi, A.K.R., and Rajini, P.S. (2015). Organophosphorus insecticide, monocrotophos, possesses the propensity to induce insulin resistance in rats on chronic exposure. *J. Diabetes* **7**, 47–59.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Nakamura, K., Moore, R., Negishi, M., and Sueyoshi, T. (2007). Nuclear Pregnane X Receptor Cross-talk with FoxA2 to Mediate Drug-induced Regulation of Lipid Metabolism in Fasting Mouse Liver. *J. Biol. Chem.* *282*, 9768–9776.
- Nakayama, K., Sudo, Y., Sasaki, Y., Iwata, H., Takahashi, M., and Kamataki, T. (2001). Studies on Transcriptional Regulation of Cyp3a16 Gene in Mouse Livers by Application of Direct DNA Injection Method. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *287*, 820–824.
- Nebert, D.W., Roe, A.L., Dieter, M.Z., Solis, W.A., Yang, Y., and Dalton, T.P. (2000). Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* *59*, 65–85.
- Neel, B.A., and Sargis, R.M. (2011). The paradox of progress: environmental disruption of metabolism and the diabetes epidemic. *Diabetes* *60*, 1838–1848.
- Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J., Waterman, M.R., Gotoh, O., Coon, M.J., Estabrook, R.W., et al. (1996). P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* *6*, 1–42.
- Nieman, L.K., and Chanco Turner, M.L. (2006). Addison's disease. *Clin. Dermatol.* *24*, 276–280.
- Oates, L., Cohen, M., Braun, L., Schembri, A., and Taskova, R. (2014). Reduction in urinary organophosphate pesticide metabolites in adults after a week-long organic diet. *Environ. Res.* *132*, 105–111.
- Ooe, H., Kon, J., Oshima, H., and Mitaka, T. (2009). Thyroid hormone is necessary for expression of constitutive androstane receptor in rat hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* *37*, 1963–1969.
- Opherk, C., Tronche, F., Kellendonk, C., Kohlmüller, D., Schulze, A., Schmid, W., and Schütz, G. (2004). Inactivation of the Glucocorticoid Receptor in Hepatocytes Leads to Fasting Hypoglycemia and Ameliorates Hyperglycemia in Streptozotocin-Induced Diabetes Mellitus. *Mol. Endocrinol.* *18*, 1346–1353.
- Oppermann, U.C., and Maser, E. (2000). Molecular and structural aspects of xenobiotic carbonyl metabolizing enzymes. Role of reductases and dehydrogenases in xenobiotic phase I reactions. *Toxicology* *144*, 71–81.
- Osabe, M., Sugatani, J., Takemura, A., Kurosawa, M., Yamazaki, Y., Ikari, A., and Miwa, M. (2009). Up-regulation of CAR expression through Elk-1 in HepG2 and SW480 cells by serum starvation stress. *FEBS Lett.* *583*, 885–889.
- Oshida, K., Vasani, N., Jones, C., Moore, T., Hester, S., Nesnow, S., Auerbach, S., Geter, D.R., Aleksunes, L.M., Thomas, R.S., et al. (2015). Identification of chemical modulators of the constitutive activated receptor (CAR) in a gene expression compendium. *Nucl. Recept. Signal.* *13*, e002.
- Ozen, H. (2007). Glycogen storage diseases: new perspectives. *World J. Gastroenterol.* *13*, 2541–2553.
- Pakharukova, M.Y., Smetanina, M.A., Kaledin, V.I., Kobzev, V.F., Romanova, I. V, and Merkulova, T.I. (2007). Activation of constitutive androstane receptor under the effect of hepatocarcinogenic aminoazo dyes in mouse and rat liver. *Bull. Exp. Biol. Med.* *144*, 338–341.
- Panahi, P., Vosough-Ghanbari, S., Pournourmohammadi, S., Ostad, S.N., Nikfar, S., Minaie, B., and Abdollahi, M. (2006a). Stimulatory effects of malathion on the key enzymes activities of insulin secretion in langerhans islets, glutamate dehydrogenase and glucokinase. *Toxicol. Mech. Methods* *16*, 161–167.
- Panahi, P., Vosough-Ghanbari, S., Pournourmohammadi, S., Ostad, S.N., Nikfar, S., Minaie, B., and Abdollahi, M. (2006b). Stimulatory effects of malathion on the key enzymes activities of insulin secretion in langerhans islets, glutamate dehydrogenase and glucokinase. *Toxicol. Mech. Methods* *16*, 161–167.
- Pantoja, C., Huff, J.T., and Yamamoto, K.R. (2008). Glucocorticoid signaling defines a novel commitment state during adipogenesis in vitro. *Mol. Biol. Cell* *19*, 4032–4041.
- Park, E.A., Song, S., Vinson, C., and Roesler, W.J. (1999). Role of CCAAT enhancer-binding protein beta in the thyroid hormone and cAMP induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription. *J. Biol. Chem.* *274*, 211–217.
- Park, S.-H., Wiwi, C.A., and Waxman, D.J. (2006). Signalling cross-talk between hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  and

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- growth-hormone-activated STAT5b. *Biochem. J.* **397**, 159–168.
- Park, Y., Kim, Y., Kim, J., Yoon, K.S., Clark, J., Lee, J., and Park, Y. (2013). Imidacloprid, a Neonicotinoid Insecticide, Potentiates Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 255–259.
- Park, Y.J., Lee, E.K., Lee, Y.K., Park, D.J., Jang, H.C., and Moore, D.D. (2012). Opposing regulation of cytochrome P450 expression by CAR and PXR in hypothyroid mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **263**, 131–137.
- Pascual, M., Gomez-Lechon, M.J., Castell, J. V., and Jover, R. (2008). ATF5 Is a Highly Abundant Liver-Enriched Transcription Factor that Cooperates with Constitutive Androstane Receptor in the Transactivation of CYP2B6: Implications in Hepatic Stress Responses. *Drug Metab. Dispos.* **36**, 1063–1072.
- Pascussi, J.M., Gerbal-Chaloin, S., Fabre, J.M., Maurel, P., and Vilarem, M.J. (2000). Dexamethasone enhances constitutive androstane receptor expression in human hepatocytes: consequences on cytochrome P450 gene regulation. *Mol. Pharmacol.* **58**, 1441–1450.
- Pascussi, J.M., Busson-Le Coniat, M., Maurel, P., and Vilarem, M.-J. (2003a). Transcriptional analysis of the orphan nuclear receptor constitutive androstane receptor (NR113) gene promoter: identification of a distal glucocorticoid response element. *Mol. Endocrinol.* **17**, 42–55.
- Pascussi, J.M., Busson-Le Coniat, M., Maurel, P., and Vilarem, M.-J. (2003b). Transcriptional Analysis of the Orphan Nuclear Receptor Constitutive Androstane Receptor (NR113) Gene Promoter: Identification of a Distal Glucocorticoid Response Element. *Mol. Endocrinol.* **17**, 42–55.
- Patel, C.J., Bhattacharya, J., and Butte, A.J. (2010). An Environment-Wide Association Study (EWAS) on type 2 diabetes mellitus. *PLoS One* **5**, e10746.
- Patel, R., Patel, M., Tsai, R., Lin, V., Bookout, A.L., Zhang, Y., Magomedova, L., Li, T., Chan, J.F., Budd, C., et al. (2011). LXR $\beta$  is required for glucocorticoid-induced hyperglycemia and hepatosteatosis in mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 431–441.
- Patel, R.D., Hollingshead, B.D., Omiecinski, C.J., and Perdew, G.H. (2007). Aryl-hydrocarbon receptor activation regulates constitutive androstane receptor levels in murine and human liver. *Hepatology* **46**, 209–218.
- Patra, K.C., and Hay, N. (2014). The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends Biochem. Sci.* **39**, 347–354.
- Peet, D.J., Janowski, B.A., and Mangelsdorf, D.J. (1998). The LXRs: a new class of oxysterol receptors. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 571–575.
- Peffer, R.C., Moggs, J.G., Pastoor, T., Currie, R.A., Wright, J., Milburn, G., Waechter, F., and Rusyn, I. (2007). Mouse Liver Effects of Cyproconazole, a Triazole Fungicide: Role of the Constitutive Androstane Receptor. *Toxicol. Sci.* **99**, 315–325.
- Pelletier, C., Després, J.-P., and Tremblay, A. (2002). Plasma organochlorine concentrations in endurance athletes and obese individuals. *Med. Sci. Sports Exerc.* **34**, 1971–1975.
- Pelletier, C., Imbeault, P., and Tremblay, A. (2003). Energy balance and pollution by organochlorines and polychlorinated biphenyls. *Obes. Rev.* **4**, 17–24.
- Peris-Sampedro, F., Cabré, M., Basaure, P., Reverte, I., Domingo, J.L., and Teresa Colomina, M. (2015). Adulthood dietary exposure to a common pesticide leads to an obese-like phenotype and a diabetic profile in apoE3 mice. *Environ. Res.* **142**, 169–176.
- Petersen, M.C., Vatner, D.F., and Shulman, G.I. (2017). Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* **13**, 572–587.
- Petrick, J.S., and Klaassen, C.D. (2007). Importance of hepatic induction of constitutive androstane receptor and other transcription factors that regulate xenobiotic metabolism and transport. *Drug Metab. Dispos.* **35**, 1806–1815.
- Petzinger, E., and Geyer, J. (2006). Drug transporters in pharmacokinetics. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* **372**, 465–475.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Pighon, A., Gutkowska, J., Jankowski, M., Rabasa-Lhoret, R., and Lavoie, J.-M. (2011). Exercise training in ovariectomized rats stimulates estrogenic-like effects on expression of genes involved in lipid accumulation and subclinical inflammation in liver. *Metabolism* *60*, 629–639.
- Pivonello, R., Isidori, A.M., De Martino, M.C., Newell-Price, J., Biller, B.M.K., and Colao, A. (2016). Complications of Cushing's syndrome: state of the art. *Lancet Diabetes Endocrinol.* *4*, 611–629.
- Porter, T.D., and Coon, M.J. (1991). Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms. *J. Biol. Chem.* *266*, 13469–13472.
- Porter, W.P., Green, S.M., Debbink, N.L., and Carlson, I. (1993). Groundwater pesticides: interactive effects of low concentrations of carbamates aldicarb and methomyl and the triazine metribuzin on thyroxine and somatotropin levels in white rats. *J. Toxicol. Environ. Health* *40*, 15–34.
- Postic, C., and Girard, J. (2008). Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J. Clin. Invest.* *118*, 829–838.
- Postic, C., Dentin, R., Denechaud, P.-D., and Girard, J. (2007). ChREBP, a Transcriptional Regulator of Glucose and Lipid Metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* *27*, 179–192.
- Prokopec, S.D., Watson, J.D., Lee, J., Pohjanvirta, R., and Boutros, P.C. (2015). Sex-related differences in murine hepatic transcriptional and proteomic responses to TCDD. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *284*, 188–196.
- Qatanani, M., Wei, P., and Moore, D.D. (2004). Alterations in the distribution and orexigenic effects of dexamethasone in CAR-null mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *78*, 285–291.
- Qatanani, M., Zhang, J., and Moore, D.D. (2005). Role of the constitutive androstane receptor in xenobiotic-induced thyroid hormone metabolism. *Endocrinology* *146*, 995–1002.
- Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., Zhang, F., Liang, S., Zhang, W., Guan, Y., Shen, D., et al. (2012). A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* *490*, 55–60.
- Qin, Y., Dalen, K.T., Gustafsson, J.-Å., and Nebb, H.I. (2009). Regulation of hepatic fatty acid elongase 5 by LXR $\alpha$ -SREBP-1c. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* *1791*, 140–147.
- Quinet, E.M., Savio, D. a, Halpern, A.R., Chen, L., Miller, C.P., and Nambi, P. (2004). Gene-selective modulation by a synthetic oxysterol ligand of the liver X receptor. *J. Lipid Res.* *45*, 1929–1942.
- Quinn, M.A., Xu, X., Ronfani, M., and Cidlowski, J.A. (2018). Estrogen Deficiency Promotes Hepatic Steatosis via a Glucocorticoid Receptor-Dependent Mechanism in Mice. *Cell Rep.* *22*, 2690–2701.
- Raafat, N., Abass, M.A., and Salem, H.M. (2012). Malathion exposure and insulin resistance among a group of farmers in Al-Sharkia governorate. *Clin. Biochem.* *45*, 1591–1595.
- Racanelli, V., and Rehmann, B. (2006). The liver as an immunological organ. *Hepatology* *43*, S54–S62.
- RAPPAPORT, A.M., BOROWY, Z.J., LOUGHEED, W.M., and LOTTO, W.N. (1954). Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit; role in hepatic physiology and pathology. *Anat. Rec.* *119*, 11–33.
- Ratziu, V., Giral, P., Charlotte, F., Bruckert, E., Thibault, V., Theodorou, I., Khalil, L., Turpin, G., Opolon, P., and Poynard, T. (2000). Liver fibrosis in overweight patients. *Gastroenterology* *118*, 1117–1123.
- Regitz-Zagrosek, V., Lehmkuhl, E., and Weickert, M.O. (2006). Gender differences in the metabolic syndrome and their role for cardiovascular disease. *Clin. Res. Cardiol.* *95*, 136–147.
- Repa, J.J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J.A., Shimomura, I., Shan, B., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Mangelsdorf, D.J. (2000a). Regulation of mouse sterol regulatory by oxysterol receptors, LXR  $\alpha$  and LXR  $\beta$ . *Genes Dev.* *2819–2830*.
- Repa, J.J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J.M., Shimomura, I., Shan, B., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Mangelsdorf, D.J. (2000b). Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXR $\alpha$  and LXR $\beta$ . *Genes Dev.* *14*, 2819–2830.
- Rezen, T., Tamasi, V., Lövgren-Sandblom, A., Björkhem, I., Meyer, U. a, and Rozman, D. (2009). Effect of CAR

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- activation on selected metabolic pathways in normal and hyperlipidemic mouse livers. *BMC Genomics* *10*, 384.
- Rezen, T., Rozman, D., Pascussi, J.-M., and Monostory, K. (2011). Interplay between cholesterol and drug metabolism. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* *1814*, 146–160.
- Režen, T., Hafner, M., Kortagere, S., Ekins, S., Hodnik, V., and Rozman, D. (2017). Rosuvastatin and Atorvastatin Are Ligands of the Human Constitutive Androstane Receptor/Retinoid X Receptor  $\alpha$  Complex. *Drug Metab. Dispos.* *45*, 974–976.
- Riant, E., Waget, A., Cogo, H., Arnal, J.-F., Burcelin, R., and Gourdy, P. (2009a). Estrogens Protect against High-Fat Diet-Induced Insulin Resistance and Glucose Intolerance in Mice. *Endocrinology* *150*, 2109–2117.
- Riant, E., Waget, A., Cogo, H., Arnal, J.-F., Burcelin, R., and Gourdy, P. (2009b). Estrogens Protect against High-Fat Diet-Induced Insulin Resistance and Glucose Intolerance in Mice. *Endocrinology* *150*, 2109–2117.
- Ridlon, J.M., Kang, D.-J., and Hylemon, P.B. (2006). Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J. Lipid Res.* *47*, 241–259.
- Rodrigues, M.H., Bruno, A.S., Nahas-Neto, J., Sandrim, V.C., Muniz, L.G., and Nahas, E.A.P. (2014). Evaluation of Clinical and Inflammatory Markers of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Postmenopausal Women with Metabolic Syndrome. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* *12*, 330–338.
- Romeo, S., Kozlitina, J., Xing, C., Pertsemlidis, A., Cox, D., Pennacchio, L.A., Boerwinkle, E., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H. (2008). Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Genet.* *40*, 1461–1465.
- Romero-Navarro, G., Lopez-Aceves, T., Rojas-Ochoa, A., and Fernandez Mejia, C. (2006). Effect of dichlorvos on hepatic and pancreatic glucokinase activity and gene expression, and on insulin mRNA levels. *Life Sci.* *78*, 1015–1020.
- Rosenfeld, M.G., and Glass, C.K. (2001). Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *J. Biol. Chem.* *276*, 36865–36868.
- Roth, A., Looser, R., Kaufmann, M., and Meyer, U. a (2008). Sterol regulatory element binding protein 1 interacts with pregnane X receptor and constitutive androstane receptor and represses their target genes. *Pharmacogenet. Genomics* *18*, 325–337.
- Rothman, D.L., Magnusson, I., Katz, L.D., Shulman, R.G., and Shulman, G.I. (1991). Quantitation of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis in fasting humans with  $^{13}\text{C}$  NMR. *Science* *254*, 573–576.
- Roust, L.R., and Jensen, M.D. (1993). Postprandial free fatty acid kinetics are abnormal in upper body obesity. *Diabetes* *42*, 1567–1573.
- Le Roy, T., Llopis, M., Lepage, P., Bruneau, A., Rabot, S., Bevilacqua, C., Martin, P., Philippe, C., Walker, F., Bado, A., et al. (2013). Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Gut* *62*, 1787–1794.
- Ruckpaul, K., Rein, H., and Blanck, J. (1985). [Regulation mechanisms of the endoplasmic cytochrome P-450 systems of the liver]. *Biomed. Biochim. Acta* *44*, 351–379.
- Rufo, C., Teran-Garcia, M., Nakamura, M.T., Koo, S.-H., Towle, H.C., and Clarke, S.D. (2001). Involvement of a Unique Carbohydrate-responsive Factor in the Glucose Regulation of Rat Liver Fatty-acid Synthase Gene Transcription. *J. Biol. Chem.* *276*, 21969–21975.
- Rui, L. (2014). Energy Metabolism in the Liver. In *Comprehensive Physiology*, (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), pp. 177–197.
- Saito, K., Kobayashi, K., Mizuno, Y., Fukuchi, Y., Furihata, T., and Chiba, K. (2010). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) agonists induce constitutive androstane receptor (CAR) and cytochrome P450 2B in rat primary hepatocytes. *Drug Metab. Pharmacokinet.* *25*, 108–111.
- Saito, K., Moore, R., and Negishi, M. (2013). p38 Mitogen-activated protein kinase regulates nuclear receptor CAR that activates the CYP2B6 gene. *Drug Metab. Dispos.* *41*, 1170–1173.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Sakakura, Y., Shimano, H., Sone, H., Takahashi, A., Inoue, N., Toyoshima, H., Suzuki, S., Yamada, N., and Inoue, K. (2001). Sterol regulatory element-binding proteins induce an entire pathway of cholesterol synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *286*, 176–183.
- Saldana, T.M., Basso, O., Hoppin, J.A., Baird, D.D., Knott, C., Blair, A., Alavanja, M.C.R., and Sandler, D.P. (2007). Pesticide Exposure and Self-Reported Gestational Diabetes Mellitus in the Agricultural Health Study. *Diabetes Care* *30*, 529–534.
- Sasaki, Y., Takahashi, Y., Nakayama, K., and Kamataki, T. (1999). Cooperative regulation of CYP2C12 gene expression by STAT5 and liver-specific factors in female rats. *J. Biol. Chem.* *274*, 37117–37124.
- Sasse, D. (1975). Dynamics of liver glycogen: the topochemistry of glycogen synthesis, glycogen content and glycogenolysis under the experimental conditions of glycogen accumulation and depletion. *Histochemistry* *45*, 237–254.
- Saussele, T., Burk, O., Blievernicht, J.K., Klein, K., Nussler, A., Nussler, N., Hengstler, J.G., Eichelbaum, M., Schwab, M., and Zanger, U.M. (2007). Selective induction of human hepatic cytochromes P450 2B6 and 3A4 by metamizole. *Clin. Pharmacol. Ther.* *82*, 265–274.
- Savary, C.C., Josse, R., Bruyere, A., Guillet, F., Robin, M.-A., and Guillouzo, A. (2014). Interactions of Endosulfan and Methoxychlor Involving CYP3A4 and CYP2B6 in Human HepaRG Cells. *Drug Metab. Dispos.* *42*, 1235–1240.
- Savkur, R.S., Wu, Y., Bramlett, K.S., Wang, M., Yao, S., Perkins, D., Totten, M., Searfoss, G., Ryan, T.P., Su, E.W., et al. Alternative splicing within the ligand binding domain of the human constitutive androstane receptor. *Mol. Genet. Metab.* *80*, 216–226.
- Sberna, A.L., Assem, M., Gautier, T., Grober, J., Guiu, B., Jeannin, A., Pais De Barros, J.P., Athias, A., Lagrost, L., and Masson, D. (2011). Constitutive androstane receptor activation stimulates faecal bile acid excretion and reverse cholesterol transport in mice. *J. Hepatol.* *55*, 154–161.
- Schnabl, B., and Brenner, D.A. (2014). Interactions Between the Intestinal Microbiome and Liver Diseases. *Gastroenterology* *146*, 1513–1524.
- Schreinemachers, D.M. (2006). Mortality from ischemic heart disease and diabetes mellitus (type 2) in four U.S. wheat-producing states: a hypothesis-generating study. *Environ. Health Perspect.* *114*, 186–193.
- Schug, T.T., Janesick, A., Blumberg, B., and Heindel, J.J. (2011). Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *127*, 204–215.
- Seeger, B., Klawonn, F., Nguema Bekale, B., and Steinberg, P. (2016). Mixture Effects of Estrogenic Pesticides at the Human Estrogen Receptor  $\alpha$  and  $\beta$ . *PLoS One* *11*, e0147490.
- Semchuk, K., McDuffie, H., Senthilselvan, A., Cessna, A., and Irvine, D. (2004). Body mass index and bromoxynil exposure in a sample of rural residents during spring herbicide application. *J. Toxicol. Environ. Health. A* *67*, 1321–1352.
- Seok, S., Fu, T., Choi, S.-E., Li, Y., Zhu, R., Kumar, S., Sun, X., Yoon, G., Kang, Y., Zhong, W., et al. (2014). Transcriptional regulation of autophagy by an FXR–CREB axis. *Nature* *516*, 108–111.
- Seppälä-Lindroos, A., Vehkavaara, S., Häkkinen, A.-M., Goto, T., Westerbacka, J., Sovijärvi, A., Halavaara, J., and Yki-Järvinen, H. (2002). Fat Accumulation in the Liver Is Associated with Defects in Insulin Suppression of Glucose Production and Serum Free Fatty Acids Independent of Obesity in Normal Men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *87*, 3023–3028.
- Shehata, A.A., Schrödl, W., Aldin, A.A., Hafez, H.M., and Krüger, M. (2013). The Effect of Glyphosate on Potential Pathogens and Beneficial Members of Poultry Microbiota In Vitro. *Curr. Microbiol.* *66*, 350–358.
- Shen, N., Jiang, S., Lu, J.-M., Yu, X., Lai, S.-S., Zhang, J.-Z., Zhang, J.-L., Tao, W.-W., Wang, X.-X., Xu, N., et al. (2015). The Constitutive Activation of Egr-1/C/EBP $\alpha$  Mediates the Development of Type 2 Diabetes Mellitus by Enhancing Hepatic Gluconeogenesis. *Am. J. Pathol.* *185*, 513–523.
- Shen, P., Hsieh, T.-H., Yue, Y., Sun, Q., Clark, J.M., and Park, Y. (2017). Deltamethrin increases the fat accumulation in 3T3-L1 adipocytes and *Caenorhabditis elegans*. *Food Chem. Toxicol.* *101*, 149–156.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Shen, W., Punyanitya, M., Silva, A.M., Chen, J., Gallagher, D., Sardinha, L.B., Allison, D.B., and Heymsfield, S.B. (2009). Sexual dimorphism of adipose tissue distribution across the lifespan: a cross-sectional whole-body magnetic resonance imaging study. *Nutr. Metab. (Lond)*. *6*, 17.
- Shi, X., Cheng, Q., Xu, L., Yan, J., Jiang, M., He, J., Xu, M., Stefanovic-Racic, M., Sipula, I., O'Doherty, R.M., et al. (2014). Cholesterol sulfate and cholesterol sulfotransferase inhibit gluconeogenesis by targeting hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ . *Mol. Cell. Biol.* *34*, 485–497.
- Shibayama, Y., Ushinohama, K., Ikeda, R., Yoshikawa, Y., Motoya, T., Takeda, Y., and Yamada, K. (2006). Effect of methotrexate treatment on expression levels of multidrug resistance protein 2, breast cancer resistance protein and organic anion transporters Oat1, Oat2 and Oat3 in rats. *Cancer Sci.* *97*, 1260–1266.
- Shibli-Rahhal, A., Van Beek, M., and Schlechte, J.A. (2006). Cushing's syndrome. *Clin. Dermatol.* *24*, 260–265.
- Shimomura, I., Shimano, H., Korn, B.S., Bashmakov, Y., and Horton, J.D. (1998). Nuclear sterol regulatory element-binding proteins activate genes responsible for the entire program of unsaturated fatty acid biosynthesis in transgenic mouse liver. *J. Biol. Chem.* *273*, 35299–35306.
- Shindo, S., Numazawa, S., and Yoshida, T. (2007). A physiological role of AMP-activated protein kinase in phenobarbital-mediated constitutive androstane receptor activation and CYP2B induction. *Biochem. J.* *401*, 735–741.
- Shiraki, T., Sakai, N., Kanaya, E., and Jingami, H. (2003). Activation of orphan nuclear constitutive androstane receptor requires subnuclear targeting by peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ : A possible link between xenobiotic response and nutritional state. *J. Biol. Chem.* *278*, 11344–11350.
- Shizu, R., Shindo, S., Yoshida, T., and Numazawa, S. (2013). Cross-talk between constitutive androstane receptor and hypoxia-inducible factor in the regulation of gene expression. *Toxicol. Lett.* *219*, 143–150.
- Sinal, C.J., Tohkin, M., Miyata, M., Ward, J.M., Lambert, G., and Gonzalez, F.J. (2000). Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell* *102*, 731–744.
- Singal, A.G., Manjunath, H., Yopp, A.C., Beg, M.S., Marrero, J.A., Gopal, P., and Waljee, A.K. (2014). The Effect of PNPLA3 on Fibrosis Progression and Development of Hepatocellular Carcinoma: A Meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* *109*, 325–334.
- Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A.M., and Czaja, M.J. (2009a). Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* *458*, 1131–1135.
- Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A.M., and Czaja, M.J. (2009b). Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* *458*, 1131–1135.
- Slotkin, T.A., Brown, K.K., and Seidler, F.J. (2005). Developmental exposure of rats to chlorpyrifos elicits sex-selective hyperlipidemia and hyperinsulinemia in adulthood. *Environ. Health Perspect.* *113*, 1291–1294.
- Smink, A., Ribas-Fito, N., Garcia, R., Torrent, M., Mendez, M.A., Grimalt, J.O., and Sunyer, J. (2008). Exposure to hexachlorobenzene during pregnancy increases the risk of overweight in children aged 6 years. *Acta Paediatr.* *97*, 1465–1469.
- Snedeker, S.M., and Hay, A.G. (2012). Do interactions between gut ecology and environmental chemicals contribute to obesity and diabetes? *Environ. Health Perspect.* *120*, 332–339.
- Soares, J.-B., Pimentel-Nunes, P., Roncon-Albuquerque, R., Leite-Moreira, A., and Leite-Moreira, A. (2010). The role of lipopolysaccharide/toll-like receptor 4 signaling in chronic liver diseases. *Hepatol. Int.* *4*, 659–672.
- Song, W.C. (2001). Biochemistry and reproductive endocrinology of estrogen sulfotransferase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *948*, 43–50.
- Sotaniemi, E.A., Arranto, A.J., Sutinen, S., and Stengård, J.H. (1983). Treatment of noninsulin-dependent diabetes mellitus with enzyme inducers. *Clin. Pharmacol. Ther.* *33*, 826–835.
- Spangenburg, E.E., Wohlers, L.M., and Valencia, A.P. (2012). Metabolic Dysfunction Under Reduced Estrogen Levels. *Exerc. Sport Sci. Rev.* *40*, 195–203.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Starling, A.P., Umbach, D.M., Kamel, F., Long, S., Sandler, D.P., and Hoppin, J.A. (2014). Pesticide use and incident diabetes among wives of farmers in the Agricultural Health Study. *Occup. Environ. Med.* *71*, 629–635.
- Staudinger, J.L., Madan, A., Carol, K.M., and Parkinson, A. (2003). Regulation of drug transporter gene expression by nuclear receptors. *Drug Metab. Dispos.* *31*, 523–527.
- Stedman, C.A.M., Liddle, C., Coulter, S.A., Sonoda, J., Alvarez, J.G.A., Moore, D.D., Evans, R.M., and Downes, M. (2005). Nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor ameliorate cholestatic liver injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 2063–2068.
- Stefan, N., Staiger, H., and Häring, H.-U. (2011). Dissociation between fatty liver and insulin resistance: the role of adipose triacylglycerol lipase. *Diabetologia* *54*, 7–9.
- Strott, C.A. (2002). Sulfonation and Molecular Action. *Endocr. Rev.* *23*, 703–732.
- Sueyoshi, T., Kawamoto, T., Zelko, I., Honkakoski, P., and Negishi, M. (1999). The repressed nuclear receptor CAR responds to phenobarbital in activating the human CYP2B6 gene. *J. Biol. Chem.* *274*, 6043–6046.
- Sueyoshi, T., Moore, R., Sugatani, J., Matsumura, Y., and Negishi, M. (2008). PPP1R16A, the membrane subunit of protein phosphatase 1beta, signals nuclear translocation of the nuclear receptor constitutive active/androstane receptor. *Mol. Pharmacol.* *73*, 1113–1121.
- Sueyoshi, T., Green, W.D., Vinal, K., Woodrum, T.S., Moore, R., and Negishi, M. (2011). Garlic Extract Diallyl Sulfide (DAS) Activates Nuclear Receptor CAR to Induce the Sult1e1 Gene in Mouse Liver. *PLoS One* *6*, e21229.
- Sugatani, J., Kojima, H., Ueda, A., Kakizaki, S., Yoshinari, K., Gong, Q.H., Owens, I.S., Negishi, M., and Sueyoshi, T. (2001). The phenobarbital response enhancer module in the human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 gene and regulation by the nuclear receptor CAR. *Hepatology* *33*, 1232–1238.
- Suino, K., Peng, L., Reynolds, R., Li, Y., Cha, J.-Y., Repa, J.J., Kliewer, S.A., and Xu, H.E. (2004). The nuclear xenobiotic receptor CAR: structural determinants of constitutive activation and heterodimerization. *Mol. Cell* *16*, 893–905.
- Sun, H., Shen, O.-X., Xu, X.-L., Song, L., and Wang, X.-R. (2008). Carbaryl, 1-naphthol and 2-naphthol inhibit the beta-1 thyroid hormone receptor-mediated transcription in vitro. *Toxicology* *249*, 238–242.
- Sun, Q., Qi, W., Yang, J.J., Yoon, K.S., Clark, J.M., and Park, Y. (2016). Fipronil promotes adipogenesis via AMPK $\alpha$ -mediated pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Food Chem. Toxicol.* *92*, 217–223.
- Sung, K.-C., Wild, S.H., and Byrne, C.D. (2013). Resolution of Fatty Liver and Risk of Incident Diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *98*, 3637–3643.
- Swales, K., and Negishi, M. (2004). CAR, driving into the future. *Mol. Endocrinol.* *18*, 1589–1598.
- Tabibian, J.H., Masyuk, A.I., Masyuk, T. V., O'Hara, S.P., and LaRusso, N.F. (2013). Physiology of Cholangiocytes. In *Comprehensive Physiology*, (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), pp. 541–565.
- Takeuchi, S., Matsuda, T., Kobayashi, S., Takahashi, T., and Kojima, H. (2006). In vitro screening of 200 pesticides for agonistic activity via mouse peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) $\alpha$  and PPAR $\gamma$  and quantitative analysis of in vivo induction pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *217*, 235–244.
- TANNENBAUM, G.S., and MARTIN, J.B. (1976). Evidence for an Endogenous Ultradian Rhythm Governing Growth Hormone Secretion in the Rat. *Endocrinology* *98*, 562–570.
- Tarantino, G., Savastano, S., and Colao, A. (2010). Hepatic steatosis, low-grade chronic inflammation and hormone/growth factor/adipokine imbalance. *World J. Gastroenterol.* *16*, 4773–4783.
- Teutsch, H.F., Goellner, A., and Mueller-Klieser, W. (1995). Glucose levels and succinate and lactate dehydrogenase activity in EMT6/Ro tumor spheroids. *Eur. J. Cell Biol.* *66*, 302–307.
- Thompson, P.D., Jurutka, P.W., Haussler, C.A., Whitfield, G.K., and Haussler, M.R. (1998). Heterodimeric DNA binding by the vitamin D receptor and retinoid X receptors is enhanced by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and inhibited by 9-cis-retinoic acid. Evidence for allosteric receptor interactions. *J. Biol. Chem.* *273*, 8483–8491.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Tikhonovich, I., Cox, J., and Weinman, S.A. (2013). Forkhead box class O transcription factors in liver function and disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *28*, 125–131.
- Tilg, H., Moschen, A.R., and Roden, M. (2017). NAFLD and diabetes mellitus. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *14*, 32–42.
- Timsit, Y.E., and Negishi, M. (2007). CAR and PXR: The xenobiotic-sensing receptors. *Steroids* *72*, 231–246.
- Titchenell, P.M., Chu, Q., Monks, B.R., and Birnbaum, M.J. (2015). Hepatic insulin signalling is dispensable for suppression of glucose output by insulin in vivo. *Nat. Commun.* *6*, 7078.
- Titchenell, P.M., Quinn, W.J., Lu, M., Chen, J., Rabinowitz, J.D., Birnbaum Correspondence, M.J., Chu, Q., Lu, W., Li, C., Chen, H., et al. (2016). Direct Hepatocyte Insulin Signaling Is Required for Lipogenesis but Is Dispensable for the Suppression of Glucose Production. *Cell Metab.* *23*, 1154–1166.
- Tolson, A.H., and Wang, H. (2010). Regulation of drug-metabolizing enzymes by xenobiotic receptors: PXR and CAR. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *62*, 1238–1249.
- Torre, C., Perret, C., and Colnot, S. (2011). Transcription dynamics in a physiological process:  $\beta$ -Catenin signaling directs liver metabolic zonation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *43*, 271–278.
- Turola, E., Petta, S., Vanni, E., Milosa, F., Valenti, L., Critelli, R., Miele, L., Maccio, L., Calvaruso, V., Fracanzani, A.L., et al. (2015). Ovarian senescence increases liver fibrosis in humans and zebrafish with steatosis. *Dis. Model. Mech.* *8*, 1037–1046.
- Tzamelis, I., Pissios, P., Schuetz, E.G., and Moore, D.D. (2000). The xenobiotic compound 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene is an agonist ligand for the nuclear receptor CAR. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 2951–2958.
- Ueda, A., Hamadeh, H.K., Webb, H.K., Yamamoto, Y., Sueyoshi, T., Afshari, C. a, Lehmann, J.M., and Negishi, M. (2002). Diverse roles of the nuclear orphan receptor CAR in regulating hepatic genes in response to phenobarbital. *Mol. Pharmacol.* *61*, 1–6.
- Ugele, B., Kempen, H.J., Kempen, J.M., Gebhardt, R., Meijer, P., Burger, H.J., and Princen, H.M. (1991). Heterogeneity of rat liver parenchyma in cholesterol 7  $\alpha$ -hydroxylase and bile acid synthesis. *Biochem. J.* *276* ( Pt 1), 73–77.
- Ukropec, J., Radikova, Z., Huckova, M., Koska, J., Kocan, A., Sebockova, E., Drobna, B., Trnovec, T., Susienkova, K., Labudova, V., et al. (2010). High prevalence of prediabetes and diabetes in a population exposed to high levels of an organochlorine cocktail. *Diabetologia* *53*, 899–906.
- Usmani, K.A., Rose, R.L., and Hodgson, E. (2003). Inhibition and activation of the human liver microsomal and human cytochrome P450 3A4 metabolism of testosterone by deployment-related chemicals. *Drug Metab. Dispos.* *31*, 384–391.
- Uyeda, K., Yamashita, H., and Kawaguchi, T. (2002). Carbohydrate responsive element-binding protein (ChREBP): a key regulator of glucose metabolism and fat storage. *Biochem. Pharmacol.* *63*, 2075–2080.
- Vecchia, C. La, and Negri, E. (2014). A review of epidemiological data on epilepsy, phenobarbital, and risk of liver cancer. *Eur. J. Cancer Prev.* *23*, 1–7.
- Vegiopoulos, A., and Herzig, S. (2007). Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Mol. Cell. Endocrinol.* *275*, 43–61.
- Veldhuis, J.D., and Bowers, C.Y. (2003). Human GH pulsatility: an ensemble property regulated by age and gender. *J. Endocrinol. Invest.* *26*, 799–813.
- Velmurugan, G., Ramprasath, T., Swaminathan, K., Mithieux, G., Rajendhran, J., Dhivakar, M., Parthasarathy, A., Babu, D.D.V., Thumburaj, L.J., Freddy, A.J., et al. (2017). Gut microbial degradation of organophosphate insecticides induces glucose intolerance via gluconeogenesis. *Genome Biol.* *18*, 8.
- Verhulst, S.L., Nelen, V., Hond, E. Den, Koppen, G., Beunckens, C., Vael, C., Schoeters, G., and Desager, K. (2009). Intrauterine exposure to environmental pollutants and body mass index during the first 3 years of life. *Environ. Health Perspect.* *117*, 122–126.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Vermeire, T., Stevenson, H., Peiters, M.N., Rennen, M., Slob, W., and Hakkert, B.C. (1999). Assessment factors for human health risk assessment: a discussion paper. *Crit. Rev. Toxicol.* *29*, 439–490.
- Vernay, M., Salanave, B., de Peretti, C., Druet, C., Malon, A., Deschamps, V., Herberg, S., and Castetbon, K. (2013). Metabolic syndrome and socioeconomic status in France: The French Nutrition and Health Survey (ENNS, 2006–2007). *Int. J. Public Health* *58*, 855–864.
- Verrotti, A., Agostinelli, S., Parisi, P., Chiarelli, F., and Coppola, G. (2011). Nonalcoholic fatty liver disease in adolescents receiving valproic acid. *Epilepsy Behav.* *20*, 382–385.
- VINCENT, J.H., and MARK, D. (1987). Comparison of Criteria for Defining Inspirable Aerosol and the Development of Appropriate Samplers. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* *48*, 454–457.
- Visser, T.J., Kaptein, E., Glatt, H., Bartsch, I., Hagen, M., and Coughtrie, M.W. (1998). Characterization of thyroid hormone sulfotransferases. *Chem. Biol. Interact.* *109*, 279–291.
- Volynets, V., Küper, M.A., Strahl, S., Maier, I.B., Spruss, A., Wagnerberger, S., Königsrainer, A., Bischoff, S.C., and 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.
- Volzke, H., Schwarz, S., Baumeister, S.E., Wallaschofski, H., Schwahn, C., Jorgen Grabe, H., Kohlmann, T., John, U., and Doren, M. (2007). Menopausal status and hepatic steatosis in a general female population. *Gut* *56*, 594–595.
- Vosough-Ghanbari, S., Sayyar, P., Pournourmohammadi, S., Aliahmadi, A., Ostad, S.N., and Abdollahi, M. (2007). Stimulation of insulin and glucagon synthesis in rat Langerhans islets by malathion in vitro: Evidence for mitochondrial interaction and involvement of subcellular non-cholinergic mechanisms. *Pestic. Biochem. Physiol.* *89*, 130–136.
- Wada, T., Gao, J., and Xie, W. (2009). PXR and CAR in energy metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* *20*, 273–279.
- Wahlang, B., Falkner, K.C., Gregory, B., Ansert, D., Young, D., Conklin, D.J., Bhatnagar, A., McClain, C.J., and Cave, M. (2013). Polychlorinated biphenyl 153 is a diet-dependent obesogen that worsens nonalcoholic fatty liver disease in male C57BL6/J mice. *J. Nutr. Biochem.* *24*, 1587–1595.
- Wang, H., Faucette, S., Moore, R., Sueyoshi, T., Negishi, M., and LeCluyse, E. (2004). Human Constitutive Androstane Receptor Mediates Induction of *CYP2B6* Gene Expression by Phenytoin. *J. Biol. Chem.* *279*, 29295–29301.
- Wang, J., Olin, M., Rozell, B., Björkhem, I., Einarsson, C., Eggertsen, G., and Gåfvels, M. (2007). Differential hepatocellular zonation pattern of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (*Cyp7a1*) and sterol 12 $\alpha$ -hydroxylase (*Cyp8b1*) in the mouse. *Histochem. Cell Biol.* *127*, 253–261.
- Wang, J., Zhu, Y., Cai, X., Yu, J., Yang, X., and Cheng, J. (2011). Abnormal glucose regulation in pyrethroid pesticide factory workers. *Chemosphere* *82*, 1080–1082.
- Wang, P., Wang, H.-P., Xu, M.-Y., Liang, Y.-J., Sun, Y.-J., Yang, L., Li, L., Li, W., and Wu, Y.-J. (2014). Combined subchronic toxicity of dichlorvos with malathion or pirimicarb in mice liver and serum: A metabonomic study. *Food Chem. Toxicol.* *70*, 222–230.
- Wang, S., Shi, N., Ji, Z., and Pinna, G. (2002). [Effects of pyrethroids on the concentrations of thyroid hormones in the rat serum and brain]. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi* *20*, 173–176.
- Wang, T.J., Ngo, D., Psychogios, N., Dejam, A., Larson, M.G., Vasan, R.S., Ghorbani, A., O’Sullivan, J., Cheng, S., Rhee, E.P., et al. (2013). 2-Amino adipic acid is a biomarker for diabetes risk. *J. Clin. Invest.* *123*, 4309–4317.
- Wang, Y., Botolin, D., Xu, J., Christian, B., Mitchell, E., Jayaprakasam, B., Nair, M., Peters, J.M., Busik, J., Olson, L.K., et al. (2006). Regulation of hepatic fatty acid elongase and desaturase expression in diabetes and obesity. *J. Lipid Res.* *47*, 2028–2041.
- Wang, Y., Viscarra, J., Kim, S.-J., and Sul, H.S. (2015). Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *16*, 678–689.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Weghorst, C.M., and Klaunig, J.E. (1989). Phenobarbital promotion in diethylnitrosamine-initiated infant B6C3F1 mice: influence of gender. *Carcinogenesis* *10*, 609–612.
- Wei, P., Zhang, J., Dowhan, D.H., Han, Y., and Moore, D.D. (2002a). Specific and overlapping functions of the nuclear hormone receptors CAR and PXR in xenobiotic response. *Pharmacogenomics J.* *2*, 117–126.
- Wei, P., Zhang, J., Dowhan, D.H., Han, Y., and Moore, D.D. (2002b). Specific and overlapping functions of the nuclear hormone receptors CAR and PXR in xenobiotic response. *Pharmacogenomics J.* *2*, 117–126.
- Wieneke, N., Hirsch-Ernst, K.I., Kuna, M., Kersten, S., and Püschel, G.P. (2007). PPAR $\alpha$ -dependent induction of the energy homeostasis-regulating nuclear receptor NR1i3 (CAR) in rat hepatocytes: Potential role in starvation adaptation. *FEBS Lett.* *581*, 5617–5626.
- Williams, C.D., Stengel, J., Asike, M.I., Torres, D.M., Shaw, J., Contreras, M., Landt, C.L., and Harrison, S.A. (2011). Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis Among a Largely Middle-Aged Population Utilizing Ultrasound and Liver Biopsy: A Prospective Study. *Gastroenterology* *140*, 124–131.
- Willson, T.M., and Kliewer, S.A. (2002). PXR, CAR AND DRUG METABOLISM. *Nat. Rev. Drug Discov.* *1*, 259–266.
- Wilson, J.D. (1992). Presentation of the Southern Society for Clinical Investigation Founder's Medal to Dr. Daniel W. Foster. *Am. J. Med. Sci.* *304*, 1–2.
- Wilson, V.S., McLachlan, J.B., Falls, J.G., and LeBlanc, G.A. (1999). Alteration in sexually dimorphic testosterone biotransformation profiles as a biomarker of chemically induced androgen disruption in mice. *Environ. Health Perspect.* *107*, 377–384.
- Wiwi, C.A., Gupte, M., and Waxman, D.J. (2004). Sexually dimorphic P450 gene expression in liver-specific hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ -deficient mice. *Mol. Endocrinol.* *18*, 1975–1987.
- Wohlfahrt-Veje, C., Main, K.M., Schmidt, I.M., Boas, M., Jensen, T.K., Grandjean, P., Skakkebaek, N.E., and Andersen, H.R. (2011). Lower birth weight and increased body fat at school age in children prenatally exposed to modern pesticides: a prospective study. *Environ. Heal.* *10*, 79.
- Wortham, M., Czerwinski, M., He, L., Parkinson, A., and Wan, Y.-J.Y. (2007). Expression of constitutive androstane receptor, hepatic nuclear factor 4  $\alpha$ , and P450 oxidoreductase genes determines interindividual variability in basal expression and activity of a broad scope of xenobiotic metabolism genes in the human liver. *Drug Metab. Dispos.* *35*, 1700–1710.
- Wright, M.C. (2006). The impact of pregnane X receptor activation on liver fibrosis. *Biochem. Soc. Trans.* *34*, 1119–1123.
- Wright, E., Vincent, J., and Fernandez, E.J. (2007). Thermodynamic characterization of the interaction between CAR-RXR and SRC-1 peptide by isothermal titration calorimetry. *Biochemistry* *46*, 862–870.
- Wyde, M.E., Bartolucci, E., Ueda, A., Zhang, H., Yan, B., Negishi, M., and You, L. (2003). The environmental pollutant 1,1-dichloro-2,2-bis (p-chlorophenyl)ethylene induces rat hepatic cytochrome P450 2B and 3A expression through the constitutive androstane receptor and pregnane X receptor. *Mol. Pharmacol.* *64*, 474–481.
- Wyde, M.E., Kirwan, S.E., Zhang, F., Laughter, A., Hoffman, H.B., Bartolucci-Page, E., Gaido, K.W., Yan, B., and You, L. (2005). Di-n-butyl phthalate activates constitutive androstane receptor and pregnane X receptor and enhances the expression of steroid-metabolizing enzymes in the liver of rat fetuses. *Toxicol. Sci.* *86*, 281–290.
- Xiao, L., Xie, X., and Zhai, Y. (2010). Functional crosstalk of CAR-LXR and ROR-LXR in drug metabolism and lipid metabolism. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *62*, 1316–1321.
- Xiao, X., Kim, Y., Kim, D., Yoon, K.S., Clark, J.M., and Park, Y. (2017). Permethrin alters glucose metabolism in conjunction with high fat diet by potentiating insulin resistance and decreases voluntary activities in female C57BL/6J mice. *Food Chem. Toxicol.* *108*, 161–170.
- Xie, Y.-B., Nedumaran, B., and Choi, H.-S. (2009). Molecular characterization of SMILE as a novel corepressor of nuclear receptors. *Nucleic Acids Res.* *37*, 4100–4115.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Xu, C., Li, C.Y.-T., and Kong, A.-N.T. (2005). Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch. Pharm. Res.* *28*, 249–268.
- Yamamoto, Y., Moore, R., Hess, H.A., Guo, G.L., Gonzalez, F.J., Korach, K.S., Maronpot, R.R., and Negishi, M. (2006). Estrogen receptor alpha mediates 17alpha-ethynylestradiol causing hepatotoxicity. *J. Biol. Chem.* *281*, 16625–16631.
- Yamashita, H., Takenoshita, M., Sakurai, M., Bruick, R.K., Henzel, W.J., Shillinglaw, W., Arnot, D., and Uyeda, K. (2001). A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *98*, 9116–9121.
- Yamazaki, H., and Shimada, T. (1997). Progesterone and Testosterone Hydroxylation by Cytochromes P450 2C19, 2C9, and 3A4 in Human Liver Microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* *346*, 161–169.
- Yang, H., Garzel, B., Heyward, S., Moeller, T., Shapiro, P., and Wang, H. (2014). Metformin represses drug-induced expression of CYP2B6 by modulating the constitutive androstane receptor signaling. *Mol. Pharmacol.* *85*, 249–260.
- Yang, X., Downes, M., Yu, R.T., Bookout, A.L., He, W., Straume, M., Mangelsdorf, D.J., and Evans, R.M. (2006). Nuclear Receptor Expression Links the Circadian Clock to Metabolism. *Cell* *126*, 801–810.
- Yecies, J.L., Zhang, H.H., Menon, S., Liu, S., Yecies, D., Lipovsky, A.I., Gorgun, C., Kwiatkowski, D.J., Hotamisligil, G.S., Lee, C.-H., et al. (2011). Akt Stimulates Hepatic SREBP1c and Lipogenesis through Parallel mTORC1-Dependent and Independent Pathways. *Cell Metab.* *14*, 21–32.
- Yellaturu, C.R., Deng, X., Cagen, L.M., Wilcox, H.G., Mansbach, C.M., Siddiqi, S.A., Park, E.A., Raghov, R., and Elam, M.B. (2009). Insulin Enhances Post-translational Processing of Nascent SREBP-1c by Promoting Its Phosphorylation and Association with COPII Vesicles. *J. Biol. Chem.* *284*, 7518–7532.
- Yokomori, N., Nishio, K., Aida, K., and Negishi, M. (1997). Transcriptional regulation by HNF-4 of the steroid 15alpha-hydroxylase P450 (Cyp2a-4) gene in mouse liver. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *62*, 307–314.
- Yoshinari, K., Kobayashi, K., Moore, R., Kawamoto, T., and Negishi, M. (2003). Identification of the nuclear receptor CAR:HSP90 complex in mouse liver and recruitment of protein phosphatase 2A in response to phenobarbital. *FEBS Lett.* *548*, 17–20.
- Yu, A.-M., Fukamachi, K., Krausz, K.W., Cheung, C., and Gonzalez, F.J. (2005). Potential role for human cytochrome P450 3A4 in estradiol homeostasis. *Endocrinology* *146*, 2911–2919.
- Zhai, Y., Wada, T., Zhang, B., Khadem, S., Ren, S., Kuruba, R., Li, S., and Xie, W. (2010). A functional cross-talk between liver X receptor- $\alpha$  and constitutive androstane receptor links lipogenesis and xenobiotic responses. *Mol. Pharmacol.* *78*, 666–674.
- Zhang, D., Liu, Z.-X., Choi, C.S., Tian, L., Kibbey, R., Dong, J., Cline, G.W., Wood, P.A., and Shulman, G.I. (2007). Mitochondrial dysfunction due to long-chain Acyl-CoA dehydrogenase deficiency causes hepatic steatosis and hepatic insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 17075–17080.
- Zhang, J., Huang, W., Chua, S.S., Wei, P., and Moore, D.D. (2002). Modulation of acetaminophen-induced hepatotoxicity by the xenobiotic receptor CAR. *Science* *298*, 422–424.
- Zhang, J., Huang, W., Qatanani, M., Evans, R.M., and Moore, D.D. (2004a). The Constitutive Androstane Receptor and Pregnane X Receptor Function Coordinately to Prevent Bile Acid-induced Hepatotoxicity. *J. Biol. Chem.* *279*, 49517–49522.
- Zhang, J., Huang, W., Qatanani, M., Evans, R.M., and Moore, D.D. (2004b). The constitutive androstane receptor and pregnane X receptor function coordinately to prevent bile acid-induced hepatotoxicity. *J. Biol. Chem.* *279*, 49517–49522.
- Zhang, J., Zhang, J., Liu, R., Gan, J., Liu, J., and Liu, W. (2016). Endocrine-Disrupting Effects of Pesticides through Interference with Human Glucocorticoid Receptor. *Environ. Sci. Technol.* *50*, 435–443.
- Zhang, X.-J., Shi, Z., Lyv, J.-X., He, X., Englert, N.A., and Zhang, S.-Y. (2015). Pyrene is a Novel Constitutive Androstane Receptor (CAR) Activator and Causes Hepatotoxicity by CAR. *Toxicol. Sci.* *147*, 436–445.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Zhou, J., Zhai, Y., Mu, Y., Gong, H., Uppal, H., Toma, D., Ren, S., Evans, R.M., and Xie, W. (2006). A Novel Pregnane X Receptor-mediated and Sterol Regulatory Element-binding Protein-independent Lipogenic Pathway. *J. Biol. Chem.* *281*, 15013–15020.

Zhu, L., Baker, S.S., Gill, C., Liu, W., Alkhouri, R., Baker, R.D., and Gill, S.R. (2013). Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: A connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology* *57*, 601–609.

Zwicker, B.L., and Agellon, L.B. (2013). Transport and biological activities of bile acids. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *45*, 1389–1398.

NURSA - Nuclear Receptor Signaling Atlas.

Base de données - Eurostat.