

# THÈSE

PRÉSENTÉE A

**L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Par **Nafia OUADAH-BOUSSOUF**

Née le 27 juin 1985

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : Biologie cellulaire et physiopathologie

**Analyse *in vivo* de la dynamique du tissu adipeux blanc après exposition à des polluants chimiques ou à des molécules pharmacologiques chez le poisson zèbre**

**(*In vivo* analysis of white adipose tissue dynamics after exposure to chemical pollutants and drugs in zebrafish)**

Soutenue le : 20 décembre 2012

Devant la commission d'examen formée de :

M. ATGIE Claude	Professeur, Université Bordeaux 1	Examineur
Mme NAVARRO Isabel	Professeur, Université de Barcelone (Espagne)	Rapporteur
M. RALDUA Demetrio	Chargé de Recherche, CSIC (Espagne)	Rapporteur
M. BABIN Patrick J	Professeur, Université Bordeaux 1	Directeur de thèse

*J'ai connu un temps où la principale pollution venait de ce que les gens  
secouaient leur tapis par la fenêtre.*

*I knew a time when the main pollution came that had people shaking their  
carpet by the window.*

*Gilbert Cesbron*

## REMERCIEMENTS/THANKS

*Je dédie spécialement ce travail à mon frère Mohamed et je le remercie pour tout ce qu'il a fait pour moi... grâce à lui je suis devenu ce que je suis, il m'a pris la main et m'a aidé à atteindre le chemin de la réussite...*

*I especially dedicate this work to my brother Mohamed and I thank him for everything he has done for me ... thanks to him I became what I am, he took my hand and helped me to reach the path to success...*

*Après trois années de travail, il est difficile de trouver les mots justes pour remercier tous ceux qui m'ont aidés et m'ont apportés leur soutien, mais je vais essayer...*

*Je tiens tout d'abord à remercier le professeur Patrick BABIN, Directeur de cette thèse, pour m'avoir accueillie, il y a maintenant quatre ans au sein du Laboratoire Maladies Rares : Génétique et Métabolisme (MRGM) (anciennement GPP) à l'Université Bordeaux I. Merci Monsieur Babin de m'avoir toujours accordée votre confiance dans le travail. Merci de m'avoir accompagnée au cours de ces années et d'avoir toujours été disponible pour moi, pour quoi que ce soit. Merci pour votre soutien, vos encouragements et surtout votre enthousiasme, votre optimisme. Votre regard critique m'a permis d'avancer dans ma réflexion. J'ai beaucoup de chance de vous avoir eu comme Directeur de thèse.*

*Je remercie le Professeur Claude ATGIE d'avoir accepté la charge de président du jury de cette thèse.*

*J'adresse également tous mes remerciements à Mme le Professeur Isabel NAVARRO et le Dr Demetrio RALDÚA, d'avoir accepté et consacré du temps à l'examen de mon travail et de le juger.*

*Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à l'ensemble des membres de l'équipe MRGM. Notamment, Sylvia BRANCHU, Anja KNOLL-GELLIDA, Angela TINGAUD-SEQUEIRA, Guilaine MATHIEU et sans oublier Michèle ANDRE qui est partie à la retraite.*

*Merci Sylvia pour ta sympathie et ta gentillesse, la relation avec toi était plus personnelle que professionnelle. Je ne garderai que de bons souvenirs de toi. Anja, merci pour vos encouragements, votre soutien et votre sympathie toute au long de ces années. Grâce au stage du master que j'ai passé avec vous, j'ai appris beaucoup de chose et j'ai confirmé mon envie de faire une thèse et continuer dans la recherche. Merci Angèle pour ton aide précieuse et inconditionnelle au début de ma thèse, pour ta présence, tes encouragements, tes judicieux conseils ainsi que pour tous les échanges qui m'ont beaucoup apportés. Sans oublier bien sur les poses café et tisane ainsi que l'animalerie qui était notre refuge en hiver. Et la petite dernière de l'équipe, Guilaine, c'est vrai que je n'ai passé que ma dernière année avec toi, mais je peux dire que j'ai eu un lien d'amitié avec toi, merci pour l'achat des sandwiches, pour les longues discussions, pour ton humour et ta gentillesse, nous avons partagé de très beaux moments ensemble.*

*J'associe à mes remerciements, Michel CORNET pour sa sympathie quotidienne. Ainsi que mes deux meilleures amies de Bordeaux Zoubida et Houda, pour leur soutien, leur présence à tout moment, pour les longues promenades dans les vieilles rues de Bordeaux...*

*Je dédie ce travail à mes chers parents qui m'ont poussé vers la réussite, qui ont toujours été là pour me soutenir et qui m'ont donnée un magnifique modèle de labeur et de persévérance.*

*Un grand merci à mon père; étant petite je ne connaissais pas la valeur de ce qu'il nous disait, pour moi c'était de la philosophie, mais plus j'avance dans la vie, plus je m'aperçois que j'ai des bases solides qui peuvent affronter toutes les difficultés grâce aux valeurs qu'il m'a transmises. Pour ma mère, je n'ai pas de mots assez forts pour exprimer ce que je ressens et pour lui présenter ma reconnaissance, elle a toujours cru en moi, elle m'a toujours poussée à faire le meilleur et elle a même oublié sa vie afin de la consacrer à ses enfants, Merci "Lommima".*

*Je remercie mes frères Faiz-nabil, Ahmed, Mohamed et Rochdi pour leur affection, leurs encouragements, leur soutien permanent et leur confiance tout au long de mon parcours scolaire et universitaire, vous avez tant fait... et vous êtes toujours là pour votre « petite » sœur.... J'associe à ces remerciements mes deux belles sœurs Lila et Asma ainsi que leurs enfants, Younes, Khadija et Nayla qui sont une véritable source de bonheur pour nous.*

*"Je peux dire que ma thèse est le fruit des efforts et le rêve de toute une famille"*

*Anis, cela fait un bon moment que tu m'encourages et supportes mon attachement à mes études, et ce n'est pas fini !!!! Merci pour ta compréhension, ta patience malgré la distance, ta confiance en moi, ton soutien de tous les jours depuis que je t'ai rencontré. Merci d'avoir épongé mes humeurs négatives (c'était rare quand même !) et pour tout le reste... Je ne peux évidemment pas oublier de remercier ta famille pour leur formidable accueil, surtout tes nièces.*

*Enfin, merci à tous ceux qui ont contribué au bon déroulement de cette thèse de près ou de loin, et à tous ceux que j'ai oublié de citer dans ma liste de remerciements.*

*Je ne peux pas finir mes remerciements sans penser à mes poissons, sans leur collaboration cette thèse n'aurait pas pu avoir lieu, et pardon pour les plus de 3 000 larves qui ont été sacrifiées.....*

*After three years of work, it is difficult to find the right words to thank all those who helped me and made me their support, but I'll try...*

*I would like to thank Professor Patrick BABIN, Director of this PhD thesis, for hosting me, there are now four years in the Laboratory Rare Diseases: Genetic and Metabolism (MGRM) formerly GPP at the University Bordeaux 1. Mr. Babin I thank you for giving me your confidence. Thank you for accompanying me during these years and have always been available to me for anything. Thank you for your support, encouragement and especially your enthusiasm, your optimism. Your critical eyes helped me advance in my thinking. I am very lucky to have you as Supervisor.*

*I thank Professor Claude ATGIE having accepted the office of President of the jury of this thesis.*

*I also address my thanks to Dr. Isabel NAVARRO and Dr. Demetrio RALDÙA, agreeing and devoted time to review my work and judge.*

*I wish to express my sincere thanks to all MGRM team members. Particular, Sylvia BRANCHU, Anja KNOLL-GELLIDA, Angela TINGAUD-SEQUEIRA, Guilaine MATHIEU and do not forget Michèle ANDRE who is party to retire.*

*Sylvia thank you for your sympathy and kindness, the relationship with you was more personal than professional. I keep good memories of you. Anja, thank you for your encouragement, your support and friendship throughout all these years. Through the course of the Master that I spent with you, I have learned many things and I confirmed my desire to continue in a thesis and research. Angela thank you for your valuable assistance and unconditionally at the beginning of my thesis, for your presence, your encouragement, and your sound advice for all exchanges that made me a lot. Not forgetting the tea and coffee breaks as well as the animal facilities that was our refuge in winter. And the youngest of the team, Guilaine, it is true that I have spent my last year with you, but I can say that I had a friendship with you, thank you for purchasing sandwiches, for long discussions, for your humor and kindness, we shared beautiful moments together.*

*I join my thanks Michel CORNET for his sympathy daily. And my two best friends in Bordeaux Zoubida and Houda, for their support, their presence at any time for long walks through the old streets of the city...*

*I dedicate this work to my dear parents who pushed me to success, which have always been there to support me and gave me a beautiful model of hard work and perseverance.*

*A big thank you to my father as a child I did not know the value of what he said, for me it was philosophy, but the more I advance in life, the more I realize that I solid foundation that can face all the difficulties with the values passed to me. For my mother, I have no words strong enough to express what I feel and to present my gratitude, she has always believed in me, she has always pushed to make the best and she even forgot her life to devote to their children, thanks "Lommima."*

*I thank my brothers Nabil-Faiz, Ahmed, Mohamed and Rochdi for their affection, their encouragement, their continued support and confidence throughout my schooling and university, you have so much ... and you are always there for your "little" sister.... I associate my thanks to my two sisters in law Lila and Asma and their children, Younes, Khadija and Nayla which are a source of happiness for us.*

*"I can say that my thesis is the result of the efforts and dreams of an entire family"*

*Anis, it's been a while since you encouraged me endure it and my attachment to my studies and it is not finished!! Thank you for your understanding, your patience despite the distance, your trust in me, your support every day since I met you. Thank you for my sponge negative moods (it was rare anyway!) And everything else ... I obviously can not forget to thank your family for their wonderful hospitality, especially your nieces.*

*Finally, thank you to all those who contributed to the success of this thesis in any way, and all those I forgot to mention in my list of thanks.*

*I can not finish my thanks without thinking to my fishes, without their cooperation, this thesis would not have happened, and forgiveness for at least more than 3 000 larvae were sacrificed.....*

# TABLE DES MATIERES

<b>RESUME</b>	
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	19
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	19
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	19
<b>CHAPITRE I : INTRODUCTION, SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE ET OBJECTIFS</b>	
<b>1. Balance énergétique et obésité</b> .....	19
1.1. Balance énergétique et prévalence de l'obésité .....	19
1.2. Indice de masse corporelle et mesure de l'adiposité .....	22
1.3. Le tissu adipeux blanc .....	25
1.2.1. Les types cellulaires du tissu adipeux blanc.....	25
1.2.2. L'adipocyte blanc .....	26
1.2.3. Activité de sécrétion du tissu adipeux .....	27
1.2.4. Adipogenèse .....	28
1.2.4.1. Le développement et la différenciation adipocytaire .....	28
1.2.4.1.1. La détermination adipocytaire.....	29
1.2.4.1.2. La différenciation adipocytaire.....	29
1.2.4.1.2.1. Le contrôle de la différenciation adipocytaire.....	30
1.2.4.1.2.2. Les facteurs de transcriptions .....	30
1.2.4.1.2.3. Les facteurs hormonaux .....	32
1.2.5. La lipogenèse et la lipolyse .....	32
1.2.5.1. Quelques notions sur les lipides .....	32
1.2.5.1.1. Les lipides apolaires et polaires.....	32
1.2.5.1.2. Les acides gras.....	34
1.2.5.2. La lipogenèse.....	35
1.2.5.2.1. Acides gras d'origine extracellulaire.....	35
1.2.5.2.2. La lipogenèse de novo .....	36
1.2.5.3. La lipolyse .....	36
<b>2. Les récepteurs nucléaires</b> .....	37
2.1. Classification des récepteurs nucléaires .....	39
2.2. Structure des récepteurs nucléaires .....	40
2.3. Mode d'action des récepteurs nucléaires.....	45
2.4. Retinoid X receptors (RXRs) .....	48
2.4.1. Isotypes, conservation phylogénétique et ligands .....	48



2.4.2. L'activation transcriptionnelle des gènes cibles des RXRs.....	50
2.5. Peroxisome proliferator activated receptor (PPARs): .....	53
2.5.1. Le PPAR $\alpha$ .....	54
2.5.2. Le PPAR $\beta/\delta$ .....	55
2.5.3. Le PPAR $\gamma$ .....	56
2.6. Liver X receptors (LXRs).....	57
<b>3. Les perturbateurs endocriniens</b> .....	<b>59</b>
3.1. Classification des perturbateurs endocriniens .....	61
3.2. Mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens .....	63
3.3. Les composés organostanniques .....	65
3.3.1. Le tributylétain .....	65
3.3.1.1. Domaines d'utilisation de TBT .....	66
3.3.1.2. Propriétés physico-chimiques des organoétains .....	67
3.3.1.3. Introduction dans l'environnement aquatique et bioaccumulation.....	68
3.3.1.4. Législation des produits à base de TBT et concentrations observées.....	69
3.3.1.5. Effet TBT sur les organismes .....	73
3.3.1.6. Risques pour l'homme.....	74
3.3.1.7. Le tributylétain est une molécule obésogène.....	77
<b>4. Modèle biologique</b> .....	<b>79</b>
4.1. L'utilisation de poisson zèbre comme modèle d'étude .....	79
4.2. Métabolisme des lipides et ontogénie de la lignée adipocytaire chez le poisson zèbre .....	82
5. Contexte scientifique et objectifs de la thèse .....	83
<b>CHAPITRE II : ZEBRAFISH OBESOGENIC TEST/ A TOOL FOR SCREENING MOLECULES THAT TARGET ADIPOSITY</b> .....	<b>86</b>
<b>CHAPITRE III : THE ENVIRONMENTAL OBESOGEN TRIBUTYL TIN CHLORIDE ACTS THROUGH RXR AND LXR BUT NOT PPAR <math>\gamma/\delta</math> ISOFORMS TO INDUCE ADIPOCYTE HYPERTROPHY IN LIVE ZEBRAFISH</b> .....	<b>95</b>
<b>CHAPITRE IV : DISCUSSION GENERALE, PERSPECTIVES ET CONCLUSION</b> .....	<b>109</b>
1. Originalité du ZO test et application pour l'identification de molécules obésogènes et anti-obésogènes .....	110
1.1. Les Méthodes de mesure de l'adiposité.....	110
1.2. Le ZO test.....	110
2. Etude du mécanisme d'action <i>in vivo</i> du TBT sur le TAB .....	115
3. Perspectives et conclusion.....	119

# TABLE OF CONTENTS

## ABSTRACT

LIST OF ABBREVIATIONS .....	1924
-----------------------------	------

LIST OF FIGURES .....	126
-----------------------	-----

LIST OF TABLES .....	127
----------------------	-----

## CHAPTER I: INTRODUCTION, LITERATURE SUMMARY AND OBJECTIVES

<b>1. Energy balance and obesity</b> .....	129
--	-----

1.1. Energy balance and obesity prevalence.....	129
---	-----

1.2. Body mass index and measures of adiposity .....	132
--	-----

1.3. White adipose tissue.....	134
--------------------------------	-----

1.2.1. Cell types of white adipose tissue .....	134
---	-----

1.2.2. The white adipocyte .....	135
----------------------------------	-----

1.2.3. Secretory activity of adipose tissue .....	136
---	-----

1.2.4. Adipogenesis .....	137
---------------------------	-----

1.2.4.1. The adipocyte development and differentiation .....	137
--	-----

1.2.4.1.1. Adipocyte determination .....	138
--	-----

1.2.4.1.2. Adipocyte differentiation.....	138
---	-----

1.2.4.1.2.1. Control of adipocyte differentiation .....	139
---	-----

1.2.4.1.2.2. The transcription factors.....	139
---	-----

1.2.4.1.2.3. Hormonal factors .....	141
-------------------------------------	-----

1.2.5. Lipogenesis and lipolysis .....	141
--	-----

1.2.5.1. Some notions on lipids .....	141
---------------------------------------	-----

1.2.5.1.1. Apolar and polar lipids.....	141
---	-----

1.2.5.1.2. Fatty acids.....	143
-----------------------------	-----

1.2.5.2. Lipogenesis.....	143
---------------------------	-----

1.2.5.2.1. Fatty acids from extracellular origin .....	143
--	-----

1.2.5.2.2. De novo lipogenesis .....	144
--------------------------------------	-----

1.2.5.3. Lipolysis .....	145
--------------------------	-----

<b>2. Nuclear receptors</b> .....	147
-----------------------------------	-----

2.1. Classification of nuclear receptors .....	148
--	-----

2.2. Structure of nuclear receptors.....	151
--	-----

2.3. Mode of action of nuclear receptors.....	152
---	-----

2.4. Retinoid X receptors (RXRs) .....	155
--	-----

2.4.1. Isotypes, phylogenetic conservation and ligands .....	155
--	-----

2.4.2. The transcriptional activation of RXRs target genes.....	155
---	-----

2.5. Peroxisome proliferator activated receptors (PPARs).....	159
---	-----

2.5.1. The PPAR $\alpha$ .....	161
2.5.2. The PPAR $\beta / \delta$ .....	162
2.5.3. The PPAR $\gamma$ .....	163
2.6. Liver X receptors (LXRs).....	164
<b>3. Endocrine disruptors</b> .....	166
3.1. Classification of endocrine disruptors .....	168
3.2. Mechanisms of action of endocrine disruptors.....	169
3.3. Organotin compounds .....	171
3.3.1. Tributyltin.....	171
3.3.1.1. Areas of use of TBT .....	172
3.3.1.2. Physico-chemical properties of organotins.....	173
3.3.1.3. TBT into the environment and its bioaccumulation.....	175
3.3.1.4. Legislation based products and observed TBT concentrations .....	175
3.3.1.5. TBT effects on organisms .....	178
3.3.1.6. Risks to humans.....	179
3.3.1.7. Tributyltin is an obesogenic molecule.....	183
<b>4. Biological model</b> .....	184
4.1. The use of zebrafish as a model .....	184
4.2. Lipid metabolism and adipocyte lineage ontogeny of zebrafish .....	187
5. Scientific background and objectives of the thesis.....	188
<b>CHAPTER II: ZEBRAFISH OBESOGENIC TEST: A TOOL FOR SCREENING MOLECULES THAT TARGET ADIPOSITY</b> .....	191
<b>CHAPTER III: THE ENVIRONMENTAL OBESOGEN TRIBUTYLTIN CHLORIDE AND ACTS THROUGH RXR AND LXR BUT NOT PPAR<math>\gamma/\delta</math> ISOFORMS TO INDUCE ADIPOCYTE HYPERTROPHY IN LIVE ZEBRAFISH</b> .....	200
<b>CHAPTER IV: GENERAL DISCUSSION, PERSPECTIVES AND CONCLUSION</b> .....	214
1. Originality of ZO test and application for the identification of obesogenic and anti-obesogenic molecules. ....	215
1.1. The measurement methods of adiposity .....	215
1.2. The ZO test.....	216
2. Study of the in vivo mechanism of action of TBT on WAT .....	220
3. Outlook and conclusion.....	224
<b>BIBLIOGRAPHIE / REFERENCES</b> .....	227
<b>LIST OF PUBLICATIONS AND COMMUNICATIONS</b> .....	250
1. Publications in international journals with peer review .....	251
2. Oral communications in international conferences or national or local symposia .....	251
3. Poster communications in international conferences or national or local symposia.....	252



## RESUME

Un régime alimentaire déséquilibré et/ou la présence de composés contaminants exogènes peuvent modifier la signalisation endocrine et l'homéostasie des lipides et induire l'obésité. Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse ont permis, dans un premier temps, de développer une méthode simple et rapide, dénommée "zebrafish obesogenic (ZO) test", pour identifier *in vivo*, par utilisation de la larve de poisson zèbre, des facteurs qui peuvent augmenter ou diminuer la taille de l'adipocyte blanc et ainsi moduler le niveau de l'adiposité (Tingaud-Sequeira, Ouadah, Babin, *J. Lipid Res.* 52, 1765-1772, 2011). Ce test permet d'identifier des composés et des mélanges de molécules obésogènes et anti-obésogènes et fournit des informations pertinentes pour l'évaluation des risques liés à leur présence mais également pour élucider les mécanismes impliqués. Les travaux ont, dans un second temps, permis d'apporter des réponses quant aux modalités d'action d'un obésogène puissant, le chlorure de tributylétain, contaminant retrouvé très largement dans notre environnement. Cette molécule agit sur l'adipocyte blanc à une concentration de l'ordre du nano molaire via les récepteurs nucléaires RXR et LXR, et non pas via les isoformes PPAR $\gamma$ /delta (Ouadah et Babin, manuscrit en préparation).

**Mots clés :** obésité, tissu adipeux blanc, poisson zèbre, polluant environnemental, tributylétain, RXR, LXR, PPAR $\gamma$ , obésogène, anti-obésogène, modèle, ZO test.

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>4-OHT</b>	4-hydroxytamoxifen
<b>8S-HETE</b>	Acide 8-S-hydroxyeicosatétraénoïque
<b>ACC</b>	Acétyl-CoA carboxylase
<b>Acyl-CoA</b>	Acyl-Co enzyme A
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AGLC</b>	Acide gras à longue chaîne
<b>AGPI</b>	Acides gras poly insaturés
<b>AR</b>	Récepteur aux androgènes
<b>ASP</b>	Protéine stimulant l'acylation
<b>BMI</b>	Body mass index
<b>C/EBPs</b>	CCAAT-enhancer binding protein
<b>CSM</b>	Cellules souches mésenchymateuses
<b>DBD</b>	Domaine de liaison à l'ADN
<b>DDT</b>	Dichlorodiphényltrichloroéthane
<b>DES</b>	Diéthylstilbestrol
<b>DHA</b>	Docosahéxanoïque
<b>DJT</b>	Dose journalière tolérable
<b>DRn</b>	Direct Repeat
<b>EGF</b>	Epidermal growth factor
<b>Ern</b>	Everted Repeat
<b>FABP4</b>	Fatty acid-binding protein 4
<b>FAS</b>	Fatty Acid Synthase
<b>FBA</b>	Fluorobexarotene
<b>FXRs</b>	Farnesoid X receptors
<b>GLUT</b>	Transporteur de glucose
<b>GR</b>	Récepteur aux glucocorticoïdes
<b>Hpf</b>	Heures après la fécondation
<b>HRE</b>	Hormone Response Element
<b>HSP</b>	Protéines de choc thermique
<b>IGF-1</b>	Insuline growth Factor 1
<b>IL-6</b>	Interleukine 6
<b>IMC</b>	Indice de masse corporelle
<b>INSEE</b>	Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques
<b>Irn</b>	Indirect Repeat
<b>jpf</b>	Jours après la fécondation
<b>l'AMPc</b>	L'adénosine monophosphate cyclique
<b>LBD</b>	Domaine de liaison au ligand
<b>LDL</b>	Low density lipoproteins, lipoprotéine de basse densité
<b>LPL</b>	Lipoprotéine lipase
<b>LXR</b>	Liver X Receptor
<b>LXRE</b>	Elément de réponse aux LXR
<b>MR</b>	Récepteur aux minéralocorticoïdes
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale pour la Santé

<b>PAI-1</b>	Plasminogene activator inhibitor-1
<b>PE</b>	Perturbateur endocrinien
<b>PI-3K</b>	Phosphoinositide 3-kinase
<b>PL</b>	Phospholipides
<b>PPAR</b>	Peroxisome Proliferator Activated Receptor
<b>PPRE</b>	Peroxisome Proliferator response elements
<b>PR</b>	Récepteur aux progestérone
<b>PVC</b>	Polyvinyle chloride
<b>RAR</b>	Recepteur de l'acide Rétinoïque
<b>RARE</b>	Elément de réponse à RAR
<b>RBP</b>	Retinol binding protein
<b>RN</b>	Récepteur nucléaire
<b>Rosi</b>	Rosiglitazone
<b>RXR</b>	Retinoid X receptors
<b>SCD-1</b>	Stearoyl Coenzyme-A Desaturase 1
<b>SREBP-1c</b>	Sterol regulatory element-binding protein-1c
<b>SVF</b>	Fraction du stroma vasculaire
<b>TAB</b>	Tissu adipeux blanc
<b>TAG</b>	Triacylglycérols
<b>TARL</b>	Taux résiduel moyen acceptable
<b>TBT</b>	Tributylétain
<b>TGF<math>\alpha</math></b>	Transforming growth factor $\alpha$
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumor necrosis factor
<b>TPT</b>	Triphenyltin
<b>TR</b>	Thyroid hormone Receptor
<b>TZD</b>	Thiazolidinediones
<b>UV</b>	Ultraviolets
<b>VDR</b>	Vitamin D Receptor
<b>VEGF</b>	Récepteurs du facteur de croissance endothélial
<b>VLDL</b>	Very Low Density Lipoprotein, lipoprotéine de très basse densité
<b>WHO</b>	World Health Organization

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b>	Balance énergétique et facteurs impliqués dans sa régulation.....	20
<b>Figure 2</b>	Comparaison du pourcentage de surpoids et d'obésité observés en France et aux Etats Unis pour l'année 2010 (source INSEE, septembre 2010) .....	22
<b>Figure 3</b>	Structure du tissu adipeux blanc.....	25
<b>Figure 4</b>	Coupe histologique du TAB périviscéral d'une femelle de poisson zèbre adulte.	26
<b>Figure 5</b>	Schéma d'un adipocyte blanc uniloculaire.....	26
<b>Figure 6</b>	Exemple de quelques protéines secrétées par le tissu adipeux blanc .....	28
<b>Figure 7</b>	Schéma illustrant la cascade d'évènements et les acteurs moléculaires impliqués au cours de la détermination et lors de la différenciation adipocytaire.....	31
<b>Figure 8</b>	Schéma d'un TAG.....	33
<b>Figure 9</b>	Schéma d'un glycérophospholipide .....	34
<b>Figure 10</b>	Différents types d'acides gras non ramifiés .....	34
<b>Figure 11</b>	Le métabolisme des lipides dans l'adipocyte blanc .....	37
<b>Figure 12</b>	Le contrôle de la lipolyse des adipocytes humaines.....	38
<b>Figure 13</b>	Schéma de la signalisation endocrine.....	39
<b>Figure 14</b>	Organisation fonctionnelle des RNs.....	43
<b>Figure 15</b>	Organisation structurelle des RNs.....	43
<b>Figure 16</b>	Mode d'action général des récepteurs nucléaires situés dans le cytoplasme .....	4
<b>Figure 17</b>	Mode d'action général des RNs situés à l'intérieur du noyau ainsi que le mécanisme de la corépression et la coactivation de la transcription.....	47
<b>Figure 18</b>	Analyse phylogénétique de la séquence des isotypes de RXRs entre différentes espèces de vertébrés .....	49
<b>Figure 19</b>	Structure chimique de quelques ligands naturels ou synthétiques des RXRs .....	50
<b>Figure 20</b>	L'activation transcriptionnelle par des hétérodimères non-permissifs, permissifs et permissifs conditionnels .....	51
<b>Figure 21</b>	Mécanisme de transcription des gènes par les PPARs .....	54
<b>Figure 22</b>	Exemples de la structure chimique de quelques ligands des PPAR $\alpha$ , $\beta/\delta$ et $\gamma$ . ....	55
<b>Figure 23</b>	Mode d'action de l'hétérodimère RXR/LXR.....	59
<b>Figure 24</b>	Schéma des interactions entre système endocrine et systèmes reproducteur, neurologique et immunologique permettant d'illustrer la complexité du mode d'action potentiel des xénobiotiques.....	60
<b>Figure 25</b>	Schéma représentant les différents modes d'action des xénobiotiques via les récepteurs nucléaires .....	64
<b>Figure 26</b>	Structures du tributylétain et du chlorure de tributylétain.....	66



<b>Figure 27</b>	Schéma représentant la distribution de l'utilisation des produits à base d'organoétains .....	67
<b>Figure 28</b>	Estimation de l'évolution historique des concentrations de TBT dans les eaux ouvertes du Bassin d'Arcachon (France).....	69
<b>Figure 29</b>	La distribution et les sources des organoétains dans le milieu aquatique .....	72
<b>Figure 30</b>	Anomalies de calcification de la valve supérieure des huîtres (A et B) comparées à l'aspect normal des huîtres témoins (C).....	73
<b>Figure 31</b>	Les sources d'exposition humaine aux composés organostanniques.....	75
<b>Figure 32</b>	Photos représentatives d'un individu femelle ou mâle de poisson zèbre ( <i>Danio rerio</i> ).....	79
<b>Figure 33</b>	Les phases nutritionnelles au cours du développement du poisson zèbre.....	80
<b>Figure 34</b>	Schéma montrant quelques essais pharmacologiques possibles en utilisant le poisson zèbre comme modèle.....	82
<b>Figure 35</b>	Visualisation <i>in vivo</i> du signal de fluorescence des gouttelettes lipidiques des adipocytes après coloration au rouge de Nil de la larve vivante de poisson zèbre .....	112
<b>Figure 36</b>	Visualisation du TAB périviscéral de larves de poisson zèbre après coloration au rouge de Nil et observation au microscope à fluorescence .....	113
<b>Figure 37</b>	Effet de la nature du régime alimentaire sur le pourcentage de perte en adiposité après la mise à jeun des larves de poisson zèbre .....	114
<b>Figure 38</b>	Le ZO test permet de tester la voie de signalisation du récepteur de type $\beta 1$ -adrénergique .....	120

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b>	Les principales formules utilisées pour calculer le poids corporel idéal.....	23
<b>Tableau 2</b>	Les valeurs seuils de l'IMC retenues par l'OMS .....	24
<b>Tableau 3</b>	Nomenclature et classification des récepteurs nucléaires humains selon leur homologie de structure .....	41
<b>Tableau 4</b>	Pourcentage d'acides aminés identiques entre les protéines homologues codées par <i>LXR<math>\alpha</math></i> entre différentes espèces de vertébrés .....	57
<b>Tableau 5</b>	Les classes principales de perturbateurs endocriniens .....	62
<b>Tableau 6</b>	Quelques données bibliographiques concernant les teneurs en TBT dans les eaux marines, les sédiments, mais également dans certains tissus biologiques, en différents points du monde .....	71

***CHAPITRE I***

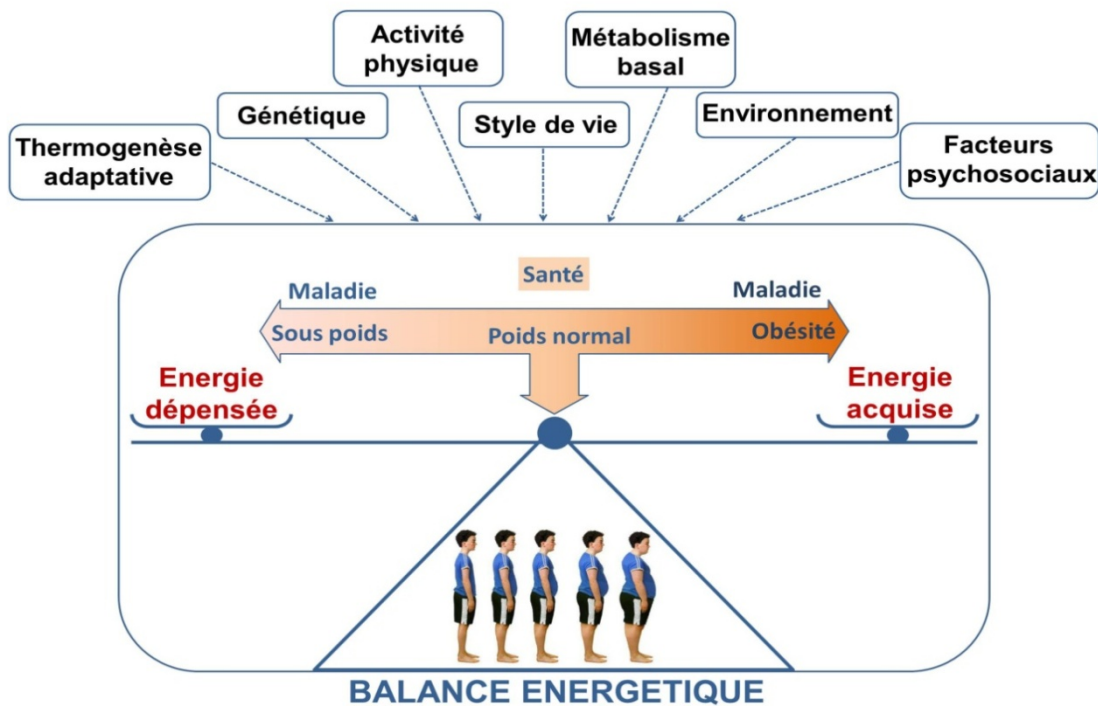
***INTRODUCTION, SYNTHÈSE  
BIBLIOGRAPHIQUE ET  
OBJECTIFS***

# 1. Balance énergétique et obésité

## 1.1. Balance énergétique et prévalence de l'obésité

La balance énergétique d'un individu est un état d'équilibre entre un apport d'énergie sous forme d'aliments et la dépense énergétique liée au maintien structural et au fonctionnement énergétique de l'organisme (Figure 1). Depuis quelques années, cette balance énergétique a tendance à être déséquilibrée, en particulier dans les pays occidentaux. Ceci est lié à une surabondance alimentaire et à l'ingestion d'aliments riches en matière grasse et sucrés mais pauvre en vitamines, en sels minéraux et autres micronutriments (Leaf et Weber, 1987). Cette augmentation de l'apport calorique est associée à une diminution de la dépense énergétique liée à la sédentarité. D'un point de vue génétique, la lignée des primates a évolué au cours des derniers millions d'années dans le contexte d'une alimentation peu abondante. Les processus biologiques et physiologiques mis en place ont abouti à l'existence d'une capacité de digestion des aliments, d'assimilation et de stockage des nutriments largement surdimensionnée afin de pouvoir assumer une alternance de périodes d'abondance et de disette alimentaire. Notre espèce vit aujourd'hui dans un environnement nutritionnel et comportemental différent alors que son patrimoine génétique dicte des processus physiologiques adaptés au captage et au stockage de l'énergie, en particulier sous forme de lipides neutres (graisses).

Les lipides de l'alimentation sont indispensables au développement et à la croissance des animaux. Dès 1929, les chercheurs George et Mildred Burr ont montré l'importance qu'une quantité minimale de lipides dans les aliments pour permettre la survie dès le plus jeune âge et la croissance du rat (Burr et Burr, 1929). A contrario, une alimentation trop riche en matières grasses, se traduit également par l'apparition d'un état pathologique lié à un surpoids et à l'obésité. A l'état normal, la masse graisseuse représente environ 20 à 25% du poids corporel chez la femme et de 10 à 15% chez l'homme (Dardour, 2012). Cette différence est à mettre en relation avec une masse musculaire moyenne plus importante chez les individus de sexe masculin.



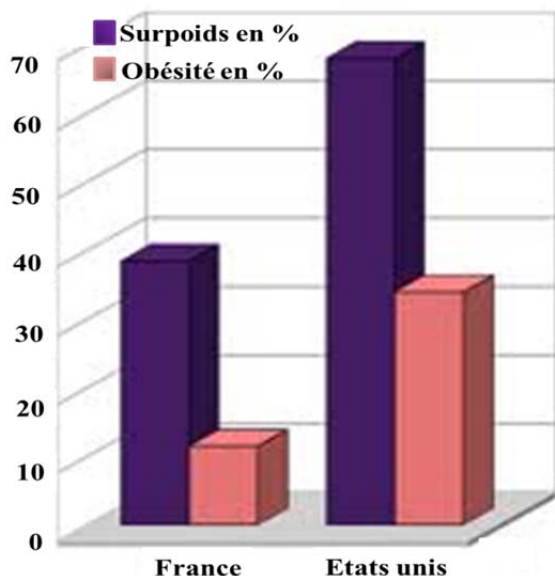
**Figure 1.** Balance énergétique et facteurs impliqués dans sa régulation.

Une perturbation de la balance énergétique peut entraîner une diminution de l'adiposité corporelle, c'est à dire la quantité de tissu adipeux blanc (TAB). Si cette perturbation va dans le sens de l'énergie dépensée, l'individu se trouve dans un état de perte de poids. A l'inverse, si le déséquilibre va dans le sens du dépôt de l'énergie acquise, cela provoque un surpoids des individus, voir une obésité (Figure 1). La perte de poids peut être dûe à une adipolyse qui est une réduction de la quantité de TAB et/ou une diminution de la masse musculaire de l'organisme. La réduction de la masse adipeuse, peut être la conséquence d'une hypotrophie, c'est-à-dire une diminution du volume des cellules adipeuses, ou par une hypoplasie, c'est-à-dire une diminution du nombre de cellules adipeuses. Cette perte de poids, par rapport à une valeur pondérale considérée comme idéale, peut être définie par une valeur limite inférieure de l'indice de masse corporelle (IMC) (voir ci-dessous). A contrario, le surpoids et sa situation extrême, l'obésité, correspondent à une accumulation excessive de graisse corporelle (De Saint Pol, 2007; Organisation Mondiale pour la Santé (OMS), 2012). L'étiologie d'une telle situation est difficile à définir du fait des interrelations complexes entre facteurs génétiques et environnementaux (Han *et al.*, 2011). L'accumulation des graisses peut se réaliser par une hypertrophie du TAB, c'est à dire une augmentation de la taille des cellules adipeuse ou plus précisément de la taille du/des gouttelettes lipidiques contenue dans les adipocytes. Cette accumulation peut également être le résultat d'une hyperplasie concomitante ou non de l'hypertrophie et qui correspond à une augmentation du nombre

des cellules adipeuses blanches. Dans les deux situations, le résultat correspond à une augmentation de l'adiposité par stockage de l'énergie en excès sous forme de triacylglycerols (TAG) dans les gouttelettes lipidiques des adipocytes (Ducharme et Bickel, 2008).

Le pourcentage d'individus considérés comme obèses a augmenté d'une manière régulière dans les pays développés et les pays émergents au cours de ces dernières décennies. Plus de 1,5 milliard de personnes dans le monde souffrent d'un surpoids, parmi lesquelles plus de 200 millions d'hommes et près de 300 millions de femmes sont considérés comme obèses (estimation 2008) (OMS, 2012; Nguyen et Lau, 2012). La fréquence du surpoids et de l'obésité a triplé dans beaucoup de pays européens depuis les années 1980. A titre d'exemple, l'Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques (INSEE) (septembre 2010) recense en France, 38,5 % d'individus en surpoids et environ 11,5 % en état d'obésité. Aux États-Unis, les chiffres observés sont impressionnants : plus de 60% de la population est en surpoids et 34% des individus sont obèses (Figure 2). Les personnes qui souffrent d'un surpoids aux États-Unis représentent le double de la moyenne mondiale et 10 fois le taux observé en Corée du Sud ou au Japon.

Les estimations récentes réalisées chez l'enfant indiquent que l'« épidémie » d'obésité observée aujourd'hui est loin d'être maîtrisée et que ce processus sera en voie d'extension au cours des prochaines années. A titre d'exemple, le pourcentage prédit d'adultes américains qui seront en surpoids à l'horizon 2020 est de l'ordre de 86% (Flegal *et al.*, 2010). A niveau mondial, plus de 40 million des enfants de moins de cinq ans sont en surpoids (estimation 2010) (Nguyen et Lau, 2012). Une étude publiée en 2009, menée sur 2 385 adolescents âgés entre 11 et 18 ans dans la région Aquitaine (France), a montré que 13,6% de ces enfants étaient en surpoids voir obèses (11,7% en surpoids et 1,9% obèses) avec une forte proportion observée chez le garçon par rapport aux filles (Thibault *et al.*, 2009). Dans le même contexte, une autre étude menée en 2009-2010 aux États-Unis, a montré que la prévalence de l'obésité pour des enfants et les adolescents entre 2 et 19 ans est de l'ordre de 16,9% (Ogden *et al.*, 2012). Il existe un facteur supplémentaire d'inquiétude. Jusqu'à récemment, le surpoids et l'obésité étaient considérés comme un problème propre aux pays développés, mais les dernières études épidémiologiques réalisées dans certains pays en voie de développement ont montré une augmentation spectaculaire du taux d'obésité des enfants. Près de 8 million d'enfants présentent un surpoids dans les pays à haut revenu et près de 35 million dans les pays à faible ou moyen revenu (OMS, 2012).



**Figure 2.** Comparaison du pourcentage de surpoids et d'obésité observés en France et aux Etats Unis pour l'année 2010 (source INSEE, septembre 2010)

L'OMS reconnaît l'obésité comme un problème de santé public majeur (OMS, 2000). L'obésité est un facteur de risque établi pour plusieurs maladies chroniques (Eckel et Krauss, 1998; Murphy *et al.*, 2000), car elle s'accompagne, en particulier, d'une modification de l'activité des adipocytes blancs. Par exemple, il a été montré que le taux de la lipoprotéine lipase (LPL) augmente avec l'augmentation de la taille des cellules adipeuses (Farnier *et al.*, 2003). De la même manière, les fonctions sécrétoires adipocytaires sont modifiées lors d'une adiposité plus élevée. On peut par exemple observer une augmentation de la sécrétion de la plupart des adipokines, comme la leptine, l'IL-6, le TNF $\alpha$  et une diminution du taux plasmatique d'adiponectine chez les personnes obèses (Boucher *et al.*, 2005). Ces modifications pourraient induire, de façon directe ou indirecte, l'apparition d'autres pathologies associées tels que les maladies cardiovasculaires, le diabète non insulino-dépendant (diabète de type 2), dont la fréquence est trois fois plus élevée chez les sujets obèses, et l'hypertension (Nguyen et Lau, 2012) voir certains cancers, par exemple cancer du côlon chez les hommes et le cancer du sein chez les femmes (Murphy *et al.*, 2000). L'ensemble des pathologies métaboliques associées à l'obésité est regroupé sous le terme de syndrome métabolique.

## 1.2. Indice de masse corporelle et mesure de l'adiposité

La mesure de la corpulence d'un individu et donc de son niveau d'adiposité peut être évaluée par l'utilisation d'estimateurs d'ordre anthropométriques. La première approche consiste à déterminer un surpoids par rapport à un poids idéal en utilisant le rapport entre le

poids de l'individu et sa taille et en encadrant ce rapport en fonction d'autres critères complémentaires comme le sexe ou l'origine ethnique. La seconde approche est purement mathématique et repose sur l'utilisation de formules mathématiques comme indiquées dans le Tableau 1.

**Tableau 1.** Les principales formules utilisées pour calculer le poids corporel idéal (d'après De Saint Pol, 2007).

<b>Formule de Broca:</b>	$PI (kg) = T (cm) - 100$
<b>Formule de Lorentz</b>	$PI \text{ masculin (kg)} = T (cm) - 100 - \frac{T (cm) - 150}{4}$ $PI \text{ féminin (kg)} = T (cm) - 100 - \frac{T (cm) - 150}{2,5}$
<b>Formule de Devine</b>	$PI \text{ masculin (kg)} = 50 (kg) + 2,3 \times [ T (\text{pouces}) - 60 ]$ $PI \text{ féminin (kg)} = 45,5 (kg) + 2,3 \times [ T (\text{pouces}) - 60 ]$
<b>Formule de Perrault</b>	$PI (kg) = T (cm) - 100 + \frac{\hat{A}ge (\text{années})}{10} \times 0,9$
<b>Formule de Creff</b>	$Morphologie normal \quad PI (kg) = T (cm) - 100 + \frac{\hat{A}ge (\text{années})}{10} \times 0,9$ $Morphologie large \quad PI (kg) = T (cm) - 100 + \frac{\hat{A}ge (\text{années})}{10} \times 0,9 \times 1,1$ $Morphologie gracile \quad PI (kg) = T (cm) - 100 + \frac{\hat{A}ge (\text{années})}{10} \times 0,9 \times 0,9$
<b>Formule de Monnerot-Dumaine</b>	$PI (kg) = \frac{T (cm) - 100 + 4 \times \text{Circonférence du poignet (cm)}}{2}$
<b>Formule de Bornhardt</b>	$PI (kg) = \frac{T (cm) \times \text{Tour de poitrine (cm)}}{240}$

PI: Poids Idéal, T: Taille

L'estimateur le plus couramment utilisé pour apprécier le niveau d'adiposité est l'IMC. D'un point de vue clinique, le sous-poids, le surpoids ou l'obésité sont définis par des valeurs limites de l'IMC, qui est une mesure simple du poids corporel par rapport à la taille de l'individu. L'IMC, en anglais « body mass index » (BMI), correspond au rapport du poids du corps sur le carré de la taille, exprimé en kg/m<sup>2</sup> (Keys *et al.*, 1972). Il existe d'autres techniques anthropométriques pour mesurer la corpulence, comme la mesure du tour de la taille ou la circonférence et l'épaisseur des plis cutanés. Cette dernière technique, repose sur le fait que les plis cutanés représentent près de la moitié de la masse grasseuse du corps (De Saint Pol, 2007).

Malgré son intérêt, l'IMC présente des inconvénients, car cet indice ne prend pas en compte la silhouette de l'individu, ni l'historique de la variation du poids corporel de l'individu. Par ailleurs, il ne reflète pas uniquement la masse grasse comme dans le cas des

athlètes qui ont une masse musculaire très importante. Malgré ces limites, certaines études ont montré une forte corrélation entre l'IMC et la masse grasse (Micozzi *et al.*, 1986; Leonhardt *et al.*, 1987). Le Tableau 2 nous montre les valeurs seuils de l'IMC retenues par l'OMS. D'après ces valeurs seuils, nous pouvons distinguer les personnes en sous-poids qui ont un IMC inférieur à 18,5. Les personnes qui ont un IMC entre 18,5 et 24,9 sont considérées dans une situation normale, les pré-obèses ayant un IMC entre 25 et 29,9. A partir de 30 kg/m<sup>2</sup>, trois classes d'obésités ont été définies en fonction de la valeur croissante de l'IMC (Tableau 2).

**Tableau 2.** Les valeurs seuils de l'IMC retenues par l'OMS

Situation de poids	IMC (Kg/m <sup>2</sup> )
Dénutrition	< 18,5
Classe I ou insuffisance pondérale	17,0 - 18,4
Classe II	16,0 - 16,9
Classe III	13,0 - 15,9
Classe IV	10,0 - 12,9
Classe V	< 10,0
<b>Valeurs de référence</b>	<b>18,5 - 24,9</b>
Surpoids	25,0 - 29,9
Obésité	≥ 30
Classe I	30,0 - 34,9
Classe II	35,0 - 39,9
Classe III	≥ 40

Une autre manière pour définir l'obésité est l'utilisation des percentiles. Cette méthode est préconisée surtout pour les enfants. Elle consiste à observer la distribution de l'IMC ou du poids sur l'ensemble de la population, et donc la position du poids d'un individu par rapport à celui d'une population de référence. Quand le poids d'un individu est proche du 50<sup>e</sup> percentile (médiane), cela veut dire qu'il est proche de la moyenne des individus de cette population. Au contraire un poids proche du 10<sup>e</sup> percentile, l'individu est considéré en sous poids. Le seuil de la situation de surpoids est proche du 85<sup>e</sup> percentile de la population, alors que l'obésité se situe au 95<sup>e</sup> percentile (De Saint Pol, 2007).

D'autres méthodes non anthropométriques peuvent être utilisées pour estimer le niveau d'adiposité. L'impédancemétrie bioélectrique permet de calculer la masse adipeuse par une mesure de la conduction électrique des tissus. Une deuxième méthode peut être mise en oeuvre, l'hydrodensitométrie, qui consiste à calculer la masse adipeuse à partir de la densité de l'individu, obtenu en l'émergeant dans l'eau. Une autre approche repose sur une absorption biphotonique aux rayons X<sup>2</sup>, et consiste à balayer le corps avec des rayons X à deux niveaux d'énergie. Un traitement informatique du rapport des atténuations des deux niveaux

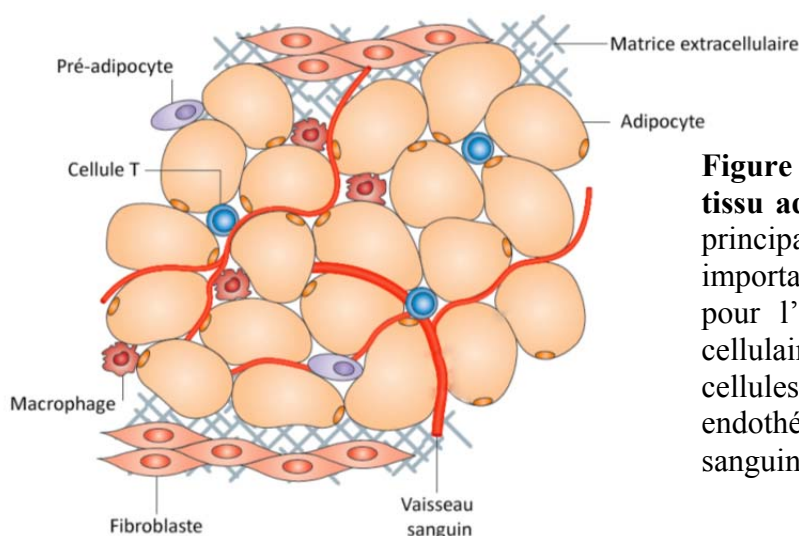


d'énergies permet de distinguer et de mesurer la masse grasseuse de la masse maigre et du contenu minéral et osseux de l'ensemble du corps (De Saint Pol, 2007). La limite de cette méthode est sa mise en œuvre difficile du fait de la taille des appareils pour les personnes à obésité sévère, ainsi que le coût de telles mesures.

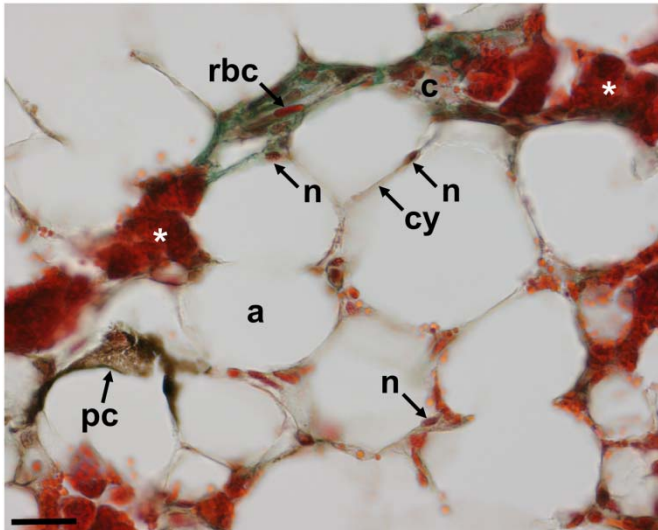
## 1.3. Le tissu adipeux blanc

### 1.3.1. Les types cellulaires du tissu adipeux blanc.

Le TAB est capable de réaliser une expansion massive ou au contraire une diminution drastique de sa taille en fonction du niveau de l'énergie stockée sous forme de gouttelettes lipidiques dans les adipocytes. Cette plasticité remarquable est également illustrée par sa capacité de régénération après intervention chirurgicale. Ce tissu peut varier de 5% du poids corporel chez les athlètes jusqu'à 60% dans le cas d'obésité extrême (Cawthorn *et al.*, 2012). Chez les vertébrés, le TAB est constitué par un certain nombre de types cellulaires caractéristiques (Figure 3). Ce tissu est constitué principalement d'adipocytes. Les types cellulaires classiquement observés chez les mammifères sont présents dans le TAB de poisson zèbre (Figure 4) (Tingaud-Sequeira *et al.*, 2012). Chez certains vertébrés, comme les poissons téléostéens, le TAB périsvical peut être infiltré par des îlots pancréatiques, ce qui n'est pas le cas des autres localisations corporelles du TAB de cet animal (Tingaud-Sequeira *et al.*, 2011).



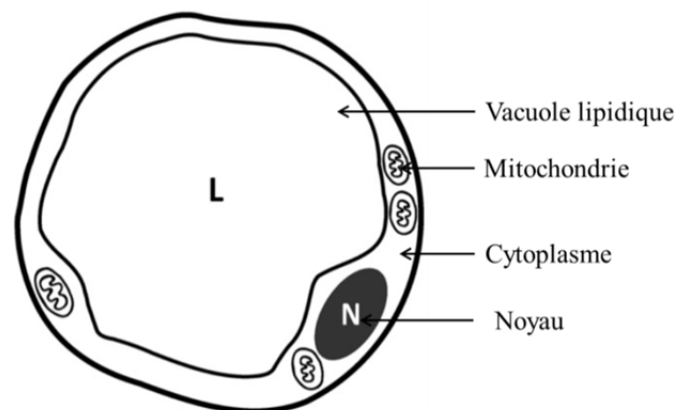
**Figure 3. Structure et types cellulaires du tissu adipeux blanc.** Les adipocytes sont les principaux composants du TAB. Ils sont importants pour le stockage de l'énergie et pour l'activité endocrine. Les autres types cellulaires présents sont les préadipocytes, les cellules immunitaires, les cellules endothéliales, les fibroblastes et les cellules sanguines (d'après Ouchi *et al.*, 2011).



**Figure 4.** Coupe histologique du TAB périsvical d'une femelle de poisson zèbre adulte. Le TAB est principalement constitué d'adipocytes de grande taille uniloculaires (a) liés entre eux par un tissu connectif lâche et fibreux et pénétré par des capillaires sanguins (c). Chaque adipocyte possède une fine bande de cytoplasme périphérique (cy) et un noyau (n). La présence possible d'îlots pancréatiques infiltrés est indiquée par des astérisks blancs. Autres abréviations : pc, cellule pigmentée; rbc, cellule sanguine rouge. Echelle = 40  $\mu\text{m}$  (d'après Tingaud-Sequeira *et al.*, 2012).

### 1.3.2. L'adipocyte blanc.

L'adipocyte blanc différencié est une cellule sphérique uniloculaire présente dans le tissu adipeux (Figure 5). Son cytoplasme est entièrement occupé par une énorme gouttelette lipidique, le noyau de cette cellule étant rejeté en périphérie contre la membrane plasmique. L'adipocyte est spécialisé dans le stockage des acides gras dans la gouttelette lipidique principalement sous forme de triacylgycérols (TAG). Ces molécules représentent environ 85% de la masse du TAB, tandis que l'eau et la matière sèche non lipidique en représentent respectivement 10 et 5%. Ces TAG sont synthétisés par lipogenèse dans le TAB à partir principalement des acides gras issuent de la circulation sanguine. La dynamique de la gouttelette lipidique est réalisée par la présence concomitante d'une activité de lipolyse intra adipocytaire.



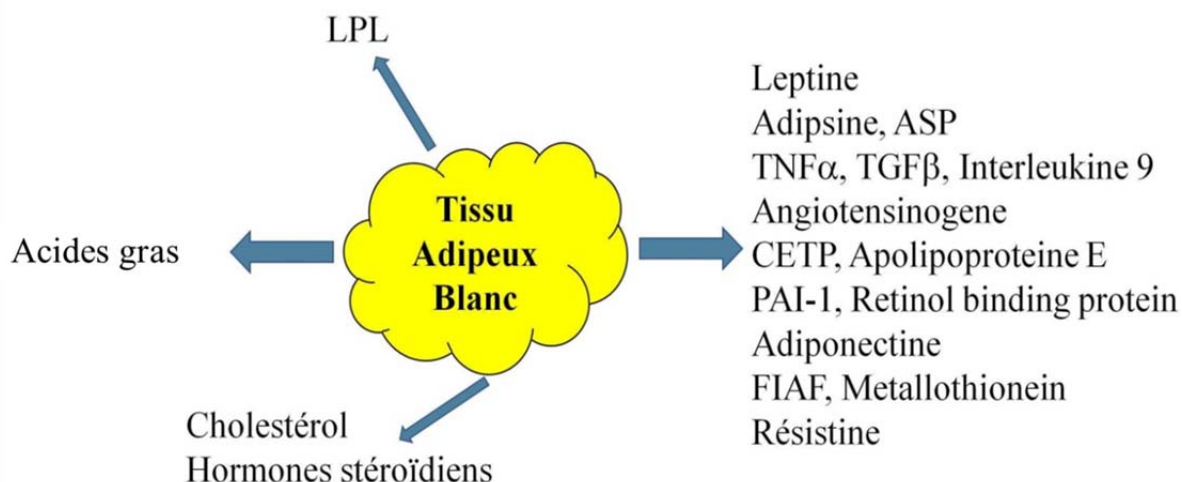
**Figure 5.** Schéma d'un adipocyte blanc uniloculaire (d'après Zhang *et al.*, 2012).

De nombreuses études ont montré une corrélation entre les apports en lipides alimentaires, le degré du stockage des lipides dans le tissu adipeux et la prise de poids (Tchoukalova *et al.*, 2010). Le renouvellement des acides gras dans le tissu adipeux est très lent, par exemple chez un adulte de poids normal et stable, le temps de renouvellement des lipides est d'environ 600 jours, alors que la durée de vie d'une adipocyte est d'environ 10 ans (Arner *et al.*, 2011). Récemment, il a été montré l'existence d'un tissu adipeux beige en plus des tissus adipeux blanc et brun chez les rongeurs et les humains (Wu *et al.*, 2012). Le tissu adipeux brun est spécialisé dans la beta-oxydation des acides gras dans un but de thermogénèse. Les cellules adipeuses « beiges » présentes dans le TAB sont UCP1-positives, et proviennent d'une lignée non myf-5, contrairement au tissu adipeux brun (Wu *et al.*, 2012).

### **1.3.3. Activité de sécrétion du tissu adipeux.**

Le TAB joue un rôle éminent dans l'homéostasie lipidique du fait de sa capacité de stockage et de libération des acides gras d'origine endogène ou alimentaire. Au cours des vingt dernières années, le TAB s'est avéré comme un site majeur pour la synthèse de molécules à rôle biologique important, en particulier dans le contrôle de la balance énergétique. Par exemple, les adipocytes matures synthétisent et libèrent dans la circulation sanguine de la leptine. Cette hormone joue un rôle critique dans la balance énergétique en contrôlant la prise alimentaire au niveau du système nerveux central et l'insulino-résistance. Cette fonction endocrine du TAB est également révélée par la synthèse d'autres protéines régulatrices comme par exemple l'angiotensinogène, l'adiponectine, la protéine stimulant l'acylation (ASP), l'adipsine, la « retinol binding protein » (RBP), le « tumor necrosis factor  $\alpha$  » (TNF $\alpha$ ), l'interleukine 6 (Il-6), et le « plasminogène activator inhibitor-1 » (PAI-1) (Figure 6). Certaines de ces protéines sont des cytokines inflammatoires et d'autres jouent un rôle dans le métabolisme lipidique. Les effets spécifiques de ces protéines peuvent être endocrine ou paracrine (Trayhurn et Beattie, 2001). L'obésité induit un changement dans la sécrétion des adipokines et augmente l'infiltration du TAB par les macrophages et donc une inflammation de ce tissu, ainsi qu'une résistance à l'insuline dans les tissus périphériques tels que le foie et les muscles (Galic *et al.*, 2010). Une absence du TAB peut avoir des conséquences profondes, comme le cas des patients lipodystrophiques, ces patients montrent des cas sévères de diabète mellitus, ce qui exige une administration de leptine et/ou des thiazolidinédiones (Javor *et al.*, 2005). Les adipocytes exercent ainsi des actions pléiotropes

par l'intermédiaire de la production de nombreux facteurs agissant d'une façon autocrine, paracrine ou endocrine.



**Figure 6.** Exemple de quelques protéines sécrétées par le tissu adipeux blanc. ASP, acylation stimulating protein; CETP, cholesteryl ester transfer protein; FIAF, fasting induced adipose factor; LPL, lipoprotein lipase; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; TGF $\beta$ , transforming growth factor beta; TNF $\alpha$ , tumour necrosis factor alpha.

#### 1.2.4. Adipogenèse.

##### 1.2.4.1. Le développement et la différenciation adipocytaire.

Le développement du TAB est initié au cours du développement embryonnaire et fœtal. Dans l'espèce humaine, le nombre d'adipocytes augmente jusqu'à l'âge d'environ 15 ans et cette hyperplasie est particulièrement importante durant les toutes premières années de la vie. Il est donc important de veiller à l'alimentation des enfants jusqu'à l'adolescence pour éviter de préparer un terrain favorable à l'obésité de l'adulte. Après 15 ans, nous disposons ainsi normalement d'un nombre fixe d'adipocytes. En cas de prise de poids, il y aura principalement une augmentation du stockage des lipides dans les gouttelettes lipidiques sans besoin d'augmenter le nombre d'adipocytes. Cette phase d'hypertrophie permet en moyenne d'augmenter d'un facteur 8 la taille de la cellule, qui peut en cas extrême multiplier sa taille par 50. Si cette hypertrophie n'est pas suffisante et que l'apport en lipides à stocker dépasse la capacité de stockage existante, une phase d'hyperplasie est alors mise en œuvre à partir de cellules souches présentes dans la fraction vasculaire du stroma de ce tissu (Fève *et al.*, 1998). Ce processus de recrutement peut être mis en œuvre, en particulier dans le cas d'obésité. Du

fait de la dynamique rapide de la lipogenèse et de la lipolyse du TAB, associée à une durée de vie qui est d'environ 10 ans de l'adipocyte (Arner *et al.*, 2011), un régime hypocalorique se traduira par une vidange des cellules sans altération majeure du nombre de ces cellules adipeuses. Toute balance énergétique ultérieure tournée vers le stockage se traduira alors vers une reprise rapide de la charge pondérale.

#### **1.2.4.1.1. La détermination adipocytaire.**

Comme pour les dérivés osseux et musculaires, le TAB est d'origine mésodermique. L'adipogenèse est le résultat d'une détermination, lors du développement embryonnaire, de cellules souches vers la lignée adipocytaire plus d'une différenciation. L'adipogenèse correspond à un cheminement de cellules souches mésenchymateuses vers la lignée adipocytaire, dont certaines resteront en réserve toute la vie au sein du TAB. Les cellules souches mésenchymateuses peuvent se différencier en plusieurs types de cellules souches multipotentes comme les myoblastes, les ostéoblastes et les adipoblastes, et cela se fait sous le contrôle de différents événements cellulaires et moléculaires (Figure 7) (Gesta *et al.*, 2007). Ces deux derniers types cellulaires peuvent avoir une relation inverse ou réciproque (Gimble et Nuttall, 2012). Les facteurs qui influencent l'orientation des cellules souches vers les adipoblastes ne sont pas encore très bien connus. L'activation de la voie de signalisation Wnts au sein des cellules souches mésenchymateuse a initialement été impliquée dans l'inhibition de la détermination adipocytaire au profit de la détermination myogénique (Ross *et al.*, 2000 ; Gesta *et al.*, 2007; Tang et Lane, 2012). Cette voie semble toutefois intervenir à deux niveaux : comme activateur précoce pendant la détermination des adipoblastes, puis plus tardivement comme inhibiteur de la différenciation adipocytaire (Ross *et al.*, 2000 ; Tang et Lane, 2012). Par ailleurs, une exposition des cellules mésenchymateuse multipotentes au BMP-4 (bone morphogenic protein 4) engage ces cellules vers la lignée adipocytaire (Tang *et al.*, 2012).

#### **1.2.4.1.2. La différenciation adipocytaire.**

Le processus de la différenciation adipocytaire est un mécanisme complexe, caractérisé par l'expression ordonnée de certains gènes et facteurs spécifiques. La plupart des

informations ont été obtenues par des études *in vitro* à partir de cultures cellulaires. Le processus de la différenciation adipocytaire est le passage d'un adipoblaste à un préadipocyte puis à un adipocyte mature. Morphologiquement, il n'y a pas de différence entre les adipoblastes et les préadipocytes, la seule différence étant l'expression de certains marqueurs précoces de la différenciation des préadipocytes (Figure 7). Il a été montré que ces cellules secrètent des facteurs qui participent à leur propre différenciation (Ailhaud, 2006).

Les préadipocytes subissent ensuite une mitose post confluente ou expansion clonale, afin de s'engager définitivement dans la différenciation adipocytaire. Ce processus est accompagné par des changements moléculaires, cellulaires et morphologiques des cellules. En effet, en acquérant l'ensemble de leurs propriétés métaboliques, les adipocytes vont acquérir la capacité à stocker les lipides, dans un premier temps dans des petites gouttelettes lipidiques, qui ensuite arriveront à confluence pour aboutir à une vacuole lipidique unique au sein du cytoplasme de la cellule (Gregoire *et al.*, 1998 ; Tang *et al.*, 2012).

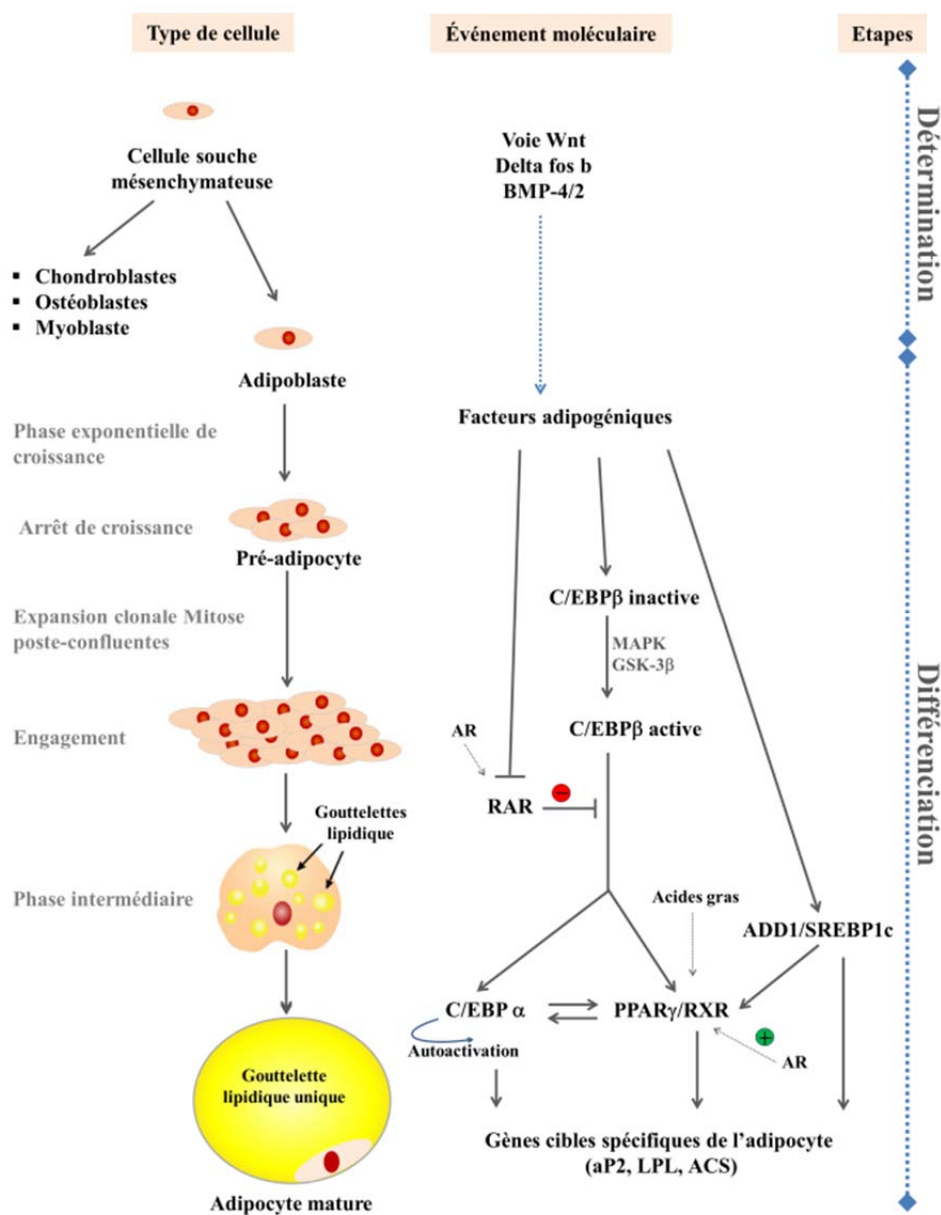
#### **1.2.4.1.2.1. Le contrôle de la différenciation adipocytaire.**

Les changements cellulaires et morphologiques qui accompagnent la différenciation adipocytaire sont le résultat de la variation de l'expression génique. Cette programmation moléculaire est influencée par des facteurs pro ou anti-adipogénique, à la fois facteurs de transcriptions et facteurs hormonaux. Dans les paragraphes suivant, nous allons aborder certains des facteurs considérés comme les plus importants.

#### **1.2.4.1.2.2. Les facteurs de transcriptions.**

La coordination transcriptionnelle de la différenciation adipocytaire se fait principalement par trois types facteurs: les C/EBPs (CCAAT-enhancer binding protein) ou les protéines de fixation à l'élément CCAAT, les trois membres de cette famille ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) sont exprimés à des temps différents de l'adipogenèse, notamment dans le déclenchement de la maturation terminale. Le C/EBP $\alpha$  est induit plus tardivement et va permettre la transactivation de certains gènes tels que la leptine, aP2 (fatty acid-binding protein 4, FABP4), « peroxisome proliferator-activated receptor »  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) et lui même (Rosen *et al.*, 2000). Le facteur de transcription SREBP-1c (Sterol regulatory element-binding protein-1c)

est aussi connu comme favorisant cette différenciation adipocytaire, il va ainsi favoriser l'expression de PPAR $\gamma$  (Figure 7). Les facteurs de type PPARs appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires (RN) et seront détaillés dans la Partie 2 du Chapitre I. Chacun des trois membres de ces PPARs,  $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  et  $\gamma$ , est codé par un gène différent et dont l'expression est relativement tissu spécifique. PPAR $\gamma$  est connu comme étant un gène clés de l'adipogenèse (Janesick et Blumberg, 2011), et est préférentiellement exprimé dans le tissu adipeux et joue un rôle important dans la différenciation et la maturation définitive des adipocytes. Ce facteur transactive de nombreux gènes marqueurs de la différenciation des adipocytes tels que la LPL ou la FABP4 afin de stocker les acides gras sous formes de TAG dans les gouttelettes lipidiques (Rosen *et al.*, 2000).



**Figure 7.** Schéma illustrant la cascade d'événements et les acteurs moléculaires impliqués au cours de la détermination et lors de la différenciation adipocytaire. RA: retinoïc acid ;

C/EBP : CAAT/enhancer binding protein ; RAR : RA receptor ; MAPK: mitogen-activated protein kinase; GSK-3:glycogen synthase kinase-3; ADD1: adipose differentiation and determination factor 1; SREBP1c: sterol regulatory binding protein 1c; PPAR $\gamma$ : peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ; RXR: retinoic-X-receptor; aP2: fatty acid-binding protein; LPL: lipoprotein lipase; ACS: acyl-CoA synthetase (d'après Gregoire *et al.*, 1998; Tang *et al.*, 2012).

#### **1.2.4.1.2.3. Les facteurs hormonaux.**

L'hormone la plus connue pour réguler positivement l'adipogenèse est l'insuline. En effet, elle est nécessaire à la différenciation *in vitro* des lignées murines adipocytaires 3T3-L1 et 3T3-F442A. L'insuline augmente de façon significative le nombre d'adipocytes ainsi que l'accumulation lipidique (Girard *et al.*, 1994). Elle va activer le récepteur IGF-1 (Insuline growth Factor 1), au niveau des pré-adipocytes. L'activation de ce récepteur déclenche l'expansion clonale via l'activation de la voie PI-3K (phosphoinositide 3-kinase), voie nécessaire à la différenciation adipocytaire (Sakaue *et al.*, 1998; Xia et Serrero 1999). Les acides gras sont aussi connus pour induire la différenciation adipocytaire. Provenant de l'alimentation ou de la lipolyse, certains acides gras agissent positivement sur les adipocytes en régulant l'expression de nombreux gènes adipocytaires par activation de certains récepteurs nucléaires tels que les PPAR $\gamma$  ou les RXR (Retinoid X receptors) (Forman *et al.*, 1997). Il existe d'autres facteurs pro-adipogéniques tel que l'hormone de croissance, les glucocorticoïdes, l'hormone thyroïdienne T3 et le « leukemia inhibitory factor ».

Il subsiste également une régulation négative de la différenciation adipocytaire. Des cytokines inflammatoires ont elles aussi été décrites comme étant des facteurs anti-adipogéniques tels que l'IL-1, l'IL-6, le TNF $\alpha$  ou les interférons  $\gamma$  et  $\beta$ . Certains facteurs de croissance inhibent cette différenciation tels que l'EGF (epidermal growth factor), le TGF $\alpha$  (transforming growth factor  $\alpha$ ) ou encore la myostatine. Pref-1, protéine exprimée uniquement dans les pré-adipocytes, a été décrite comme un facteur anti-adipogénique. Il a été montré, que sa forme soluble pouvait inhiber la différenciation, ou à l'inverse son inhibition peut induire l'adipogenèse (Smas *et al.*, 1999).

#### **1.2.5. La lipogenèse et la lipolyse.**

##### **1.2.5.1. Quelques notions sur les lipides.**

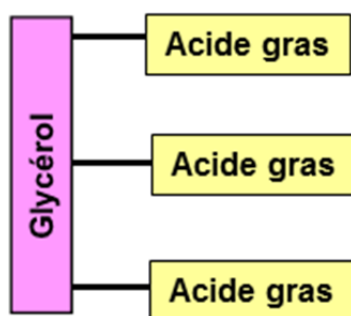
###### **1.2.5.1.1. Les lipides apolaires et polaires.**



Les lipides représentent une famille de molécules organiques très hétérogène. Ce sont généralement des molécules insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques, tels que l'éther, le chloroforme, l'acétone, le méthanol ou le benzène. Ils peuvent pour la plupart d'entre eux être utilisés comme source d'énergie par les êtres vivants et les lipides hydrolysés ont généralement comme constituants principaux les acides gras.

### ***Les lipides apolaires (neutres)***

Les TAG constituent la principale classe des lipides neutres, et sont constitués d'une molécule de glycérol estérifiée par trois molécules d'acides gras (Figure 8).

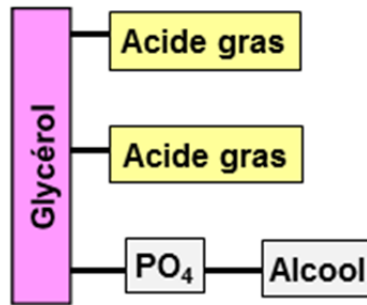


**Figure 8.** Schéma d'un TAG.

Les cires représentent la deuxième classe quantitativement la plus importante de lipides neutres. Il s'agit d'esters constitués d'un acide gras estérifié avec un alcool gras. Ces molécules sont présentes dans le zooplancton marin et dans le corps et les œufs de certains poissons zooplanctivores (anguilles, capelan...)

### ***Les lipides polaires***

Les lipides polaires quantitativement les plus importants dans les cellules sont les glycérophospholipides. Ils sont constitués par un acide phosphatidique estérifié par une tête polaire dont la nature détermine le type de glycérophospholipide (Figure 9). Ils sont principalement intégrés aux membranes biologiques. La fluidité de ces membranes est déterminée pour une grande partie par le degré d'insaturation des acides gras constitutifs de ces phospholipides. Les sphingolipides constituent une autre catégorie de phospholipides pour lesquels le squelette carbonné est constitué par un alcool aminé à longue chaîne, la sphingosine.



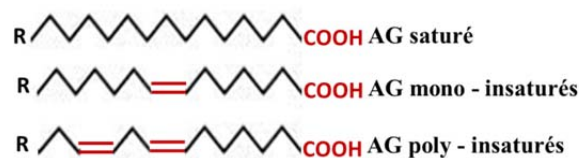
**Figure 9.** Schéma d'un glycérophospholipide.

### *Les lipides non-hydrolysables*

Le cholestérol est le lipide non-hydrolysable le plus répandu chez les vertébrés. Il est présent tel quel dans les membranes cellulaires ou peut être présent sous forme d'ester de cholestérol dans le cytoplasme des cellules et stocké alors avec les autres lipides apolaires.

#### **1.2.5.1.2. Les acides gras.**

Les acides gras sont les constituants élémentaires des lipides hydrolysables, composés d'une chaîne hydrocarbonée comportant à une extrémité un groupement méthyle CH<sub>3</sub> et à l'autre extrémité un groupement carboxyle COOH (Figure 10). Les acides gras sont définis par leurs nombre de carbone, leur degré d'insaturation, *i.e.* leur nombre de double liaison, et par la position de ces doubles liaisons le long de la chaîne hydrogénéocarbonnée.



**Figure 10.** Différents types d'acides gras non ramifiés.

**Les acides gras saturés :** Ce sont des acides gras qui ne comportent aucune double liaison. Par exemple, C14:0 désigne un acide gras à 14 atomes de carbones et sans double liaison, donc saturé.

**Les acides gras mono-insaturés :** Ce sont des acides gras qui possèdent une seule double liaison. Par exemple, le C18:1 n-9 ( $\omega$ 9) désigne un acide gras à 18 atomes de carbones et une

double liaison est situé sur le 9<sup>ème</sup> carbone en partant de l'extrémité méthyle de la chaîne carbonée.

**Les acides gras poly-insaturés :** Ce sont des qui possèdent plusieurs doubles liaisons. Par exemple, le C22:6n-3 ( $\omega$ 3) désigne un acide gras à 22 atomes de carbones et 6 doubles liaisons dont la première est située sur le 3<sup>ème</sup> atome carbone en partant de l'extrémité méthylrique.

### **1.2.5.2. La lipogenèse.**

La synthèse de lipides et en particulier des TAG dans l'adipocyte s'effectue selon deux voies 1) à partir de la captation des acides gras circulants, 2) par lipogenèse *de novo* à partir d'acétyl-CoA.

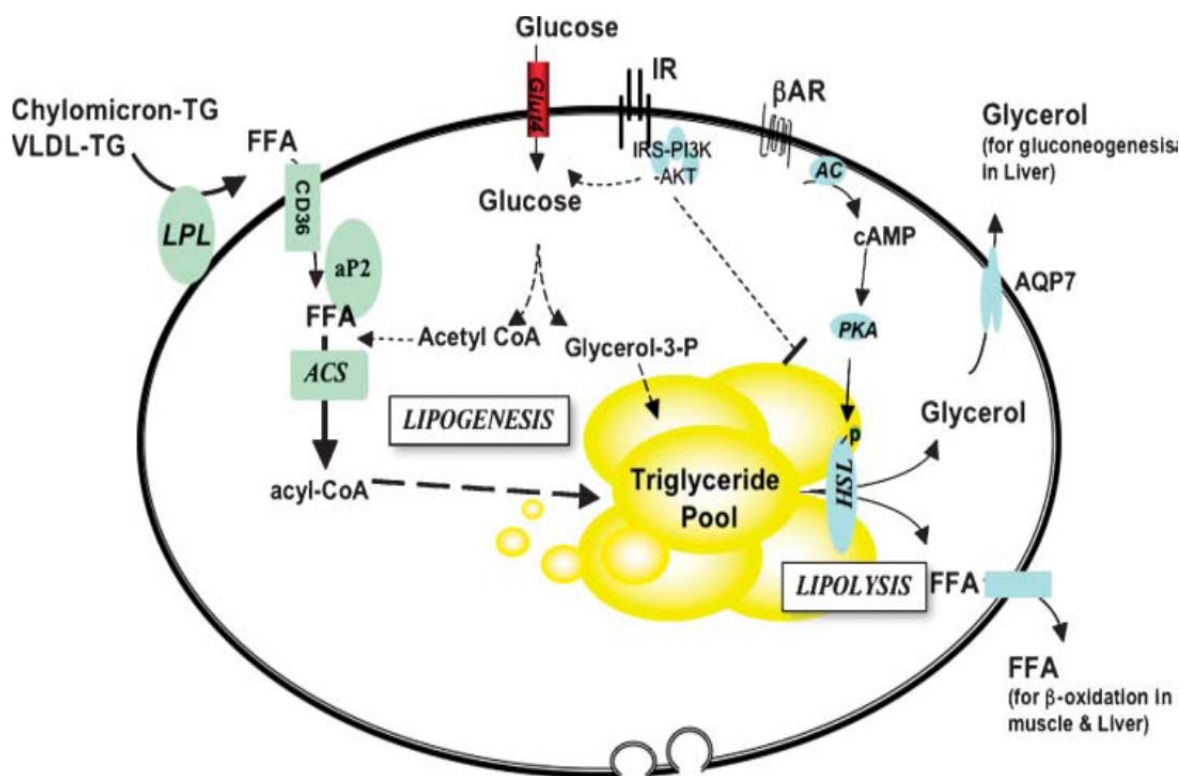
#### **1.2.5.2.1. Acides gras d'origine extracellulaire.**

Les acides gras peuvent être apportés à l'adipocyte selon deux sources. Ceux liés à la sérum albumine et ceux estérifiés dans des lipides hydrolysables incorporés à des lipoprotéines circulantes. Ces acides gras peuvent avoir une origine endogène ou bien exogène à partir des acides gras d'origine alimentaire absorbés au niveau de l'intestin grêle (Babin and Gibbons, 2009). Les processus associés au transfert des acides gras dans les cellules intestinales puis dans le système circulatoire sont difficiles à étudier *in vivo*. Des travaux récents réalisés par utilisation du modèle poisson zèbre ont permis de visualiser ce transfert par utilisation d'acides gras couplés au marqueur fluorescent Bodipy (Walters *et al.*, 2012, Babin *et al.*, non publié). Les acides gras sont réestérifiés principalement dans des TAG puis incorporés à des lipoprotéines (chylomicrons, VLDL (Very Low Density Lipoprotein, lipoprotéine de très basse densité)) par les entérocytes ou les hépatocytes et déversés dans le système circulatoire. Ces lipoprotéines subissent l'action de la LPL au niveau de l'endothélium vasculaire et les acides gras ainsi libérés sont captés par les adipocytes via des transporteurs membranaires (e.g. CD36) spécifiques. Leur transformation en acyl-CoA sera le point de départ de leur estérification sous forme de TAG, phospholipides ou esters de cholestérol (Figure 11).

### 1.2.5.2.2. La lipogenèse *de novo*.

La lipogenèse *de novo* dans l'adipocyte permet la synthèse d'acide gras à partir de la métabolisation du glucose extracellulaire (Figure 11). L'entrée du glucose dans l'adipocyte se fait grâce à des transporteurs spécifiques, GLUT-1 et GLUT-4 (Mueckler, 1990). Une fois dans la cellule, le glucose est dégradé en pyruvate par le processus de glycolyse. Suite à cette étape, l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) et l'acide gras synthase (FAS, pour Fatty Acid Synthetase) interviennent de façon successive pour catalyser la formation des acides gras saturés à longue chaîne, à partir de l'acétyl-CoA. L'action de différentes désaturases permet la synthèse d'acides gras plus ou moins désaturés. Les acides gras sont ensuite estérifiés dans l'adipocyte par la voie du glycérol-3-phosphate pour donner des TAG. La lipogenèse *de novo* est majoritairement réalisée dans le foie de l'espèce humaine. Bien qu'étant accessoire dans le TAB, elle peut intervenir dans ce tissu en particulier lors d'un régime riche en glucides (Letexier *et al.*, 2003).

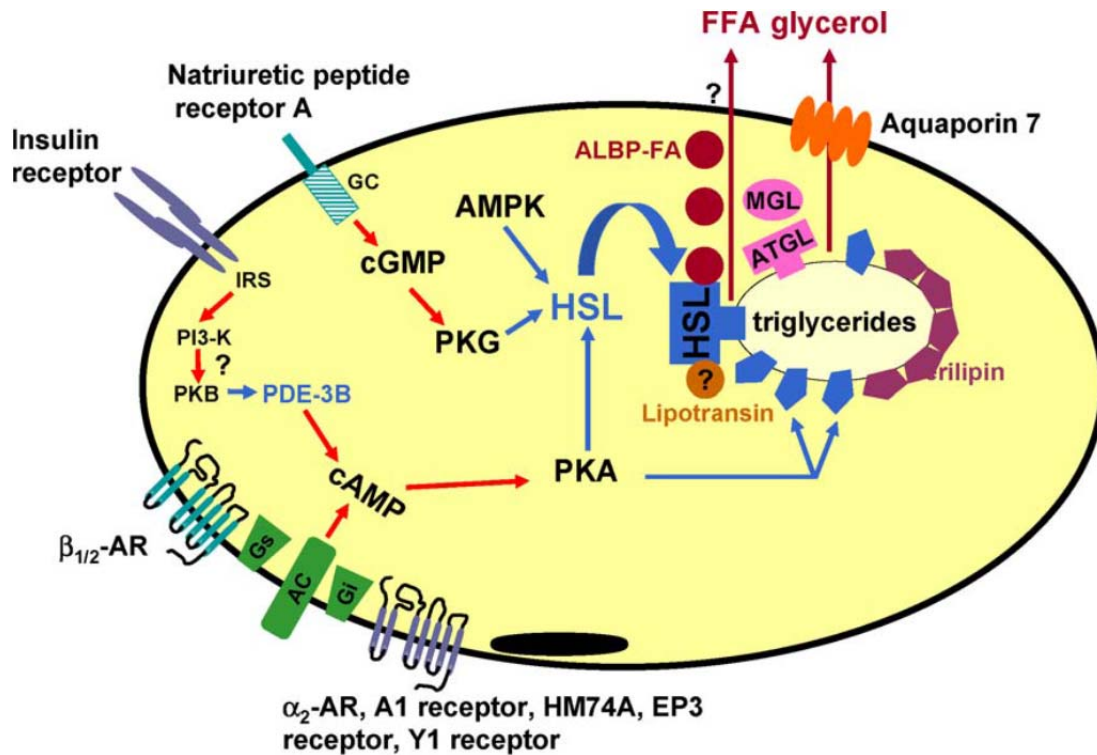
L'insuline contrôle la lipogenèse à différentes étapes. Sous son action, le transporteur GLUT-4 va être transloqué à la membrane des adipocytes, ce qui permet l'entrée du glucose dans la cellule. L'insuline a également une action positive sur certaines enzymes qui contrôlent la voie de biosynthèse des acides gras à partir de l'acétate.



**Figure 11.** Le métabolisme des lipides dans l'adipocyte blanc. Dans cette cellule coexiste la lipogénèse et la lipolyse, chacune de ces deux voies étant prépondérante lors de la phase de dépôt des réserves lipidiques ou lors de leur mobilisation. L'adipocyte est sensible à l'évolution des indices nutritionnels, comme par exemple la concentration sanguine en insuline. Cette hormone stimule la captation du glucose et de la lipogénèse et inhibe la lipolyse. Cette lipolyse est asservie par la régulation  $\beta$ -adrénergique. AC, l'adénylate cyclase; ACS, l'acyl-CoA synthase; AKT, AKR souris thymome proto-oncogène viral; AR, récepteur adrénérgique; HSL, lipase sensible aux hormones; IR, récepteur de l'insuline; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PKA, la protéine kinase A (d'après Sethi et Vidal-Puig, 2007).

### 1.2.5.3. La lipolyse.

La lipolyse permet l'hydrolyse des TAG stockés dans la gouttelette lipidique (Figure 12). Cette voie métabolique prend son origine au niveau des récepteurs membranaux de type  $\beta$ -adrénergique et aboutit à l'activation hormono dépendante de lipases dont l'activité permet la dégradation des TAG en acides gras non estérifiés et glycérol (Osuga *et al.*, 2000 ; Zimmermann *et al.*, 2004; Jenkins *et al.*, 2004). Une fois produits par l'adipocyte, les acides gras seront relargués dans la circulation sanguine avec prise en charge par la sérum albumine ou bien subir la  $\beta$ -oxydation intra adipocytaire ou être reestérifiés. En contrôlant la phosphorylation de la protéine kinase A, L'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) est le principal régulateur de la lipolyse. L'activité lipolytique d'un adipocyte dépend du taux intracellulaire d'AMPc dont la production est stimulée par les récepteurs couplés aux petites protéines Gs mais inhibée par les récepteurs couplés aux petites protéines Gi. L'insuline est un puissant inhibiteur de la lipolyse et son action passe par la diminution du taux intracellulaire de l'AMPc via la phosphatidylinositol 3-Kinase et la protéine kinase B (Kitamura *et al.*, 1999).



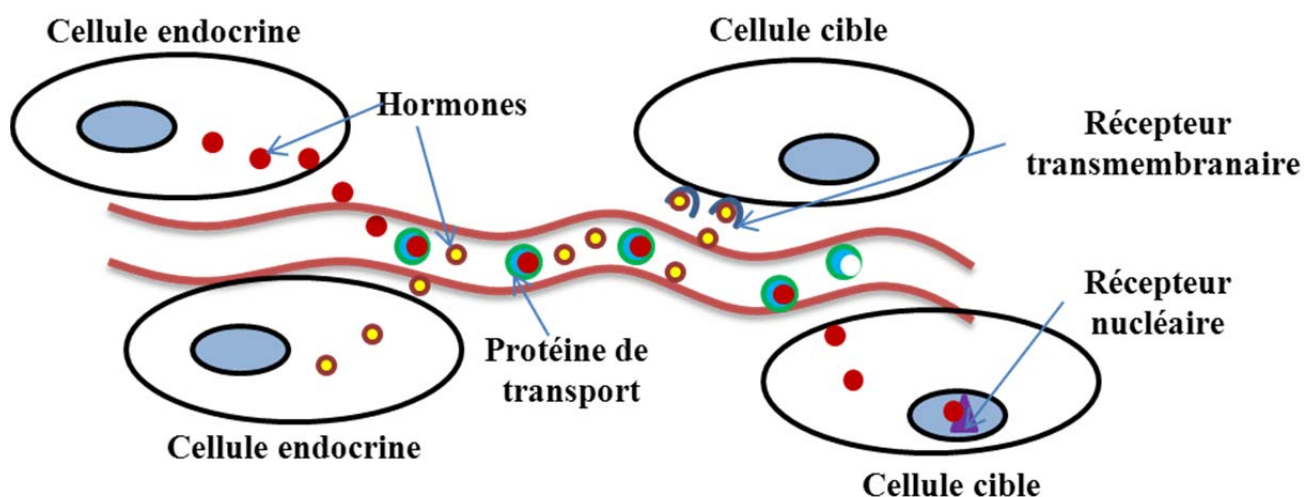
**Figure 12** Le contrôle de la lipolyse des adipocytes humains. Les voies de transduction du signal des catécholamines via des récepteurs adrénergiques (AR), peptides natriurétiques de type A par l'intermédiaire du récepteur, l'insuline et d'autres agents antilipolytiques (prostaglandines E2 EP3 par l'intermédiaire de récepteurs, par l'intermédiaire de récepteurs A1 de l'adénosine, l'acide nicotinique par HM74A et NPY / PYY via Y1 récepteurs) sont décrits. Protéines phosphorylées par des protéines kinases (PKA, la protéine kinase A; PKB, protéine kinase B; PKG, protéine kinase G; AMPK, protéine kinase activée par l'AMP) sont indiquées en bleu. Lipase hormono-sensible (HSL) peut favoriser la phosphorylation sa translocation du cytosol vers la surface de la gouttelette lipidique. Phosphorylation Perilipin peut induire une altération physique importante de la surface des gouttelettes qui facilite l'action de la LGV et la lipolyse. Amarrage protéine de liaison lipidique adipocytaire (ALBP) à HSL favorise l'évacuation des acides gras (AG) du modèle par l'hydrolyse des triglycérides. Les points d'interrogation indiquent les voies qui sont encore hypothétiques ou dont la pertinence n'a pas été pleinement démontrée. CA, adénylcyclase; ATGL, triglycérides adipocytaires lipase; GC, guanylate cyclase; Gi, inhibiteur de protéine liant le GTP; Gs, stimulant protéine liant le GTP; IRS, insulin receptor substrate; FFA, acides gras libres; MGL, monoglycéride lipase; PDE -3B, 3B phosphodiesterase; PI3-K, le phosphatidylinositol-3-phosphate kinase (d'après Langin, 2006).

Une partie des travaux réalisés dans le cadre de ce travail de thèse ont consisté à caractériser les processus biologiques impliqués dans la dynamique *in vivo* du TAB après exposition à des polluants chimiques ou à des molécules pharmacologiques chez le poisson zèbre. Certaines de ces molécules peuvent agir via les récepteurs nucléaires (RN) et sont considérés comme des perturbateurs endocriniens. Nous allons donc définir dans les parties 2 et 3 du Chapitre I ce que sont les RNs puis présenter les caractéristiques principales de

certaines perturbateurs endocriniens rencontrés dans notre environnement chimique et qui peuvent avoir une action sur les systèmes biologiques via ces RNs.

## 2. Les récepteurs nucléaires

La voie endocrine est un des modes d'action utilisée par les cellules pour communiquer à distance. La cellule endocrine envoie un message sous la forme d'une hormone qui va emprunter le système circulatoire soit librement, soit liée à une protéine de transport. Cette hormone quitte la circulation pour atteindre la cellule cible, et se lie à un récepteur spécifique qui permet une action ciblée de l'hormone (Figure 12). Il existe deux types de récepteurs hormonaux : les récepteurs transmembranaires et les récepteurs intracellulaires.



**Figure 13.** Schéma de la signalisation endocrine ([http://www.med.univ-montp1.fr/enseignement/cycle\\_1/PCEM2/mod-integres/MI6\\_regulation-hormonale\\_chronobiologie/Ressources\\_locale/bio-cell/biocell\\_cours1.htm](http://www.med.univ-montp1.fr/enseignement/cycle_1/PCEM2/mod-integres/MI6_regulation-hormonale_chronobiologie/Ressources_locale/bio-cell/biocell_cours1.htm)).

Les RNs sont des récepteurs intracellulaires localisés principalement dans le noyau des cellules. Ils sont capables de réguler directement l'activité transcriptionnelle de gènes cibles via une interaction spécifique avec des éléments de régulation situés à proximité de ces gènes. Ces récepteurs sont largement répandus dans le règne animal y compris chez les invertébrés et semblent être apparus à la base de l'évolution des métazoaires (Escriva *et al.*, 1997). Ils fonctionnent comme des facteurs de transcription activés par la liaison à des petites molécules lipophiles, comme des hormones ou des métabolites incluant par exemple les acides gras, les oxystérols ou des xénobiotiques. La nature hydrophobe de ces ligands leur permet de franchir facilement les membranes cellulaires. Ces récepteurs sont impliqués dans la régulation d'un large spectre de phénomènes physiologiques (Gronemeyer *et al.*, 2004; Chambon, 2005).

La caractérisation biochimique des RNs a débuté dans les années 60 par la capacité de certains types cellulaires à lier l'œstradiol avec une haute affinité, cette liaison modifiant alors leur activité cellulaire (Jensen et Khan, 2004 ; Germain *et al.*, 2006). Le récepteur aux glucocorticoïdes humain (GR, NR3C1) a été l'un des premiers RN cloné par R. Evans et ses collaborateurs et au cours de la même période un récepteur aux estrogènes (ER) a été cloné par les laboratoires de P. Chambon et G. Greene (Germain *et al.*, 2006). Le clonage de ces RNs a permis de montrer une forte homologie de structure entre leurs protéines déduites et a permis de les regrouper dans la superfamille de RNs. Cette superfamille est maintenant reconnue comme étant l'une contenant le plus grand nombre de membres parmi les familles de facteurs de transcription des eucaryotes (Mangelsdorf et Evans, 1995). Chez les mammifères, espèce humaine comprise, cette superfamille comporte plus d'une quarantaine de membres (Robinson-Rechavi *et al.*, 2001 ; Robinson-Rechavi *et al.*, 2003 ; Zhang *et al.*, 2004). Au cours des dernières décennies, la recherche sur ces facteurs de transcription a été extrêmement active du fait que ces protéines sont des régulateurs puissants de l'expression génique et constituent des cibles pharmacologiques majeures.

## **2.1. Classification des récepteurs nucléaires.**

Il existe plusieurs méthodes de classification des RNs : en fonction de leur homologie, de leur mode de fonctionnement ou en fonction de la nature de leur ligand (récepteurs aux stéroïdes, récepteurs non stéroïdiens, récepteurs orphelins). Toutefois, dans les années 2000, la classification des RNs a été repensée en termes d'homologie de structure. Ils ont été regroupés en 7 familles définies d'après des données phylogénétiques (Tableau 3) (Laudet, 1997; Nuclear Receptors Nomenclature Committee, 1999; Giguere, 1999). La famille la plus diversifiée est la famille NR1, qui regroupe les récepteurs des hormones thyroïdiennes, les RARs (Retinoic Acid Receptor) ainsi que les PPARs et les LXR (Liver X Receptor). L'ensemble des récepteurs des stéroïdes (androgènes, œstrogènes, progestérone et corticostéroïdes) est regroupé dans la famille des récepteurs NR3, tandis que les RXRs (Retinoid X receptors) font partie de la famille NR2. Il est à noter qu'une 7ème catégorie de récepteurs nucléaires a été définie, les récepteurs NR0 comprenant deux membres, NR0B1 (DAX1) et NR0B2 (Small Heterodimer Partner) qui ne possèdent chacun qu'un seul des domaines conservés C ou E (Laudet, 1997; Nuclear Receptors Nomenclature Committee, 1999; Giguere, 1999).



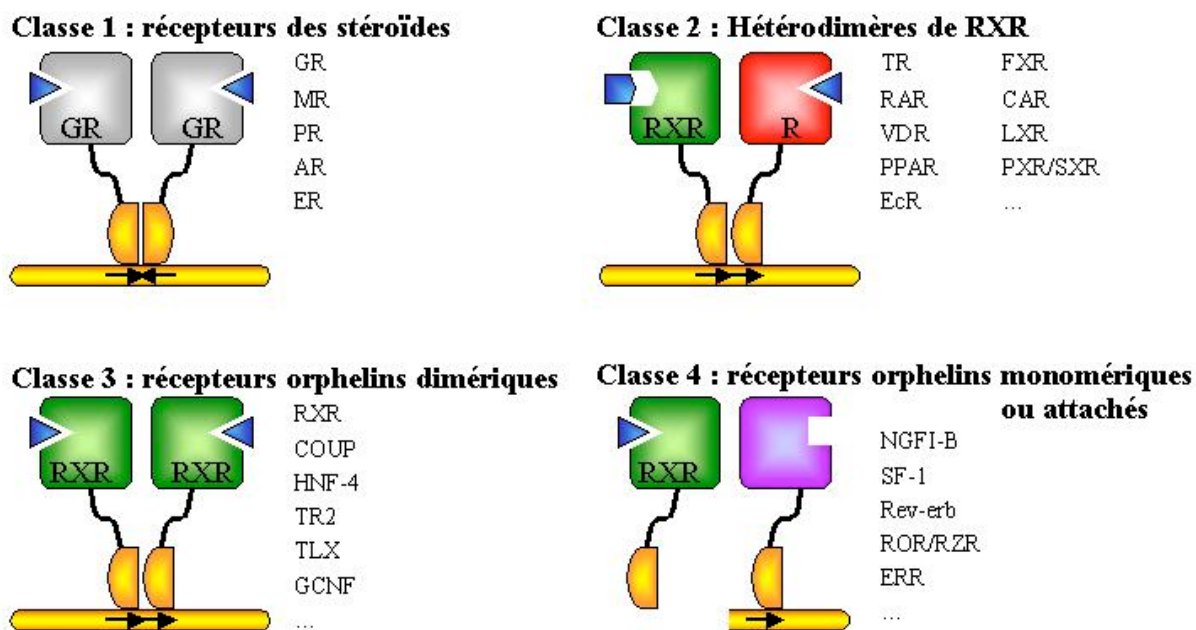
**Tableau 3.** Nomenclature et classification des récepteurs nucléaires humains selon leur homologie de structure. Cette classification des récepteurs nucléaires, proposée par le *Nuclear Receptor Nomenclature Committee*, se base sur l'analyse des homologies de séquence des domaines C, D et E. Il existe, chez l'Homme, 48 récepteurs nucléaires classés en sept familles, de NR0 à NR6 (d'après Laudet, 1997; Nuclear Receptors Nomenclature Committee, 1999; Giguere, 1999).

Famille	Groupe	Membre	Acronyme	Nom
NR1	A	NR1A1	TR $\alpha$	Thyroid hormone Receptor alpha
		NR1A2	TR $\beta$	Thyroid hormone Receptor beta
	B	NR1B1	RAR $\alpha$	Retinoic Acid Receptor alpha
		NR1B2	RAR $\beta$	Retinoic Acid Receptor beta
		NR1B3	RAR $\gamma$	Retinoic Acid Receptor gamma
	C	NR1C1	PPAR $\alpha$	Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor alpha
		NR1C2	PPAR $\beta/\delta$	Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor beta
		NR1C3	PPAR $\gamma$	Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor gamma
	D	NR1D1	Rev-ErbA $\alpha$	Reverse ErbA alpha
		NR1D2	Rev-ErbA $\beta$	Reverse ErbA beta
	F	NR1F1	ROR $\alpha$	RAR-related Orphan Receptor alpha
		NR1F2	ROR $\beta$	RAR-related Orphan Receptor beta
		NR1F3	ROR $\gamma$	RAR-related Orphan Receptor gamma
H	NR1H2	LXR $\beta$	Liver X Receptor beta	
	NR1H3	LXR $\alpha$	Liver X Receptor alpha	
	NR1H4	FXR	Farnesoid X Receptor	
I	NR1I1	VDR	Vitamin D Receptor	
	NR1I2	PXR	Pregnane X Receptor	
	NR1I3	CAR	Constitutive Androstane Receptor	
NR2	A	NR2A1	HNF4 $\alpha$	Hepatocyte Nuclear Factor 4alpha
		NR2A2	HNF4 $\beta$	Hepatocyte Nuclear Factor 4beta
	B	NR2B1	RXR $\alpha$	Retinoid X Receptor alpha
		NR2B2	RXR $\beta$	Retinoid X Receptor beta
		NR2B3	RXR $\gamma$	Retinoid X Receptor gamma
	C	NR2C1	TR2	Testicular Receptor 2
NR2C2		TR4	Testicular Receptor 4	

	E	NR2E1	TLX	drosophila Tailless homologue
		NR2E3	PNR	Photoreceptor-specific Nuclear Receptor
	F	NR2F1	COUP-TFI	Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor I
NR2F2		COUP-TFII	Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor II	
NR2F6		EAR-2	ErbA2-Related gene-2	
NR3	A	NR3A1	Er $\alpha$	Estrogen Receptor alpha
		NR3A2	Er $\beta$	Estrogen Receptor beta
	B	NR3B1	ERR $\alpha$	Estrogen receptor-Related Receptor alpha
		NR3B2	ERR $\beta$	Estrogen receptor-Related Receptor beta
		NR3B3	ERR $\gamma$	Estrogen receptor-Related Receptor gamma
	C	NR3C1	GR	Glucocorticoid Receptor
		NR3C2	MR	Mineralocorticoid Receptor
NR3C3		PR	Progesterone Receptor	
NR3C4		AR	Progesterone Receptor	
NR4	A	NR4A1	NGFIB	Nerve Growth Factor-Induced factor B
		NR4A2	NURR1	NUR Related factor 1
		NR4A3	NOR1	Neuron-derived Orphan Receptor 1
NR5	A	NR5A1	SF1	Steroidogenic Factor 1
		NR5A2	LRH-1	Liver Receptor Homologous protein 1
NR6	A	NR6A1	GCNF	Germ Cell Nuclear Factor
NR0	B	NR0B1	DAX1	Dosage-sensitive sex reversal, Adrenal hypoplasia critical region on X chromosome gene 1
		NR0B2	SHP	Small Heterodimer Partner

Les RNs peuvent également être classés en fonction de leur mode de dimérisation et de la structure de leur domaine de liaison à l'ADN. Le domaine de liaison à l'ADN est constitué de la répétition d'une séquence de fixation du RN sur l'ADN, séparé par un nombre variable de nucléotides. Quatre classes de RNs ont ainsi été constituées (Figure 13). La première classe comprend les récepteurs des hormones stéroïdes (récepteurs des glucocorticoïdes (GR), androgènes (AR), œstrogènes (ER), minéralocorticoïdes (MR) et progestérone (PR)) et se fixe sur l'ADN sous forme d'homodimère. La deuxième classe est composée des récepteurs qui forment des hétérodimères avec les RXRs (récepteurs de l'acide

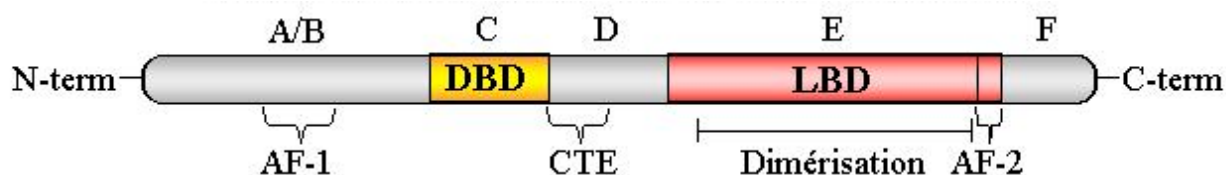
9-*cis* rétinol), et se fixe sur des répétitions directes de séquences d'ADN. Les classes III et IV regroupent des récepteurs qui se distinguent selon qu'ils se fixent à l'ADN sous forme d'homodimères (comme par exemple les RXRs) ou sous forme de monomères respectivement ; la plupart des récepteurs orphelins appartiennent à ces deux sous-catégorie (Olefsky, 2001 ; Mangelsdorf et Evans, 1995). Il est à noter que les récepteurs dimériques peuvent se fixer sur l'ADN par des éléments de réponse définis comme des répétitions directes (*Direct Repeat* ; DRn), inversée (*Indirect Repeat* ; IRn) ou evertée (*Everted Repeat* ; ERn).



**Figure 14.** Organisation fonctionnelle des RNs. Les quatre classes de RN selon leur mode de dimérisation et leur domaine de liaison à l'ADN (d'après Olefsky, 2001).

## 2.2. Structure des récepteurs nucléaires.

Les différents RNs possèdent une organisation générale très similaire et contiennent différents domaines fonctionnels notés de A à F (Figure 14). Chacun de ces domaines possède une fonction spécifique et représente divers degrés de conservation entre les membres de la superfamille des RNs.



**Figure 15.** Organisation structurale des RNs. Ces protéines ont une structure constituée de domaines (A-F) ayant des fonctions différentes (d'après Olefsky, 2001).

### ***Le domaine A/B :***

Ce domaine représente la région amino-terminale et démontre une grande variabilité en terme de taille et de séquence protéique. Une étude réalisée sur le récepteur de progestérone humaine a démontré que ce domaine possède une activité transcriptionnelle. Cette activité dépend du promoteur et du type cellulaire (Vegeto *et al.*, 1993). Ceci suggère que la région A/B des RNs peut interagir avec les corégulateurs spécifiques d'un type cellulaire donné. Le domaine A/B contient une région appelée AF-1 dont la fonction est l'activation de la transcription.

### ***Le domaine C (domaine de liaison à l'ADN) :***

C'est le domaine de liaison à l'ADN (DBD) des RNs, sous forme d'hétérodimère, d'homodimère ou de monomère. Ce domaine est le plus conservé dans la superfamille des RNs et est constitué de deux motifs en doigt de zinc (CI et CII), composé chacun d'un atome de zinc chélaté par quatre résidus de cystéines. Cette liaison se fait sur des petites séquences d'ADN cible «HRE» ou Hormone Response Element. Ce site de fixation contient une ou deux répétition directe (DRn), inversée (IRn) ou evertée (ERn) de demi-sites hexanucléotidiques consensus séparés par un nombre variable de nucléotides (entre 0 et 7). Par exemple les récepteurs aux stéroïdes reconnaissent la séquence consensus «AGAACA», alors que les récepteurs aux œstrogènes avec d'autres récepteurs nucléaires reconnaissent la séquence «AGGCTA».

### ***Le domaine D :***

Ce domaine représente une partie charnière dans le RN et est constitué d'acides aminés faisant le lien entre le domaine C et le domaine E/F (domaine de liaison du ligand). Cette région confère une certaine flexibilité structurale à la protéine. Cette région permet ainsi de réaliser différentes configurations fonctionnelles et est impliquée dans la localisation des RNs dans le noyau (Ylikomi *et al.*, 1992).

### ***Le domaine E/F (domaine de liaison au ligand (LBD)) :***

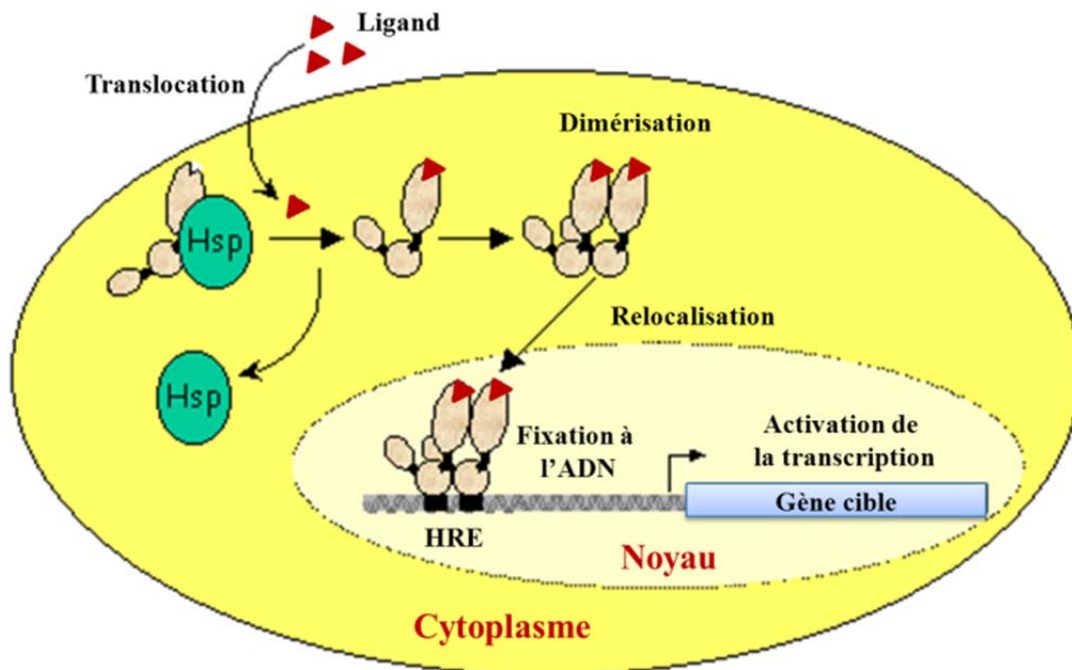
Ce domaine est le siège de plusieurs fonctions dont la principale est la liaison du ligand. La structure de ce domaine est caractérisée par la formation d'une poche hydrophobe

dans laquelle le ligand de nature lipophile peut se fixer. Ce domaine assure non seulement la fixation du ligand mais aussi la dimérisation entre les RNs et la régulation de la transcription dépendante du ligand. A l'extrémité C-terminale du domaine et situé sur l'hélice 12, on trouve une région dénommée AF-2. Cette région est hautement conservée entre les espèces et est nécessaire pour l'activation dépendante du ligand. Elle joue également un rôle important dans la transactivation ligand-dépendante et le recrutement des coactivateurs (Feng *et al.*, 1998). Enfin, la région la plus terminale, dénommée F n'est pas présente dans tous les RNs. Son rôle n'est pas très bien connu, mais semble avoir un rôle dans les récepteurs aux œstrogènes dans la spécificité du ligand et influencerait l'activation transcriptionnelle (Weatherman *et al.*, 2001).

### **2.3. Mode d'action des récepteurs nucléaires.**

Les RNs sont des facteurs de transcription très puissants. Ils contrôlent la transcription de gènes cibles par plusieurs mécanismes différents dont l'activation et la répression de certaines activités. En fonction de la localisation du RN dans la cellule en absence de ligand, il existe en général deux modes de fonctionnement pour les RNs (Sonoda *et al.*, 2008).

Dans un premier cas, nous avons des récepteurs cytoplasmiques inactifs (Figure 15), en complexe avec des protéines de choc thermique (HSP). La présence de ces HSPs dans le complexe inactif est indispensable pour une liaison spécifique du ligand (Chambraud *et al.*, 1990). La liaison du ligand au sein de la cavité hydrophobe du RN, permet l'activation de ce dernier, et sa dissociation du complexe réalisé avec les HSPs. Le récepteur va ensuite se dimériser en hétérodimère ou homodimère et va être transloqué dans le noyau. Le dimère va se fixer sur la région HRE de son gène cible afin d'activer sa transcription. La nature de cette régulation transcriptionnelle dépend de la nature de l'homo ou de l'hétérodimère ainsi que de la liaison des corégulateurs à la séquence AF-2 du RN (Nilsson *et al.*, 2001).

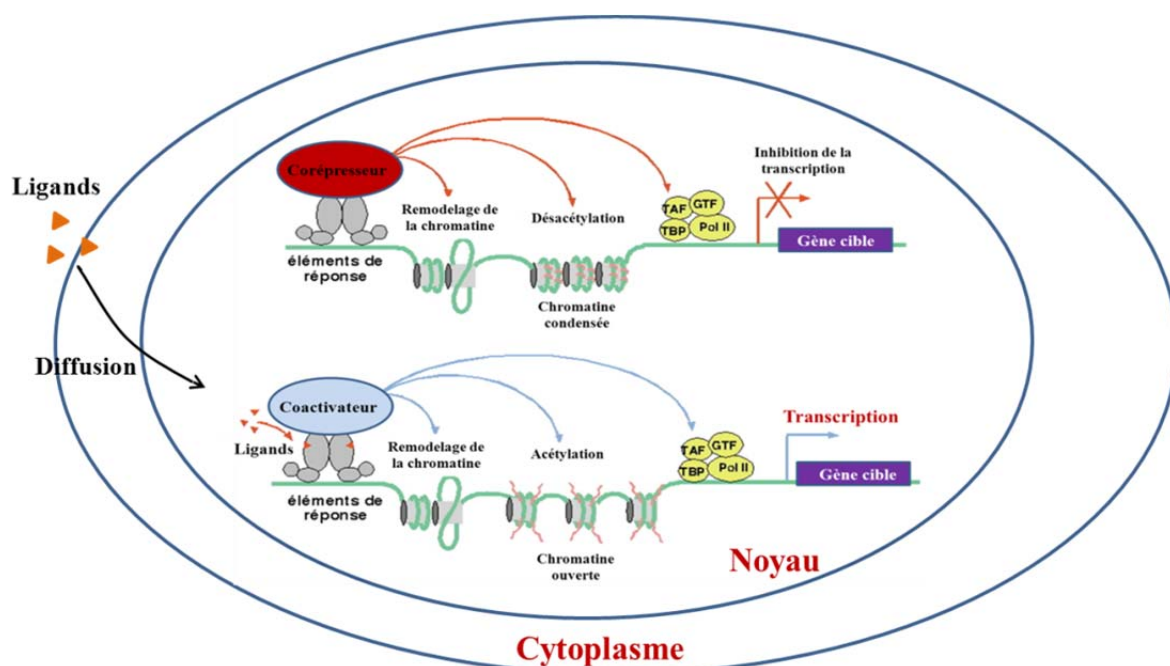


**Figure 16.** Mode d'action général des récepteurs nucléaires situés dans le cytoplasme. La liaison du ligand entraîne la libération du RN par les protéines chaperonnes. Le RN se dimérise et est transloqué dans le noyau, afin de démarrer la transcription du gène cible (d'après Chambraud *et al.*, 1990 ; Nilsson *et al.*, 2001 ; Sonoda *et al.*, 2008).

Bien que ce modèle d'activité soit vrai pour les récepteurs aux hormones stéroïdiennes (Pratt et Toft, 1997), la majorité des RNs se trouve à l'intérieur du noyau après leur traduction. Afin de moduler la transcription des gènes cibles, les RNs sont associés à de nombreux corégulateurs de la machinerie transcriptionnelle, comme des corépresseurs et des coactivateurs (McKenna *et al.*, 1999). Après fixation du ligand, le complexe répresseur se dissocie du récepteur, et ce dernier peut ensuite recruter un ou plusieurs coactivateurs. Certains coactivateurs possèdent une activité ATPase, amenant à un remodelage local de la chromatine. D'autres coactivateurs possèdent une activité histone acétylase, permettant ainsi la dérégulation de la structure chromatinienne (Narlikar *et al.*, 2002).

En cas de présence d'un RN sans ligand, la chromatine compactée est dans un état de répression dû à une forte désacétylation de l'histone, et aucune transcription n'est possible. Si le RN est activé par son ligand, la chromatine décompactée devient active avec de hauts niveaux d'acétylation des histones et cela mène au déclenchement de la transcription. Cependant, l'ouverture de la chromatine n'est pas suffisante pour permettre l'activation de la transcription et donc des interactions supplémentaires entre les RNs et la machinerie transcriptionnelle seront requises pour réguler l'expression génique (Figure 17) (Narlikar *et*

*al.*, 2002; Wong *et al.*, 1997). Les gènes peuvent être également régulés par les RNs via des interactions directes avec d'autres facteurs de transcription.



**Figure 17.** Mode d'action général des RNs situés à l'intérieur du noyau ainsi que le mécanisme de la corrépression et la coactivation de la transcription. En absence de ligand, les RNs sont associés à des complexes de corrépresseurs, recrutant des protéines ayant une activité histone désacétylase. La désacétylation des histones entraîne un compaction de la chromatine, conduisant à une répression transcriptionnelle. La fixation du ligand entraîne une libération des corrépresseurs, un recrutement de coactivateurs et une décompaction de la chromatine, permettant l'activation de la transcription (d'après Narlikar *et al.*, 2002; Wong *et al.*, 1997).

Notre connaissance des mécanismes mis en jeu pour réguler l'expression génique par les RNs mettent en évidence le rôle de l'interaction spécifique entre le RN et son ligand et celui de l'interaction également spécifique de ce complexe avec l'ADN. Dans ce dernier cas, le rôle éminent de coactivateurs et de corrépresseurs font l'objet des travaux actuellement en cours. Les RNs ont un rôle majeur lors de la morphogenèse, croissance, la différenciation, le métabolisme et la reproduction. Compte tenu de l'importance des RNs en physiologie humaine et animale, leur rôle dans le développement de certaines maladies et leur importance en tant que cible thérapeutique pour plusieurs maladies, une compréhension détaillée de leur fonction aura un impact non seulement en biologie humaine mais également dans le développement de nouveaux médicaments pour le traitement de plusieurs pathologies comme le cancer, le diabète, l'athérosclérose ou encore l'obésité.

Une partie des travaux réalisés dans le cadre de ce travail a consisté à évaluer le rôle de certains NRs dans l'action d'un composé organostannique, le chlorure de tributylétain

(TBT) sur la dynamique du TAB. Il est donc nécessaire de décrire les modalités d'action de certains des NRs pouvant être impliqués.

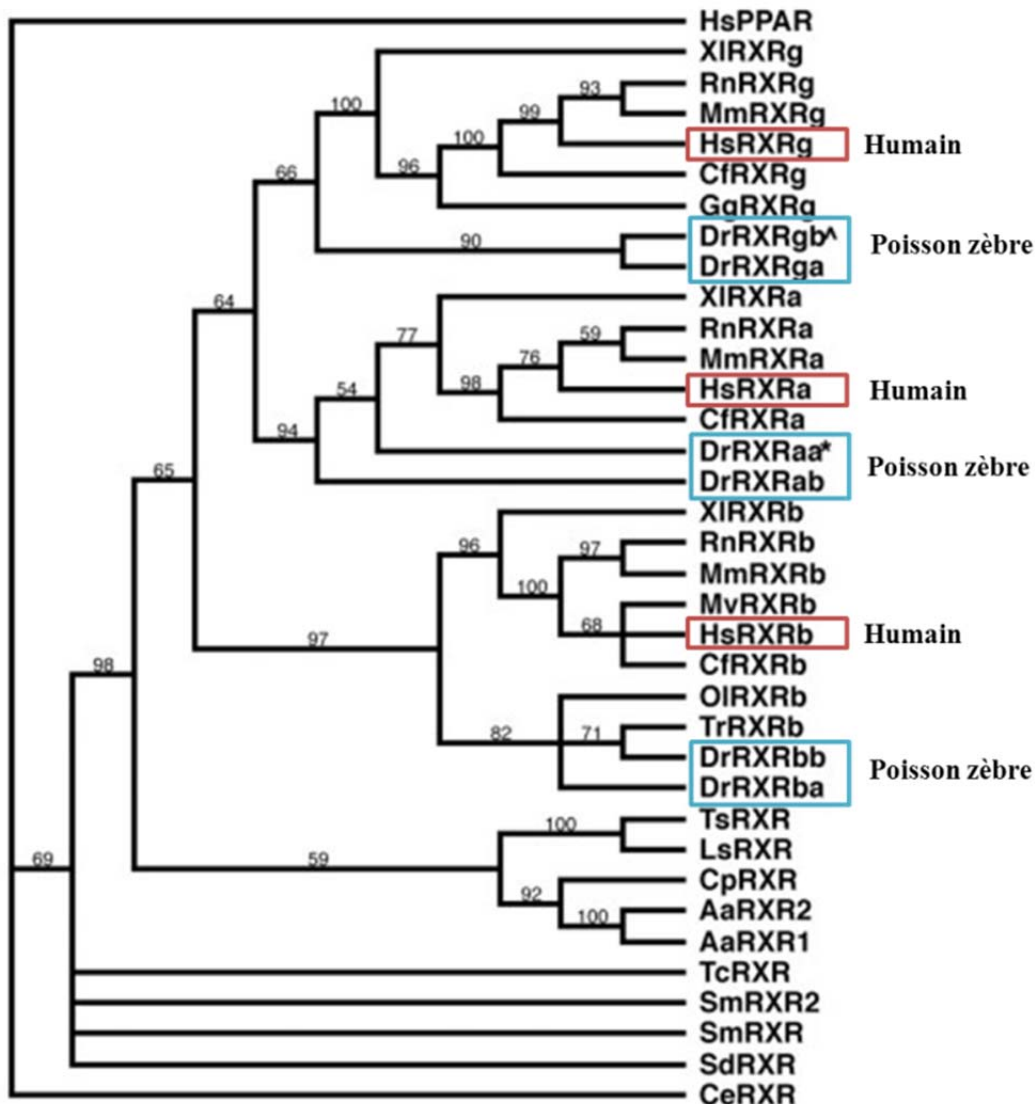
## **2.4. Retinoid X Receptors (RXRs).**

### **2.4.1. Isotypes, conservation phylogénétique et ligands.**

Les Retinoid X receptors (RXRs) sont des RNs membres importants et essentiels du métabolisme des hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes. Ils appartiennent à la famille NR2 des RNs (Tableau 3). Les RXRs sont impliqués dans divers processus cellulaires, de la prolifération cellulaire au métabolisme lipidique (Lefebvre *et al.*, 2010). Trois isotypes de RXR ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) sont exprimés, et leurs taux d'expression différentiels varient selon le type cellulaire et l'état de différenciation des cellules. RXR $\alpha$  sont plutôt prédominant au niveau de l'épiderme, les intestins, les reins et le foie, les RXR $\beta$  sont plutôt ubiquitaire, alors que les RXR $\gamma$  sont majoritairement exprimés au niveau du cerveau, des muscles et du tissu adipeux (Dawson et Xia, 2012).

Les trois isotypes de RXRs sont bien conservés entre les différentes espèces de vertébrés avec une conservation des groupes de synténie autour des gènes orthologues entre les mammifères et les poissons téléostéens (Tallafuss *et al.*, 2006; Waxman *et al.*, 2007). L'existence de co-orthologues de ces gènes dans le génome du medaka ou du poisson zèbre serait le résultat de la duplication globale du génome chez l'ancêtre des poissons téléostéens (Figure 18) (Tallafuss *et al.*, 2006; Waxman *et al.*, 2007; Philip *et al.*, 2012).



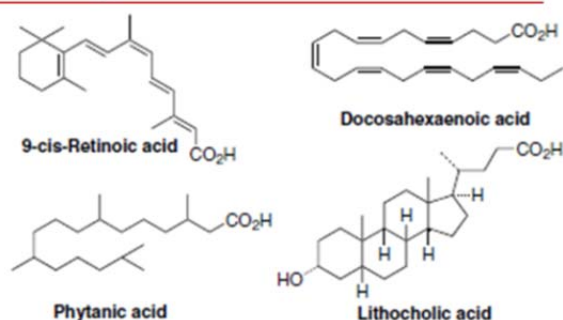


**Figure 18.** Analyse phylogénétique de la séquence des isotypes de RXRs entre différentes espèces de vertébrés (d'après Waxman *et al.*, 2007). Les séquences humaines et de poisson zèbre sont respectivement encadrées en rouge et bleu.

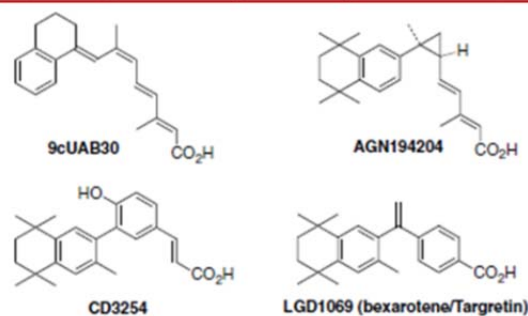
Les RXRs ont initialement été classés parmi les récepteurs orphelins car leurs ligands naturels étaient inconnus. Le « 9-cis retinoïc acid » a été proposé comme le ligand pour ces récepteurs, mais celui-ci n'a pu être détecté dans les cellules *in vitro* et *in vivo* (Wolf, 2006). Les acides gras poly insaturés (AGPI) tels que l'acide docosahéxanoïque (DHA) et un métabolite saturé de la chlorophylle, l'acide phytanique, sont également proposés comme ligands des RXRs (Dawson et Xia, 2012). D'autres composés synthétiques présentent également une activité d'agoniste ou d'antagoniste des RXRs. Ceci concerne par exemple le fluorobexarotène (FBA), le SR11237 et le CD3254 (pour une liste plus exhaustive, voir la Figure 19). D'autres composés synthétiques, comme le tributylétain (TBT) et le triphénylétain

(TPT), sont des contaminants de l'environnement et peuvent être ligands pour les RXRs (Grün et Blumberg, 2006b; Shi *et al.*, 2012) (voir Chapitre III).

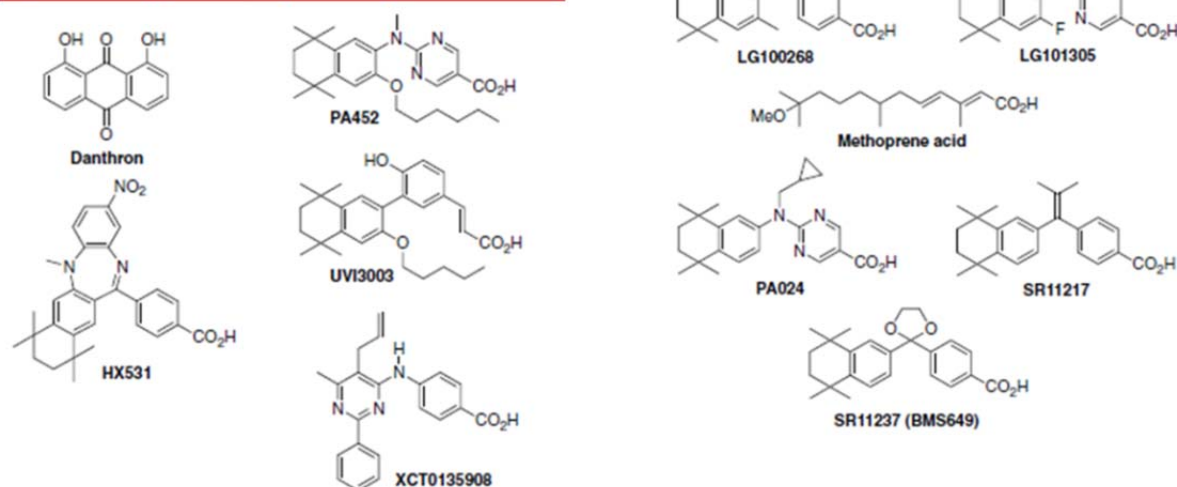
### A) Agonistes naturels RXR



### B) Agonistes synthétiques RXR



### C) Antagonistes synthétiques RXR



**Figure 19.** Structure chimique de quelques ligands naturels ou synthétiques des RXRs (d'après Dawson et Xia, 2012).

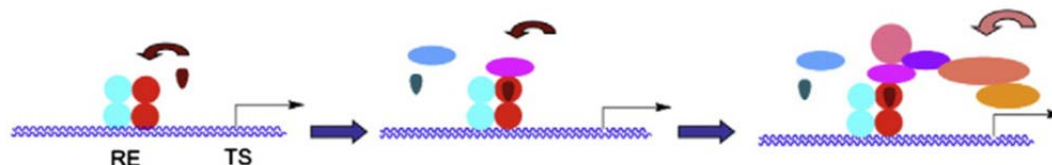
#### 2.4.2. L'activation transcriptionnelle des gènes cibles des RXRs.

L'identification des RXRs a constitué une avancée importante dans notre compréhension du mode d'action des RNs car ceux-ci représentent le partenaire obligatoire pour l'hétérodimérisation de nombreux RNs (Mangelsdorf *et al.*, 1990) bien qu'ils puissent également fonctionner sous la forme d'homodimères. Les RXR sont présents de manière ubiquitaire chez les métazoaires et leur activation se réalise à l'aide de ligands de faible poids moléculaires (Lima *et al.*, 2011; Novák *et al.*, 2008). De ce fait, ces RNs, jouent des rôles majeurs dans le développement embryonnaire, l'organogenèse et la différenciation cellulaire. Il est à noter que l'action relativement pléiotrope des RXRs provient de leur capacité à l'hétérodimérisation avec d'autres NRs mais également du fait que leurs ligands peuvent stimuler l'activation de la transcription du partenaire de l'hétérodimère dans le cas de récepteurs permissifs (Figure 20) (Lefebvre *et al.*, 2010). Les RNs activés qui ont une affinité

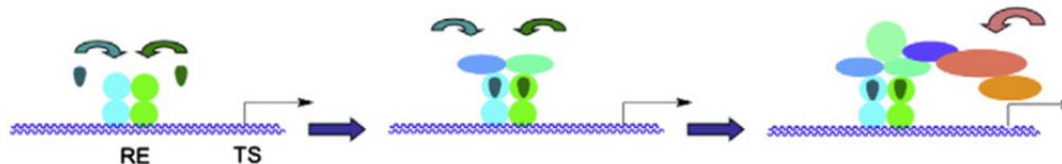
moyenne pour leurs ligands, comme par exemple les PPARs, les FXRs ou les LXRs, peuvent être considérés comme permissifs lors de leur hétérodimérisation avec les RXRs, alors que les RNs qui ont une forte affinité pour leurs ligands, tels que RARs, TR, et VDR, constituent en général des hétérodimères non permissifs avec les RXRs (Lefebvre *et al.*, 2010). Le mécanisme par lequel ces RNs interagissent entre eux reste encore très peu connu.

Parmi les RNs qui forment des hétérodimères avec un RXR, on rencontre trois types d'hétérodimères comme décrit en Figure 19.

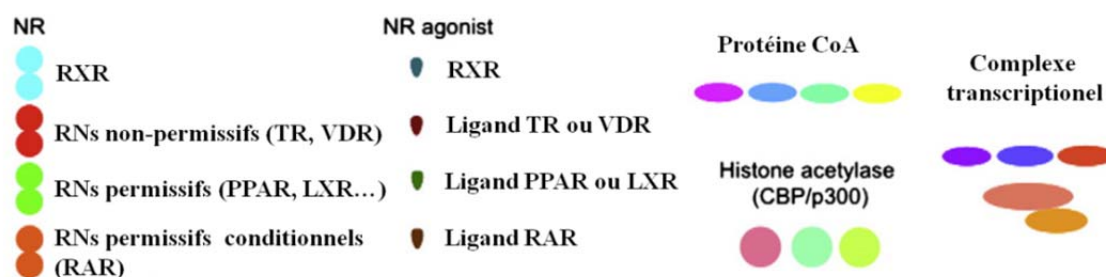
### A Transactivation non-permissive



### B Transactivation permissive



### C Transactivation permissive conditionnelle



**Figure 20.** L'activation transcriptionnelle par des hétérodimères non-permissifs, permissifs et permissifs conditionnels. A) activation transcriptionnelle par des partenaires des RXRs non-permissifs, comme TRs (thyroid hormone receptor) ou VDRs (vitamin D receptor); B) activation transcriptionnelle par des partenaires des RXRs permissifs, comme PPARs (peroxysome proliferator-activated receptor) ou LXRs (liver (oxysterol) X receptor); C) activation transcriptionnelle par des partenaires des RXRs permissifs conditionnels, comme les RARs (retinoic acid receptor) (d'après Dawson et Xia, 2012).

### Les hétérodimères non permissifs

Ce type de complexe ne peut pas être activé par le ligand de RXR. Seule la liaison d'un ligand du partenaire de RXR permet une transactivation des gènes cibles (Figure 19A).

Dans ce cas, RXR est qualifié de « partenaire silencieux ». Pour ce type d'hétérodimère, l'orientation est toujours identique : RXR occupe la position 5' sur l'élément de réponse tandis que son partenaire occupe la position 3'. On rencontre notamment dans cette catégorie les hétérodimères RXR/TR, RXR/VDR et RXR/RAR. Ce dernier hétérodimère présente toutefois une particularité. Alors que le ligand de RXR seul n'est pas capable d'activer l'hétérodimère, la liaison de l'acide rétinoïque tout *trans* au site de liaison du ligand (LBD) de RAR autorise la fixation d'un ligand de RXR ce qui augmente la transactivation d'un gène placé sous le contrôle d'un élément de réponse à RAR (RARE) (Minucci *et al.*, 1997). Donc l'hétérodimère RXR/RAR est qualifié comme étant un hétérodimère ***permissif conditionnel*** (Figure 20C).

Un ligand de RXR particulier a été identifié, le LG100754. Cette molécule agit comme un antagoniste de RXR pour l'homodimère RXR/RXR et comme agoniste dans le cas des hétérodimères RXR/PPAR ( $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  et  $\gamma$ ) (Rosemary *et al.*, 2001). Ce ligand n'active pas les autres hétérodimères comme RXR/LXR( $\alpha$  et  $\beta$ ), RXR/FXR/BAR et RXR/NGFI-B (Rosemary *et al.*, 2001).

### ***Les hétérodimères permissifs***

Les hétérodimères permissifs sont activés par les ligands des deux partenaires de l'hétérodimère, c'est-à-dire que l'agoniste RXR peut activer l'hétérodimère mais aussi l'agoniste de son partenaire. Parmi ce type d'hétérodimère nous pouvons citer les PPAR/RXR, FXR/RXR et RXR/LXR (Figure 20B).

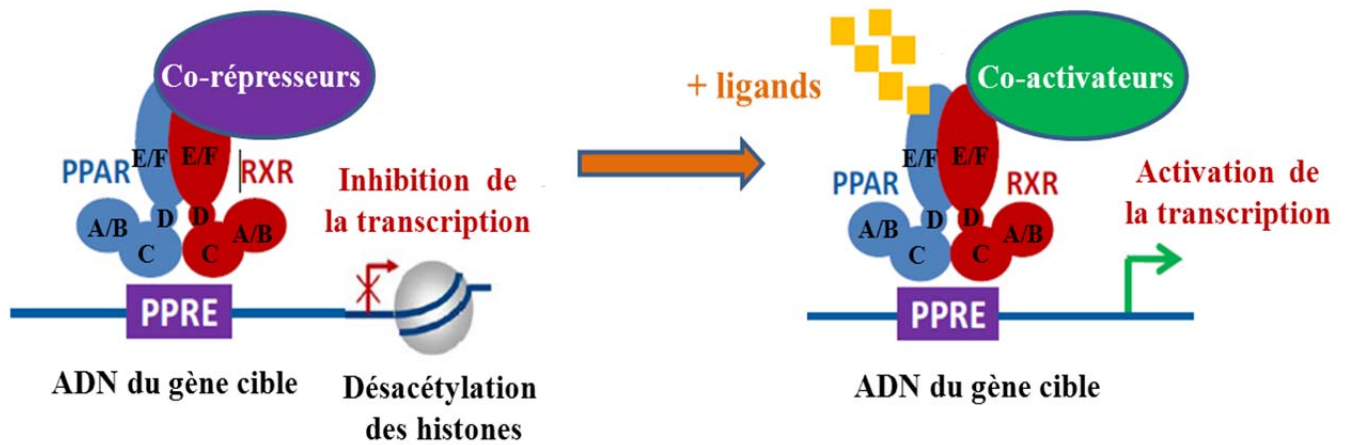
Chez les rongeurs, il a été montré que l'activation des RXRs avec un pan-agoniste LG100268, provoque une diminution du poids corporel et le taux de la consommation alimentaire, chez des rats Zucker obèses, et résistant à l'insuline (Ogilvie *et al.*, 2004). L'administration orale de cette molécule chez les rats pendant 6 semaines, provoque une augmentation cinq fois plus importante de l'apoptose du tissu adipeux sous-cutané et une diminution dans cette masse grasse. Le traitement avait aussi des effets indésirables sur le niveau de TAG qui a augmenté de deux fois. Une diminution de 75% du taux de l'hormone thyroïdienne totale T4 a également été observée (Janesick et Blumberg, 2011). Cependant, d'après certains auteurs l'utilisation potentielle d'un ligand RXR dans le but de réduire du poids peut être limitée à cause de la capacité d'un ligand RXR à activer l'hétérodimère PPAR $\gamma$ /RXR (Dawson et Xia, 2012). Il est connu que les hétérodimères RXR/PPAR $\gamma$  sont cibles de plusieurs molécules obésogènes (Grün *et al.*, 2006 ; Janesick et Blumberg, 2011). Une étude a montré qu'une molécule obésogène environnementale, le TBT, active

l'hétérodimère RXR/PPAR $\gamma$  via les RXR, car cette molécule a la capacité de se lier avec le résidu Cys 432 de l'hélice 11 du RXR $\alpha$  (le Maire *et al.*, 2009) (voir Chapitre III).

## 2.5. Peroxisome proliferator activated receptors (PPARs).

Les peroxysomes sont des organites cellulaires entourés par une membrane simple et ne contenant pas de matériel génétique. Toutes les protéines qui le constituent sont donc codées par des gènes nucléaires et proviennent du cytoplasme. Les peroxysomes sont chargés de la détoxification de la cellule par dégradation du peroxyde d'hydrogène très toxique et par la  $\beta$ -oxydation des acides à très longue chaîne.

Les récepteurs activés par les proliférateurs des peroxysomes (PPARs) sont des facteurs de transcription appartenant à la superfamille des RNs aux hormones (famille NR1, Tableau 3) et ont été initialement découverts chez les rongeurs par Isseman et Green (1990). Ces récepteurs peuvent transformer une grande variété de signaux de l'environnement, nutritionnels et inflammatoires en réponses cellulaires. Leur activité est modulée par l'interaction avec des ligands spécifiques de nature lipophiliques, qui peuvent être naturel comme les acides gras à longue chaîne (AGLC) ou synthétique (Escher et Wahli, 2000). En formant des hétérodimères avec les RXRs, le complexe PPAR/RXR modulent la transcription après s'être fixés sur des séquences spécifiques « Peroxisome Proliferator Response Elements » (PPRE) localisées dans la région régulatrice de leurs gènes cibles (Figure 21). Ils contrôlent ainsi l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique et glucidique (Berger et Moller, 2002; Barbier *et al.*, 2002). Il existe trois isotypes de PPARs qui ont été décrits  $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  et  $\gamma$ , appelé aussi FAAR ou NU1C suivant l'espèce où ils ont été clonés. Ces trois isotypes sont en général bien conservés entre les espèces. Par exemple chez le poisson zèbre, l'existence des trois isoformes et leur expression tissulaire semblent similaires aux mammifères (Ibabe *et al.*, 2002) avec une expression des trois gènes qui dépend du sexe et du stade de développement (Ibabe *et al.*, 2005). De la même manière que chez les mammifères, l'expression du gène *PPAR $\gamma$*  peut servir de marqueur des adipocytes chez le poisson zèbre (Flynn III *et al.*, 2009).

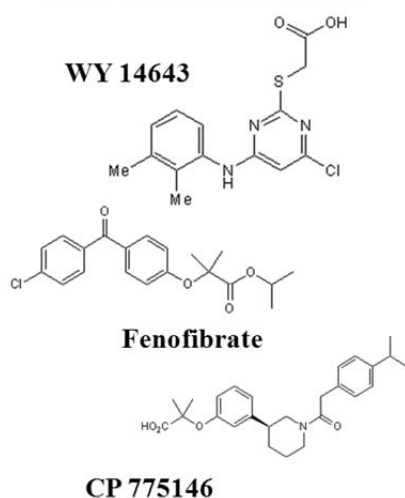


**Figure 21.** Mécanisme de transcription des gènes par les PPARs (modifié d'après Desvergne *et al.*, 2006). En absence de ligand, le PPAR interagit avec un complexe de corépresseurs qui inhibe la transcription du gène par leur activité désacétylase. Suite à la liaison de ligands naturels ou synthétiques, le corépresseur est libéré, le PPAR s'hétérodimérise avec le RXR. Ce phénomène entraîne le recrutement de co-activateurs présentant une activité acétylase qui induit la transcription du gène cible.

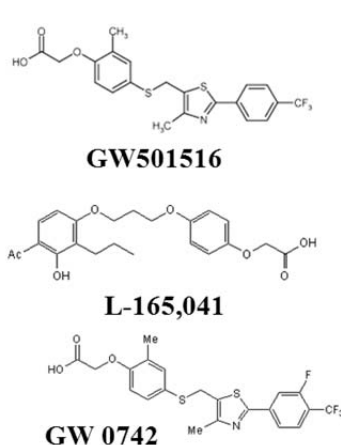
### 2.5.1. Le PPAR $\alpha$ .

Le PPAR $\alpha$  (NR1C1) est exprimé dans divers tissus notamment ceux qui ont un potentiel catabolique important pour les acides gras (Ibabe *et al.*, 2002), comme le foie, le cœur, les reins, le tissu adipeux brun et l'intestin grêle (Escher *et al.*, 2001). Cette implication des PPAR $\alpha$  dans le catabolisme des acides gras se fait via son rôle régulateur des enzymes clefs de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale et péroxysomale des acides gras (Desvergne *et al.*, 2006). Les PPAR $\alpha$  sont activés par des eicosanoïdes naturels dérivés de l'acide arachidonique tels que l'acide 8-S-hydroxyeicosatétraénoïque (8S-HETE), le leucotriène B4, ainsi que par des phospholipides oxydés provenant des oxLDL (Willson et Wahli, 1997). Par ailleurs, les fibrates, des ligands pharmacologiques et activateurs du PPAR $\alpha$ , sont utilisés cliniquement pour traiter les dyslipidémies. Les fibrates exercent leur effet hypo-triglycéridémiant, d'une part par la stimulation du catabolisme des acides gras conduisant à une diminution de la production hépatique des VLDL, et d'autre part, en activant l'hydrolyse des lipoprotéines via l'induction de la LPL et la diminution de l'ApoC-III hépatique (Staels *et al.*, 1998). La Figure 22A représente certains ligands des PPAR $\alpha$ .

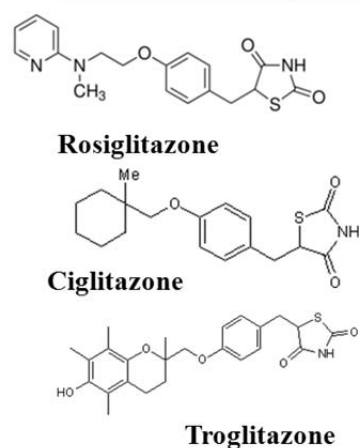
### A) Agonistes PPAR $\alpha$



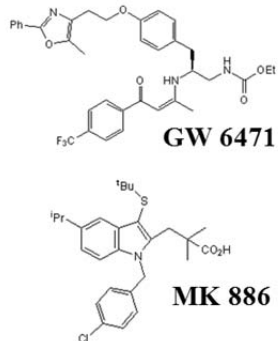
### B) Agonistes PPAR $\beta/\delta$



### C) Agonistes PPAR $\gamma$



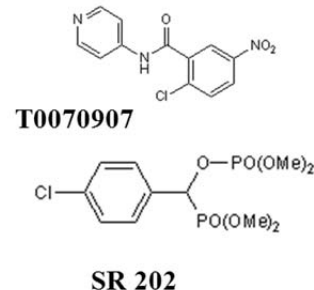
### Antagoniste PPAR $\alpha$



### Antagoniste PPAR $\beta/\delta$



### Antagoniste PPAR $\gamma$



**Figure 22.** Exemples de la structure chimique de quelques ligands des PPAR  $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  et  $\gamma$ .

## 2.5.2. Le PPAR $\beta/\delta$ .

Le PPAR $\beta/\delta$  (NR1C2) est le plus ubiquitaire des PPARs. Il est présent dans de nombreux tissus comme les muscles, le tissu adipeux, les poumons, le cerveau, et l'intestin. Dans ce dernier organe, le PPAR $\beta$  représente l'isoforme majoritaire (Escher *et al.*, 2001). Ce récepteur possède plusieurs ligands synthétiques (Figure 21B). Il est impliqué dans l'oxydation et le métabolisme des lipides ainsi que dans les mécanismes de la prolifération cellulaire. Un traitement avec les agonistes de PPAR $\beta$  GW501516 ou le L165041 semble avoir des effets hypolipémiants grâce à leurs effets inducteurs du captage musculaire des acides gras et de leur catabolisme ce qui, secondairement, modulent le métabolisme des lipoprotéines (Karpe et Ehrenborg, 2009). Un traitement des souris db/db avec les agonistes PPAR $\beta$  montre un effet positif sur la réduction de la triglycéridémie (Leibowitz *et al.*, 2000).

Une étude exhaustive réalisée chez le saumon atlantique, montre l'existence de 4 gènes pour les PPAR $\beta$ . Ces gènes sont séparés dans deux familles ssPPAR $\beta$ 1 et ssPPAR $\beta$ 2 et chaque famille contient deux isotypes ssPPAR $\beta$ 1A et  $\beta$ 1B et ssPPAR $\beta$ 2A et  $\beta$ 2B (Leaver *et*

*al.*, 2007). Il a été montré que l'isoforme ssPPAR $\beta$ 1A peut être activée par les acides gras monoinsaturés, le 2-bromopalmitate mais également l'agoniste des PPAR $\beta$  des mammifères, le GW501516 (Leaver *et al.*, 2007).

Il a été montré que les PPAR $\beta$  ont un rôle important dans le métabolisme lipidique et la différenciation cellulaire des cellules adipocytaires en culture. En utilisant des cellules avec une expression détériorée des PPAR $\beta$  les chercheurs ont observé une forte diminution de la différenciation cellulaire et de l'accumulation des lipides, diminution non récupérable même en présence de l'agoniste du PPAR $\gamma$ , le troglitazone. Par contre l'ajout d'un agoniste PPAR $\beta/\delta$  le L165041 dans le milieu de culture a potentialisé l'action de l'agoniste PPAR $\gamma$  en stimulant la différenciation adipocytaire et l'accumulation des lipides (Matsusue *et al.*, 2004).

### 2.5.3. Le PPAR $\gamma$ .

Le PPAR $\gamma$  (NR1C3) est majoritairement exprimé dans le tissu adipeux où il contrôle la différenciation cellulaire (Matsubara *et al.*, 2005), le stockage des lipides et module l'action de l'insuline. PPAR $\gamma$  est aussi exprimé dans la muqueuse intestinale à des taux plus élevés dans le côlon et le caecum que dans l'intestin grêle. A ce niveau, son expression décroît du duodénum au jéjunum (Lefebvre *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2006). Le PPAR $\gamma$  est considéré comme le régulateur clé de l'adipogenèse et pourrait permettre de faire le lien direct entre l'obésité et le diabète de type 2 (Janesick et Blumberg, 2011). L'activation de ce RN par des ligands naturels comme certains acides gras et leurs dérivés ou des xénobiotiques a montré un effet positif sur la stimulation de l'adipogenèse que ce soit *in vitro* ou *in vivo* (Janesick et Blumberg, 2011). La famille des thiazolidinediones (TZD) (Figure 22C) comme les glitazones (rosiglitazone, troglitazone...) représente des ligands puissants et sélectifs pour les PPAR $\gamma$  (Lehmann *et al.*, 1995; Good, 2005). Cependant, les agonistes du PPAR $\gamma$  sont souvent utilisés pour réduire la résistance à l'insuline, ce qui s'accompagne d'une diminution de l'hypertriglycémie et améliore ainsi le profil lipidique des patients (Pourcet *et al.*, 2006). Le PPAR $\gamma$  présente également une bonne cible pharmacologique contre la néo vascularisation rétinienne et choroïdienne en bloquant l'expression des récepteurs du facteur de croissance endothélial (VEGF) (Good, 2005). Un blocage des PPAR $\gamma$  par l'antagoniste GW9662, empêche le développement de l'obésité induite par une nourriture riche en lipides chez des souris *in vivo*, sans avoir un impact sur le taux de la prise alimentaire (Nakano *et al.*, 2006). Une autre étude a également montré qu'une diminution de 50% dans l'activité des PPAR $\gamma$  induit une protection contre l'obésité provoqué par un régime riche en lipides et à la résistance à l'insuline (Takasawa *et al.*, 2008). Une inhibition concomittante des PPAR $\gamma$  et



des RXRs par des antagonistes spécifique de chacune des deux isoformes, montre une diminution significative de taux des TAG contenu dans le TAB, le muscle squelettique et le foie (Yamauchi *et al.*, 2001).

PPAR $\gamma$  est également une cible pour les molécules obésogènes comme certains médicaments ou certains perturbateurs endocriniens. Parmi ces molécules, on trouve les analogues halogènes du bisphénol A, avec un effet obésogène indentifié dans l'espèce humaine, le poisson zèbre et le *Xénope* (Riu *et al.*, 2011), mais également les phtalates, comme le monoethylhexyphtalate, ou des organoétains tels que le TBT (Kanayama *et al.*, 2005 ; Janesick et Blumberg, 2011).

## 2.6. Liver X receptors (LXRs).

Les LXRs font partie de la famille NR1 des RNs. Ils se lient à l'ADN de gènes cibles sous forme d'hétérodimères permissifs avec les RXR (Lefebvre *et al.*, 2010). Chez l'homme et la souris ils existent sous deux isoformes, LXR $\alpha$  (NR1H3) et LXR $\beta$  (NR1H2) provenant chacune de deux gènes distincts. Chez le poisson zèbre, un seul gène *lxr* très conservé par rapport aux mammifères a pu être identifié et sa protéine représente une forte identité de séquence avec les LXR $\alpha$  de mammifères (Tableau 4) (Archer *et al.*, 2008).

**Tableau 4.** Pourcentage d'acides aminés identiques entre les protéines homologues codées par *LXR $\alpha$*  entre différentes espèces de vertébrés (d'après Archer *et al.*, 2008).

	Longueur (aa)	Poisson zèbre	Humain	Souris	Rat	Poulet	Fugu
Poisson zèbre	412						
Humain	447	69					
Souris	445	70	91				
Rat	445	70	91	97			
Poulet	409	76	75	76	76		
Fugu	363	93	78	78	77	83	
Oryzias	390	88	73	74	73	77	96

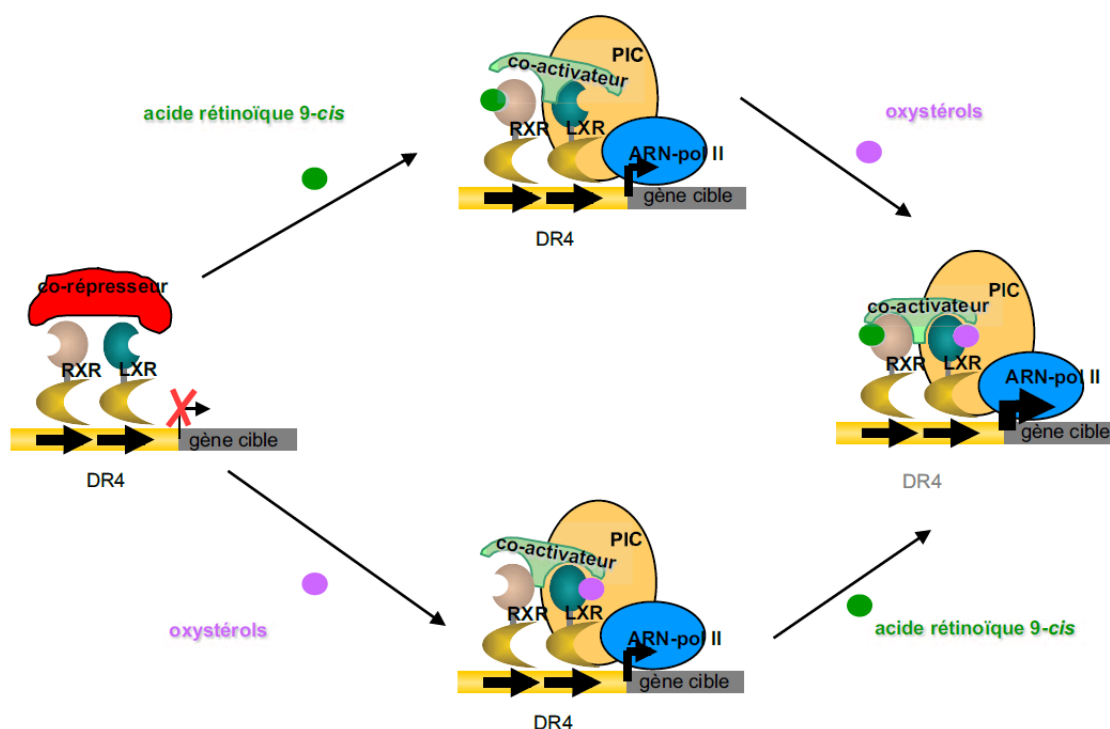
Depuis leur découverte en 1995, les LXRs ont émergé comme des régulateurs métaboliques puissants dans de nombreux tissus et types cellulaires (Laurencikiene et Rydén, 2012). Comme la plupart des RNs, les LXRs sont activés par des petits ligands lipophiliques. Dans le cas des LXRs, les oxystérols et des dérivés du cholestérol, sont des ligands naturels

(Wójcicka *et al.*, 2007; Laurencikienė et Rydén, 2012). D'autres ligands synthétiques ont été identifiés comme par exemple le T0901317 ou le GW3965 (Wójcicka *et al.*, 2007).

Une analyse du profil d'expression des LXRs, montre que l'expression de la forme  $\beta$  est plutôt ubiquitaire alors que la forme  $\alpha$  présente des niveaux de transcrits élevés dans les organes qui présentent un métabolisme lipidique actif comme le tissu adipeux ou les organes stéroïdogènes (Mouzat *et al.*, 2009). Les résultats obtenus ces dernières années suggèrent que les LXRs pourraient avoir des rôles importants dans le métabolisme des adipocytes. Toutefois, la quasi-totalité de ces travaux ont été réalisés dans des cellules ou des tissus non-adipeux et il est difficile à ce jour de connaître le rôle exacts de ces RNs dans le TAB (Laurencikienė et Rydén, 2012). Des travaux menés chez des souris KO déficientes et l'analyse de l'expression des gènes LXR $\alpha$  et LXR $\beta$  suggèrent que les LXRs interviennent dans la régulation de certains nombre de gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol et dans le métabolisme des acides gras dans le foie, les macrophages et l'intestin (Ulven *et al.*, 2005). Les LXR $\alpha$  et LXR $\beta$  sont exprimés et activés par ligands endogènes et synthétiques dans le tissu adipeux, ce qui mène à l'accumulation de lipide dans des adipocytes. Ceci indique un rôle régulateur important de LXR dans plusieurs voies de signalisation du tissu adipeux, comme le métabolisme du glucose et la synthèse *de novo* d'acide gras (Ulven *et al.*, 2005). Les LXRs stimulent la synthèse des acides gras *de novo* par la stimulation de la transcription de certains gènes lipogéniques comme le SREBP-1c (sterol regulatory element-binding protein-1c) (Wójcicka *et al.*, 2007). Un traitement de poissons zèbres adultes avec l'agoniste synthétique des LXRs, le GW3965, induit une forte expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique du foie (Archer *et al.*, 2008). Dès le stade embryonnaire, et dans les premières 24 heures après la fécondation (hpf), *lxr* est exprimé d'une manière ubiquitaire, suivit par une spécificité plus marquée pour le foie à 3 jours après la fécondation (jpf), et pour les intestins à 4 jpf, alors que chez les adultes presque tous les organes analysés lors de cette étude représentent une expression de *lxr* (Archer *et al.*, 2008). Pour des adipocytes isolées de la truite arc en ciel, l'expression des LXRs montre une augmentation importante lors de leur différenciation et lors d'un traitement avec l'agoniste T0901317. Cette augmentation est concomitante d'un niveau plus élevé de la lipolyse dans les cellules (Cruz-Garcia *et al.*, 2012). Un traitement de cellules musculaires (myotubes) humaines avec le T0901317 pendant 4 jours, augmente la lipogénèse en augmentant la synthèse des lipides *de novo* et l'accumulation des lipides (Kase *et al.*, 2007). Cela est confirmé avec une autre étude sur des préadipocytes humains en culture, les chercheurs ont montré que l'agoniste LXR T0901317 a fortement stimulé l'expression de SREBP-1c et des enzymes lipogéniques ACC-1, FAS et Stearoyl Coenzyme-A Desaturase 1 (SCD-1) dans la lignée cellulaire préadipocytaire

humaine Chub-S7 ainsi que dans la fraction du stroma vasculaire primaire (SVF). Les effets sur l'expression des gènes ont été associés à la stimulation de la lipogenèse *de novo* dans les deux modèles cellulaires, ce qui entraîne l'accumulation des lipides (Darimont *et al.*, 2006).

Les LXRs sous forme d'hétérodimères avec les RXRs se fixent sur l'ADN principalement sur le «LXR response elements» (LXRE). En absence du ligand, l'hétérodimère LXR/RXR est fixé constitutivement sur le LXRE, et dans cet état inactif ces RNs agissent comme des répresseurs de la transcription génique par le recrutement de corépresseurs (Lobaccaro *et al.*, 2001). Dans le cas contraire, en présence du ligand, la fixation d'un agoniste de LXR ou de RXR sur l'hétérodimère provoque le départ des corépresseurs et la fixation des coactivateurs ce qui crée un environnement permissif pour la transcription (Figure 23).



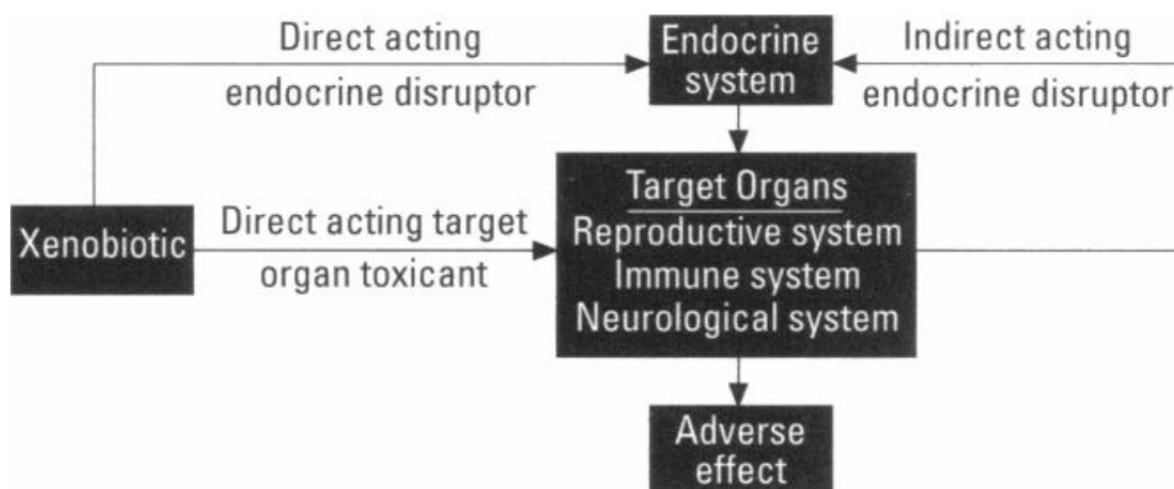
**Figure 23.** Mode d'action de l'hétérodimère RXR/LXR. L'hétérodimère RXR/LXR peut être activé à la fois par l'acide rétinoïque 9-*cis* et/ou un oxystérol. La double induction entraîne une activité additive ou synergique sans doute par un recrutement plus efficace de coactivateurs. ARN-pol II : ARN polymérase II ; PIC : Pre-Initiation-Complex ; DR4 : Direct Repeat 4 ; LXR : Liver X Receptor ; RXR : Retinoid X Receptor (d'après Peet *et al.*, 1998).

### 3. Les perturbateurs endocriniens

Le déversement en quantité et en diversité de nombreux composés issu de l'activité humaine et industrielle pose la question de leur impact sur la santé humaine et animale. Un certain nombre de molécules d'origine naturelle ou synthétique peuvent induire des

modifications non désirées du système endocrinien. Un perturbateur endocrinien (PE) peut être défini comme une « substance exogène capable d'interférer avec la synthèse, la sécrétion, le transport, la liaison, l'action ou l'élimination des hormones naturelles responsables du maintien de l'homéostasie, du développement, de la reproduction et du comportement » (Kavlock *et al.*, 1996). Selon l'OMS, «un PE est une substance ou un mélange de substances exogènes qui altèrent les fonctions du système endocrinien et qui induisent des effets nocifs sur la santé d'un organisme intact, de ses descendants ou (sous-) populations » (OMS, 2002). Les PE ne sont pas liés à une classe chimique particulière ou définis par un mécanisme d'action spécifique. Le seul caractère commun de ces agents xénobiotiques est dans leur capacité à induire des modifications du système endocrinien, qui par la suite auront des conséquences néfastes pour les organismes sains et leurs progénitures.

En effet, PE peuvent interagir directement avec le système endocrinien, e.g. pancréas, testicules, ovaires, thyroïde et parathyroïdes, TAB..., comme ils peuvent également impacter la structure et/ou la fonction d'autres tissus et organes non endocriniens et affecter ainsi indirectement le système endocrinien (Figure 24) (Kavlock *et al.*, 1996).



**Figure 24.** Schéma des interactions entre système endocrine et systèmes reproducteur, neurologique et immunologique permettant d'illustrer la complexité du mode d'action potentiel des xénobiotiques (D'après Kavlock *et al.*, 1996).

Il est connu de longue date que des substances exogènes peuvent interférer avec le système endocrinien. Des préparations médicinales sont utilisées depuis la nuit des temps pour moduler ce que nous appellerons ultérieurement le système hormonal ou endocrine. Les agriculteurs ont établi depuis bien longtemps la corrélation entre l'ingestion par voie alimentaire d'une espèce particulière de trèfle par certains ruminants et des problèmes de reproduction. Ce fourrage contient des molécules oestrogénomimétiques tels que le

coumestrol (Adams, 1995). La capacité de substances chimiques naturelles ou synthétiques à interagir avec les récepteurs des hormones endogènes était déjà établie dès les années 1930 (Marty *et al.*, 2011). A partir des années 1940, des composés stéroïdiens ont commencé à être utilisés dans le but de réguler le cycle de reproduction du bétail et d'améliorer l'efficacité et le taux de la prise de poids. Dans le même contexte, des produits, tels que l'éthinylestradiol, le mestranol, ou le noréthynodrel, ont été développés comme agents contraceptifs ou dans le but de traiter des pathologies humaines (Marty *et al.*, 2011). Vers les années 50, des scientifiques ont découvert les propriétés biocides des composées organostanniques (organoétains) et leur utilisation n'a cessé d'augmenter comme agents actifs dans plusieurs produits industriels, comme les fongicides, produits repoussant pour les rongeurs, protecteur du bois, dans les peintures anti-salissures et les stabilisateurs du polyvinyle chlorure (PVC) (Hoch, 2001).

### **3.1. Classification des perturbateurs endocriniens.**

La classification des PE peut se faire en fonction de différents paramètres: leur usage, leur origine ou leur nature chimique. Les PE peuvent être d'origine naturelle comme les phytoestrogènes ou bien synthétique comme des fongicides, herbicides ou insecticides, ou bien des molécules pharmaceutiques comme les hormones de synthèse ou bien cosmétiques comme les filtres Ultraviolets (UV). Le Tableau 5 indique certains exemples de PE, essentiellement des toxiques environnementaux.

**Tableau 5.** Les classes principales de perturbateurs endocriniens (d'après Colborn *et al.*, 1993; Colborn, 1996).

HERBICIDES ET FONGICIDES		INSECTICIDES	
<b>Fongicides</b>	Vinclozoline Procymidone Fénarimol Zirame Nitrofène Trifuraline Bénomyle Mancozèbe Manèbe Amitrole <b>Tributylétain</b> Zinèbe	<b>Organochlorés</b>	DDE Méthoxychlore DDT Lindane Dieldrine Heptachlore Endosulfan Toxaphène Mirex
	<b>Pyréthrinoïdes de synthèse</b>		Dicofol Cyperméthrine
<b>Herbicides</b>	Atrazine Alachlore Linuron	<b>Organophosphorés</b>	Parathion
		<b>Carbamates</b>	Méthomyl Carbaryl
PRODUITS CHIMIQUES INDUSTRIELS		PHYTO-OESTROGENES	
Hexachlorobenzène Biphényles polychlorés (PCB) et Dioxines Bisphénol A Styrènes Alkylphénols Phtalates		Génistéine Coumestrol Daidzéine Enterolactone Zéaralénone	

Les effets observés suite au relargage massif de PE dans l'environnement se caractérisent, entre autre, par l'observation d'anomalies du développement des animaux, des mortalités très élevées de certaines populations animales et des défauts de la reproduction. L'une des premières personnes à avoir attiré l'attention du public sur les effets indésirables des PE a été R. Carson dans son livre «Printemps silencieux» en 1962. Elle y décrit les effets du dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) sur les populations d'oiseaux ce qui a contribué à l'interdiction de l'utilisation de ce produit aux USA à partir de 1972. Les années 1970, ont été marquées par l'affaire du diéthylstilbestrol (DES), qui est un estrogène synthétique prescrit pendant plus de trente ans aux femmes enceintes afin de prévenir les avortements spontanés, les risques des prématurités et les hémorragies gravidiques. Cette

molécule est maintenant interdite. Les scientifiques ont en effet pu faire le lien entre la prescription de cette molécule à la mère et l'apparition d'anomalies majeures du tractus génital des femmes issuent de ces grossesses (Treffers *et al.*, 2001). Cette molécule est par ailleurs un obésogène puissant (Newbold *et al.*, 2009).

Des nombreux travaux scientifiques ont permis d'établir un lien de cause à effet entre la présence de xénobiotiques dans l'environnement et l'apparition d'anomalies dans les populations animales, en particulier aquatiques. Ceci concerne par exemple les composés organostanniques (Chagot *et al.*, 1990). Le bisphénol A est un autre exemple de substance très largement utilisée et dont l'interdiction devrait être définitive. Cette molécule est très largement utilisée dans les plastiques polycarbonates, les résines de polystyrène et les scellants dentaires. Elle est également utilisée comme additif à d'autres matières plastiques telles que le PVC (Casals-Casas et Desvergne, 2011). Cette molécule provoque des effets néfastes à des périodes critiques au moment du développement fœtal et postnatal, ce qui conduit à des troubles métaboliques à l'âge adulte. Elle peut agir à très faible doses largement en dessous de la dose journalière admissible actuellement (50 µg/kg/j) (Nalbone *et al.*, 2011).

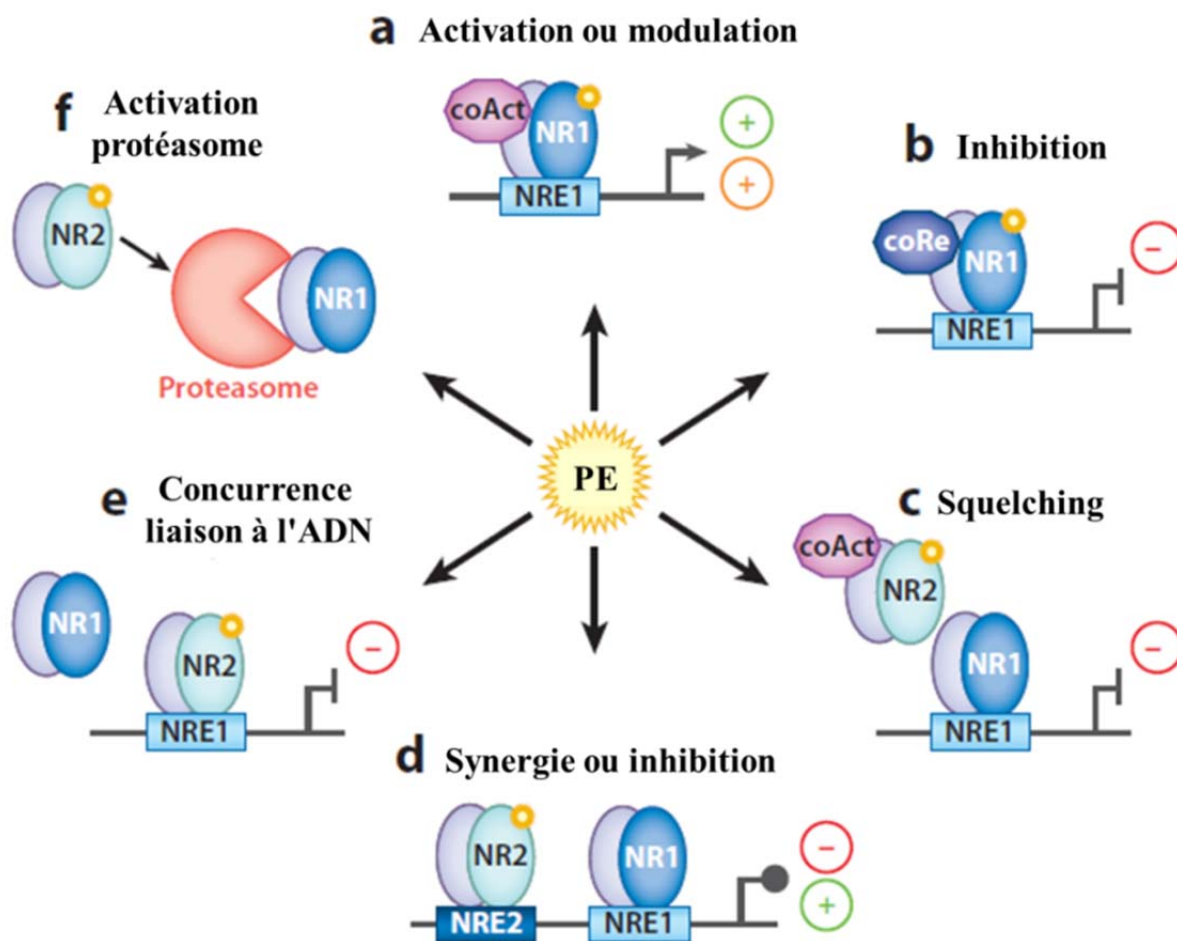
### **3.2. Mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens.**

La perturbation endocrinienne se caractérise non pas par un effet toxique, mais par une modification du système endocrinien susceptible d'entraîner un effet toxique lorsque les régulations homéostatiques sont perturbées. Les cibles des xénobiotiques sont multiples. Comme plusieurs études le montrent, les PE peuvent interférer avec les NRs selon plusieurs mécanismes (Figure 25). Ils peuvent agir comme des :

- Agonistes: ils peuvent imiter l'action d'une hormone naturelle en se fixant sur le récepteur cellulaire et entraîne une réponse normale. Ils peuvent aussi favoriser le recrutement des coactivateurs par l'hétérodimère et par la suite le déclenchement de la transcription du gène cible (Figure 25a) (Casals-Casas et Desvergne, 2011).
- Antagonistes: ils peuvent se lier au récepteur hormonal et inhiber sa liaison à l'ADN et donc empêcher la transcription d'un gène cible en prenant la place de l'hormone naturelle, ils favorisent des changements de conformation qui permettent le recrutement de corépresseurs (Figure 25b) (Casals-Casas et Desvergne, 2011).
- Agents compétitifs sur le recrutement des coactivateurs ou la liaison sur site de l'ADN : Les PE peuvent interférer d'une manière indirecte, la liaison d'un PE avec un récepteur nucléaire (exemple RN2) peut perturber le fonctionnement d'un autre

récepteur nucléaire (exemple RN1) via une interférence moléculaire comme la compétition pour recruter les coactivateurs (Figure 25c) ou pour la liaison sur les sites de liaison à l'ADN (Figure 25e) (Casals-Casas et Desvergne, 2011).

- D'autres mécanismes indirects sont : 1) la liaison de deux récepteurs nucléaires RN1 et RN2 à des séquences d'ADN voisines, ce qui peut conduire soit à une synergie ou une inhibition de l'activité de régulation (Figure 25d), 2) une activation de transcription stimulée par la fixation du PE sur un des deux récepteurs nucléaires, ce qui entraîne la dégradation de l'autre récepteur par l'activation du protéasome (Figure 25f) (Casals-Casas et Desvergne, 2011).



**Figure 25.** Schéma représentant les différents modes d'action des xénobiotiques via les récepteurs nucléaires, PE, perturbateur endocrinien; NR1/NR2, récepteurs nucléaires type 1 et 2; coAct, coactivateurs; coRe, corépresseur ; NRE1/NRE2, élément de réponse de récepteur nucléaire 1 et 2 (Casals-Casas et Desvergne, 2011).



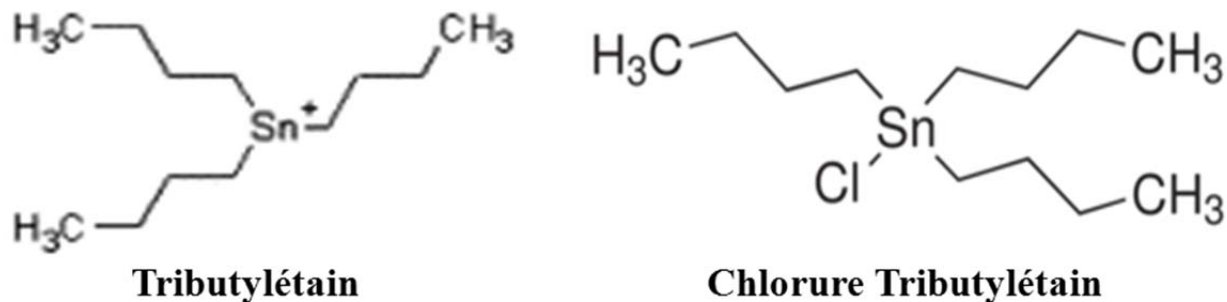
### 3.3. Les composés organostanniques.

Les composés organostanniques (organoétains) sont des produits industriels de synthèse. Ils sont des dérivés organiques de l'étain ( $\text{Sn}^{4+}$ ) et sont caractérisés par la présence d'au moins une liaison covalente entre un atome de carbone et un atome d'étain. Les composés organostanniques sont désignés comme des mono-, di-, tri-, tétra- composés organiques de l'étain et ont la formule générale  $(n\text{-C}_4\text{H}_9)_x\text{Sn-X}$ , où X est un anion ou un groupe lié de façon covalente par un hétéroatome (Okoro *et al.*, 2011). La pollution par les organoétains dans le milieu aquatique est une préoccupation mondiale. Deux groupes de composés sont toxiques pour la vie aquatique, les Tributylétains (TBTs) et les triphénylétains. Dans ce travail de thèse nous avons déterminé par quelle voie de signalisation des RNs le TBT agit-t-il sur le TAB du poisson zèbre pour induire son effet obésogénique (Chapitre III).

#### 3.3.1. Le tributylétain.

De point de vue économique, les navires et les bateaux qui possèdent des coques propres et lisses se déplacent plus rapidement et consomment beaucoup moins de combustibles. Toutefois, les objets flottant à la surface de l'eau se recouvrent rapidement d'organismes vivants sous la ligne de flottaison, car ils servent ainsi de support pour le développement de ces organismes en particulier marins (Alzieu *et al.*, 1980). Les salissures biologiques peuvent être à l'origine d'importants dommages en particulier dans la perte de la vitesse des navires, de la surconsommation de carburant, du développement des points de corrosion, de l'augmentation du poids des bouées et des équipements flottants et du rétrécissement des canalisations (Alzieu *et al.*, 1980). Au cours des années 1960, les peintures antisalissures ont été mises au point par l'industrie chimique, ces peintures sont notamment composées de produits organostanniques, comme TBT. Ce type de peinture a démontré une très grande efficacité contre l'adhésion et le développement des algues et des organismes sur la coque des bateaux. Des quantités massives de ce type de composés ont été ainsi déversées dans notre environnement.

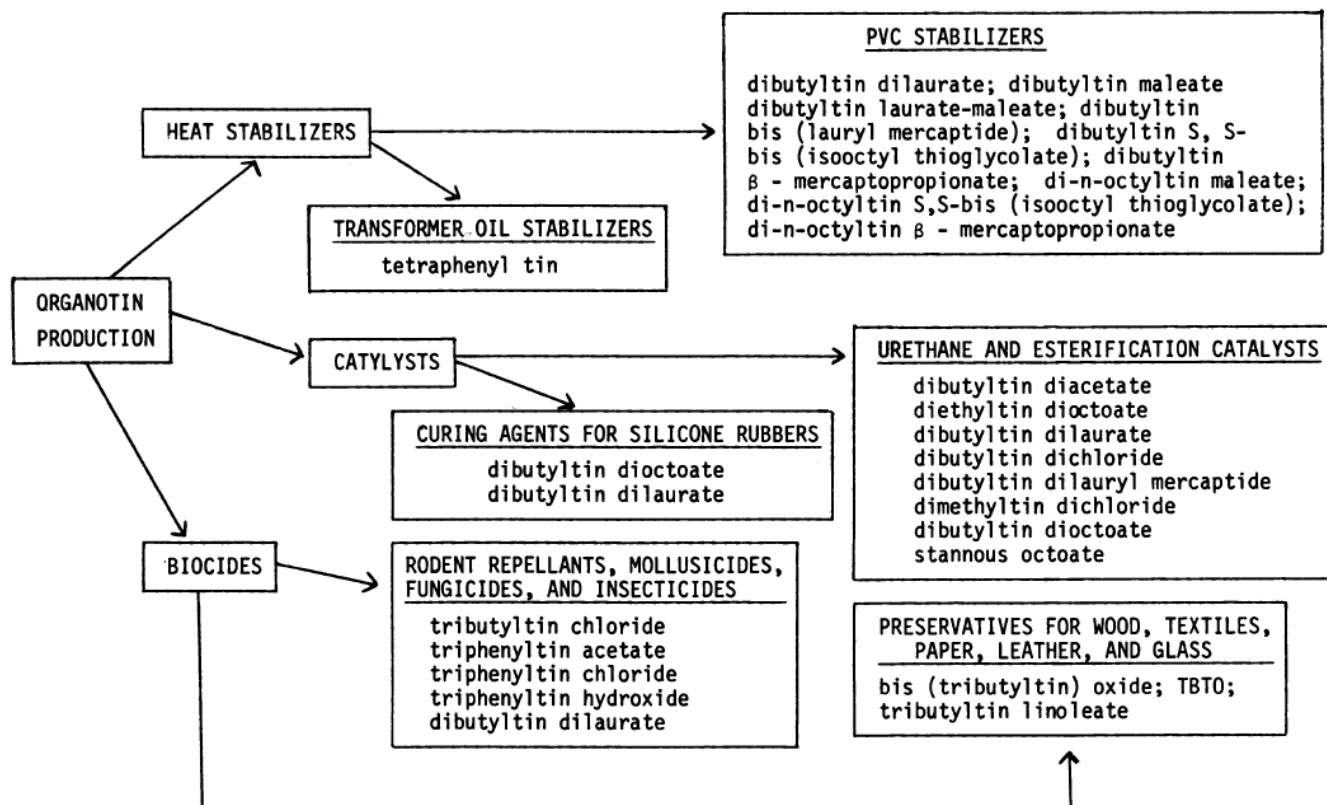
Les composés tributylétains sont des composé organostannique de formule chimique  $(n\text{-C}_4\text{H}_9)_3\text{Sn-H}$ , comportent plusieurs sous-produits: Oxyde de tributylétain, fluorure de tributylétain, chlorure de tributylétain (Figure 27), tributylétain hydroxyde, naphténate de tributylétain et tris(tributylstanyl) phosphate sont les principaux organoétains utilisés dans l'industrie des biocides (Clark *et al.*, 1988).



**Figure 26.** Structures du tributylétain et du chlorure de tributylétain.

### 3.3.1.1. Domaines d'utilisation de TBT.

L'utilisation de TBT dans les peintures antisalissure a eu un intérêt particulier, car elle représente avec son utilisation en agrochimique, les voies les plus importantes de sa libération dans l'environnement (Ayanda *et al.*, 2012). Les organoétains étaient également utilisés comme stabilisateurs de PVC avec un pourcentage pouvant atteindre 70% (Ayanda *et al.*, 2012). Comme fongicide dans des tours de refroidissement, ils agissent comme fongicides, bactéricides, insecticides mais également comme des conservateurs pour le bois, le textile, le papier, le cuir, et dans l'équipement électrique (Clark *et al.*, 1988 ; Hoch, 2001). La Figure 26 donne une vue d'ensemble des voies d'utilisations des produits à base d'organoétains. Il est intéressant de noter que les dérivés dialkyltins sont utilisés comme des stabilisateurs de chaleur et des catalyseurs, alors que les trialkyl- et les dérivés triaryltins sont utilisés principalement comme des biocides (Piver, 1973). Ces nombreuses applications commerciales des composés organostanniques ont conduit à une très forte augmentation de leur production mondiale, de quelques tonnes dans les années 50, à 30 – 35 000 tonnes/an au début des années 80 pour atteindre plus de 50 000 tonnes en 1992 (Alzieu *et al.*, 1998 ; Ayanda *et al.*, 2012).



**Figure 27.** Schéma représentant la distribution de l'utilisation des produits à base d'organoétains (d'après Piver, 1973).

### 3.3.1.2. Propriétés physico-chimiques des organoétains.

La solubilité des organoétains est variable selon le type de sous-produit, par exemple pour le chlorure de TBT, elle est de 17 mg/l dans l'eau distillé et de  $5.7 \pm 2.3$  mg/l à la pression de vapeur de 4.2,  $\text{pH} > 7$  et une salinité de 18% (Ayanda *et al.*, 2012). Dans la molécule des organoétains, la liaison carbone-étain est un point de moindre résistance, la dégradation des organoétains est réalisée par des facteurs biotique et abiotique. Le clivage de la liaison Sn-C peut se produire sous irradiation UV, qui est le processus de dégradation abiotique le plus important (Alzieu *et al.*, 1998; Okoro *et al.*, 2011). La demi-vie du TBT dans l'eau de mer varie selon les conditions du milieu (température, pH, turbidité, éclaircissement), elle peut aller de quelques jours à quelques semaines. La dégradation est plus rapide dans les eaux chargées en matière en suspension; les demi-vies calculées varient de 5,8 jours en période estivale pour des eaux turbides, à 127 jours en hiver dans des eaux dépourvues de matériel particulaire (Alzieu *et al.*, 1998), sa dégradation est aussi fortement ralentie en milieux froids.

Le TBT possède un comportement hydrophobe ce qui favorise son piégeage dans les sédiments et donc son élimination de la phase aqueuse conduisant à un stockage à long terme

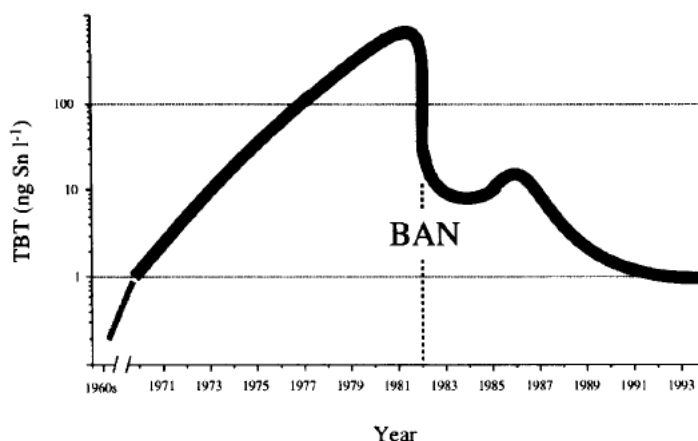
de ce contaminant. La demi-vie de TBT dans les sédiments est estimée entre plus d'une année et quelques dizaines d'années (Alzieu *et al.*, 1998 ; Ayanda *et al.*, 2012). Ce phénomène de absorption du TBT dans les sédiments semble être un processus réversible en fonction des conditions (Ma *et al.*, 2000).

### **3.3.1.3. Introduction dans l'environnement et bioaccumulation.**

Les effets délétères et incontrôlés du TBT provenant de peintures anti-salissures ont été documentés dès dans la fin des années 1970 dans le bassin d'Arcachon (Sud-Ouest de la France) par des chercheurs de l'IFREMER. A cette époque ces chercheurs ont tiré l'alarme et ont montré que le responsable majeur des problèmes rencontrés avec les huîtres, *Crassostrea gigas*, tels que la forte mortalité au stade larvaire et l'apparition d'anomalies de calcification des coquilles chez les adultes étaient due à la forte contamination des eaux par le TBT. Ces problèmes avaient provoqué une forte baisse dans la valeur commercialisable des stocks de mollusques (Evans *et al.*, 1995 ; Alzieu, 2000). Dans le bassin d'Arcachon, entre 1977 et 1981, les valeurs de concentrations en TBT déterminées dans l'eau excédaient les 100 ng/L, alors que suite à la réglementation de janvier 1982 sur l'utilisation du TBT en France dans les peintures anti-salissures, les valeurs sont repassées au niveau de 1 ng.L-1 à la fin des années 80 et au début des années 90 (Figure 28) (Ruiz *et al.*, 1996).

Dans le but d'évaluer les problèmes causés par le TBT et ses dérivés, plusieurs études environnementales ont été réalisées dans les eaux douces, marines, dans les sédiments et même dans certains organismes biologiques dans le monde entier. La contamination par le TBT et ses dérivés a été détectée partout dans les milieux marins avec des concentrations qui varient selon le temps et l'espace. Les chercheurs avaient remarqué que les taux les plus élevés se trouvent dans les régions côtières où la circulation des navires et l'activité nautique sont les plus fortes.

Avant que l'utilisation du TBT soit réglementée, les analyses des concentrations de ce produit dans les eaux marines étaient très élevées. Par exemple en 1983, des concentrations comprise entre <30 et 630 ng/l de TBT dans la rivière Crouche en Grande Bretagne, tandis que dans les eaux de la baie de Chesapeake allaient de <1 jusqu'à 1342 ng/l de TBT et entre 5 et 235 ng/l TBT dans le bassin de San Diego (Seligman *et al.*, 1986 ; Huggett *et al.*, 1992). En ce qui concerne la France, une étude réalisée sur la côte atlantique entre 1986 et 1987, montre des valeurs de TBT comprises entre 4 et 63 ng/l , alors que dans la côte méditerranéenne, une étude en 1988 a montré des concentrations qui peuvent aller jusqu'à 250 ng/l (Alzieu *et al.*, 1998).



**Figure 28.** Estimation de l'évolution historique des concentrations de TBT dans les eaux ouvertes du Bassin d'Arcachon (France) (d'après Ruiz *et al.*, 1996).

#### 3.3.1.4. Législation des produits à base de TBT et concentrations observées.

Les conséquences économiques et environnementales ont obligé certains pays à mettre en place rapidement une réglementation interdisant l'usage de TBT. Les composés organostanniques utilisés pour le traitement antifouling des coques de bateau sont interdits en France depuis janvier 1982 dans les peintures anti-salissures pour les bateaux de moins de 25m. Cette interdiction en France a été vite suivie par la Grande Bretagne en 1987, les Etats Unis en 1988, et le Canada en 1989. Depuis 2003, l'interdiction d'usage a été portée à tous les navires battant pavillon de l'UE (sauf Marine Nationale) avant que l'OMI en 2008 proscrive tous les systèmes anti-salissures susceptibles de libérer des composés organostanniques (Andral *et al.*, 2011).

Un certain nombre de données bibliographiques concernant le taux de TBT dans les eaux marines, les sédiments et aussi pour certains organismes biologiques, dans différents points dans le monde et en France sont représentés dans le Tableau 6. Ces informations peuvent être utiles afin de connaître le niveau de distribution de ce contaminant au niveau mondial.

Des années après l'interdiction de l'utilisation du TBT en Europe, Devier et ses collaborateurs ont fait une étude sur différents sites dans la région d'Arcachon, ils ont remarqué qu'en général les taux de TBT sont relativement faibles, sauf à l'entrée du bassin (site Banc d'Arguin), les valeurs de TBT détectées après la saison d'été (mois d'aout) étaient

le double des valeurs détectées initialement (début de la saison). L'explication donnée consiste en une entrée de TBT à cause du mouvement nautique durant la période d'été par une utilisation illégale des peintures anti-salissures à base de TBT, en plus la géométrie fermée de ce site, entouré de nombreux bancs de sable (Devier *et al.*, 2005). D'autres rapports montrent que malgré ces interdictions, des concentrations non négligeables en TBT et de ses dérivés, sont observées à proximité des zones portuaires importantes, en Picardie, en Bretagne et en Provence, Globalement, les niveaux de contamination apparaissent plus élevés en Méditerranée qu'en Atlantique, ce qui pourrait être dû à l'absence de marée et donc à un moindre renouvellement des eaux côtières à proximité des sources portuaires (Andral *et al.*, 2011). L'autre raison invoquée est l'absence de réglementation dans les pays d'Afrique du Nord qui pourraient contaminer la côte française. Une étude en 1999 démontre qu'il existe toujours des sources de contamination pour la côte française dans l'ensemble des ports même après l'interdiction (Michel et Averty, 1999). Ce cas de figure observé en France est similaire pour plusieurs autres pays, comme au Canada par exemple. Des chercheurs ont montré des taux de contamination élevés dans plusieurs sites vers 1995 (Chaux *et al.*, 1997).

En raison de l'utilisation généralisée de quantités considérables de TBT, cette molécule est entrée dans divers écosystèmes. Ce composé doit retenir notre attention car il est décrit comme la substance la plus toxique qui ait jamais été introduite dans le milieu marin et classé comme un des PE les plus puissant jamais produit (Evans *et al.*, 1995; Pereira *et al.*, 1999; Ayanda *et al.*, 2012). Cette molécule possède une toxicité élevée pour la vie aquatique même à de très faibles concentrations (Chagot *et al.*, 1990).

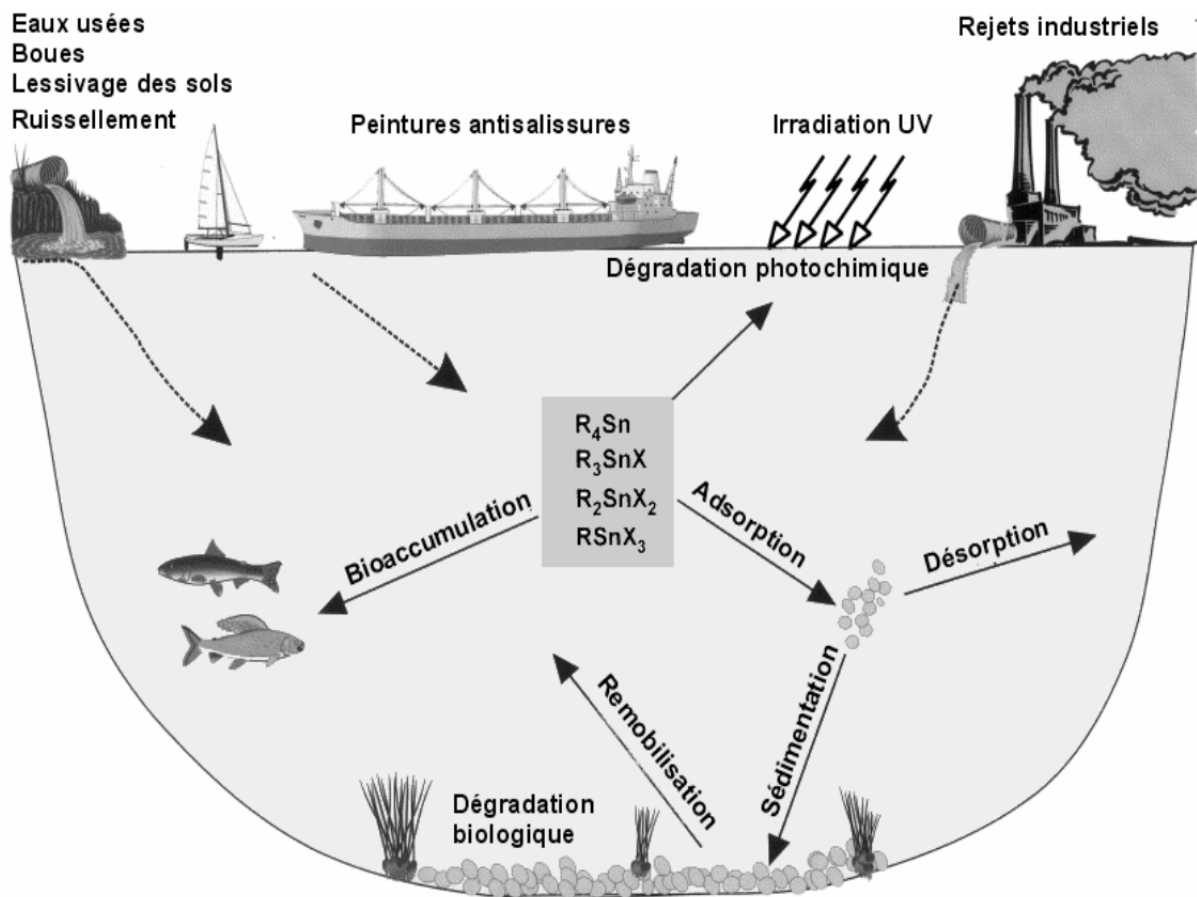
L'utilisation du TBT en tant qu'additifs à des peintures antisalissures représente l'une des voies les plus importante d'introduction du TBT dans l'environnement aquatique, avec une participation de ces applications industrielles et agricoles (Clark *et al.*, 1988; Hoch, 2001). Cette catégorie de substance nocives représente un risque non seulement pour les écosystèmes aquatiques mais également terrestres (Chagot *et al.*, 1990). Le caractère hydrophobe de TBT est le critère le plus important qui favorise son accumulation et sa persistance dans l'environnement. Son accumulation dans la microcouche de surface favorise sa photo-décomposition par des rayonnements UV, mais dans les écosystèmes aquatique et terrestre ce processus est très limité car leur piégeage dans les sédiments semble être la voie principale (Hoch, 2001).

**Tableau 6.** Quelques données bibliographiques concernant les teneurs en TBT dans les eaux marines, les sédiments, mais également dans certains tissus biologiques, en différents points du monde (d'après Michel et Averty, 1999 ; Okoro *et al.*, 2011).

Tributylétain dans les sédiments			Tributylétain dans l'eau de mer			Tributylétain dans certains tissu biologiques			
Sampling location	Year	TBT (ng/g dw)	Sampling location	Year	TBT (ng/l)	Sampling location	Biological sample	Year	TBT (ng/g dw)
West and east coast, Canada Crystal Lake, US	1995 2001-2003	< d.1-5100 1.5-14,000a	West and east coast, Canada Coast, Korea North coast of Kyoto, Japan	1995 1997-1998 2003	< d.1,-500 < d.1,-4.5 3.9-27	Coast, Canada	Mussel Mussel	1995 1996	20-1198 < 1440a,b
Port of Osaka, Japan Coast, Malaysia Great Barrier Reef World Heritage Area, Australia Alexandra harbour, Egypt Kochi harbour, India Mumbai harbour, India Fishing harbours, Taiwan West coast, India North coast of Kyoto, Japan Coast, Vietnam Sanricu coast, Japan	1995-1996 1997-1998 1999 1999 2000-2001 2000-2001 2001-2004 2002-2003 2003 2003 2005	10-2100 2.8-1100a,b < d.1-1275 1-2076 16.4-16,816b 4.5-1193b 2.4-8548b 5-2384b 1.2-19 8.3-51 2-14,000	South west coast, Spain South east coast, France Coastal waters, Greece North west coast, Spain	1993 1998 1998-1999 Not provide	9.1-79 < 0.015-0.12 < d.1,-70 0.4-196.6	Japan sea, Japan Bangladesh Aomori, Japan Coast, Korea Coast, Korea Coast, Malaysia Aqua culture area, Taiwan North coast of Kyoto, Japan Coast, Vietnam Coastline of Hong Kong, China Coastline of Hong Kong, China Sanrieu coast, Japan	Walley pollock Fish Fish Vivalves Starfish Fish Oyster Mussel Clam T. Clavigera T. Luteostoma Mussel	1991 1994 1996 1997-1998 1997-1998 1998 2002 2003 2003 2004 2004 2005	2.2-6.4 a 0.47-3 < d.1, -240 a,ba, b 16-1610 7-323 2.4-190 a, b < 3.8-417 a, b 0.8-11a 3.8-15 < d.1,-18 3.8 -170 3-287
			<b>Marinas areas along the French coasts monitored in 1997</b>		<b>Harbours along the French coasts monitored in 1997</b>				
			<b>English Channel</b>		<b>English Channel</b>				
			Dunkerque Calais Boulogne Ouireham Port en Bessin Cherbourg Saint Malo Roscoff	16.8 87.7 49 46 58.6 50-61.3 9.8-11.6 1.7	Dunkerque Calais Boulogne Le Havre Ouireham Port en Bessin Cherbourg	7-15.4 18.7-43 2.3-86.3 7.3-17.4 18.7 55-280.1 24			
			<b>Atlantic</b>		<b>Atlantic</b>				
			Brest La Trinitésur Mer Le Crouesty Pomic St Gilles Croix de Vie Les Sables d'Olonne La Rochelle Arcachon Hendaye	8.6-11.1 1.8-3.8 1.4-4.4 15.8 1.9 2.1-2.2 3.4-16.4 12.7-21.9 6.7	Brest Concarneau Lorient Saint Nazaire St Gilles Croix de Vie Les Sables d'Olonne La Rochelle Hendaye	11.6-37.4 129 15.5-98.5 8.4-30 1.9 2.1-2.2 3.3-78.4 3.3-4			
			<b>Mediterranean</b>		<b>Mediterranean</b>				
			Banyuls Gruissan Cap d'Agde Port Camargue Marseille Toulon Cannes Nice	12.5-13.6 10-11.8 4.6-27.1 66.1-115.2 40.2-137.2 37.7-67.9 59.2-189.1 72.9-199.3	Port Vendres Sète Fos sur Mer Marseille Toulon	5.7-13.6 3.8-21.4 5.0-5.3 40.2-109.3 42-237.3			
West coast, France River Thames, UK South west coast Tagus Estuary, Portugal Danish harbours and marinas, Demark North west Sicilian coast, Italy North east coast, Spain Coast, Portugal North coast, Spain South west, France Barcelona harbour, Spain North west coast, Spain	1993 1994 1998 1998-1999 1998 1999-2000 1995-2000 1999-2000 2000 2001 2002 2005	7-30 1-60 1.2-130 5.4-35b 100-5000b 3-27 51-7673 < 3.8 -12.4 50-5480 < d.1-89 98-4702 0.6-303	Northwestern Mediterranean, Spain River Elbe and North Sea The Netherlands South west Coast, Spain Strait between Denmark and Sweden Baltic Sea, Poland South west coast, Spain Coast, Portugal Northwestern Sicilian coasts, Italy West coast, Portugal Aegean Sea, Greece North west coast, Spain North west coast, Spain	1993 1993 1993 1993-1994 1997 1998 1999 1999-2000 1999-2000 2000 2001-2003 2005 2005	Deep sea fish Fish Fish Oyster Vivalve Mussel H. Trunculus Mussel H. Trunculus Mussel Bivalves Oyster Mussel	1.0-52a 66-490 a, b 9.2-67 a, b 269-96 200-300a,b 2.2-39 a 48 < 5.7-489 < d.1,-91 11-789 < 5.7-489 74-193 52.8-96			

Dw, dry weight; TBT = Tributyltin; < d.1 = below detection limit. a, Wet weight; b, ng organotin instead of Sn; c, It is not specified whether concentration is given on basis of dry or wet weight

La Figure 29 représente les sources des organoétains et leurs distributions dans le milieu aquatique. Les bactéries ont été remarquées pour avoir une capacité remarquable d'accumulation des organoétains. Les bivalves marins sont également en mesure d'accumuler des quantités importantes de TBT (jusqu'à 5 mg/g). Les poissons et les crustacés accumulent des quantités plus faibles que les bactéries et les bivalves en raison de leur possession de mécanismes enzymatiques de dégradation des organoétains (Okoro *et al.*, 2011). Leur absorption chez la souris est également faible avec une excrétion principale via les selles. Les mammifères et les oiseaux accumulent des niveaux élevés des butylétains dans leurs organes et tissus (Iwata *et al.*, 1995). Chez certains mammifères, des composés du TBT peut être métabolisée en DBT (dibutylétain) et d'autres métabolites, le TBT peut être identifié dans le tissu adipeux, le foie et les reins (Adeeko *et al.*, 2003).



**Figure 29.** La distribution et les sources des organoétains dans le milieu aquatique (d'après Hoch, 2001).



### 3.3.1.5. Effet TBT sur les organismes.

Les recherches scientifiques réalisées à partir des années 1970 ont montré que le TBT est très toxique pour un large nombre des organismes aquatiques (Smith, 1981). Les premiers effets toxique du TBT sur l'environnement côtier ont été observés dans le Bassin d'Arcachon au début des années 1980. A partir de 1975, la production ostréicole était très fortement perturbée, premièrement par une apparition des certaines déformations au niveau de la calcification des huîtres «*Crassostrea gigas*» (Figure 30). Dans certains cas, ces malformations donnent des coquilles à structure lamellaire, dans lesquelles se trouvent des poches renfermant une substance gélatineuse. Ces malformations sont d'autant plus accentuées que l'on se trouve à proximité immédiate des zones portuaires. Les perturbations imputées au TBT étaient alors également observées par la décroissance progressive de la reproduction et du recrutement des juvéniles jusqu'à des seuils proche du zéro (Alzieu *et al.*, 1982).

Une étude sur l'effet de TBT sur des larves de «*Crassostrea gigas*» a montré une forte sensibilité de ces organismes au TBT même à des concentrations très faibles (0,7 ng/L). Les chercheurs de cette étude ont établi une échelle de corrélation entre la concentration en TBT et les effets sur l'embryogenèse et le développement larvaire, depuis le seuil sans effet à 0,7 ng/L ce TBT jusqu'à une inhibition complète de la reproduction à 35 µg/L de TBT (His et Robert, 1983).



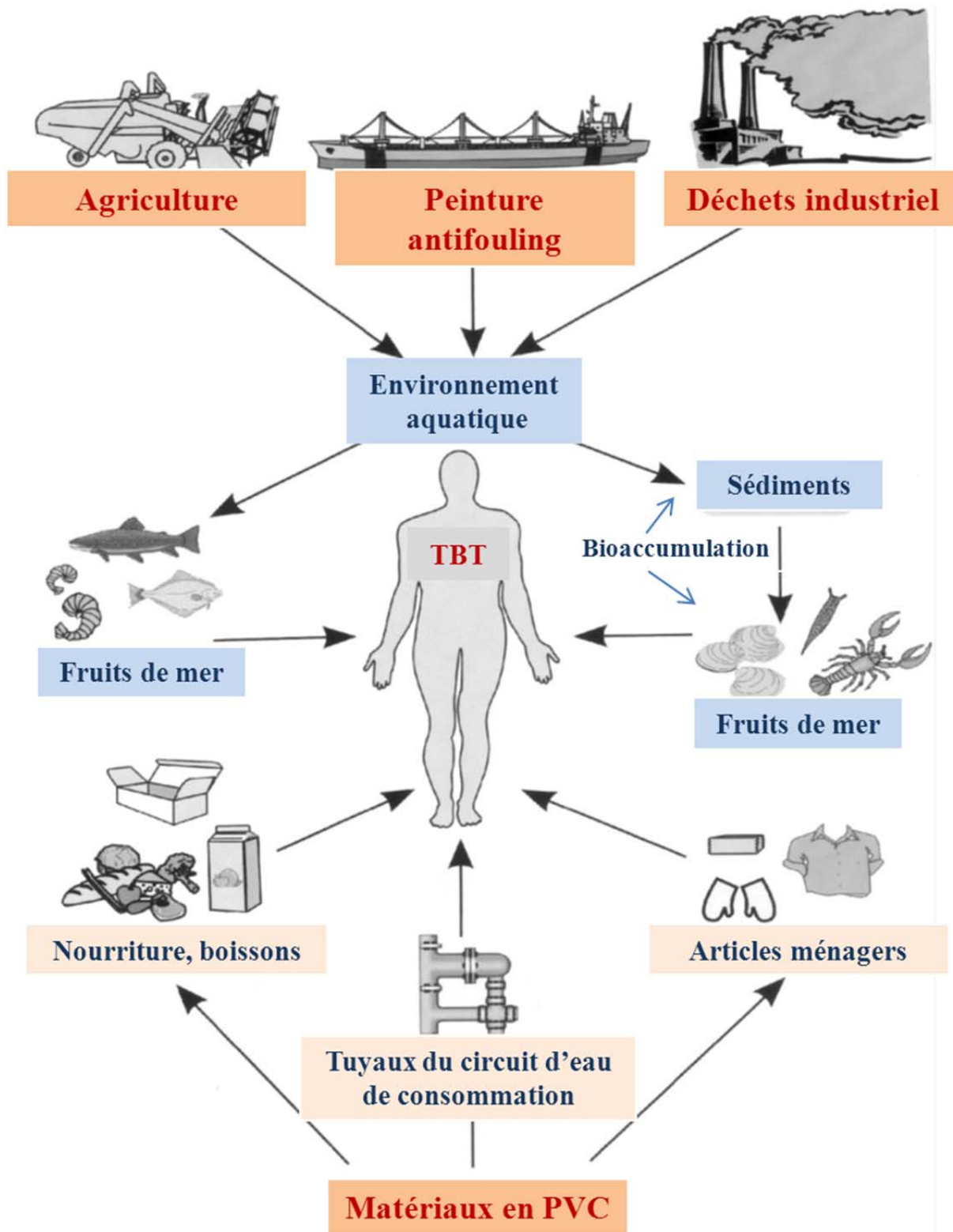
**Figure 30.** Anomalies de calcification de la valve supérieure des huîtres (A et B) comparées à l'aspect normal des huîtres témoins (C) (D'après Alzieu *et al.*, 1982).

Parmi l'altération la plus remarquable observée chez les mollusques, le TBT induit une modification drastique de la sexualité de ces animaux dénommée l'imposex. Le TBT induit une perturbation endocrinienne en diminuant l'activité ovarienne de l'aromatase. Cela se traduit par une augmentation du niveau de testostérone, croissance du pénis et stérilité comme chez les femelles de certains espèces de gastéropodes comme *Nucella lapillus* (Oberdörster et

McClellan-Green, 2002). Chez cette espèce une étude récente a montré une induction de l'imposex par un agoniste du RXR, le HX630 (Stange *et al.*, 2012). Les premières phases de l'imposex peuvent apparaître à des concentrations inférieures à 1 ng/L de TBT. Des observations de terrain ont montré que cette modification entraînait une chute des populations (Bryan *et al.*, 1988 ; Coray *et al.*, 2007). Ce phénomène se rencontre aussi chez d'autres espèces de gastéropodes pour un grand nombre de sites côtiers mondiaux, comme en mer du Nord et en Méditerranée (Morcillo et Porte, 1997). L'exposition au TBT peut également transformer des femelles en mâles comme pour le poisson zèbre (McAllister *et al.*, 2003). Le phénomène d'imposex est à ce jour le biomarqueur le plus sensible de la présence de TBT dans les environnements aquatiques (Smith, 1981). Le TBT a également la capacité d'inhiber l'activité NADH/NADPH cytochrome C réductase des mollusques (Morcillo et Porte, 1997).

### **3.3.1.6. Risques pour l'homme.**

La toxicité des organoétains pour l'espèce humaine a été mise en évidence dès 1954 par la mort de plus d'une centaine de patients traités avec un médicament contenant 10% d'iodure de triéthylétain «triéthyltin iodide» (Smith, 1981). L'utilisation généralisée des organoétains dans les activités agricoles, urbaines et industrielles des dernières décennies entraîne un risque environnemental pour l'espèce humaine (Hoch, 2001). L'exposition aux organoétains est plus précisément au TBT peut être envisagée selon deux voies 1) par une exposition directe par l'ingestion d'aliments contaminés. Cette voie est considérée comme étant la principale voie de contamination humaine par les organoétains (Antizar-Ladislao, 2008), 2) par une exposition indirecte par utilisation des produits ménagers contenant des résidus de composés organostanniques (Figure 31). Il existe très peu de données sur les niveaux de contamination et les risques sanitaires associés pour l'espèce humaine (Okoro *et al.*, 2011). Une étude réalisée sur des échantillons de poussière prise dans des sacs d'aspirateurs de 28 appartements en Allemagne a montré l'existence de 7,2 mg/kg des organoétains dont 0,08 mg/kg de TBT (Fromme *et al.*, 2005). Des analyses sur le vin au Canada ont montré que 29 sur 90 échantillons analysés soit 32% contenait des traces d'organoétains (monobutylétain, dibutylétain ou tributylétain) à des pourcentages différents, de 0,08 à 1,44 ng/ml pour le dibutylétain par exemple (Forsyth *et al.*, 1994).



**Figure 31.** Les sources d'exposition humaine aux composés organostanniques (Hoch, 2001).

En se basant sur des travaux réalisés chez les rongeurs, une dose journalière tolérable (DJT) d'une valeur de  $0,25 \mu\text{g}/\text{kg}$  (poids corporel/jour) a été mise en place (Penninks, 1993; DGHCP, 2003). En raison des incertitudes d'extrapolation de la toxicité entre l'homme et le

rat, de la cinétique d'extrapolation homme-rat mais aussi des différences inter-individuelles pour la toxicité et la cinétique, un facteur de sécurité de 100 a été utilisé pour le calcul final de la DJT. Cette DJT est fondée sur la réduction du poids comme résultats de l'alimentation de rats adultes avec l'oxyde de TBT. Cette valeur DJT a été adoptée par OMS (OMS, 1999). Des données de la littérature sur des travaux réalisés dans 22 pays pour lesquels il existe des données sur la quantité des TBT dans des produits alimentaires indiquent que 9 d'entre eux, dont la France, le Canada, l'Italie, le Japon, la Corée, la Pologne, Taiwan, la Thaïlande et les Etats-Unis, dépassent le taux résiduel moyen acceptable ou Tolérable Average Residue Levels (TARL) (Belfroid *et al.*, 2000). Cet indice est calculé à partir de la DJT (dose journalière tolérable), par exemple pour une personne qui pèse 60 kg, la formule de calcul sera comme suit :

$$\text{TARL} = \frac{(\text{DJT} \times 60 \text{ kg})}{\text{Moyenne journalière de consommation}}$$

En Norvège, l'apport moyen de la consommation était 33 ng/kg pc (poids corporel)/jour, et les gros consommateurs d'aliments contaminés avaient une moyenne de 70 ng/kg pc/ jour. Bien que ces valeurs sont inférieures à la DJT adopté par l'OMS (OMS, 1999 ; DGHCP, 2003), mais un risque potentiel peut exister pour les gros consommateurs et les personnes pesant moins comme les enfants (Belfroid *et al.*, 2000). La consommation des fruits de mer contaminés en Taïwan a été reportée sur la population générale et sur les pêcheurs. En général la concentration du TBT dans les huitres va de 0,32 à 1,51 µg/g de poids sec, les valeurs des huitres consommées par les pêcheurs étaient de 94,1 et 250 g/ jour pour la population générale et les individus les plus exposés respectivement comme les pêcheurs (Chien *et al.*, 2002). En outre, les concentrations de TBT ont été mesurées dans les balanes, les moules et les poissons le long de la côte orientale de la mer Egée. Les concentrations moyennes de TBT ont été trouvés à 235 ng/g dans les poissons, et 116 et 635 respectivement dans les moules et les balanes. Les plus fortes concentrations des organoétains ont été observées dans les balanes qui avaient été échantillonnés dans les marinas et les ports. Toutes les moules échantillonnées présentaient des valeurs au-dessous du TARL. Ceci indique une absence de risque pour le consommateur des moules. Cependant, 7 échantillons de poissons parmi les 15 analysés, affichaient des taux de TBT au-dessus du TARL, ce qui indique un risque pour les de consommateurs (Kucuksezgin *et al.*, 2011). Les niveaux de TBT ont été suivis dans les poissons de consommation courante en Iran. Les échantillons ont été achetés sur les marchés de poissons à intervalles saisonniers en 2010 le long de la côte nord de l'Iran. Les concentrations du TBT dans le muscle de ces poissons étaient de l'ordre de n.d. (non

défini) à  $4,31 \pm 0,95$  ng/g (poids humide), ce qui était inférieur au TARL pour ce pays (Rastkari *et al.*, 2012).

Parmi le peu d'études réalisées sur les effets de TBT sur l'homme, une étude a montré que le TBT peut avoir un effet inhibiteur sur les récepteurs aux œstrogènes (RE) humain à une très faible concentration de la même manière que le 4-hydroxytamoxifen (OHT) ou l'ICI 182,780, qui sont des antagonistes spécifique des récepteurs aux estrogènes (Cho *et al.*, 2012). En outre, il a été démontré que de nombreux types cellulaires subissent une apoptose après traitement avec le TBT et la mort cellulaire des cellules immunitaires. Après 4 heures de traitement par  $1 \mu\text{M}$  de TBT, des cellules T Jurat montrent des modifications morphologiques et biochimiques caractéristiques de l'apoptose (Krug, 2012).

### **3.3.1.7. Le tributylétain est une molécule obésogène.**

L'incidence et la prévalence de l'obésité et le surpoids ont considérablement augmenté au cours des trois dernières décennies dans presque tous les pays du monde. Ce phénomène n'est pas facile à expliquer avec des changements de style de vie dans les populations ayant des habitudes initiales très différentes. Cela conduit à s'interroger sur l'influence de facteurs environnementaux chimiques dans l'augmentation de la prévalence de l'obésité.

Les obésogènes sont des composés chimiques ou pharmaceutiques qui, directement ou indirectement, peuvent favoriser l'obésité en augmentant le stockage des lipides dans les cellules adipeuses existantes et/ou le nombre des adipocytes, en modifiant la quantité de calories brûlées au repos, en modifiant l'équilibre de la balance énergétique et/ou en modifiant les mécanismes de régulation de l'appétit et la satiété. Il existe des preuves de l'effet obésogène de certaines substances chimiques ou pharmaceutiques suite à des expériences réalisées sur des cultures de cellules ou des animaux de laboratoire. Très peu de données sont actuellement disponibles pour l'espèce humaine, mais un faisceau d'arguments indiquent que les organoétains et le TBT en particulier seraient obésogènes pour l'espèce humaine.

Le TBT, en plus de ses effets toxiques, montre un effet obésogène très puissant. Cette molécule peut conduire à des changements épigénétiques qui prédisposent les individus exposés à un gain de poids et l'obésité ultérieure (Janesick et Blumberg, 2012). Plusieurs chercheurs ont identifié le TBT comme étant un xénobiotiques obésogène (Kanayama *et al.*, 2005 ; Grün et Blumberg, 2009a ; Grün *et al.*, 2006a ; Janesick et Blumberg, 2012). Cette molécule induit la différenciation adipocytaire dans les modèles de cultures cellulaires et

augmente la masse adipeuse *in vivo* chez le *Xénope*, la souris (Grün *et al.*, 2006a) mais également le poisson zèbre (voir Chapitre III). Le TBT possède une grande affinité à des concentrations de l'ordre du nM avec certains RNs tels que les RXRs, le PPAR $\gamma$  (Kanayama *et al.*, 2005 ; Grün *et al.*, 2006b) et les LXRs (Inadera et Shimomura, 2005 ; Cui *et al.*, 2011) et plus précisément l'hétérodimère LXR $\alpha$ /RXR mais pas le LXR $\beta$ /RXR (Cui *et al.*, 2011). L'exposition de têtards de *Xénope* à de faibles concentrations de TBT induit une augmentation de la quantité de cellules adipeuses (Grün *et al.*, 2006a). Chez la souris, l'exposition prénatale au TBT au cours de la gestation a entraîné une accumulation prématurée de lipides dans le tissu adipeux à la naissance, et provoque une augmentation de la taille des dépôts lipidiques à un âge de 10 semaines, bien que, les souris exposées avaient une taille légèrement plus petite que les contrôles (Grün *et al.*, 2006a). Des expériences ultérieures visant à comprendre les mécanismes qui sous-tendent les effets de l'exposition prénatale au TBT ont révélé qu'un seul traitement prénatal avec le TBT ou avec un obésogène pharmaceutique, la rosiglitazone (Rosi), peut modifier le destin de cellules souches mésenchymateuses multipotentes (CSM). Ces cellules souches, dans des conditions de développement normal, peuvent se différencier en un certain nombre de cellules dont des cellules osseuses (ostéoblaste), des cellules du cartilage (chondrocyte) ou des cellules adipeuses (adipocytes) (Pittenger *et al.*, 1999). Les CSM issues du TAB de femelles gravides traitées par une dose unique de TBT ou de Rosi, étaient prédisposées à devenir des adipocytes. Les CSM provenant d'animaux traités avec des obésogènes étaient environ deux fois plus susceptibles de se différencier en adipocytes en culture par rapport aux cellules contrôles, et cette fréquence a été augmentée par la suite avec un traitement *in vitro* avec le TBT ou la Rosi (Kirchner *et al.*, 2010). La capacité de ces cellules à se différencier en cellules osseuses était par voie de conséquence inhibée (Kirchner *et al.*, 2010). Dans ces études *in vitro* il a été montré que la capacité du TBT ou la Rosi à induire l'adipogenèse à partir des CSM (Kirchner *et al.*, 2010) ou des préadipocytes 3T3-L1 (Li *et al.*, 2011) était entièrement dépendante de l'activation du PPAR $\gamma$  et RXR (Kanayama *et al.*, 2005). Le TBT montre un effet obésogène également via les RE chez la souris, mais cela semble dépendre de la concentration en TBT (Penza *et al.*, 2011). Le TBT induit une forte accumulation des lipides dans les cellules en cultures, mais un antagoniste des PPAR $\gamma$  n'arrive pas à inhiber l'effet de TBT ce qui a permis de conclure que le TBT ne passe pas via les PPAR $\gamma$  (Inadera et Shimomura, 2005). Cette hypothèse est en contradiction avec les travaux plus récents sur le rôle du TBT comme facteur inducteur de l'adipogenèse (Kirchner *et al.*, 2010). Il est à noter, que la quasi-totalité de ces travaux sont réalisés à l'aide de cultures cellulaires et ne reflète donc pas la situation retrouvée *in vivo* par les cellules adipocytaires. Le but du travail présenté

dans le Chapitre III a été de clarifier le mode d'action *in vivo* du TBT sur le TAB en utilisant le modèle poisson zèbre.

## 4. Modèle biologique

### 4.1. L'utilisation de poisson zèbre comme modèle d'étude.

Le poisson zèbre (*Danio rerio*) est un poisson Téléostéen de la famille des cyprinidés appartenant à l'ordre des Ostéichthyens comprenant près de 6 500 espèces. C'est un poisson tropical d'eau douce originaire du delta du Gange (régions nord-est de l'Inde). Les habitats naturels de ce poisson sont les rizières, les eaux stagnantes et les petits cours d'eau au débit lent. Il fait partie des animaux poïkilothermes et il possède un optimum thermique à environ 28°C. C'est un poisson omnivore mesurant en moyenne de 4 à 5 cm à l'état adulte. Il présente un dimorphisme sexuel à l'âge adulte visible dès 3 mois (Figure 32). Il est facile à élever et très peu coûteux. C'est un animal ovipare dont les femelles peuvent pondre jusqu'à une centaine d'ovules par cycle ovarien d'une durée d'environ 10 jours. Les poissons mâles peuvent être différenciés des poissons femelles car ces dernières présentent un oviducte au niveau de la papille ano-uro-génitale juste en avant la nageoire anale, en plus de leur forme et leur couleur caractéristique. L'observation de la morphogenèse chez le *Danio rerio* est facilitée de par un développement à l'extérieur du corps des femelles. Ceci permet des micromanipulations et les observations *in vivo* aisées de part la transparence des embryons/larves jusqu'à un stade relativement tardif du développement.

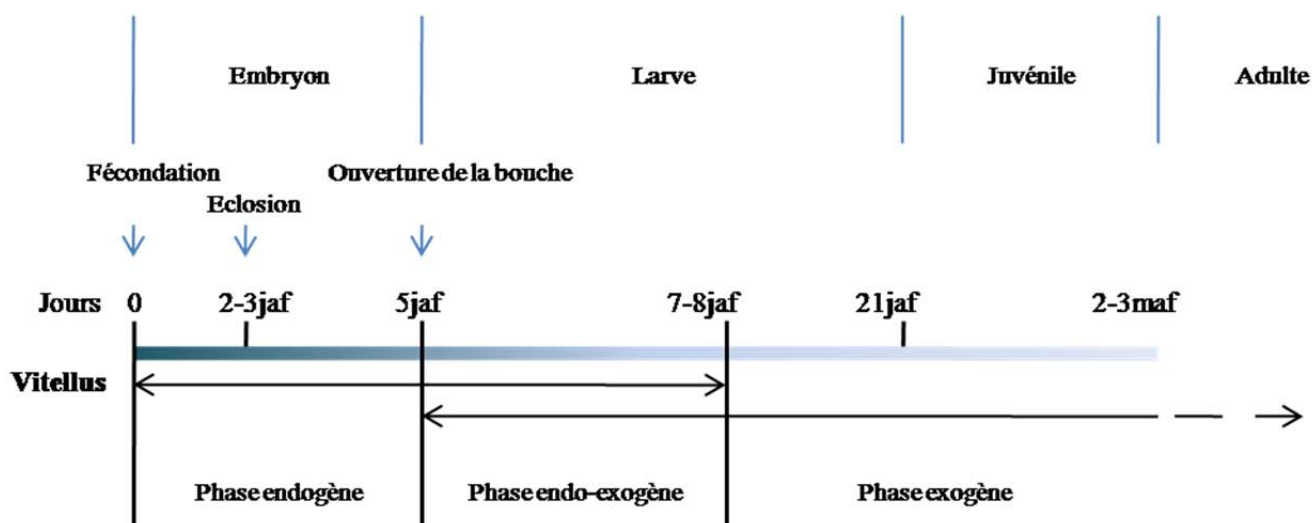


**Figure 32.** Photos représentatives d'un individu femelle ou mâle de poisson zèbre (*Danio rerio*).

Les poissons téléostéens passent par trois grandes phases nutritionnelles au cours de leur développement. Ces phases se distinguent par l'origine des nutriments utilisés (Figure 33). Entre la fécondation et 4 jpf, c'est la phase de nutrition endogène. L'embryon puis la larve se

développe grâce aux réserves contenues au sein du sac vitellin. Après l'ouverture de la bouche entre 4 et 5 jpf, la larve est capable d'ingérer des aliments exogènes et une phase de nutrition mixte (ou endo-exogène) se met en place au cours de laquelle la larve épuise ses réserves vitellines et simultanément consomme un aliment exogène adapté. Cette période se termine avec la résorption complète des réserves vitellines vers 7-8 jpf. Par la suite, la période de nutrition exogène stricte se met en place.

Le poisson zèbre est un modèle reconnu et très utilisé en génétique moléculaire du développement des vertébrés, en génétique médicale et en toxicologie et pharmacologie (voir par exemple : Jagadeeswaran, 2005 ; Sullivan et Kim, 2008 ; Raldúa et Babin, 2009; Fraysse *et al.*, 2006 ; Berghmans *et al.*, 2008 ; Jones *et al.*, 2008 ; Hölttä-Vuori *et al.*, 2010). La popularité de poisson zèbre vient de ces nombreux avantages par rapport aux autres modèles tels que la souris ou le rat: sa petite taille, une descendance nombreuse, un temps de génération très court, nous pouvons aussi avoir un grand nombre de poisson dans un espace réduit. De plus il est moins couteux. Tous cela facilite sont utilisation en particulier quand il s'agit d'un criblage à grande échelle et à visée thérapeutique. D'autres avantages liés à l'utilisation du modèle sont un génome entièrement séquencé, un grand nombre de lignées transgéniques accessibles, une communauté de chercheurs très nombreuse et une connaissance remarquable du modèle (exemple : 17 867 entrées dans PubMed au 2 novembre 2012).



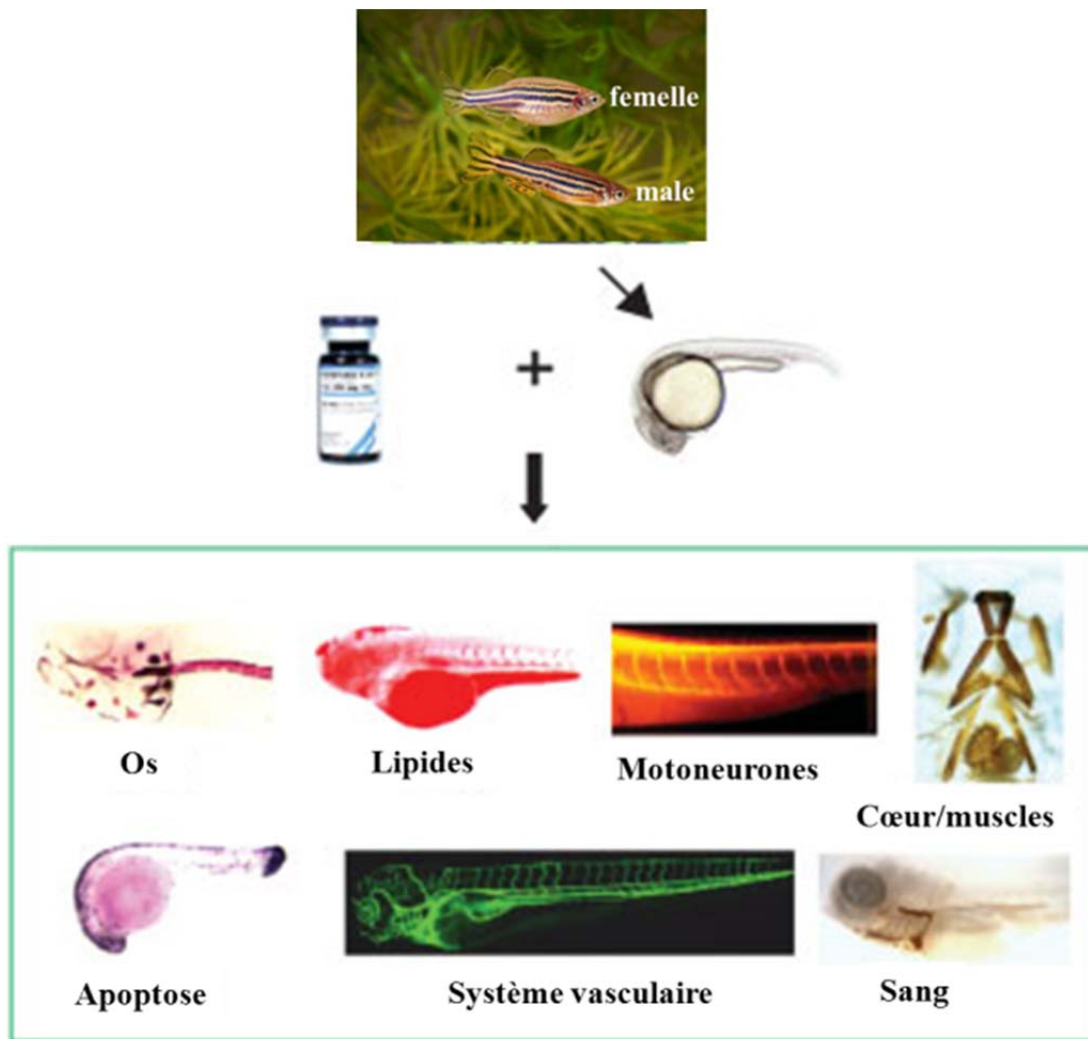
**Figure 33.** Les phases nutritionnelles au cours du développement du poisson zèbre.

En pharmacologie, des expériences ont montré que les médicaments cardiovasculaires, anti-angiogénique et anti-cancéreux sur des embryons de poisson zèbre ont des



réponses comparables à celles des mammifères (Langheinrich, 2003). Toutes les données indiquent que le poisson-zèbre représente un organisme très utile pour différents types d'études pharmacologiques (Figure 34): tels que des criblages des banques de molécules, guider la validation et l'optimisation, les études des modes d'action des molécules, des analyses de fonctionnement de certains gènes, la toxicologie prédictive et la tératogénicité, la pharmacogénomique et la toxicogénomique (Langheinrich, 2003). Ses qualités donnent à ce modèle plusieurs avantages décisifs en pharmacologie par rapport à des études *in vitro* sur cultures cellulaires et *in vivo* sur des rongeurs.

Le poisson zèbre est recommandé dans les tests réglementaires d'écotoxicité aquatique. De plus, c'est un modèle reconnu dans le contexte de la perturbation endocrinienne (Segner, 2009). En effet, il est utilisé à la fois pour le criblage des substances à activité endocrine mais également pour l'identification de leurs effets et l'étude de leurs mécanismes d'action à différents niveaux d'organisation biologique (Segner, 2009). Parmi ces études, les travaux de D. Raldúa et ses collaborateurs sur la perturbation du fonctionnement de la glande thyroïdienne chez l'embryon et la larve du poisson zèbre par des molécules chimiques synthétiques ou naturelles sont à noter (Raldúa et Babin, 2009 ; Thienpont *et al.*, 2011 ; Raldúa *et al.*, 2012).



**Figure 34.** Schéma montrant quelques essais pharmacologiques possibles en utilisant le poisson zèbre comme modèle (d'après Langheinrich, 2003).

## 4.2. Métabolisme des lipides et ontogénie de la lignée adipocytaire chez le poisson zèbre.

Le poisson zèbre est un modèle très pertinent pour étudier le métabolisme des lipides des vertébrés au cours du développement et chez l'adulte du fait des facilités expérimentales attachées à ce modèle et à un métabolisme lipidique similaire à celui des mammifères (voir par exemple : Babin and Vernier, 1989 ; Babin *et al.*, 1997 ; André *et al.*, 2000 ; Farber *et al.*, 2001 ; Marza *et al.*, 2005 ; Morais *et al.*, 2007 ; Raldúa et Babin, 2007; Babin and Gibbons, 2009 ; Flynn III *et al.*, 2009 ; Oka *et al.*, 2010 ; Hölttä-Vuori *et al.*, 2010 ; Tingaud-Sequeira *et al.* 2011 ; Tingaud-Sequeira *et al.* 2012). Une obésité induite par la nourriture peut être obtenue avec ce modèle (Oka *et al.*, 2010). La plupart des gènes clés du métabolisme lipidiques ont été caractérisés, en incluant les RNs, et la réponse aux inhibiteurs du métabolisme des lipides est généralement similaire à celle obtenue chez les mammifères.

L'épidémie mondiale d'obésité exige une meilleure compréhension des facteurs développementaux et environnementaux qui agissent sur le stockage des lipides dans les adipocytes. La transparence du poisson zèbre jusqu'à un stade relativement avancé de son développement permet d'étudier les mécanismes et les facteurs qui interviennent dans l'établissement de la lignée adipocytaire et dans sa modulation.

Des travaux récents ont permis de visualiser *in vivo* les adipocytes au sein du poisson zèbre à la coloration vitale au rouge de Nile (Flynn III *et al.*, 2009 ; Tingaud-Sequeira *et al.* 2011). Les TAG présents dans la gouttelette lipidique de l'adipocyte sont colorés en fluorescence et visualisables et quantifiables avec un microscope à fluorescence. Ces travaux ont démontré que les premiers adipocytes sont viscéraux et apparaissent durant la période larvaire autour de la vessie natatoire, et augmentent en nombre et en distribution avec la croissance des larves (Flynn III *et al.*, 2009). La différenciation des adipocytes est en fonction de la croissance de l'animal et n'est pas corrélée à son âge (Imrie et Sadler, 2010). La structure du TAB de poisson zèbre est similaire à celle retrouvée chez les mammifères (Figure 4) (Flynn III *et al.*, 2009 ; Tingaud-Sequeira *et al.* 2012). L'expression de PPAR $\gamma$  est un indicateur de la mise en place des adipocytes au cours de son développement (Flynn III *et al.*, 2009). De nombreux travaux menés chez les mammifères ont montré que ce gène a un rôle clé dans le développement du TAB et qu'il pourrait donc être une cible privilégiée de traitements à visée thérapeutique (Farmer, 2005 ; Tontonoz *et Spiegelman*, 2008).

## 5. Contexte scientifique et objectifs de la thèse

Le régime alimentaire et certains xénobiotiques peuvent modifier la signalisation endocrine et l'homéostasie des lipides, ce qui peut dans certaines situations provoquer un dépôt excessif de réserves lipidiques dans le TAB. La compréhension fine des métabolismes lipidiques et hormonaux sous-jacent à l'homéostasie lipidique a fait des progrès considérables au cours des dernières décennies. Ceci a été réalisé en particulier par une caractérisation des acteurs moléculaires impliqués et par l'utilisation de modèles cellulaires et animaux comme les rongeurs. Toutefois, l'utilisation de ces modèles se heurte à deux écueils principaux. Les modèles cellulaires ne peuvent pas rendre compte des interactions cellulaires et métaboliques complexes qui existent *in vivo* et le maintien et la différenciation des cultures cellulaires nécessitent l'utilisation de cocktails de facteurs hormonaux et de croissance qui peuvent ne pas correspondre à la situation réellement observée par les cellules *in vivo*. Par ailleurs, le développement *in utero* des rongeurs ne facilite pas les investigations sur les modalités de la

mise en place de la lignée adipocytaire au cours du développement et de sa modulation par des facteurs endogènes et exogènes. Pour ce deux raisons principales, il y a nécessité d'avoir accès à un modèle animal qui permettrait d'étudier aisément, dans un contexte *in vivo*, la mise en place de la lignée adipocytaire et sa modulation qualitative et quantitative.

Dans ce contexte, mon travail de thèse a consisté dans un premier temps à effectuer des travaux sur la caractérisation de la mise en place de la lignée adipocytaire au cours du développement du poisson zèbre (résultats non montrés dans le cadre de ce manuscrit de thèse). Ce domaine de recherche fait l'objet d'une compétition entre plusieurs équipes de recherche. Suite à la publication des travaux de l'équipe de J. Rawls (Flynn III *et al.*, 2009) et de celle de KC Sadler (Imrie et Sadler, 2010), nous avons décidé de passer à la seconde étape du programme de travail qui consiste à étudier les effets de certains facteurs exogènes sur la modulation *in vivo* de la lignée adipocytaire.

Les objectifs principaux du travail ont donc été :

- De développer une méthode simple et rapide, par utilisation du modèle poisson zèbre, pour étudier *in vivo* les effets de l'alimentation, de molécules pharmacologiques ou de certains polluants de l'environnement sur la dynamique de TAB. Nous avons ainsi mis au point le « zebrafish obesogenic (ZO) test" en définissant d'une façon la plus rigoureuse possible un protocole expérimental qui permet de tenir compte des paramètres critiques à envisager pour un tel test. Ce travail est présenté au Chapitre II et a fait l'objet d'une publication dans le *Journal of Lipid Research* en 2011 (Tingaud-Sequeira, Ouadah, Babin, 2011).
- D'étudier les effets de certaines molécules déjà identifiées ou non comme potentiellement obésogènes ou anti-obésogènes chez les mammifères sur l'adiposité du poisson zèbre. Nous avons utilisé le ZO test afin de réaliser un criblage de ces molécules. Les résultats obtenus pour certaines de ces molécules sont présentés dans les Chapitres II à IV.
- D'analyser les interactions entre l'effet des molécules et l'effet des conditions nutritionnelles. Les résultats obtenus pour certaines des molécules étudiées sont présentés dans les Chapitres II à IV.
- D'étudier et de caractériser le mécanisme d'action *in vivo* d'un obésogène, le TBT, afin de clarifier la voie de signalisation utilisée dans l'adipocyte. Les résultats obtenus sont présentés dans le Chapitre III et font l'objet d'un manuscrit prochainement soumis pour publication (Ouadah-Boussouf and Babin, 2012).

L'ensemble des travaux réalisés et des résultats obtenus permettent de proposer le poisson zèbre comme un modèle *in vivo* très pertinent pour étudier les effets de la composition de l'aliment, des molécules pharmacologiques et chimiques, y compris les PEs, sur la dynamique du TAB des vertébrés.

***CHAPITRE II***

***ZEBRAFISH OBESOGENIC TEST/  
A TOOL FOR SCREENING  
MOLECULES THAT TARGET  
ADIPOSITY***

# Zebrafish obesogenic test: a tool for screening molecules that target adiposity

Angèle Tingaud-Sequeira, Nafia Ouadah, and Patrick J. Babin<sup>1</sup>

Maladies Rares: Génétique et Métabolisme (MRGM), University Bordeaux, F-33400 Talence, France

**Abstract** Dietary and xenobiotic compounds may alter endocrine signaling and lipid homeostasis, thus inducing obesity. We describe a short-term assay method, the zebrafish obesogenic (ZO) test, for examining the effects of diet, drugs, and environmental contaminants, singly or in combination, on white adipose tissue (WAT) dynamics in live larvae. The ZO test is an intermediate step in obesity research, between *in vitro* and rodent assays, and may be also used to study the effect of environmental toxicants on the adiposity of aquatic species. The procedure, using Nile Red (NR) fluorescent probe to reveal adipocyte lipid droplets, is suitable for pharmaceutical or toxicological screening. Larvae treated at an environmentally-relevant concentration of tributyltin chloride (TBT), an environmental obesogen, exhibited a remarkable increase in adiposity, irrespective of the lipid composition of the background diet. Exogenous compounds, e.g., rosiglitazone or TBT, known to increase adiposity in the fasting state, were classified as obesogenic. Anti-obesogenic compounds favored a decrease in adiposity in the fasting state. The ZO test, using adipocyte lipid droplet size and adiposity as its endpoints, is a whole-organism alternative testing assay for obesogenic and anti-obesogenic compounds and mixtures and provides relevant information for environmental and human risk assessments.—Tingaud-Sequeira, A., N. Ouadah, and P. J. Babin. **Zebrafish obesogenic test: a tool for screening molecules that target adiposity.** *J. Lipid Res.* 2011. 52: 1765–1772.

**Supplementary key words** obesity • adipose tissue • tributyltin • endocrine disrupting chemicals • Nile Red • adipocyte • lipid droplet • organotins • human risk assessment

Obesity is the result of interplay between genetic and environmental factors and is characterized by excess fat storage in white adipocytes. Due to the increasing prevalence of obesity all over the world, research into this issue has become one of the main public health priorities. Food quality and quantity is probably the main cause of obesity; however, increasing evidence for environmental factors

has recently been revealed, such as exposure to endocrine disrupting chemicals (EDC) during early life (1, 2). Obesogens are a special class of EDCs that target adipose tissue formation and the lipid metabolism (2).

Overweight and obesity are characterized by overrepresentation of white adipose tissue (WAT). Several studies have investigated xenobiotic molecules able to modulate adipogenesis and the adipocyte lipid metabolism. Some obesity-causing chemicals are hypothesized to act as peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) agonists or estrogen receptor- $\alpha$  antagonists (2). In addition to rodent assays, most of these studies used cell models and focused mainly on adipocyte differentiation (3). The *Caenorhabditis elegans* nematode was recently used as a whole organism to screen for molecules able to regulate fat storage (4). However, one limitation of this nonvertebrate model is that the major fat storage compartment is the intestine. Evidence supporting the action mechanism of obesity-causing chemicals is under active investigation, but there is not, as yet, any convenient *in vivo* method for screening the obesogenic and anti-obesogenic molecules that target vertebrate WAT.

Zebrafish, a model organism of vertebrate development and organogenesis, is receiving increasing attention as a model for human diseases, drug discovery, and toxicology studies. Thus, zebrafish are increasingly used in drug-screening assays as an intermediate step after cell-based evaluation to prioritize drug candidates for conventional animal testing, thus reducing the number and cost of mammalian studies (5). Semitransparent zebrafish larvae offer a unique opportunity to study the effects of molecules on adipocyte biology and whole-organism adiposity in live vertebrates, as data on WAT development are now available for this species (6, 7). WAT is not found in embryos and early larvae (6, 7), although these stages are sensitive to fat metabolism effectors (8). An obesity syndrome

This work was supported by Conseil Régional d'Aquitaine (CRA) Project 200881301031/TOD (P.J.B.) and postdoctoral fellowship (A.T.S.); by French Ministry of Research and Education predoctoral fellowship (N.O.); and by Université Bordeaux 1 BQR 2009 (P.J.B.).

Manuscript received 11 May 2011 and in revised form 30 June 2011.

Published, JLR Papers in Press, July 1, 2011  
DOI 10.1194/jlr.D017012

Abbreviations: API, average pixel intensity; EDC, endocrine disrupting chemical; HFD, high-fat diet; NR, Nile Red; PPAR $\gamma$ , peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ ; SD, standard diet; SL, standard length; TBT, tributyltin chloride; WAT, white adipose tissue; ZO, zebrafish obesogenic.

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed.  
e-mail: p.babin@gpp.u-bordeaux1.fr

may be induced at adult stages by genetic and dietary factors (9, 10).

We describe a simple, rapid zebrafish larva bioassay, the zebrafish obesogenic (ZO) test, for in vivo assessment of the potential impact of diet composition, chemical pollutants, and drugs on white adipocyte lipid droplet size and adiposity.

## METHODS

### Animals

All zebrafish experiments were conducted in conformity with the Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals using protocols approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Université Bordeaux 1 (UFR Biologie). Wild-type adult zebrafish (*Danio rerio*) were initially purchased from a commercial source (Exomarc, Lormont, France). In some cases, the transparent *casper* line was used (11). Embryos and larvae were obtained by natural mating and raised in embryo water (90 µg/ml Instant Ocean [Aquarium Systems, Sarrebourg, France], 0.58 mM CaSO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O, dissolved in reverse-osmosis purified water) at 28.5°C with an 11L:13D photoperiod. Animal stages were recorded according to standard length (SL), i.e., the distance from the rostral tip of the larva to the base of the caudal fin. From five days postfertilization until they were used in the ZO test, larvae were maintained in static 5 l tanks at a density of around 30 larvae per liter and fed ad libitum with a commercial formulated food adapted for zebrafish larvae (ZF Biolabs, Tres Cantos, Spain).

### Chemicals and larva treatment

Rosiglitazone (71740) and T0070907 (10026) were purchased from SPI-BIO (Montigny le Bretonneux, France). Phenylephrine (P6126) and tributyltin chloride (TBT) (T50202) were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). 1000× stock solutions of 1 mM rosiglitazone, 10 mM T0070907, and 0.05 mM TBT were prepared in DMSO on the day of the experiment. A 20 mM stock solution of phenylephrine was prepared in purified water. The three-day animal treatment protocol included adiposity recordings before and after chemical treatment (Fig. 1). Larvae with an SL between 7.5 and 9 mm were selected for enrollment in the ZO test and incubated individually in glass containers containing 25 ml water. There was no significant variation in SL during the three-day experimental period. The first day of the protocol was devoted to ad libitum feeding with a standard diet (SD) for late larvae (TetraMin Baby, Tetra GmbH, Melle, Germany) or hard-boiled chicken egg yolk as a high-fat diet (HFD), with food remaining inside the container at the end of the period. It was not

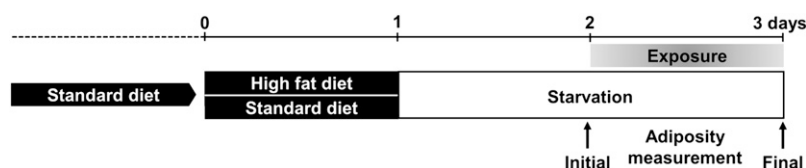
possible to detect differences in feeding rates between SD and HFD fish, and large amounts of food were detectable in the lumen of the intestine under the microscope, irrespective of the nutrient used. Total fat content by weight of SD and HFD was 10% and 55%, respectively. The starvation period started on the second day and initial adiposity was measured at the end of the second day using Nile Red (NR) staining and fluorescence microscopy or triacylglycerol content (see below). Each group of animals consisted of 10 larvae of similar size and initial adiposity. They were incubated individually in glass containers containing 25 ml medium and remained in the fasting state under static conditions during exposure to selected compounds or vehicle alone (0.1% DMSO) for one additional day. No mortality was observed at the concentrations used in either control or 24 h exposed animals. Final adiposity in exposed and control animals was recorded after 24 h using NR staining and fluorescence microscopy. Apart from changes in adiposity levels, there was no apparent qualitative behavioral or morphological phenotype associated with these dietary and pharmacological treatments.

### Nile Red staining

A 500 µg/ml stock NR (N3013) (Sigma-Aldrich) solution was prepared in acetone. Just before use, the working solution was obtained by 1/100 dilution of the stock solution in fish water. Live fish were then exposed to NR working solution in the dark for 30 min at 28°C. Under these conditions, adipocyte NR staining was saturated, as the intensity of the fluorescent signal did not increase after longer exposure. The fish were then rinsed twice with fish water for 5 min, anesthetized in 2-phenoxyethanol (P1126) (Sigma-Aldrich) diluted 1/2000 in fish water for 5 min, and observed under a fluorescence microscope. NR staining was performed twice, once before the one-day exposure period, to measure initial adiposity, and again afterwards, to measure final adiposity. The initial staining dissipated to background levels before the second staining (data not shown).

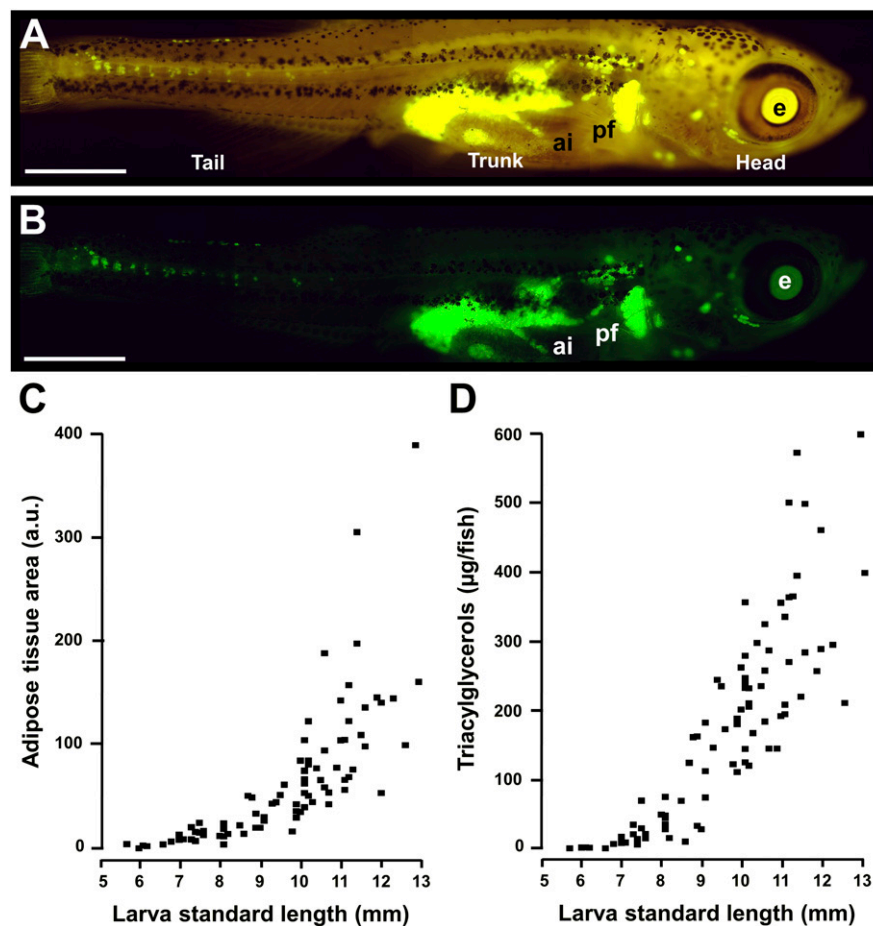
### Quantitative analysis of whole-mount fluorescence signals

Image acquisition quality is a critical point for further analyses, and the presence of food inside the intestinal lumen may interfere by quenching signals from NR-labeled perivisceral WAT. As 24 h starvation is sufficient to empty the zebrafish larva digestive tract, all fish processed for image analyses were starved for that period prior to NR staining. Differential interference contrast and fluorescence images were obtained on anesthetized larvae using a Nikon Eclipse E1000 (Nikon, Champigny sur Marne, France) microscope fitted with Nomarski optics and a Nikon Intensilight C-HGFI unit. Larvae were imaged in water and returned to the medium within approximately 1.5 min. A TRITC filter (EX 540/25, BA 605/55) was used for differential interference contrast and fluorescence image superposition (Fig. 2A)



**Fig. 1.** Diagram of the ZO test protocol used to prepare larva exposure and measure adiposity. Zebrafish larvae were nourished with SD during their growth and then divided into two groups. The first one received SD for one day and the second HFD for one day. This was followed by a one-day starvation for both groups. Larvae were then exposed to the selected compounds or to vehicle alone for one additional day in a fasting state. Whole-body adiposity was measured, using Nile Red staining and fluorescence signal quantification, before and after exposure to the compounds. Evaluations were carried out on control animals at the same times.





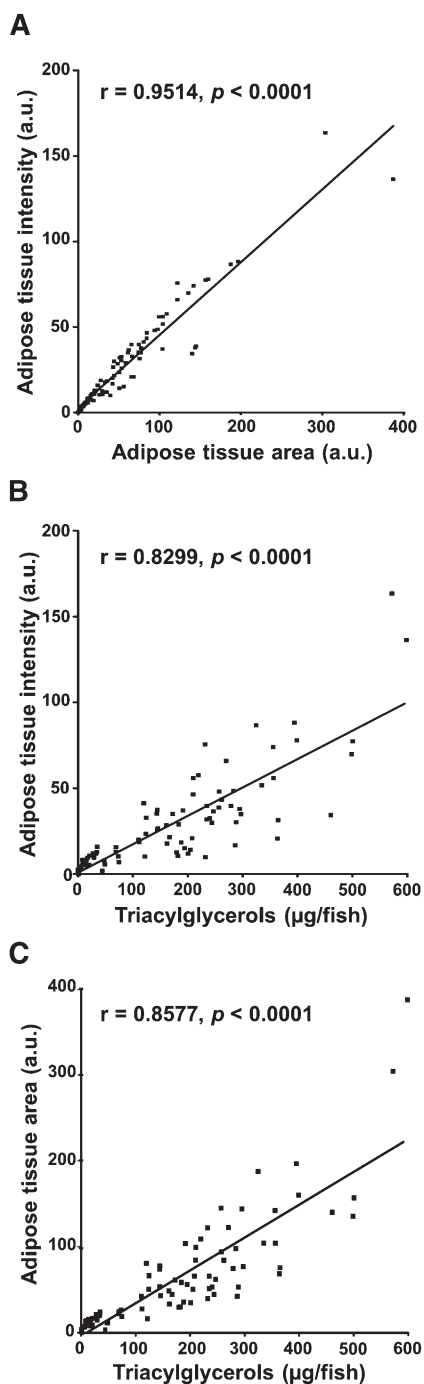
**Fig. 2.** In vivo quantitative assessment of WAT in zebrafish larvae. A: Lateral view under a fluorescence microscope after NR staining, using a TRITC filter. Anterior part to the right and dorsal part to the top. SL of the larva was 8.2 mm. B: Lateral view of the same animal under an HQ-FITC-BP filter with adipocytes stained green. C: Relationship between WAT fluorescence area after NR staining and larva SL. D: Relationship between triacylglycerol content per larva and larva SL. A total of 88 larvae were selected, with a broad distribution of SL, from 5 to 13 mm. Larvae, on a SD background, were starved for one day before sampling. Scale bar, 1 mm. ai, anterior intestine; e, eye; pf, pectoral fin.

and an HQ-FITC-BP filter (Ex 460-500, BA 510-560) for fluorescence quantification (Fig. 2B). Images were acquired with a Nikon DXM1200 camera and LUCIA G software (version 4.81) and saved in high-resolution (3,840 × 3,005 pixels) tagged image file format (TIFF). All image series for quantification were obtained at the same settings. Quantitative analysis of NR fluorescence signals was performed using free-processing ImageJ software (National Institutes of Health, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), according to the protocol previously described (12). Three images (head, trunk, and tail) were recorded per larva at the magnification used. The images were combined to produce an overall view of the larva for fluorescence quantitation (Fig. 2B). Background fluorescence was estimated by analyzing average pixel intensity (API) values in image areas that did not contain any WAT, i.e., the background threshold, and this background was calculated individually for each image. To calculate the background levels, the images were first converted to 8-bit grayscale, inverted, and thresholded. WAT and individual adipocytes were then selected using the “wand tool” function of the computer program. Selected areas were transferred to the original three-channel image (red, green, and blue), the inverse selection was created, and the API for the background was calculated. This background threshold was then removed by subtracting the background API from each pixel in the image. Selected WAT areas,

including individual adipocytes, were transferred to the subtracted image, and finally, the API of the selected areas was calculated (see ref. 12 for more details). Signal area and intensity were measured and expressed in arbitrary units. FocalCheck™ fluorescence microscope test slide 1 (Invitrogen) was used to evaluate microscope excitation-source stability by plotting the area and signal intensity of the beads over time. Periodic imaging of microbeads using the same acquisition parameters did not reveal any differences ( $P > 0.05$ ) over at least a two-day period, demonstrating the stability of the excitation source (ref. 12, data not shown). The analytical precision of the quantification method was determined from blind duplicate pairs of NR fluorescence signal areas and was defined as the mean absolute difference between duplicates divided by the mean of the duplicates times 100. The precision value was 0.49%.

#### Triacylglycerol assay

The area and intensity of NR fluorescence signals were recorded for each larva and were then processed to assay the whole-body triacylglycerol content using a previously described protocol (13) with modifications. Animals were starved for 24 h before NR staining and euthanasia to avoid any contamination from food triacylglycerols in the digestive tract. Glass tubes were used throughout triacylglycerol extraction. Briefly, whole animals



**Fig. 3.** Relationship between WAT fluorescence intensity and area after NR staining and triacylglycerol content per larva. A total of 88 larvae were selected, with a broad distribution of SL, from 5 to 13 mm. Larvae, on a SD background, were starved for one day before sampling. Adipose tissue intensity and area values were expressed in arbitrary units (a.u.). A: Relationship between adipose tissue fluorescence intensity and area after NR staining of live zebrafish larvae. B: Triacylglycerol content per larva was plotted against WAT fluorescence intensity. C: Triacylglycerol content per larva was plotted against WAT area values. The slopes of the calculated linear regressions were significantly different from zero at  $P < 0.0001$ , and the variables were significantly correlated, with nonparametric Spearman correlation ( $P$ , two-tailed) as shown on the graph.

were homogenized mechanically in 400  $\mu$ l homogenizing buffer (PBS, pH 7.4, containing 10 mM EDTA). Homogenates were transferred to tubes containing 2 ml isopropanol:hexane (4:1) solution. After shaking, samples were left in the dark for 30 min. Hexane:diethylether (500  $\mu$ l,1:1) solution was then added. Samples were mixed and left in the dark for 10 min. One milliliter water was then added, samples were mixed and left standing until the two phases separated (20 to 30 min). Eight hundred microliters of the supernatant were transferred to new tubes and processed until complete evaporation. Two hundred and fifty microliters of colorimetric reagent were added per tube, and the triacylglycerol content was evaluated by microassay, using a commercially available kit (Biolabo S.A., Maizy, France). In parallel, a standard curve was plotted using 0, 10, 20, 30, 40, and 50  $\mu$ g triolein in 400  $\mu$ l homogenizing buffer. Added triolein was extracted, processed, and treated identically to the other samples. The reaction was allowed to develop at 37°C for 1.5 h, with shaking at 220 rpm. Only samples within the standard curve were taken into account for data analysis.

### Statistics

All statistical analyses were conducted using SPSS 17.0 micro-computer software (SPSS, Chicago, IL). At least three independent experiments were performed per condition with 10 larvae per group. To offset the variability among independent experiments in terms of the decrease in adiposity in control groups after a one-day starvation period and to have a view of negative or positive quantitative variations from initial adiposities, values presented in graphs are mean  $\pm$  SEM of representative experiments. This procedure did not preclude highly reproducible absolute differences in adiposity between control and chemically treated groups in independent similar experiments. Normality of the distribution was assessed using the Shapiro-Wilk test (0.01% risk). Levene's test was used to verify the equality of variances. In experiments comparing a control and a chemically treated group with animals that received the same background diet, the statistical significance of difference in mean values was determined by Student's  $t$ -test. In experiments combining PPAR $\gamma$  agonist and antagonist and their controls, the statistical significance was determined by single-factor ANOVA followed by the post hoc Dunnett's test. A  $P$  value of 0.05 or less was considered significant. In the experiment combining rosiglitazone or TBT treatment with HFD, we used the univariate general linear model to check the individual effect of each factor and to determine whether there was any interaction between factors.

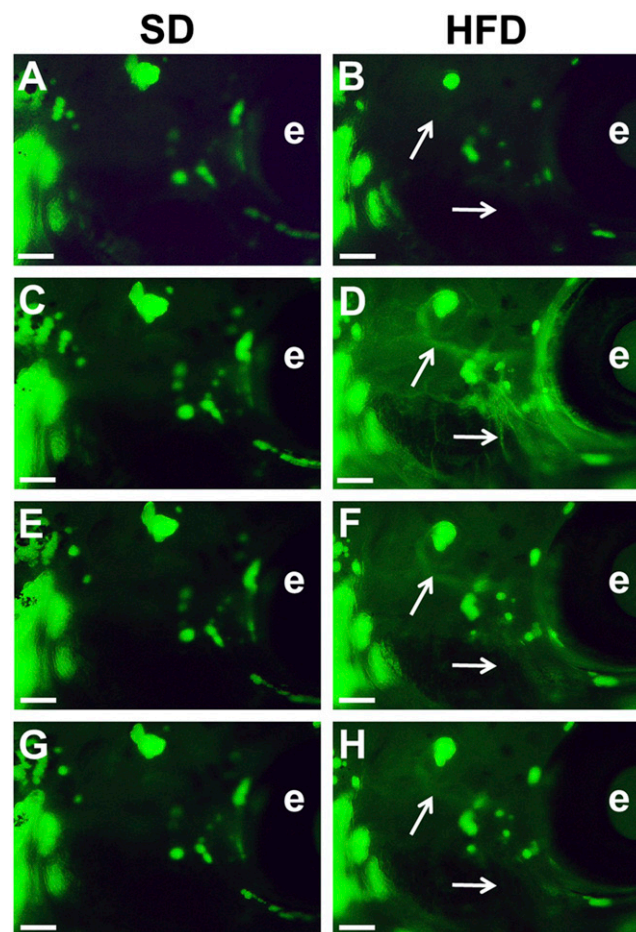
## RESULTS AND DISCUSSION

The first step was to perform *in vivo* staining of zebrafish adipocytes with vital NR using a rigorous feeding protocol (Fig. 1). As previously described, NR was found to be a selective fluorescent vital dye for adipocyte intracellular lipid droplets (6, 14). Relationships between WAT fluorescence area and SL and between triacylglycerol content and SL were established (Fig. 2C, D). The adipose tissue signal area was strongly correlated with intensity in larvae with an SL of 5 to 13 mm (Fig. 3A). There was also a very good correlation between whole-mount NR fluorescence adipose tissue signal intensity and area and whole-larva triacylglycerol content (Fig. 3B, C). During postembryonic zebrafish development, WAT appearance is correlated with size rather than age (7). We found that larvae suitable to the ZO test had to have an SL between 7.5 and 9 mm to

obtain an adipose tissue fluorescence area ranging from 10 to 60 arbitrary units after NR staining. These values were within the linear range between adipose tissue fluorescent area and triacylglycerol content of individual larvae (Fig. 3C). In this SL range, the main anatomic locations of WAT were established (Fig. 2B). The main perivisceral WAT mass spreads from the anterior dorsal limits of the general/visceral cavity to the rectum, above and around the two swim bladder chambers, closely associated with the first loop of the anterior intestine, as well as the posterior intestine, close to the rectum. Other main locations are at the base of the pectoral fins, surrounding the eyes (individual adipocytes or clusters), and in the dermis of the tail.

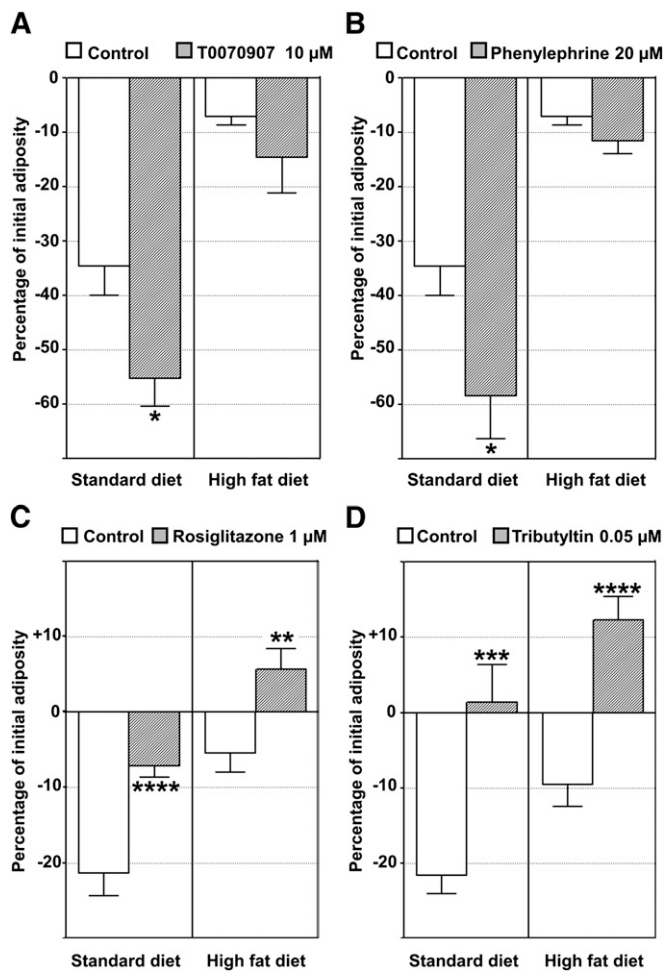
We then investigated the effect of starvation and initial diet lipid content on the adiposity of live animals. Under the experimental conditions used, individual adipocytes were easily identified under the microscope, and their size was rapidly sensitive to the conditions applied. Zebrafish larvae were fed SD or HFD for one day, starved for one day, and then exposed or not to the chemicals for one additional day in starved condition (Fig. 1). HFD induced an increase in NR lipid staining in the blood vessels of the larvae after feeding (Fig. 4D), which gradually returned to basal levels during fasting (Fig. 4B, F, H). These variations in NR staining in the circulatory system were not observed in SD larvae (Fig. 4A, C, E, G). A one-day starvation in the presence of 0.1% DMSO as a vehicle control induced a decrease in whole-body adiposity, as evaluated by NR fluorescent staining ( $-19.77 \pm 1.87\%$  in SD versus  $-11.83 \pm 0.93\%$  in HFD background,  $P < 0.005$ ,  $n = 10$  independent experiments analyzed).

Given these findings, the ZO test was used to study WAT dynamics after exposure to pharmaceuticals and environmental pollutants in interaction with the initial diet lipid content. Food intake ability and/or nutrient absorption at the intestinal level may be altered during exposure to exogenous molecules. In addition, the presence of food inside the intestinal lumen may interfere by quenching signals from NR-labeled perivisceral WAT. We found that starting starvation one day before exposure to compounds and extending it throughout the exposure period avoided any interference by these confounding factors, thus focusing on the exogenous compound's effect on adiposity regulation. However, it was still possible to study the interaction between the initial diet composition and the chemicals used, as nutritional history has proved to be a significant factor in the effects of these molecules (see below). The following compounds were selected: *i*) T0070907 used as a PPAR $\gamma$  antagonist (15, 16), *ii*) phenylephrine used as an  $\alpha$ 1-adrenergic receptor agonist capable of eliciting an increase in lipolytic activity of human WAT (17), *iii*) rosiglitazone as a member of the thiazolidinedione family used for type II diabetes treatment and a well-known potent PPAR $\gamma$  agonist (16), and *iv*) TBT, a biocide found in antifouling paints capable of binding to PPAR $\gamma$  but also to its heterodimeric partner retinoid X receptor (18, 19). The whole-body adiposity dynamics of each larva were expressed as percentage decrease or increase in NR fluorescence signal



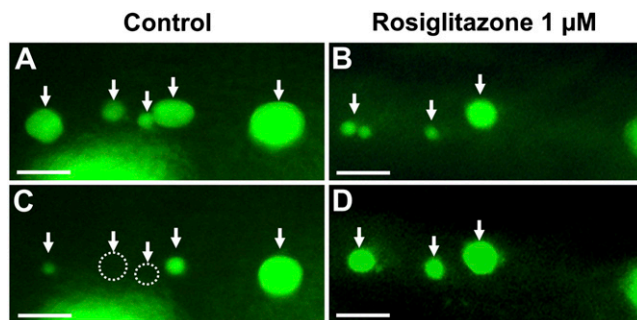
**Fig. 4.** The effect of lipid content of the diet on Nile Red fluorescent signal in the circulatory system of live larvae. Lateral view under a fluorescence microscope after NR staining. Anterior part to the right and dorsal part to the top. Images of the head region of representative larvae enrolled in ZO test represent animals initially nourished for one day on SD (A, C, E, G) or HFD (B, D, F, H) diet. A, B: Before feeding. C, D: At the end of the one-day feeding period (day 1). E, F: At the end of the one-day fast (day 2). G, H: After two days of fasting (day 3). See Fig. 1 for details of ZO test diagram. Initial SL of the larva was 8.9 mm in (A) and 8.8 mm in (B). Adipocytes are stained green, and the positions of selected blood vessels that may be labeled on HFD are indicated by white arrows. Scale bar, 200  $\mu$ m. e, eye.

areas after the one-day exposure period. The results of representative experiments are depicted in Fig. 5. Exposure to T0070907 (Fig. 5A) and phenylephrine (Fig. 5B) caused a decrease in adiposity compared with controls on an SD nutrient background. These exogenous compounds favored a decrease in adiposity in the fasting state and were classified as anti-obesogenic. In SD fish, rosiglitazone demonstrated the ability to prevent adiposity loss in the unfed condition (Fig. 5C). Adiposity even increased after this treatment on an HFD background (Fig. 5C). Compared with controls, Rosiglitazone-treated larvae had  $16.09\% \pm 2.17$  more adiposity than controls on an HFD background ( $n = 5$  independent experiments). In addition, the ZO test made it possible to monitor individual adipocytes *in vivo* at higher magnification (Fig. 6). As in other vertebrates, zebrafish-differentiated adipocytes were unilocular (6, 7).



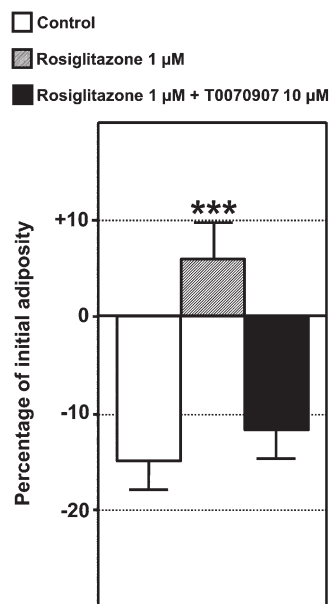
**Fig. 5.** ZO test as a tool for screening molecules and nutritional factors that target adiposity in living zebrafish. A, B: Molecules with a lipogenic (anti-obesogenic) effect. C, D: Molecules with an adipogenic (obesogenic) effect. Quantitative analysis was performed by recording the image area of NR fluorescence signals. WAT dynamics is expressed as a percentage of initial adiposity value. Representative experiments are presented. Quantification was assayed in the presence of 0.1% DMSO as a vehicle control or 0.1% DMSO plus the molecule to be tested at the indicated concentration on a SD or HFD background. T0070907 (A) and phenylephrine (B) exposure induced a decrease in adiposity compared with control groups on SD, whereas no significant difference was found on HFD. Rosiglitazone exposure induced a smaller decrease in adiposity compared with controls on an SD background, whereas an increase in adiposity was observed on an HFD background (C). TBT induced an increase in adiposity, irrespective of the lipid content of the diet (D). Rosiglitazone-induced adipogenesis was additive to the effect of a high-fat diet (C). TBT, an environmental contaminant, also had an additive effect and was strongly obesogen at this environmentally relevant level (D). Values are mean  $\pm$  SEM,  $n = 10$  animals per group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.005$ , \*\*\*\* $P < 0.0005$  by comparison of means using the same background diet.

Whereas control larvae exhibited a decrease or disappearance of NR-stained lipid droplets (Fig. 6A, C), rosiglitazone induced an increase in droplet size (Fig. 6B, D). The effect of rosiglitazone was completely abolished by PPAR $\gamma$  antagonist T0070907, indicating that rosiglitazone had a specific effect on adipocyte hypertrophy (Fig. 7).

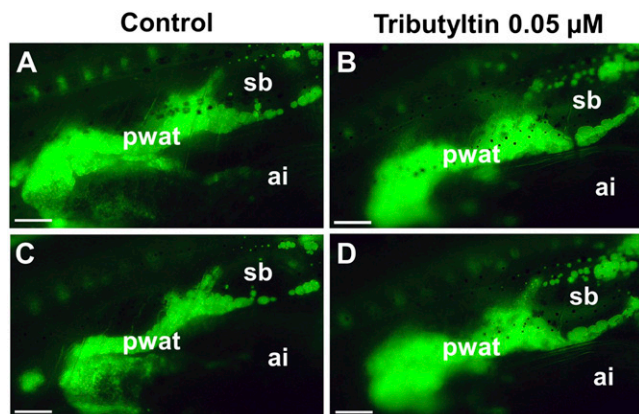


**Fig. 6.** In vivo adipocyte lipid droplet dynamics using the ZO test. Representative clusters of individual adipocytes from live unfed larvae were selected after NR staining, and images were recorded from the same animal before (A, B) and after (C, D) a 24-h exposure to the compounds. Adipocytes are stained green. C: Control larva recorded in (A) (SL = 8.9 mm) exposed to 0.1% DMSO, used as a vehicle control. D: Rosiglitazone-treated larva recorded in (B) (SL = 8 mm) exposed to 0.1% DMSO plus 1  $\mu$ M rosiglitazone. Transparent casper line was used to avoid any pigmented cell optical artifact at the magnification used. Whole-body variations in initial versus final adiposity of the two selected animals were  $-5.6\%$  and  $+5.6\%$  in control and rosiglitazone-treated animals, respectively. Scale bar, 150  $\mu$ m.

TBT is a recognized environmental obesogen (19–21). Larvae treated at an environmentally relevant concentration (22–24) exhibited a remarkable increase in adiposity, irrespective of the lipid composition of the background



**Fig. 7.** ZO test as a tool for studying molecular mechanisms underlying adiposity dynamics in living zebrafish. Quantitative analysis was performed by recording the image area of NR fluorescence signals. WAT dynamics is expressed as a percentage of initial adiposity value. A representative experiment is presented. Quantification was assayed in the presence of 0.1% DMSO as a vehicle control or 0.1% DMSO plus rosiglitazone 1  $\mu$ M or 0.1% DMSO plus rosiglitazone 1  $\mu$ M and T0070907 10  $\mu$ M on an HFD background. Rosiglitazone-induced adipogenesis was abolished by PPAR $\gamma$  antagonist T0070907, indicating that rosiglitazone had a specific effect on adipocyte hypertrophy. Values are mean  $\pm$  SEM,  $n = 10$  animals per group. \*\*\* $P < 0.001$  by comparison with control group using ANOVA and Dunnett's test.



**Fig. 8.** In vivo adiposity dynamics under the effect of TBT using the ZO test. Representative perivisceral WAT from live unfed larvae were selected after NR staining and images were recorded before (A, B) and after (C, D) a 24-h exposure or not to the compounds. Lateral view and anterior part to the right and dorsal part to the top. Larvae on an HFD background were starved for 24 h before initial adiposity recording (see Fig. 1 for details of ZO test diagram). C: Control larva recorded in (A) (SL = 8.2 mm) exposed to 0.1% DMSO, used as a vehicle control. D: TBT-treated larva recorded in (B) (SL = 8.1 mm) exposed to 0.1% DMSO plus 0.05  $\mu\text{M}$  TBT. Adipocytes are stained green. Perivisceral and whole-body variations in initial versus final adiposity of the two selected animals was  $-23\%$  and  $-19.14\%$  in control and  $+12\%$  and  $+12.81\%$  in TBT-treated animals, respectively. Scale bar, 500  $\mu\text{m}$ . ai, anterior intestine; pwat, perivisceral white adipose tissue; sb, swim bladder.

diet (Fig. 5D and Fig. 8). Compared with controls, TBT-treated larvae had  $15.75\% \pm 2.45\%$  more adiposity than controls on an HFD background ( $n = 5$  independent experiments). Statistical analysis using a univariate general linear model of the effect of factors, rosiglitazone or TBT treatment, combined with HFD, indicated that each of these two factors had a significant effect ( $P < 0.0001$ ). However, there was no interaction between the chemical and diet factors that resulted in an additive effect. The observed effect of TBT was limited to WAT, as no significant NR signal was found in the circulatory system, intestines (Fig. 8), or other anatomic locations (e.g., liver and gall bladder; data not shown). There is currently evidence to suggest that prenatal exposure to TBT or rosiglitazone activates the PPAR $\gamma$ , a key adipogenesis regulator (16), thereby altering the fate of multipotent stromal stem cells, predisposing them to become adipocytes (23, 25). However, due to its short-term, one-day window of exposure at larval stage, the ZO test is probably not suitable for evaluating the potential of chemicals and drugs to induce adipocyte hyperplasia. Adipocyte lipid droplet size results from a balance between the actions of various physiological stimuli and factors that promote triacylglycerol lipolysis and those that promote lipogenesis, irrespective of the mechanisms involved. HFD induced an increase in lipid content in the circulatory system of the larvae compared with SD, indicated by an increase in the NR signal after feeding (Fig. 4). Consequently, the fatty acids available for triacylglycerol synthesis may be more abundant, facilitat-

ing neutral lipid deposition in adipocytes even in the fasting state. It should be pointed out that, at the time of initial adiposity recording (i.e., after a one day fast) and at the image magnification and fluorescent microscope settings used (e.g., the background subtracted method used), there was no significant nonadipose NR fluorescence signal likely to interfere with WAT quantitation (Fig. 2B, Fig. 4F, Fig. 8). The nutritional condition used favored a lipolysis state, as demonstrated by the decrease in lipid droplet size in controls (Fig. 6A, C). However, exposure to obesogenic molecules (e.g., rosiglitazone) induced an increase in lipid droplet size, as evidenced on an HFD background (Fig. 6B, D). Exogenous compounds (e.g., rosiglitazone or TBT) that increased adiposity in the fasting state were classified as obesogenic.

In summary, our data demonstrated that zebrafish larvae provided a suitable vertebrate model for screening chemicals and mixtures likely to impair adipocyte fat storage and mobilization in interaction with diet lipid content. The ZO test is an intermediate step in obesity research, between in vitro and rodent assays, and it also may be used to study the effect of environmental toxicants on the adiposity of aquatic species. One major advantage of the described method is that the complex, dynamic, interactive, multi-organ events that occur in vivo remain intact, thus making it easier to characterize potentially obesogenic or anti-obesogenic substances. **EL**

## REFERENCES

- Newbold, R. R., E. Padilla-Banks, R. J. Snyder, T. M. Phillips, and W. N. Jefferson. 2007. Developmental exposure to endocrine disruptors and the obesity epidemic. *Reprod. Toxicol.* **23**: 290–296.
- Grün, F., and B. Blumberg. 2009. Endocrine disruptors as obesogens. *Mol. Cell. Endocrinol.* **304**: 19–29.
- Lea-Currie, Y. R., D. J. Duffin, and B. M. Buehrer. 2011. Use of adipose-derived stem cells in high-throughput screening to identify modulators of lipogenesis. *Methods Mol. Biol.* **702**: 359–368.
- Lemieux, G. A., J. Liu, N. Mayer, R. J. Bainton, K. Ashrafi, and Z. Werb. 2011. A whole-organism screen identifies new regulators of fat storage. *Nat. Chem. Biol.* **7**: 206–213.
- McGrath, P., and C. Q. Li. 2008. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. *Drug Discov. Today*. **13**: 394–401.
- Flynn III, E. J., C. M. Trent, and J. F. Rawls. 2009. Ontogeny and nutritional control of adipogenesis in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Lipid Res.* **50**: 1641–1652.
- Imrie, D., and K. C. Sadler. 2010. White adipose tissue development in zebrafish is regulated by both developmental time and fish size. *Dev. Dyn.* **239**: 3013–3023.
- Jones, K. S., A. P. Alimov, H. L. Rilo, R. J. Jandacek, L. A. Woollett, and W. T. Penberthy. 2008. A high throughput live transparent animal bioassay to identify non-toxic small molecules or genes that regulate vertebrate fat metabolism for obesity drug development. *Nutr. Metab. (Lond.)*. **5**: 23
- Song, Y., and R. D. Cone. 2007. Creation of a genetic model of obesity in a teleost. *FASEB J.* **21**: 2042–2049.
- Oka, T., Y. Nishimura, L. Zang, M. Hirano, Y. Shimada, Z. Wang, N. Umamoto, J. Kuroyanagi, N. Nishimura, and T. Tanaka. 2010. Diet-induced obesity in zebrafish shares common pathophysiological pathways with mammalian obesity. *BMC Physiol.* **10**: 21.
- White, R. M., A. Sessa, C. Burke, T. Bowman, J. LeBlanc, C. Ceol, C. Bourque, M. Dovey, W. Goessling, C. E. Burns, et al. 2008. Transparent adult zebrafish as a tool for in vivo transplantation analysis. *Cell Stem Cell.* **2**: 183–189.

12. Raldua, D., and P. J. Babin. 2009. Simple, rapid zebrafish larva bioassay for assessing the potential of chemical pollutants and drugs to disrupt thyroid gland function. *Environ. Sci. Technol.* **43**: 6844–6850.
13. Schwartz, D. M., and N. E. Wolins. 2007. A simple and rapid method to assay triacylglycerol in cells and tissues. *J. Lipid Res.* **48**: 2514–2520.
14. Greenspan, P., and S. D. Fowler. 1985. Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red. *J. Lipid Res.* **26**: 781–789.
15. Lee, G., F. Elwood, J. McNally, J. Weiszmann, M. Lindstrom, K. Amaral, M. Nakamura, S. Miao, P. Cao, R. M. Learned, et al. 2002. T0070907, a selective ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma, functions as an antagonist of biochemical and cellular activities. *J. Biol. Chem.* **277**: 19649–19657.
16. Tontonoz, P., and B. M. Spiegelman. 2008. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu. Rev. Biochem.* **77**: 289–312.
17. Boschmann, M., G. Krupp, F. C. Luft, S. Klaus, and J. Jordan. 2002. In vivo response to alpha(1)-adrenoreceptor stimulation in human white adipose tissue. *Obes. Res.* **10**: 555–558.
18. Le Maire, A., M. Grimaldi, D. Roecklin, S. Dagnino, V. Vivat-Hannah, P. Balaguer, and W. Bourguet. 2009. Activation of RXR-PPAR heterodimers by organotin environmental endocrine disruptors. *EMBO Rep.* **10**: 367–373.
19. Li, X., J. Ycaza, and B. Blumberg. The environmental obesogen tributyltin chloride acts via peroxisome proliferator activated receptor gamma to induce adipogenesis in murine 3T3-L1 preadipocytes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* Epub ahead of print. March 21, 2011; doi:10.1016/j.jsbmb.2011.03.012.
20. Inadera, H., and A. Shimomura. 2005. Environmental chemical tributyltin augments adipocyte differentiation. *Toxicol. Lett.* **159**: 226–234.
21. Zuo, Z., S. Chen, T. Wu, J. Zhang, Y. Su, Y. Chen, and C. Wang. 2011. Tributyltin causes obesity and hepatic steatosis in male mice. *Environ. Toxicol.* **26**: 79–85.
22. Guo, S., L. Qian, H. Shi, T. Barry, Q. Cao, and J. Liu. 2010. Effects of tributyltin (TBT) on *Xenopus tropicalis* embryos at environmentally relevant concentrations. *Chemosphere.* **79**: 529–533.
23. Grün, F., and B. Blumberg. 2006. Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. *Mol. Endocrinol.* **20**: 2141–2155.
24. Zhang, J., Z. Zuo, Y. Wang, A. Yu, Y. Chen, and C. Wang. 2011. Tributyltin chloride results in dorsal curvature in embryo development of *Sebastiscus marmoratus* via apoptosis pathway. *Chemosphere.* **82**: 437–442.
25. Kirchner, S., T. Kieu, C. Chow, S. Casey, and B. Blumberg. 2010. Prenatal exposure to the environmental obesogen tributyltin predisposes multipotent stem cells to become adipocytes. *Mol. Endocrinol.* **24**: 526–539.

***CHAPITRE III***

***THE ENVIRONMENTAL OBESOGEN  
TRIBUTYL TIN CHLORIDE ACTS  
THROUGH RXR AND LXR BUT NOT  
PPAR  $\gamma/\delta$  ISOFORMS TO INDUCE  
ADIPOCYTE HYPERTROPHY IN  
LIVE ZEBRAFISH***

**The environmental obesogen tributyltin chloride acts through RXR and LXR but not PPARgamma/delta isoforms to induce adipocyte hypertrophy in live zebrafish**

**Nafia Ouadah-Boussouf, Patrick J. Babin\***

*University of Bordeaux, Maladies Rares : Génétique et Métabolisme (MRGM), EA 4576, F-33400 Talence, France*

\*Corresponding author at: Maladies Rares : Génétique et Métabolisme (MRGM), EA 4576, University of Bordeaux, Bât. B2, avenue des facultés, 33405 Talence, France. Tel.: +33 (0)5 4000 8776; Fax: +33 (0)5 4000 8915.

*E-mail address: p.babin@gpp.u-bordeaux1.fr (P.J. Babin).*



## Abstract

**Introduction:** Overweight and obesity are defined as a disease in which abnormal excessive body fat accumulation causes adverse effects on health. A proposed contributor to the rise in obesity is exposure to endocrine disrupting chemicals (EDC's). Obesogens are EDCs that directly or indirectly may promote obesity by increasing fat storage in fat cells and/or the number of adipocytes by altering the lipid homeostasis and the energy balance. The organotin tributyltin chloride (TBT) induces adipogenesis in cell culture models and increases adipose mass *in vivo* in two vertebrate model organisms, frogs and mice. It has been suggested that TBT acts through use of peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) $\gamma$ .

**Methods:** We recently designed the zebrafish obesogenic (ZO) test; adiposity is measured using a fluorescent probe that stains lipid droplets (Tingaud-Sequeira *et al.*, J. Lipid Res. 2011). Zebrafish is one of the most important models in environmental toxicology and is rapidly becoming a major model for studies on human health and disease.

**Results:** Zebrafish larvae treated at environmentally-relevant nano molar concentrations of TBT exhibited a remarkable increase in adiposity. By using the ZO test, we demonstrated that PPAR $\gamma$ /retinoid X receptor (RXR) heterodimers may be recruited to modulate adiposity in living zebrafish but were not involved in TBT obesogenic effect. We found that RXR/RXR homodimers and RXR/liver X receptor (LXR) heterodimers are *in vivo* effectors of the obesogenic effect of TBT on zebrafish adipose tissue.

**Conclusion:** TBT acts *in vivo* to induce triacylglycerol storage in white adipocytes via nuclear receptors LXR and RXR, and not via the PPAR $\gamma$  and  $\delta$  isoforms.

Grant support: N.O. was supported by a predoctoral fellowship from the French Ministry of Research and Education. This work was supported by the Conseil Régional d'Aquitaine (200881301031/TOD project) to P.J.B.

*You will find below a resume and discussion of the manuscript content including the final version of the Figures. The right place of this text is on Section 2 of Chapter IV. It has been reproduced here in attend to have the definitive version of this manuscript. Sorry for the inconvenience.*

An obesogenic molecule can promote lipid deposition in adipocytes by disrupting lipid homeostasis at one or multiple levels and may an ED from xenobiotic origin. It can substitute for natural ligands blocking or over-regulating hormone receptors. They can also lead to a disruption of hormone biosynthesis and consequently alter lipid homeostasis. Finally, an obesogenic molecule can change the energy balance by inducing alterations in metabolic programming during development and/or in processes controlling satiety (Grün and Blumberg, 2009a, 2009b)

Among the molecules we screened with the ZO test, TBT has proven to be one of the most powerful obesogen we have used and can induce its action at a concentration incredibly low, of the order of nM (Figure 3, Chapter III, Ouadah-Boussouf and Babin, 2012). This concentration is related to the concentration of TBT which can be measured in human blood. For example, the average concentration observed in a study conducted in the USA in 1998 was  $23.4 \pm 44.04$  nM (Kannan *et al.*, 1999). TBT can be considered obesogenic at concentrations usually found in animal organisms for hormones. The data obtained on the zebrafish larvae confirms that this molecule is one of the most toxic products ever introduced by man into the environment. TBT is classified as one of the most powerful EDs (Evans *et al.*, 1995, Pereira *et al.*, 1999; Ayanda *et al.*, 2012) and was previously identified as highly obesogenic (Kanayama *et al.*, 2005 , Grün and Blumberg, 2009a; Grün *et al.*, 2006a; Janesick and Blumberg, 2012).

*In vitro* studies show that the ability of TBT or Rosi induce adipogenesis from multipotent stem cells of the vascular stroma (MSCs) (Kirchner *et al.*, 2010) or the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes (Li *et al.*, 2011) was dependent on the activation of the heterodimer RXR/PPAR $\gamma$  (Kanayama *et al.*, 2005; Nishikawa *et al.*, 2004; Nakanishi *et al.*, 2005, 2006; Nakanishi, 2007; 2008; Grün *et al.*, 2006a; Grün and Blumberg, 2006b). In cell culture, TBT appears to bind to PPAR $\gamma$  and operates in a competitive manner against Rosi, by blocking the binding of the latter with the PPAR $\gamma$  (Hiromori *et al.*, 2009). TBT can activate the heterodimer forms containing PPAR $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  and  $\gamma$  via their partner RXR (Le Maire *et al.*, 2009). Indeed, a covalent bond between the tin atom of TBT and cysteine 432 of helix H11 of the human RXR $\alpha$  can be established (Le Maire *et al.*, 2009). Other authors have also shown that TBT interacts with RXRs to influence the expression of genes regulated by

permissive heterodimers (Wang *et al.*, 2011). Moreover, imposex in gastropod molluscs can be induced via RXR ligands similarly to the inductive effect of TBT (Castro *et al.*, 2007; Sousa *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2011; Stange *et al.*, 2012).

The starting point of our investigations on the mode of action of TBT was using a PPAR $\gamma$  antagonist, the T0070907 because previous work carried out on cell cultures of 3T3-L1 preadipocytes were shown that this antagonist could block the obesogenic effect of TBT (Kirchner *et al.*, 2010). This result was in contradiction with the work done previously on the adipocyte line where a lack of blocking the action of TBT by the antagonist GW9662 of PPAR $\gamma$  was observed (Inadera and Shimomura, 2005). The lack of effect of GW9662 to block the differentiation of preadipocytes would be due to the short half-life time of this antagonist in cell culture. TBT can therefore carry out its work after activation of the heterodimer RXR/PPAR $\gamma$  (Li *et al.*, 2011).

Using Rosi as a positive control, we could show, by using the ZO test, that T0070907 blocks the action of this well-known PPAR $\gamma$  agonist (Figure 7 of Chapter II-Tingaud Sequeira *et al.*, 2011; Figure 4 of Chapter III, Ouadah-Boussouf and Babin, 2012). However, the PPAR $\gamma$  antagonist is unable to block the action of TBT on zebrafish WAT (Figure 4 of Chapter III, Ouadah-Boussouf and Babin, 2012). From this result, inconsistent with that obtained in cell culture of preadipocytes, we investigated the *in vivo* mode of action of TBT on the zebrafish WAT in order to characterize the NRs potentially involved.

NRs, and in particular their ligand binding site, are highly conserved during evolution. This generally allows the use of specific agonists and antagonists in interspecies conditions. Among some NRs known to regulate lipid metabolism, *e.g.* ER, PPAR $\alpha$ ,  $\gamma$  and  $\delta$ , RXR and LXR, the use of specific antagonists resulted in a number of cases, compared to controls, by a higher decrease of adiposity observed during fasting (Figure 1 of Chapter III, Ouadah-Boussouf and Babin, 2012). This concerns T0070907 and GSK3787 respectively antagonists of PPAR $\gamma$  and  $\delta$ , the UVI3003 used as an antagonist of RXR and GSK2033 used as an LXR antagonist. The activity of these NRs may be modulated *in vivo* to modify the level of adiposity in larval zebrafish. So we then focused our work on these NRs.

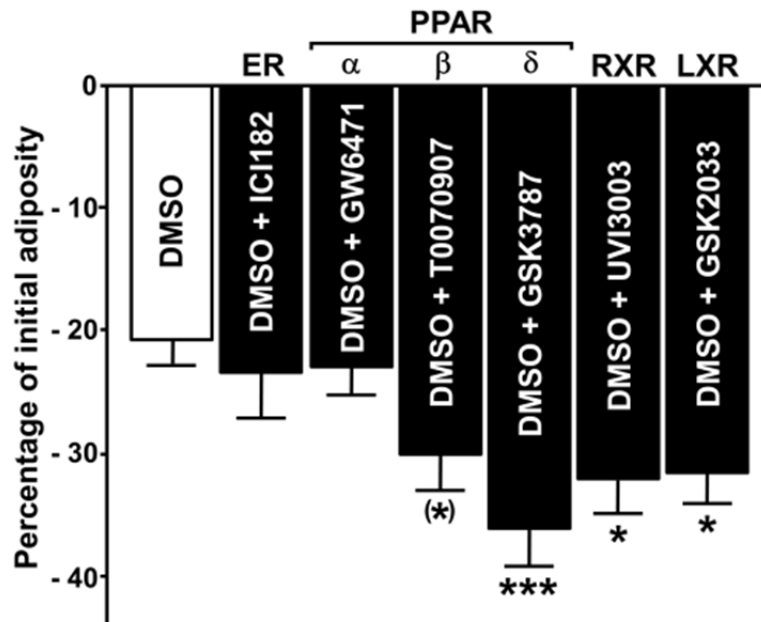
As indicated in Chapter I (Part N° 2), RXRs represent mandatory heterodimerization partner for many NRs (Mangelsdorf *et al.*, 1990). RXR ligands can stimulate transcriptional activation of their partners when it they are permissive receptors such as PPARs and LXRs (Lefebvre *et al.*, 2010). Using the ZO test, we showed that RXR/PPAR $\gamma$  and RXR/LXR heterodimers may be recruited as modulators of adiposity in larval zebrafish (Figure 2 of

Chapter III, Ouadah-Boussouf and Babin, 2012). Concerning the heterodimer RXR/PPAR $\gamma$ , separate use of the agonist of both partners of the heterodimer or both agonists simultaneously shows an obesogenic effect and hypertrophy of adipocytes. PPAR $\gamma$  is known for its obesogenic effect on zebrafish, *Xenopus* and humans (Riu *et al.*, 2011). It has been suggested that this NR is a major target for obesogenic molecules (Kanayama *et al.*, 2005; Janesick and Blumberg, 2011). RXRs are also the target for obesogens and blocking this receptor by the antagonist HX531 may have an anti-diabetic and anti-obesogenic effect. This antagonist could inhibit hypertrophy of adipocytes derived from OLETF rats (Nakatsuka *et al.*, 2012). Our work shows that three different RXR agonists, fluorobexarotene, SR11237 and DHA had an obesogenic activity that can be inhibited by the antagonist UVI3003. Our results show also that inhibition of one of the partners of the RXR/PPAR $\gamma$  heterodimer by its specific antagonist, causes inhibition of the obesogenic effect of the agonist of the other partner. The same result was observed with RXR/LXR heterodimer (Figure 2 of Chapter III, Ouadah-Boussouf and Babin, 2012). This indicates that the fatness of the zebrafish larva can be modulated by these NRs heterodimer forms.

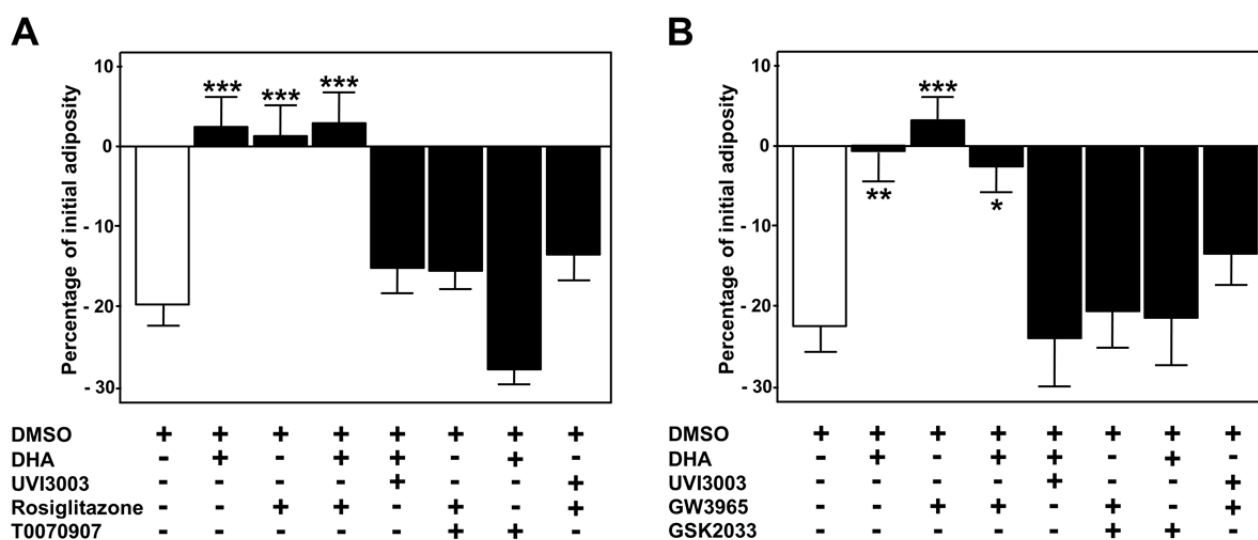
A 24-hour exposure of zebrafish larvae according to the procedure of ZO test with Rosi and GW501516, PPAR $\gamma$  and PPAR $\beta/\delta$  agonists, respectively, induced an increase in adiposity compared to animals exposed to the vehicle (DMSO) alone. This is in agreement with previous observations on the increase in the amount of lipids in cells in culture (Schmuth *et al.*, 2004; Kirchner *et al.*, 2010). In both cases, this effect could be inhibited by specific antagonists of these two NRs, T0070907 and GSK3787, respectively. These two antagonists have no effect on the obesogenic effect of TBT observed by the ZO test suggesting that TBT does not use PPAR $\gamma$  and PPAR $\beta/\delta$  (Figure 4 of Chapter III, Ouadah-Boussouf and Babin, 2012). DHA and GW3965, respectively agonists of RXRs and LXRs, are obesogenic in the same way as TBT (Figure 5 of Chapter III, Ouadah-Boussouf and Babin, 2012). The antagonist of RXR, UVI3003, completely inhibits the effect of DHA and also the obesogenic effect of TBT. GSK2033, an LXRs antagonist, completely inhibits the obesogenic effect of GW3965 but partially the effect of TBT. These results indicate that in WAT of larval zebrafish, TBT achieves its obesogenic effect via RXR/RXR homodimers and LXR/RXR heterodimers. RXR/PPAR $\gamma$  heterodimers does not seem to be involved in the obesogenic effect of TBT but have the potential to be recruited separately in the presence of TBT to modulate adiposity in zebrafish (Figure 6 of Chapter III, Ouadah-Boussouf and Babin, 2012).

Our results indicate that TBT stimulates the deposition of TAG in zebrafish WAT by activating RXR/RXR homodimers and RXR/LXR heterodimers. The schematic

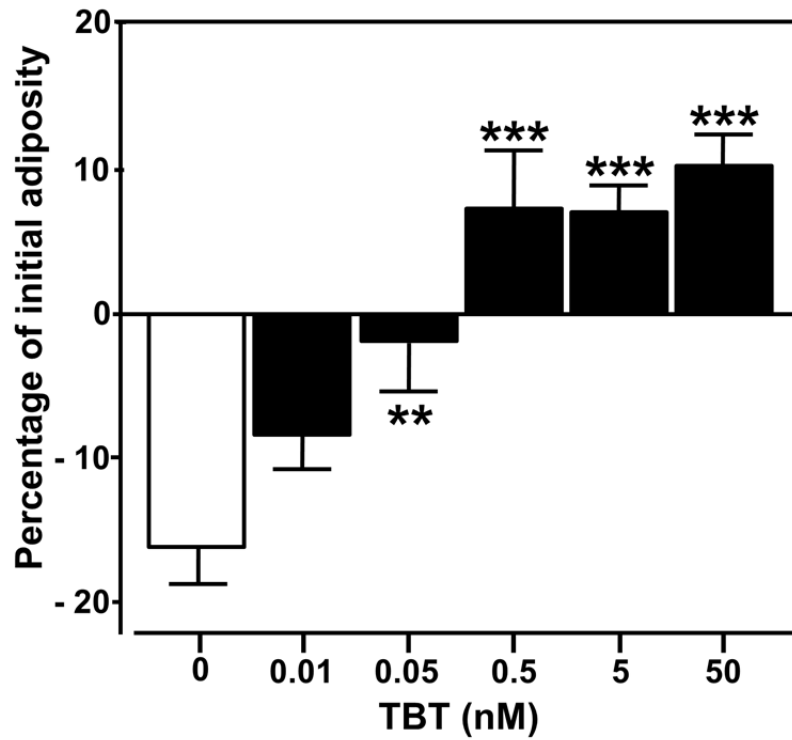
representation of the signaling NR pathways involved in TBT-induced hypertrophic adipocytes in living zebrafish is depicted in Figure 7 of Chapter III). This is consistent with the hypothesis originally formulated by Inadera and Shimomura in 2005. The contradictory results obtained by other authors by using cell cultures could possibly be explained by the action of hormonal and/or growth factors present in the culture medium. It should be noted that RXR/RXR homodimer may selectively bind to PPREs (Ijpenberg *et al.*, 2004). In addition, activation of LXRs is involved not only in lipogenesis but also in adipogenesis with an expression of the adipocyte-specific genes in 3T3-L1 cells (Juvet *et al.*, 2003; Seo *et al.*, 2004). The unique counterpart to LXR found in the zebrafish genome is closer to human LXR $\alpha$  than  $\beta$  (Archer *et al.*, 2008). In mouse macrophage RAW264 cells the transcriptional response to TBT is through the RXR/LXR $\alpha$  heterodimer (Cui *et al.*, 2011), indicating that these ED may also, in this cell type, use this heterodimer to carry out its action. The terms of the TBT binding to RXR $\alpha$  are known (Le Maire *et al.*, 2009), but there is no data, to our knowledge, on the ability of TBT to link directly LXR.



**Figure 1. Identification of nuclear receptor antagonists able to decrease adiposity in live zebrafish larvae.** ZO test was conducted to larvae initially nourished with SD. WAT dynamics is expressed as a percentage of initial adiposity value (see the Experimental Procedures section for details about ZO test and quantitative analysis protocols). A representative experiment is presented. Quantification was assayed in the presence in fish water of 0.1% DMSO as a vehicle control or 0.1% DMSO plus the selected nuclear receptor antagonist. The concentration of each antagonist used was 10  $\mu$ M with the exception of UVI3003 where 0.1  $\mu$ M has been applied. In the conditions used, antagonists ICI182 to ER and GW6471 to PPAR $\alpha$  were unable to modulate adiposity by comparison to vehicle control. T0070907 and GSK3787 used as antagonists of PPAR $\gamma$  and PPAR $\delta$ , respectively and UVI3003 and GSK2033 used as antagonists of RXR and LXR, respectively were able to decrease adiposity by comparison to vehicle control. Values are mean  $\pm$  SEM, n = 10 animals per group. (\*) $P$  = 0.085, \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.001 by comparison with control group using ANOVA and Dunnett's test.

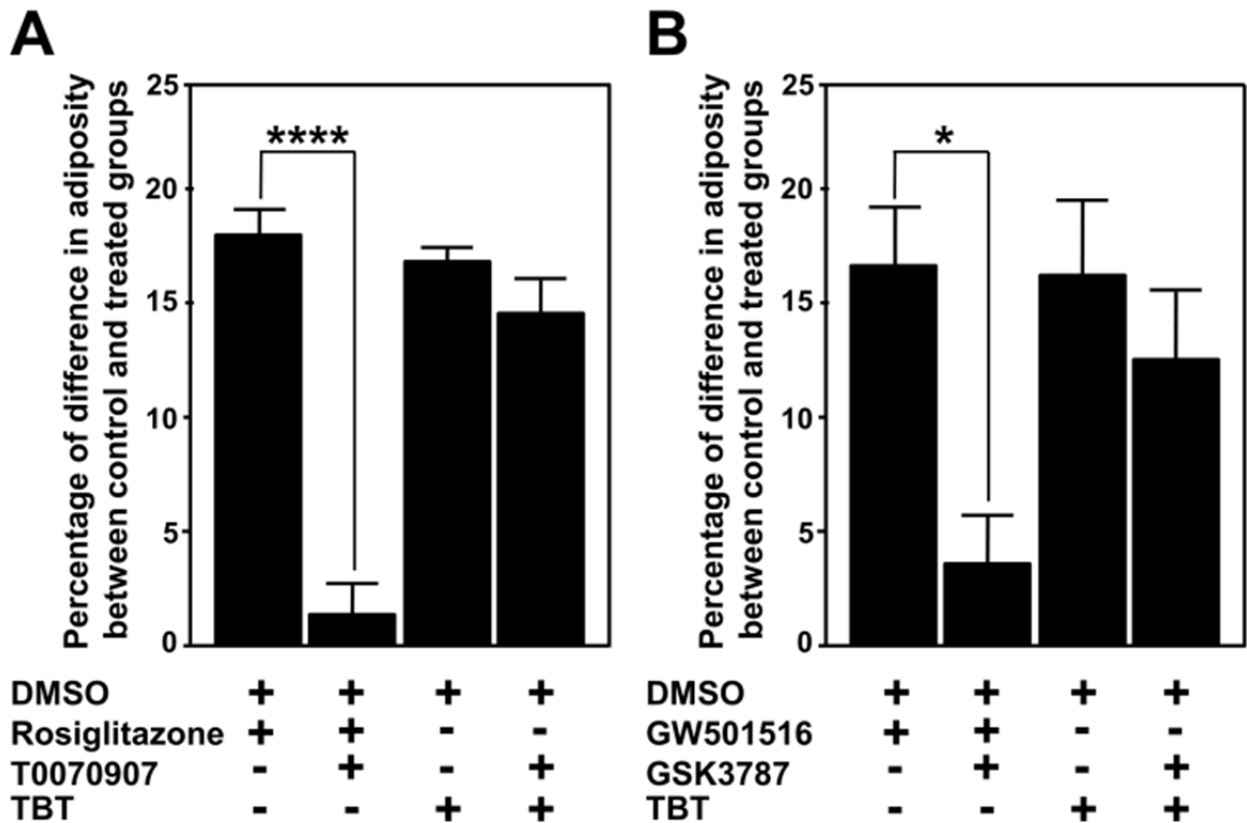


**Figure 2. RXR/PPAR $\gamma$  and RXR/LXR heterodimers may be recruited to modulate adiposity in living zebrafish.** A) Characterization of RXR/PPAR $\gamma$  heterodimer involvement. B) Characterization of RXR/LXR heterodimer involvement. Representative experiments are presented. ZO test was applied to larvae previously nourished with HFD. Quantification was assayed in the presence in fish water of 0.1% DMSO as a vehicle control or 0.1% DMSO plus the combination of the indicated compounds. DHA (1  $\mu$ M) and UVI3003 (0.1 $\mu$ M) were used as RXR agonist and antagonist, respectively. Rosiglitazone (1  $\mu$ M) and T0070907 (10  $\mu$ M) were used as PPAR $\gamma$  agonist and antagonist, respectively. GW3965 (1  $\mu$ M) and GSK2033 (10  $\mu$ M) were used as LXR agonist and antagonist, respectively. Values are mean  $\pm$  SEM, n = 10 animals per group. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001 by comparison with control group using ANOVA and Dunnett's test.

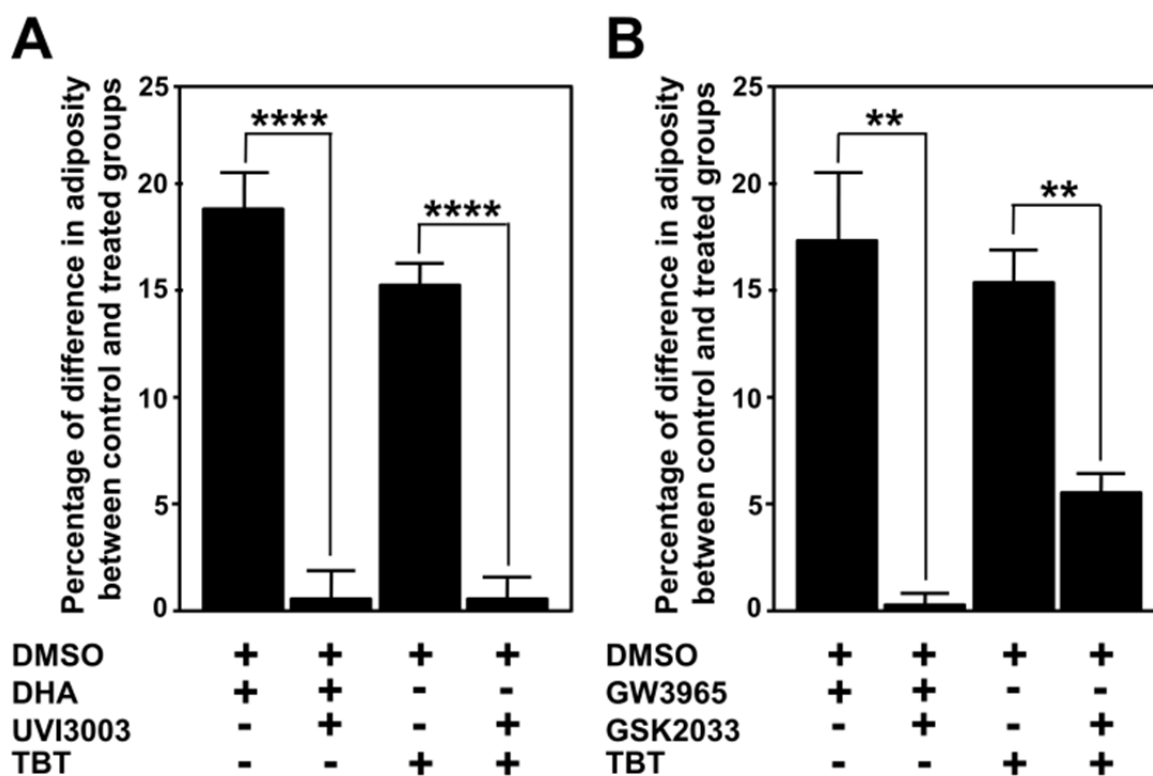


**Figure 3. TBT is a potent *in vivo* obesogenic compound effective at a nanomolar concentration in live zebrafish larvae.** A representative experiment is presented. ZO test was applied to larvae previously nourished with HFD. Quantification was assayed in the presence in fish water of 0.1% DMSO as a vehicle control or 0.1% DMSO plus TBT at the indicated concentrations. Values are mean  $\pm$  SEM, n = 10 animals per group. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  by comparison with control group using ANOVA and Dunnett's test.

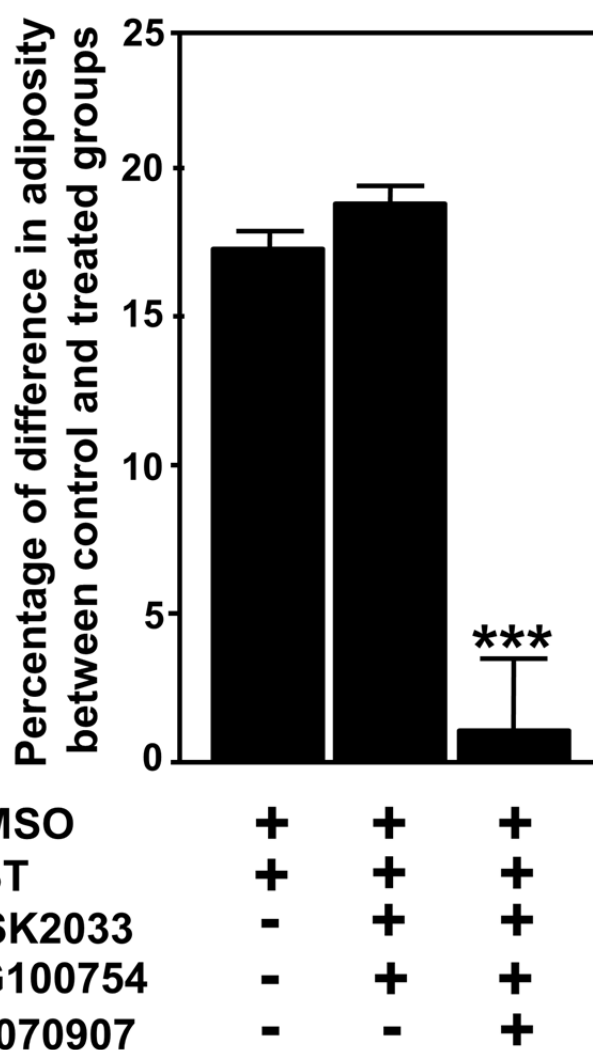




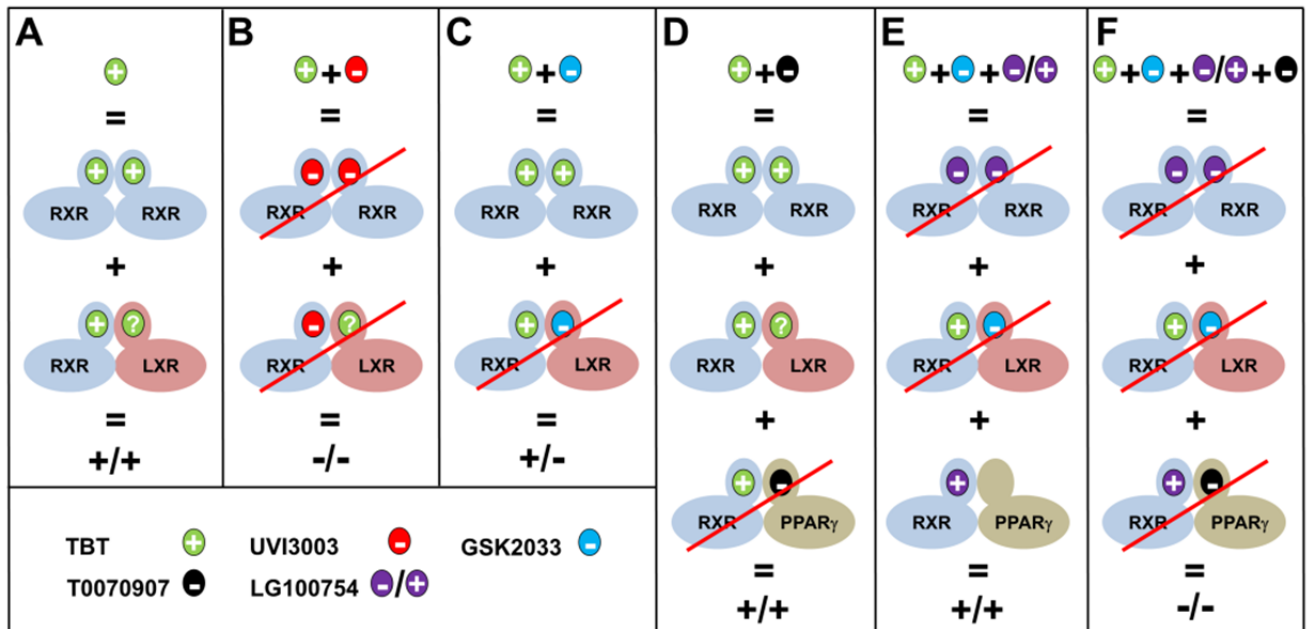
**Figure 4. Antagonists to PPAR $\gamma$  and  $\delta$  isoforms are not able to block the obesogenic effect of TBT on white adipose tissue of live zebrafish larvae.** *A*, PPAR $\gamma$  pathway. Values are mean  $\pm$  SEM of five and four independent experiments of rosiglitazone and TBT treated groups, respectively. *B*, PPAR $\delta$  pathway. Values are mean  $\pm$  SEM of three independent experiments of GW501516 and TBT treated groups, respectively. ZO test was applied to larvae previously nourished with HFD. Quantification was assayed in the presence in fish water of 0.1% DMSO as a vehicle control or 0.1% DMSO plus the combination of the indicated compounds. Rosiglitazone (1  $\mu$ M) and T0070907 (10  $\mu$ M) were used as PPAR $\gamma$  agonist and antagonist, respectively. GW501516 (1  $\mu$ M) and GSK3787 (10  $\mu$ M) were used as PPAR $\delta$  agonist and antagonist, respectively. TBT was used at 25 nM. In each independent experiment, n = 10 animals per group. \* $P$  < 0.05, \*\*\*\* $P$  < 0.0001 by comparison with the corresponding agonist treated group using one-tailed unpaired  $t$ -test.



**Figure 5. RXR/RXR homodimers and RXR/LXR heterodimers are *in vivo* effectors of the obesogenic effect of TBT on zebrafish adipose tissue.** *A*, RXR/RXR pathway. Values are mean  $\pm$  SEM of eight and seven independent experiments of DHA and TBT treated groups, respectively. *B*, RXR/LXR pathway. Values are mean  $\pm$  SEM of four and six independent experiments of GW3965 and TBT treated groups, respectively. ZO test was applied to larvae previously nourished with HFD. Quantification was assayed in the presence in fish water of 0.1% DMSO as a vehicle control or 0.1% DMSO plus the combination of the indicated compounds. DHA (1  $\mu$ M) and UVI3003 (0.1  $\mu$ M) were used as RXR agonist and antagonist, respectively. GW3665 (1  $\mu$ M) and GSK2033 (10  $\mu$ M) were used as LXR agonist and antagonist, respectively. TBT was used at 25 nM. In each independent experiment, n = 10 animals per group. \*\* $P$  < 0.01, \*\*\*\* $P$  < 0.0001 by comparison with the corresponding agonist treated group using one-tailed unpaired *t*-test.



**Figure 6. RXR/PPAR $\gamma$  heterodimers are not involved in the obesogenic effect of TBT but have the potential to be recruited separately in the presence of TBT to modulate adiposity in living zebrafish.** ZO test was applied to larvae previously nourished with HFD. Quantification was assayed in the presence in fish water of 0.1% DMSO as a vehicle control or 0.1% DMSO plus the combination of the indicated compounds. LG100754 (0.1  $\mu$ M) was used as RXR homodimer antagonism and RXR heterodimer agonist. GSK2033 (10  $\mu$ M) and T0070907 (10  $\mu$ M) were used as LXR and PPAR $\gamma$  antagonists, respectively. TBT was used at 25 nM. Values are mean  $\pm$  SEM of three independent experiments with n = 10 animals per group in each independent experiment. \*\*\* $P$  < 0.001 using ANOVA followed by the post hoc Tukey's test.



**Figure 7 (Graphical abstract).** Schematic representation of the signaling NR pathways involved in TBT-induced hypertrophic adipocytes in living zebrafish. A plus symbol indicates an agonist effect, a negative symbol an antagonist one. The question mark inside the TBT graphic symbol indicates that there was uncertainty about the ability of TBT to bind LXR. Antagonist compounds have been used in a concentration range of the order of  $\mu\text{M}$ , while the TBT was in a range of the nM. TBT was fully (+/+), partially (+/-) or no (-/-) obesogenic according to the combination of agonists and antagonists used. A) TBT induced adipocyte hypertrophy through RXR/RXR and RXR/LXR pathways. B) This effect was fully abolished with RXR antagonist UVI3003. C) In the presence of LXR antagonist GSK2033, TBT was partially active due to inhibition of RXR/LXR heterodimers while RXR homodimers were still active. D) The obesogenic effect of TBT was not inhibited by PPAR $\gamma$  antagonist T0070907 precluding a role of RXR/PPAR $\gamma$  heterodimer in TBT action. E) RXR/PPAR $\gamma$  heterodimers were still active *in vivo* even after RXR/RXR and RXR/LXR pathway blockage. These pathways were antagonized with LG100754 and GSK2033, respectively. However, LG100754 was also a RXR heterodimer agonist that had the potential to recruit RXR/PPAR $\gamma$  and therefore induced hypertrophic adipocyte independently to the presence of TBT. This was consistent with adipocyte hypertrophy induced by rosiglitazone treatment, a PPAR $\gamma$  agonistic effect that was inhibited by T0070907 (not shown on the graph, see Fig. 4A). F) The agonistic effect of LG100754 on RXR/PPAR $\gamma$  heterodimer was also abolished by the PPAR $\gamma$  antagonist T0070907.

***CHAPITRE IV***

***DISCUSSION GENERALE,  
PERSPECTIVES ET  
CONCLUSION***

# **1. Originalité du ZO test et application pour l'identification de molécules obésogènes et anti-obésogènes.**

## **1.1. Les méthodes de mesure de l'adiposité.**

Il existe plusieurs méthodes pour estimer la quantité de graisse corporelle chez l'animal ou l'humain. La plus utilisée et la plus simple à mettre en œuvre est l'IMC comme discuté dans le Chapitre I. Cet indice est fréquemment utilisé en clinique afin de déterminer le sous-poids, le surpoids et l'obésité. Cet indice reste insuffisant pour caractériser finement la répartition du TAB et donc la silhouette de l'individu et l'historique de son évolution pondérale. Il peut malgré tout exister une corrélation entre l'IMC et la masse grasse (Micozzi *et al.*, 1986; Leonhardt *et al.*, 1987). Il existe d'autres méthodes de visualisation du TAB, telles que celles relevant de l'imagerie (Shen *et al.*, 2003). Pour les petits modèles animaux des méthodes expérimentales existent pour mesurer la teneur en graisses. Cela comprend les méthodes invasives, par exemple par la mesure *ex vivo* du dépôt de graisse. Cette technique longue et fastidieuse n'assure pas une dissection complète de toute la masse grasseuse du corps de l'animal. L'extraction des lipides totaux par des solvants organiques peut être tentée, mais là aussi s'avère difficile à mettre en œuvre dans le cas de séries expérimentales importantes. D'autres méthodes non invasives existent, par exemple, l'absorption biphotonique aux rayons X ou la résonance magnétique nucléaire. Chacune de ces méthodes présente un compromis relatif (Sasser *et al.*, 2012). Les méthodes dites invasives permettent d'avoir des informations sur la distribution des graisses dans les organes ou sur des régions spécifiques. Toutefois, le sacrifice des animaux empêche d'avoir une évaluation individuelle longitudinale de la variation d'adiposité en fonction d'un traitement particulier. A l'inverse les méthodes non invasives permettent d'avoir cette évaluation longitudinale mais donnent peu de détails concernant les organes et les régions spécifiques du fait de leur résolution limitée (Sasser *et al.*, 2012).

Il est à noter que la quantification des lipides à partir de cultures cellulaires, cultures d'adipocytes par exemple, peut se réaliser par extraction des lipides et quantification et/ou par coloration des cellules avec l'Oil Red O ou le rouge de Nil.

## **1.2. Le ZO test.**

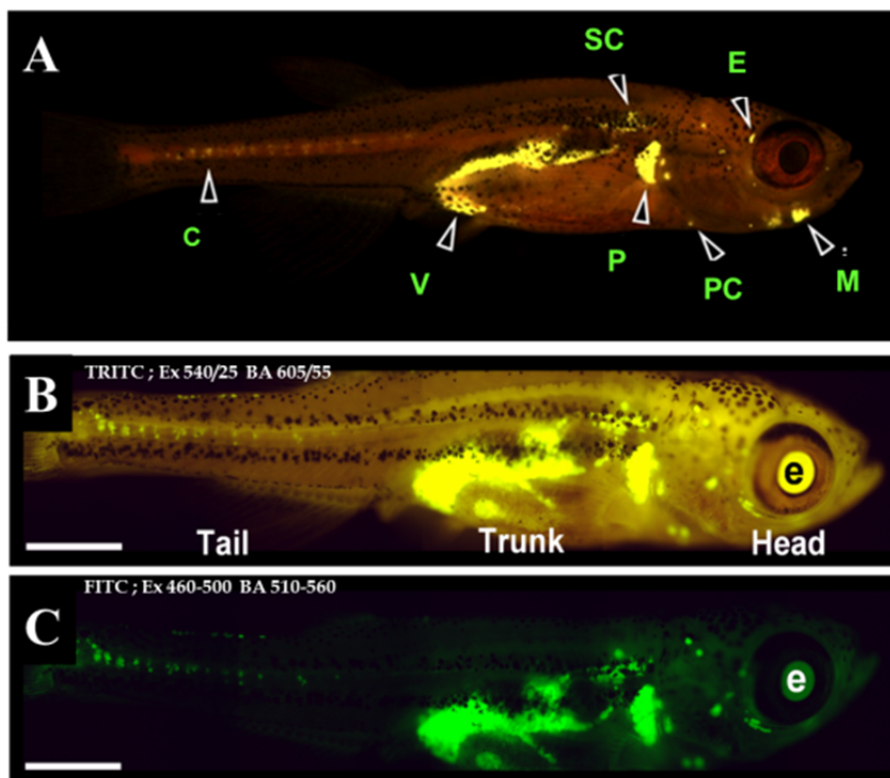
Le ZO test développé au cours des travaux de thèse constitue une méthode simple, rapide et fiable pour évaluer l'effet de molécules exogènes seules ou en mélange, en

interaction ou non avec des facteurs d'origine alimentaire. Ce test qui utilise la larve vivante du poisson zèbre tire son originalité principale de part l'utilisation d'une coloration spécifique des lipides neutres présents dans les adipocytes et leur visualisation aisée par microscopie à fluorescence du fait de la transparence du corps de l'animal. La méthode vitale employée permet un suivi individuel des animaux vivants. La petite taille de ceux-ci, permet de réaliser des séries expérimentales avec un grand nombre d'animaux, ce qui autorise des expérimentations à grande échelle et une analyse statistique adéquate des effets observés.

Après avoir défini de façon rigoureuse le protocole nutritionnel et la durée d'exposition aux molécules, celles-ci sont directement dissoutes, en général en présence de DMSO, dans l'eau d'élevage des poissons. L'épiderme de ces animaux au stade larvaire est très fin ce qui facilite considérablement la diffusion des molécules à l'intérieur de l'organisme et sa distribution rapide via le système circulatoire. Les adipocytes matures sont uniloculaires et la coloration de la gouttelette lipidique unique constituée quasi exclusivement de TAG est réalisée à l'aide du rouge de Nil. Ce colorant vital a un pic d'émission de fluorescence spécifique après excitation (Figure 34) (Greenspan and Fowler, 1985 ; Flynn *et al.*, 2009 ; Romek *et al.*, 2011). Le protocole consiste à réaliser une capture de l'image en fluorescence de la larve avant et après exposition à un composé donné, exposition qui a elle-même été précédée par une alimentation à l'aide d'un aliment de composition lipidique connue. Ce protocole permet ainsi d'étudier, d'une part l'effet d'une exposition à une molécule donnée sur l'adiposité de l'animal, mais également d'apprécier l'interaction entre cet effet et le passé nutritionnel de l'animal.

L'analyse du signal de fluorescence du TAB, même pour des localisations corporelles profondes, est possible du fait de la transparence de la larve à ces stades de développement. L'aire ou l'intensité du signal de fluorescence du TAB après coloration au rouge de Nil est mesurée par traitement informatisé des images (logiciel ImageJ (NIH), libre de droits) selon une procédure similaire à celle précédemment développée au sein du laboratoire. Cette procédure parfaitement optimisée est utilisée en routine dans le cadre de la mise en œuvre d'un autre test développé par l'équipe, le « T4 immunofluorescence quantitative disruption test » (TIQDT) (Raldúa and Babin, 2009 ; Thienpont *et al.*, 2011 ; Raldúa *et al.*, 2012). Dans le cas du ZO test, nous avons démontré qu'il existe une corrélation très significative entre l'aire ou l'intensité du signal de fluorescence du TAB et la quantité des TAG dosées en biochimie à partir des larves entières. La quantité de TAB présente dans la larve du poisson zèbre est liée à la taille de l'animal et non à son âge. Une observation similaire a été publiée (Imrie and Sadler, 2010). La mise en œuvre du ZO test doit s'effectuer avec des larves dont la

taille est comprise entre 7,5 et 9 mm. Ceci permet d'obtenir une fluorescence entre 10 et 60 unités arbitraires après coloration au rouge de Nil pour des animaux dont les différentes localisations du TAB sont en place. Le TAB est alors disposé au niveau viscéral, à la base des nageoires pectorales et caudale, au niveau de la mâchoire et autour des yeux, au sein de la région péricardique, et de façon limitée au niveau sous-cutané (Figure 35A) (Flynn *et al.*, 2009). La gamme de taille des animaux utilisée permet de maintenir l'adiposité de la peau à un niveau acceptable pour permettre la visualisation par transparence des autres sites corporels de distribution du TAB. Le filtre HQ-FITC-BP du microscope à fluorescence utilisé permet de minimiser au maximum le bruit de fond lors de la capture d'image (Figure 34C) par rapport au TRITC utilisé précédemment (Figure 35B) (Flynn *et al.*, 2009).



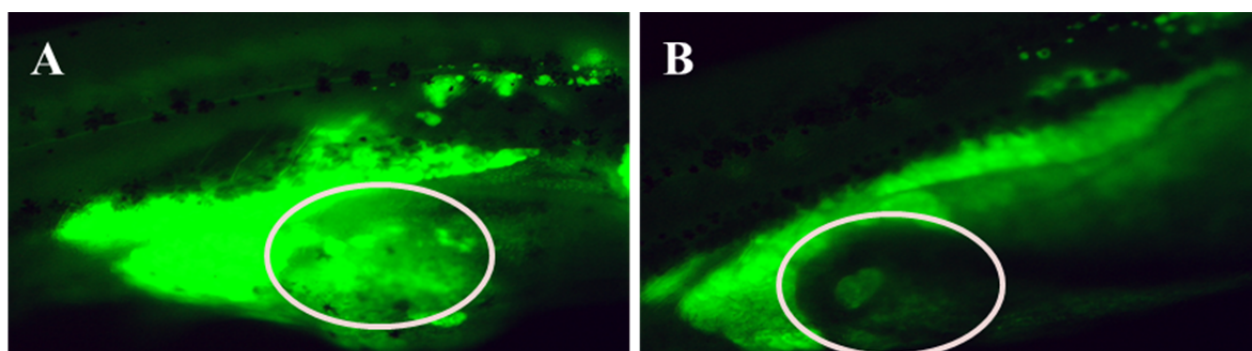
**Figure 35.** Visualisation *in vivo* du signal de fluorescence des gouttelettes lipidiques des adipocytes après coloration au rouge de Nil de la larve vivante de poisson zèbre. (A) Les différentes localisations du TAB de la larve en vue latérale (d'après Flynn *et al.*, 2009) ; (B), Vue latérale sous microscope avec un filtre TRITC ; (C), Vue latérale pour le même animal sous le filtre HQ-FITC-BP. (e), œil ; (SC), sous cutané ; (M), mâchoire ; (V), viscérale ; (P), pectorale ; (C), caudale ; (PC) région péricardique Echelle, 1 mm (d'après Tingaud-Sequeira *et al.*, 2011).

Le ZO test donne une opportunité originale et unique, non seulement pour la visualisation du TAB *in vivo* chez un modèle animal, mais permet également d'avoir une évaluation individuelle longitudinale sur des tissus et des organes spécifiques (voir par

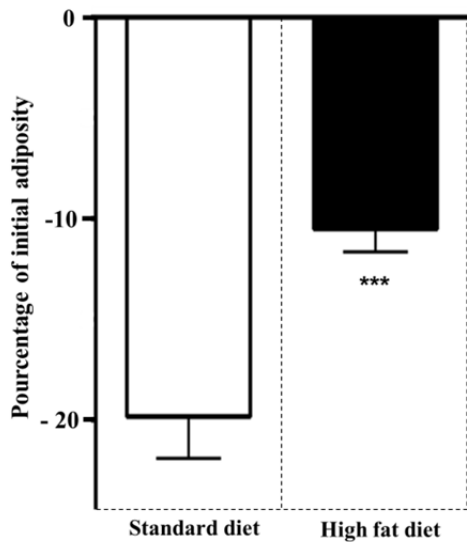


exemple la Figure 8 du Chapitre II, Tingaud-Sequeira *et al.*, 2011). Une analyse *in vivo* à l'échelle de l'adipocyte peut également être réalisée, ce qui constitue un avancé remarquable, de notre point de vue, pour l'étude de la dynamique *in vivo* de l'adipocyte et des facteurs impliqués (voir par exemple la Figure 6 du Chapitre II, Tingaud-Sequeira *et al.*, 2011).

La larve de poisson zèbre permet d'étudier l'effet du régime alimentaire sur la dynamique à court terme et à long terme du TAB. Le ZO test est quand à lui particulièrement dédié pour cette évaluation à court terme. Une alimentation riche en lipides (55% de lipides) se traduit par une augmentation rapide et très importante du signal de fluorescence dans la circulation sanguine par rapport à l'alimentation standard (10 % de lipides) (Figure 4 du Chapitre II, Tingaud-Sequeira *et al.*, 2011). Le protocole mis œuvre tient compte de la mise à jeun de 24 heures nécessaire avant l'exposition aux molécules afin d'éviter le quenching du signal de fluorescence du TAB périsvical lié à la présence des aliments dans la lumière du tractus digestif (Figure 36). Cette mise à jeun de 24 heures n'est pas suffisante pour diminuer drastiquement la quantité de lipides qui circulent dans le système circulatoire des animaux nourris avec un régime riche en lipides (Figure 4 du Chapitre II, Tingaud-Sequeira *et al.*, 2011). Par contre, la mise en œuvre du ZO test sur des animaux contrôles indique que la mise à jeun des larves provoque très rapidement une diminution de l'adiposité corporelle (Figure 36). Cette diminution est dépendante de la nature du régime alimentaire ingéré. Des larves contrôles traitées avec 0,1% DMSO et nourries initialement avec un aliment standard, perdent  $19,77 \pm 1,87$  % de leur adiposité en 24 heures ; alors que des larves nourries initialement avec un aliment riche en lipides ne perdent que  $11,83 \pm 0,93$ % de leur adiposité (Figure 37).



**Figure 36.** Visualisation du TAB périsvical de larves de poisson zèbre après coloration au rouge de Nil et observation au microscope à fluorescence. A) Larve 24 heures après la prise de nourriture. B) Larve 3 heures après la prise de nourriture. La différence de fluorescence observée, au niveau du tractus digestif (cercle blanc), est le résultat du quenching de fluorescence imputable à la présence des aliments dans le tractus digestif.



**Figure 37.** : Effet de la nature du régime alimentaire sur le pourcentage de perte en adiposité après la mise à jeun des larves de poisson zèbre. Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  SEM de 9 expériences indépendantes, N=10 larves par groupes, \*\*\* $p < 0.005$  par comparaison des moyennes en utilisant le « one-tailed unpaired *t*-test ».

La possibilité d'étudier les interactions entre facteurs nutritionnels et exposition à des molécules qui modulent l'adiposité est l'une des qualités les plus représentatives du ZO test. Nous l'avons illustré de la façon suivante (Tingaud-Sequeira *et al.*, 2011). PPAR $\gamma$  est considéré comme le RN régulateur clé de l'adipogenèse (Tontonoz et Spiegelman, 2008) et permet de faire le lien entre l'obésité et le diabète de type 2 (Janesick et Blumberg, 2011). La Rosi est connu comme agoniste des PPAR $\gamma$  et est capable d'induire la différenciation adipocytaire en culture cellulaire à une concentration de l'ordre de 10  $\mu$ M (Velebit *et al.*, 2008). Cet agoniste est capable de diminuer rapidement l'expression de certaines enzymes clés du métabolisme du glucose chez des larves de poisson zèbre traitées à la concentration de 1  $\mu$ M (Elo *et al.*, 2007). Le T0070907 est un antagoniste puissant des PPAR $\gamma$  et peut être utilisé à la concentration de 10  $\mu$ M en culture cellulaire (Lee *et al.*, 2002 ; Tontonoz et Spiegelman, 2008). A titre d'exemple, nous avons également testé une autre molécule, la phényléphrine, qui intervient dans une autre voie de signalisation et qui est un agoniste des récepteurs  $\alpha$ 1 adrénergiques. Cette molécule est capable d'augmenter la lipolyse au sein du TAB humain (Boschmann *et al.*, 2002). Le T0070907 et la phényléphrine produisent un effet lipolytique significatif par rapport aux contrôles lorsque les animaux ont été préalablement nourris avec un régime alimentaire standard, ce qui n'est plus le cas avec un régime riche en lipides (Figure 5 du Chapitre II, Tingaud-Sequeira *et al.*, 2011). La prise en compte du passé nutritionnel est donc un critère important pour permettre l'identification de molécules à caractère anti-obésogène. Les larves traitées à la Rosi ont augmenté leur niveau d'adiposité avec un régime alimentaire initial riche en lipide (Figure 5 du Chapitre II, Tingaud-Sequeira *et al.*, 2011). Sous l'effet de la Rosi, la balance entre mobilisation des TAG consécutive à la situation de jeûne et lipogenèse est orientée vers le stockage de ces lipides ce qui se traduit par une augmentation de la taille de la gouttelette lipidique présente dans les adipocytes

différenciés (Figure 6 du Chapitre II, Tingaud-Sequeira *et al.*, 2011). D'une façon tout à fait remarquable, cet effet obésogénique de la Rosi peut être inhibé par co-incubation avec l'antagoniste des PPAR $\gamma$ , le T0070907 (Figure 7 du Chapitre II, Tingaud-Sequeira *et al.*, 2011). Ce résultat confirme un résultat obtenu précédemment en culture cellulaire (Kirchner *et al.*, 2009) et démontre que le ZO test peut être utilisé comme un outil pour l'étude des mécanismes moléculaires qui sous-tendent la dynamique *in vivo* du TAB de poisson zèbre. Cette propriété a été utilisée pour mieux définir les mécanismes moléculaires impliqués dans l'effet obésogénique puissant d'un contaminant environnemental, le TBT (Chapitre III).

## **2. Etude du mécanisme d'action *in vivo* du TBT sur le TAB.**

Une molécule obésogène peut favoriser le dépôt des lipides dans les adipocytes en perturbant l'homéostasie lipidique à un ou plusieurs niveaux et peut être un PE de nature xénobiotique. Il peut agir en se substituant à des ligands naturels et bloquer ou en sur-réguler des récepteurs aux hormones. Elle peut également induire un dérèglement de la biosynthèse des hormones et altérer par voie de conséquence l'homéostasie lipidique. Enfin, une molécule obésogène peut modifier la balance énergétique en induisant des dysfonctionnements dans les processus de régulation de la satiété et induire des altérations de la programmation métabolique au cours du développement (Grün et Blumberg, 2009a ; 2009b)

Parmi les molécules que nous avons criblé avec le ZO test, le TBT s'est avéré être l'un des obésogènes le plus puissant que nous ayons utilisé et peut induire son action obésogénique à une concentration incroyablement basse, de l'ordre du nM (Figure 3, Chapitre III, Ouadah-Boussouf and Babin, 2012). Cette concentration est à mettre en rapport avec la concentration en TBT qui peut être mesurée dans le sang humain. Par exemple, la concentration moyenne observée lors d'une étude menée aux USA en 1998 a été de  $23,4 \pm 44,04$  nM (Kannan *et al.*, 1999). Le TBT peut donc être considéré comme un obésogène à des concentrations habituellement rencontrées dans les organismes animaux pour les hormones. Ces données obtenues sur la larve de poisson zèbre confirment que cette molécule est l'un des produits les plus toxiques qui ait jamais été introduit par l'homme dans notre environnement. Le TBT est classé comme l'un des PEs les plus puissants (Evans *et al.*, 1995; Pereira *et al.*, 1999; Ayanda *et al.*, 2012) et avait été identifiée précédemment comme très obésogénique (Kanayama *et al.*, 2005 ; Grün et Blumberg, 2009a ; Grün *et al.*, 2006a ; Janesick et Blumberg, 2012).

Des études menées *in vitro* montrent que la capacité du TBT ou de la Rosi à induire l'adipogenèse à partir des cellules souches multipotentes du stroma vasculaire (CSM) (Kirchner *et al.*, 2010) ou la différenciation de préadipocytes 3T3-L1 (Li *et al.*, 2011) était dépendante de l'activation de l'hétérodimère RXR/PPAR $\gamma$  (Kanayama *et al.*, 2005 ; Nishikawa *et al.*, 2004 ; Nakanishi *et al.*, 2005 ; 2006 ; Nakanishi, 2007 ; 2008 ; Grün *et al.*, 2006a ; Grün et Blumberg, 2006b). En culture cellulaire, le TBT semble se lier à PPAR $\gamma$  et fonctionne d'une manière compétitive contre la rosiglitazone, en bloquant la liaison de cette dernière avec le PPAR $\gamma$  (Hiromori *et al.*, 2009). Le TBT peut activer les trois formes des hétérodimères PPAR $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  et  $\gamma$  via leur partenaire RXR (le Maire *et al.*, 2009). En effet, le TBT peut avoir une liaison covalente entre son atome d'étain et la cystéine 432 de l'hélice H11 du RXR $\alpha$  humain (le Maire *et al.*, 2009). D'autres auteurs ont également montré que le TBT interagit avec les RXRs pour influencer l'expression des gènes régulés par les hétérodimères permissifs (Wang *et al.*, 2011). Par ailleurs, l'imposex des mollusques gastéropodes peut être induit via des ligands de RXR de façon similaire à l'action inductrice du TBT (Castro *et al.*, 2007 ; Sousa *et al.*, 2010 ; Lima *et al.*, 2011 ; Stange *et al.*, 2012).

Le point de départ de nos investigations sur le mode d'action du TBT a été d'utiliser un antagoniste des PPAR $\gamma$ , le T0070907, car des travaux précédents réalisés sur des cultures cellulaires de préadipocytes 3T3-L1 avaient indiqués que cet antagoniste pouvait bloquer l'effet obésogène du TBT (Kirchner *et al.*, 2010). Ce résultat était en contradiction avec des travaux réalisés précédemment sur cette lignée adipocytaire où une absence de blocage de l'action du TBT par l'antagoniste GW9662 du PPAR $\gamma$  avait été observée (Inadera and Shimomura, 2005). L'absence de l'effet du GW9662 pour bloquer la différenciation des préadipocytes serait due à une temps de demi vie très court en culture cellulaire de cet antagoniste, le TBT pouvant mener son action après activation de l'hétérodimère RXR/PPAR $\gamma$  (Li *et al.*, 2011).

En utilisant comme contrôle positif l'effet de la Rosi, nous avons pu montrer, par utilisation du ZO test, que le T0070907 bloque l'action obésogénique de la Rosi, agoniste bien connu du PPAR $\gamma$  (Figure 7 du Chapitre II, Tingaud-Sequeira *et al.*, 2011 ; Figure 4 du Chapitre III, Ouadah-Boussouf and Babin, 2012). Toutefois, cet antagoniste du PPAR $\gamma$  est incapable de bloquer l'action du TBT sur le TAB de poisson zèbre (Figure 4 du Chapitre III, Ouadah-Boussouf and Babin, 2012). A partir de ce résultat en contradiction avec celui obtenu en culture cellulaire de préadipocytes, nous avons recherché le mode d'action *in vivo* du TBT sur le TAB du poisson zèbre par l'étude des RNs potentiellement impliqués.

Les RNs, et en particulier le site de liaison au ligand, sont très conservés au cours de l'évolution. Ceci permet généralement d'utiliser des agonistes et des antagonistes spécifiques dans des conditions interspèces. Parmi certains NRs connus pour réguler le métabolisme des lipides, e.g. ER, PPAR $\alpha$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ , RXR et LXR, l'utilisation d'antagonistes spécifiques a permis dans un certain nombre de cas d'augmenter, par rapport aux contrôles, la diminution de l'adiposité observée au cours du jeûne (Figure 1 du Chapitre III, Ouadah-Boussouf and Babin, 2012). Ceci concerne le T0070907 et le GSK3787, respectivement antagonistes des PPAR $\gamma$  et  $\delta$ , l'UVI3003 utilisé comme antagoniste du RXR, et le GSK2033 antagoniste du LXR. L'activité de ces NRs est donc modulable *in vivo* pour modifier le niveau d'adiposité de la larve de poisson zèbre. Nous avons donc par la suite concentré nos travaux sur ces NRs.

Comme indiqué au Chapitre I (partie N°2), les RXRs représentent le partenaire obligatoire à l'hétérodimérisation pour de nombreux RNs (Mangelsdorf *et al.*, 1990). Les ligands des RXRs peuvent stimuler l'activation de la transcription de leurs partenaires quand il s'agit des récepteurs permissifs comme par exemple les PPARs et les LXRs (Lefebvre *et al.*, 2010). En utilisant le ZO test, nous avons montré que les hétérodimères RXR/PPAR $\gamma$  et RXR/LXR peuvent être recrutés comme modulateurs de l'adiposité chez la larve de poisson zèbre (Figure 2 du Chapitre III, Ouadah-Boussouf and Babin, 2012). Concernant l'hétérodimère RXR/PPAR $\gamma$ , une utilisation séparée de l'agoniste de chacun des deux partenaires de l'hétérodimère ou des deux agonistes simultanément montre un effet obésogénique et une hypertrophie des adipocytes. Les PPAR $\gamma$  sont connus pour leur effet obésogène que ce soit chez le poisson zèbre, le *Xénope* ou l'espèce humaine (Riu *et al.*, 2011). Ce NR représente une cible majeure des molécules obésogènes (Kanayama *et al.*, 2005 ; Janesick et Blumberg, 2011). Les RXRs sont également la cible des obésogènes et un blocage de ce récepteur par l'antagoniste HX531 peut avoir un effet anti-obésogène et antidiabétique. Cet antagoniste a pu inhiber l'hypertrophie des adipocytes dérivée des rats OLETF (Nakatsuka *et al.*, 2012). Nos travaux montrent que trois agonistes différents des RXRs, le fluorobexarotène, le SR11237 et la DHA ont une activité obésogène qui peut par ailleurs être inhibée par l'antagoniste l'UVI3003. Nos résultats démontrent par ailleurs, qu'une inhibition de l'un des partenaires de l'hétérodimère RXR/PPAR $\gamma$ , par son antagoniste spécifique, provoque l'inhibition de l'effet obésogène de l'agoniste de l'autre partenaire. Le même résultat a été observé avec l'hétérodimère RXR/LXR (Figure 2 du Chapitre III, Ouadah-Boussouf and Babin, 2012). Ceci indique que l'adiposité de la larve de poisson zèbre peut être modulée par ces RNs sous forme d'hétérodimères.

Une exposition de 24 heures des larves de poisson zèbre selon la procédure du ZO test avec la Rosi et le GW501516, agonistes respectivement des PPAR $\gamma$  et  $\beta/\delta$ , induit une augmentation de l'adiposité par rapport aux animaux exposés avec le véhicule (DMSO) seul. Ceci est en accord avec des observations précédentes sur l'augmentation de la quantité de lipides dans des cellules en culture (Schmuth *et al.*, 2004 ; Kirchner *et al.*, 2010). Dans les deux cas cet effet a pu être inhibé par des antagonistes spécifiques, le T0070907 et le GSK3787, de ces deux RNs. Ces deux antagonistes n'ont aucune action sur l'effet obésogène du TBT observé par le ZO test ce qui suggère que le TBT n'utilise pas les PPAR $\gamma$  et PPAR $\beta/\delta$  (Figure 4 du Chapitre III, Ouadah-Boussouf and Babin, 2012). La DHA et le GW3965, respectivement agonistes des RXRs et des LXRs, présentent un effet obésogène de la même manière que le TBT (Figure 5 du Chapitre III, Ouadah-Boussouf and Babin, 2012). L'antagoniste UVI3003 des RXRs inhibe complètement l'effet obésogène de la DHA mais également du TBT. L'antagoniste GSK2033 des LXRs inhibe complètement l'effet obésogène du GW3965 mais partiellement l'effet de TBT. Ces résultats indiquent que chez la larve de poisson zèbre, le TBT réalise son effet obésogène via les homodimères RXR/RXR et les d'hétérodimères LXR/RXR. Les hétérodimères RXR/PPAR $\gamma$  ne semblent pas être impliqués dans l'effet obésogénique du TBT mais ont le potentiel d'être recrutés séparément en présence de TBT pour moduler l'adiposité du poisson zèbre (Figure 6 du Chapitre III, Ouadah-Boussouf and Babin, 2012).

Nos résultats indiquent que le TBT stimule le dépôt des TAG dans le TAB du poisson zèbre par activation de l'homodimère RXR/RXR et de l'hétérodimère RXR/LXR. Ceci est en accord avec l'hypothèse initialement formulée par Inadera et Shimomura en 2005. Les résultats contradictoires obtenus par les autres auteurs par utilisation de cultures cellulaires pourraient éventuellement s'expliquer par l'action concomitante de facteurs hormonaux ou de croissance présent dans le milieu de culture. Il est à noter que l'homodimère RXR/RXR peut se lier sélectivement aux PPREs (Ijpenberg *et al.*, 2004). Par ailleurs, l'activation des LXRs est impliquée non seulement en lipogenèse mais également en adipogenèse avec une expression de gènes spécifiques de l'adipocyte dans les cellules 3T3-L1 (Juvet *et al.*, 2003 ; Seo *et al.*, 2004). L'homologue unique du LXR retrouvé dans le génome du poisson zèbre est plus proche du LXR $\alpha$  humain que de la forme  $\beta$  (Archer *et al.*, 2008). Dans les cellules de macrophage de souris RAW264 la réponse transcriptionnelle au TBT passe par l'hétérodimère RXR/LXR $\alpha$  (Cui *et al.*, 2011), ce qui indique que ce PE peut également, dans ce type cellulaire, utiliser cet hétérodimère pour mener son action. Les modalités de liaison du TBT au RXR $\alpha$  sont connues (le Maire *et al.*, 2009), mais aucune donnée n'existe, à notre connaissance, sur la capacité du TBT à lier directement le LXR.

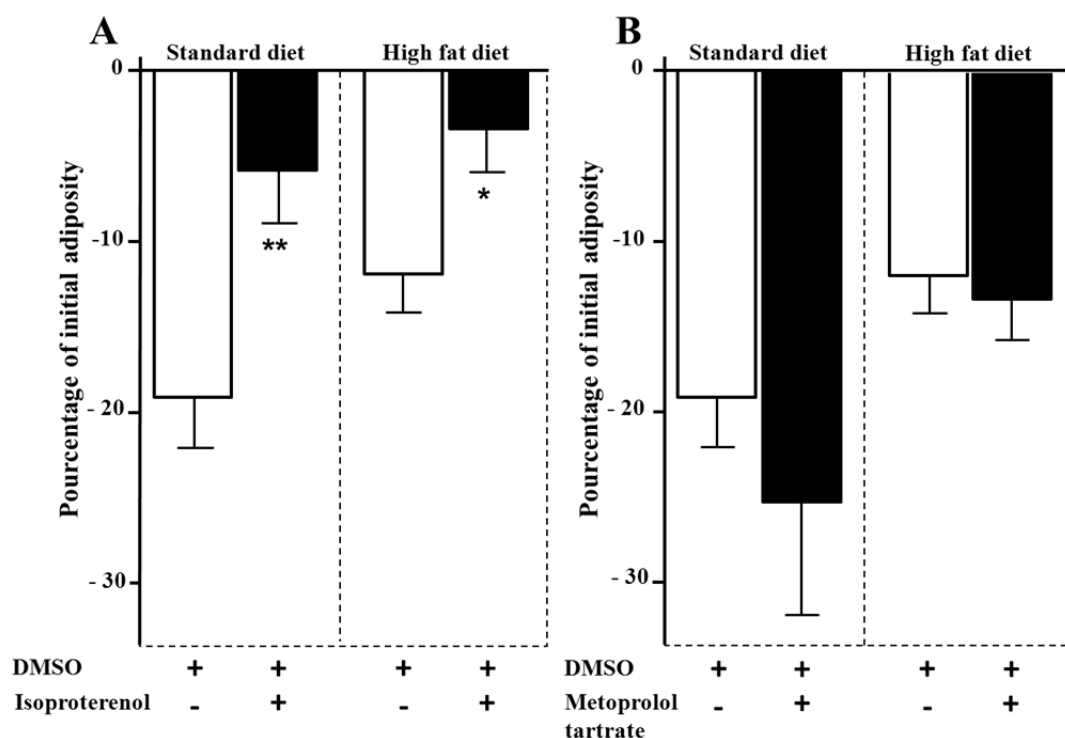
### 3. Perspectives et conclusion.

Les travaux menés dans le cadre de ce travail reposent sur la possibilité d'utiliser le ZO test. L'ensemble des analyses réalisées pour décrire la mode d'action du TBT *in vivo* sur le TAB ont été rendues possible par l'utilisation, du fait de leur petite taille et de la fécondité très élevée de cet animal, de plusieurs milliers de larves de poisson zèbre. Ceci a permis d'utiliser des séries expérimentales contenant un grand nombre d'animaux, d'effectuer des analyses appareillées, et de produire un nombre intéressant de réplicats indépendants pour chacune des expériences. Cette puissance d'analyse, rendue possible par la mise en œuvre du ZO test, est très difficilement abordable par l'utilisation du modèle rongeur, du fait du coût expérimental engendré et de la difficulté éthique à utiliser un si grand nombre de mammifères.

Le ZO test, de part son principe, utilise comme point final la taille de la gouttelette lipidique de l'adipocyte, ce qui permet *in fine* d'obtenir une estimation quantitative du niveau d'adiposité de l'animal vivant. Nous considérons que ce point final correspond au niveau d'intégration est le plus adéquat pour décrire l'action de molécules obésogènes ou anti-obésogènes, comme cela a pu être illustré par la caractérisation du mode d'action *in vivo* du TBT via les RNs. Une analyse plus fine de la cascade d'évènements moléculaires qui aboutissent à la variation de ce point final peut s'avérer nécessaire. Ceci concerne, par exemple, l'étude de la variation des certains gènes cibles de l'homodimère RXR/RXR et de l'hétérodimère LXR/RXR lors de l'action du TBT. Ce type d'analyse pourrait être aisément réalisé par PCR quantitative en temps réel sur la larve de poisson zèbre mais uniquement dans le cas de gènes, à priori très rares, spécifiquement exprimés dans l'adipocyte blanc. L'hybridation *in situ in toto* pourrait être une alternative pour les gènes plus ubiquitaires, mais cette méthode n'est alors que semi-quantitative. Il est à noter que dans certaines situations expérimentales, la variation du niveau des transcrits ne correspond pas à une variation concomitante des protéines correspondantes et que la réponse moléculaire observée peut être inverse à la réponse physiologique attendue (voir par exemple, Thienpont *et al.*, 2011).

Le ZO test ne se limite pas uniquement à tester l'effet de molécules via les RNs. Au cours de ce travail nous avons criblé des molécules pharmaceutiques, des pesticides et autres contaminants de l'environnement dont les effets pourraient ou non s'effectuer par d'autres voies de signalisations cellulaires. A titre d'exemple, la phényléphrine, un agoniste des récepteurs  $\alpha$ 1-adrénergique capable d'induire une augmentation de l'activité lipolytique du

TAB humain (Boschmann *et al.*, 2002), provoque une diminution de l'adiposité par rapport aux contrôles si les animaux ont été nourris préalablement avec un aliment standard peu riche en lipides (Figure 5 du Chapitre II, Tingaud-Sequeira *et al.*, 2011). L'activité des récepteurs membranaires de type adrénérgique peut donc là aussi être étudiée avec le ZO test. Nous illustrerons cette possibilité à l'aide d'un second exemple. Il est connu que le récepteur  $\beta$ 1-adrénérgique peut être impliqué dans la stimulation de la lipolyse à la fois dans le TAB et le tissu adipeux brun des mammifères (Atgié *et al.*, 1997 ; Jimenez *et al.*, 2002). Chez un poisson téléostéen, le tilapia, des mesures effectuées sur des adipocytes isolés ont montré que le récepteur  $\beta$ 1-adrénérgique possède un rôle inverse par rapport aux mammifères, c'est-à-dire qu'il semble inhiber la lipolyse (Vianen *et al.*, 2001). En utilisant le ZO test, nous avons pu démontrer *in vivo* qu'un agoniste du récepteur  $\beta$ 1-adrénérgique, l'isoproterenol, inhibe la diminution d'adiposité due au jeûne que ce soit dans des conditions de régime alimentaire initial standard ou riche en lipides alors qu'un antagoniste du même récepteur, le metoprolol tartrate, semble sans effet significatif (Figure 37). Ce résultat confirme l'efficacité et la sensibilité du ZO test pour étudier *in vivo* les modalités d'action de différents types de molécules sur l'activité métabolique du TAB.



**Figure 38.** Le ZO test permet de tester la voie de signalisation du récepteur de type  $\beta$ 1-adrénérgique. A) L'isoprotérenol est une agoniste  $\beta$ 1-adrénérgique chez les mammifères mais semble posséder une activité inverse sur les adipocytes de poisson zèbre par une inhibition de la diminution de l'adiposité au cours du jeûne à la fois en régime alimentaire standard ou riche en lipides. B) Le metoprolol tartrate, antagoniste du récepteur de type  $\beta$ 1-adrénérgique



semble sans effet significatif. Les deux molécules ont été testées à la concentration de 10  $\mu$ M. Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  SEM, \*P < 0,05 ; \*\*P < 0,01 par comparaison des moyennes par rapport aux contrôles en utilisant le « one-tailed unpaired *t*-test ».

Le protocole mis en œuvre lors du ZO test permet, par exposition pendant 24 heures aux molécules à évaluer, de connaître leur capacité à moduler la taille de la gouttelette lipidique de l'adipocyte. Le principe utilisé, coloration au rouge de Nil et acquisition et traitement d'images en fluorescence, peuvent également être utilisés pour étudier les effets à long terme de ces molécules sur la mise en place et l'hyperplasie de la lignée adipocytaire au cours du développement. Dans ce contexte, des travaux préliminaires ont été réalisés dans le cadre de cette thèse (données non montrées). La variabilité individuelle de la taille des animaux au cours de leur développement a rendu difficile l'interprétation des données. Une optimisation du protocole expérimental est donc nécessaire pour ce type de travaux.

En conclusion, ce travail a permis de développer une méthode simple et rapide, dénommée ZO test, pour identifier *in vivo*, par utilisation de la larve de poisson zèbre, des facteurs qui peuvent augmenter ou diminuer la taille de l'adipocyte blanc et ainsi moduler le niveau d'adiposité. Ce test mis en œuvre chez un vertébré modèle permet d'identifier des molécules qui ciblent le fonctionnement du TAB et d'étudier les mécanismes sous-jacents à un effet obésogène ou anti-obésogène. Nous avons par exemple clarifié le mécanisme d'action du TBT qui agit sur le TAB du poisson zèbre via les RNs RXR et LXR et non pas via les isoformes PPAR $\gamma/\delta$ .



## ABSTRACT

An unbalanced diet and / or the presence of exogenous compounds contaminants may alter endocrine signaling and lipid homeostasis and induce obesity. The work done in this thesis have, at first, developed a simple and rapid method, called "zebrafish obesogenic (ZO) test" to identify *in vivo* by using the zebrafish larva, the factors that may increase or decrease the size of the white adipocyte and therefore modulate the level of adiposity (Tingaud-Sequeira, Ouadah, Babin, J. Lipid Res. 52, 1765-1772, 2011). This test helps to identify compounds and mixtures of obesogenic and anti-obesogenic molecules and provides information relevant to the risk assessment of their presence but also to elucidate the mechanisms involved. Work in a second time allowed to answer as to how the action of tributyltin chloride, a powerful obesogenic contaminant found widely in the environment. This molecule acts *in vivo* on white adipocytes in a concentration of the order of nano molar via nuclear receptors LXR and RXR, and not via the PPARgamma/delta isoforms (Ouadah-Boussouf and Babin, manuscript in preparation).

**Keywords:** obesity, white adipose tissue, zebrafish, environmental pollutant, tributyltin, RXR, LXR, PPARg, obesogenic, anti-obesogenic, model, ZO test.

## LIST OF ABBREVIATIONS

<b>4-OHT</b>	4 -Hydroxytamoxifen
<b>8S-HETE</b>	Acid, 8-S-hydroxyeicosatetraenoic
<b>ACC</b>	Acetyl-CoA carboxylase
<b>acyl-CoA</b>	Acyl-Co enzyme A
<b>AR</b>	Androgen Receptor
<b>ASP</b>	Acylation stimulating protein
<b>BMI</b>	Body mass index
<b>BMP-4</b>	Bone morphogenic protein 4
<b>C / EBPs</b>	CCAAT-enhancer binding protein
<b>cAMP</b>	Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate
<b>DBD</b>	DNA binding domain
<b>DBT</b>	Dibutyltin
<b>DDT</b>	Dichlorodiphenyltrichloroethane
<b>DES</b>	Diethylstilbestrol
<b>DHA</b>	Docosahexaenoic acid
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid
<b>Dpf</b>	Days post fertilization
<b>DRn</b>	Direct Repeat,
<b>ED</b>	Endocrine disruptor
<b>EGF</b>	Epidermal growth factor
<b>ER</b>	Estrogen receptor
<b>ERn</b>	Everted Repeat
<b>FA</b>	fatty acids
<b>FABP4</b>	fatty acid-binding protein 4
<b>FAS</b>	Fatty acid synthase
<b>FBA</b>	Fluorobexarotene
<b>FXR</b>	Farnesoid X receptors
<b>GLUT</b>	Glucose Transporter
<b>GR</b>	Glucocorticoid receptor
<b>hpf</b>	Hours post fertilization
<b>HRE</b>	Hormone Response Element
<b>HSP</b>	Heat shock proteins
<b>IGF-1</b>	insulin growth Factor 1
<b>IL-6</b>	Interleukin 6
<b>INSEE</b>	National Institute of Statistics and Economic Studies
<b>IRn</b>	Indirect Repeat,
<b>LCFA</b>	Long-chain fatty acids
<b>LDL</b>	Low Density Lipoprotein
<b>LPL</b>	Lipoproteine lipase
<b>LXR</b>	Liver X Receptor
<b>LXRE</b>	Liver X Receptor response element
<b>MR</b>	Mineralocorticoid Receptor
<b>MSC</b>	Mesenchymal stem cells

<b>NRs</b>	nuclear receptors
<b>PAI-1</b>	Plasminogen activator inhibitor-1
<b>PI-3K</b>	Phosphoinositide 3-kinase
<b>PPAR</b>	Peroxisome proliferator-activated receptor
<b>PPRE</b>	Peroxisome proliferator response elements
<b>PR</b>	Progesterone Receptor
<b>PUFAs</b>	Polyunsaturated fatty acids
<b>PVC</b>	Polyvinyl chloride
<b>RAR</b>	Retinoic Acid Receptor
<b>RARE</b>	RAR response element
<b>RBP</b>	Retinol binding protein
<b>Rosi</b>	Rosiglitazone
<b>RXR</b>	Retinoid X receptors
<b>SCD-1</b>	Stearoyl Coenzyme-A Desaturase 1
<b>SREBP-1c</b>	Sterol regulatory element-binding protein-1c
<b>TAG</b>	Triacylglycerols
<b>TARL</b>	Tolerable or acceptable average residue levels
<b>TBT</b>	Tributyltin
<b>TDI</b>	Tolerable daily intake
<b>TGF<math>\alpha</math></b>	Transforming growth factor $\alpha$
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumor necrosis factor $\alpha$ (TNF)
<b>TPT</b>	Triphenyltin
<b>TR</b>	Thyroid hormone Receptor
<b>TZDs</b>	Thiazolidinediones
<b>UV</b>	Ultraviolet
<b>VDR</b>	Vitamin D Receptor
<b>VEGF</b>	vascular endothelial growth factor
<b>VLDL</b>	Very Low Density Lipoprotein
<b>WAT</b>	White adipose tissue
<b>WHO</b>	Organization World Health Organization

## LIST OF FIGURES

<b>Figure 1</b>	Energy balance and factors involved in its regulation.....	130
<b>Figure 2</b>	Comparison of the percentage of overweight and obesity observed in France and the United States for the year 2010 .....	132
<b>Figure 3</b>	Structure and cell types of WAT .....	135
<b>Figure 4</b>	Histological section of perivisceral WAT of a female adult zebrafish .....	135
<b>Figure 5</b>	Diagram of a unilocular white adipocyte .....	136
<b>Figure 6</b>	Some of the proteins secreted by WAT.....	137
<b>Figure 7</b>	Diagram showing the cascade of events and molecular players involved in and adipocyte determination and differentiation.....	140
<b>Figure 8</b>	Diagram of a TAG.....	142
<b>Figure 9</b>	Diagram of a glycerophospholipid .....	142
<b>Figure 10</b>	Different types of non-ramified fatty acids .....	142
<b>Figure 11</b>	Lipid metabolism in white adipocytes.....	145
<b>Figure 12</b>	Control of human adipocyte lipolysis .....	147
<b>Figure 13</b>	Diagram of endocrine signaling .....	147
<b>Figure 14</b>	Functional organization of NRs .....	151
<b>Figure 15</b>	Structural organization of RNs.....	151
<b>Figure 16</b>	General mode of action of NRs located in the cytoplasm.....	153
<b>Figure 17</b>	General mode of action of NRs located inside the nucleus and the mechanism of corepression and coactivation of transcription.....	154
<b>Figure 18</b>	Phylogenetic analysis of the sequence of RXR isotypes among different vertebrate species .....	1955
<b>Figure 19</b>	Chemical structure of some natural or synthetic ligands of RXRs .....	157
<b>Figure 20</b>	The transcriptional activation by non-permissive, permissive and conditional permissive heterodimers.....	158
<b>Figure 21</b>	Mechanism of gene transcription by PPARs.....	160
<b>Figure 22</b>	Examples of the chemical structure of some PPAR $\alpha$ , $\beta/\delta$ and $\gamma$ ligands.....	162
<b>Figure 23</b>	Mode of action of the RXR/LXR heterodimer.....	166
<b>Figure 24</b>	Pattern of interactions between the endocrine system and the reproductive, neurological and immune systems to illustrate the complexity of the potential mode of action of xenobiotics .....	167
<b>Figure 25</b>	Diagram showing the different modes of action of xenobiotics via NRs .....	171
<b>Figure 26</b>	Structures of tributyltin and tributyltin chloride.....	172
<b>Figure 27</b>	Schematic distribution of the use of products containing organotins .....	173
<b>Figure 28</b>	Estimate of the historical evolution of TBT concentrations in the open waters of the Bassin d'Arcachon (France .....	175

<b>Figure 29</b>	Distribution and sources of organotins in the aquatic environment.....	178
<b>Figure 30</b>	Abnormalities of the upper valve calcification oysters (A and B) compared with the normal appearance of control oysters (C) .....	179
<b>Figure 31</b>	Sources of human exposure to organotin compounds.....	181
<b>Figure 32</b>	Pictures representative of an individual female or male zebrafish ( <i>Danio rerio</i> )	185
<b>Figure 33</b>	Nutritional phases during zebrafish development .....	186
<b>Figure 34</b>	Diagram showing some possible pharmacological tests using zebrafish as a model (after Langheinrich, 2003).....	187
<b>Figure 35</b>	<i>In vivo</i> imaging of the fluorescence signal of adipocyte lipid droplets after staining with Nile Red in living zebrafish larva .....	217
<b>Figure 36</b>	Visualization of perivisceral WAT of larval zebrafish after Nile red staining and observation under a fluorescence microscope.....	218
<b>Figure 37</b>	Effect of diet lipid composition on the percentage of fat loss after the fasting of zebrafish larva .....	219
<b>Figure 38</b>	The ZO test is useful to test $\beta$ 1-adrenergic receptor signaling pathway. ....	226

#### LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b>	The main formulas used to calculate the ideal body weight .....	133
<b>Tableau 2</b>	The threshold BMI values used by the WHO .....	134
<b>Tableau 3</b>	Nomenclature and classification of human NRs according to their structural homology.....	147
<b>Tableau 4</b>	Percentage of identical amino acids between homologous proteins encoded by LXR $\alpha$ between different species of vertebrates .....	164
<b>Tableau 5</b>	The main classes of endocrine disruptors .....	168
<b>Tableau 6</b>	Some bibliographical data concerning the levels of TBT in marine waters, sediments, but also in some biological tissues, in different parts of the world ...	177

***CHAPTER I***

***INTRODUCTION,  
LITERATURE SUMMARY AND  
OBJECTIVES***

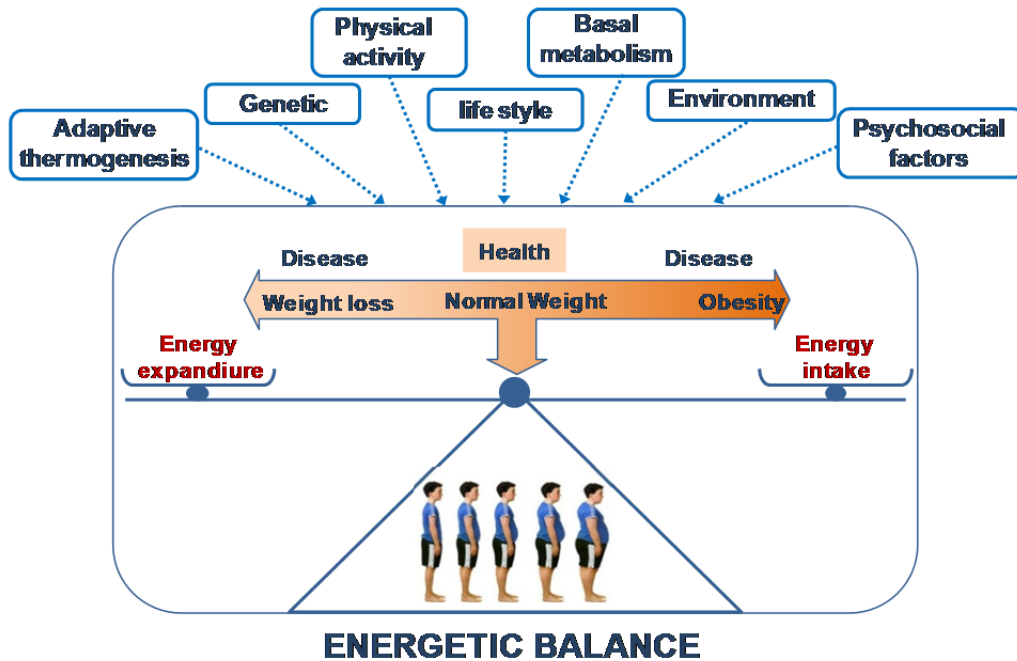


# **1. Energy balance and obesity**

## **1.1. Energy balance and obesity prevalence**

The energy balance of an individual is equilibrium between energy input in the form of food and energy expenditure to maintain structural and operating energy of the body (Figure 1). In recent years, the energy balance tends to be unbalanced, especially in Western countries. This is due to an overabundance food and eating foods high in fat and sugars but low in vitamins, minerals and other micronutrients (Leaf and Weber, 1987). This increase in caloric intake is correlated with a decrease in energy expenditure associated with physical inactivity. From a genetic point of view, the primate lineage has evolved over the last million years in the context of a parcimonious diet. The biological and physiological processes in place led to the existence of a capacity of food digestion, assimilation and storage of nutrients largely oversized in order to assume alternate periods of abundance and scarcity of food. Our species alive today in a different nutritional and behavioral context while its genetic still dictates physiological processes suitable for capture and storage of energy, particularly in the form of neutral lipids (fats).

Lipid diets are essential to the development and growth of animals. In 1929, researchers George and Mildred Burr showed the importance that a minimum amount of fat in foods to allow survival from the earliest age and harmonious growing of rats (Burr and Burr, 1929). Conversely, a diet high in fat is also reflected by the occurrence of a condition related to overweight and obesity. In the normal state, body fat represents about 20-25% of body weight in women and 10 to 15% in males (Dardour, 2012). This difference is to be linked with a higher average muscle mass in males.

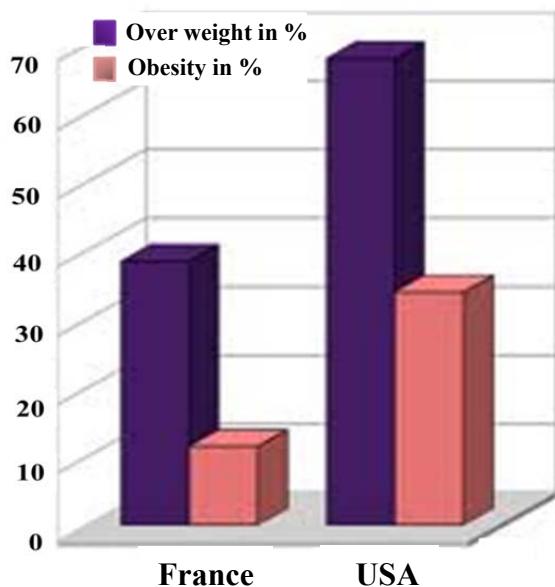


**Figure 1.** Energy balance and factors involved in its regulation.

Disruption of energy balance can lead to a decrease in body fat, i.e. the amount of white adipose tissue (WAT). If the disturbance is in the direction of energy expenditure, the individual is in a state of loss of weight. Conversely, if the imbalance is in the direction of deposition of the energy gained, it causes overweighted individuals, even obesity (Figure 1). Weight loss may be due to adipolysis which is a reduction of the amount of WAT and / or a decrease in muscle mass of the body. The reduction of body fat may be a consequence of hypotrophy, that is to say a reduction in the volume of fat cells, or hypoplasia, that is to say a reduction in the number of fat cells. This weight loss, compared to a weight value considered ideal, can be defined by a lower limit value of the body mass index (BMI) (see below). In contrast, overweight and its extreme situation, obesity, correspond to an excessive accumulation of body fat (De Saint Pol, 2007; World Health Organization (WHO), 2012). The etiology of such a situation is difficult to define because of complex interrelations between genetic and environmental factors (Han *et al.*, 2011). The accumulation of fat can be achieved by an enlarged WAT, i.e. an increase in fat cell size, or more precisely the size of lipid droplets contained in adipocytes. This accumulation may be the result of a concomitant hypertrophy associated or not with hyperplasia which corresponds to an increase in the number of white adipose cells. In both cases, the result is an increase in adiposity by storing excess energy in the form of triacylglycerols (TAG) in lipid droplets of adipocytes (Ducharme and Bickel, 2008).

The percentage of individuals classified as obese has increased on a regular basis in developed countries and emerging countries during recent decades. More than 1.5 billion people in the world suffer from overweight, including more than 200 million men and 300 million women are considered obese (2008 estimate) (WHO, 2012; Nguyen and Lau, 2012). The frequency of overweight and obesity has tripled in many European countries since the 1980s. For example, the National Institute of Statistics and Economic Studies (INSEE) (September 2010) lists in France, 38.5% of overweight individuals and about 11.5% in a state of obesity. In United States, the figures reported are impressive: more than 60% of the population is overweight and 34% are obese individuals (Figure 2). People who suffer from obesity in the United States are twice the world average and 10 times the rate in South Korea or Japan.

Recent estimates performed in children indicate that the "epidemic" of obesity seen today is far from being mastered and that this process is being extended in the coming years. For example, the predicted percentage of American adults will be overweight by 2020 is about 86% (Flegal *et al.*, 2010). At the global level, more than 40 million children under five are overweight (2010 estimate) (Nguyen and Lau, 2012). A study published in 2009, conducted on 2 385 adolescents aged between 11 and 18 years in the region Aquitaine (France), showed that 13.6% of children were overweight and even obese (11.7% overweight and 1.9% obese) with a high proportion observed were boys compared to girls (Thibault *et al.*, 2009). In the same context, another study conducted in 2009-2010 in the United States showed that the prevalence of obesity in children and adolescents between 2 and 19 years was about 16.9% (Ogden *et al.*, 2012). There is an additional factor of concern. Until recently, overweight and obesity were considered a problem of developed countries, but recent epidemiological studies in some developing countries have shown a dramatic increase in childhood obesity. Nearly 8 million children are overweight in high-income countries and almost 35 million in low-and middle-income (WHO, 2012).



**Figure 2.** Comparison of the percentage of overweight and obesity observed in France and the United States for the year 2010 (source: INSEE, September 2010).

WHO recognizes obesity as a major public health problem (WHO, 2000). Obesity is an established risk factor for several chronic diseases (Eckel and Krauss, 1998; Murphy *et al.*, 2000), because it is accompanied, in particular, by a change in the activity of white adipocytes. For example, it has been shown that the rate of lipoprotein lipase (LPL) increases with increasing the size of fat cells (Farnier *et al.*, 2003). Similarly, adipocyte secretory functions are modified with a higher adiposity. One can for example observe an increase in the secretion of most adipokines, such as leptin, IL-6, TNF $\alpha$  and decreased plasma adiponectin in obese individuals (Boucher *et al.*, 2005). These changes may induce, directly or indirectly, the appearance of other associated diseases such as cardiovascular disease, non-insulin-dependent type 2 diabetes, whose frequency is three times higher in obese subjects, and hypertension (Nguyen and Lau, 2012) and even some cancers, *e.g.* colon cancer in men and breast cancer in women (Murphy *et al.*, 2000). The set of metabolic diseases associated with obesity is grouped under the term metabolic syndrome.

## 1.2. Body mass index and measures of adiposity

Measure the body fatness of an individual and therefore the level of adiposity can be evaluated by using anthropometric estimators. The first approach is to determine overweight by transfer to an ideal weight using the ratio between the weight of the individual and his size and framing this report based on additional criteria such as gender or ethnicity. The second approach is purely mathematical and is based on the use of mathematical formulas as shown in Table 1.

**Table 1.** The main formulas used to calculate the ideal body weight (after De Saint Pol, 2007).

<b>Broca formula:</b>	$IW (kg) = T (cm) - 100$
<b>Lorentz formula</b>	$IW \text{ male (kg)} = T (cm) - 100 - \frac{T (cm) - 150}{4}$ $IW \text{ female (kg)} = T (cm) - 100 - \frac{T (cm) - 150}{2,5}$
<b>Devine formula</b>	$IW \text{ male (kg)} = 50 (kg) + 2,3 \times [ T (\text{pouces}) - 60 ]$ $IW \text{ female (kg)} = 45,5 (kg) + 2,3 \times [ T (\text{pouces}) - 60 ]$
<b>Perrault formula</b>	$IW (kg) = T (cm) - 100 + \frac{\text{age (years)}}{10} \times 0,9$
<b>Creff formula</b>	
Normal morphology	$IW (kg) = T (cm) - 100 + \frac{\text{age (years)}}{10} \times 0,9$
Broad morphology	$IW (kg) = T (cm) - 100 + \frac{\text{age (years)}}{10} \times 0,9 \times 1,1$
Gracile morphology	$IW (kg) = T (cm) - 100 + \frac{\text{age (years)}}{10} \times 0,9 \times 0,9$
<b>Monnerot-Dumaine formula</b>	
	$IW (kg) = \frac{T (cm) - 100 + 4 \times \text{Wrist circumference (cm)}}{2}$
<b>Bornhardt formula</b>	
	$IW (kg) = \frac{T (cm) \times \text{Chest size (cm)}}{240}$

IW: Ideal Weight, S: Size

The estimator most commonly used to assess the level of adiposity is BMI. From a clinical point of view, the underweight, overweight and obesity are defined by limiting values of BMI, which is a simple measure of body weight contribution to the size of the individual. BMI is defined as the ratio of body weight to the square of the height in  $kg / m^2$  (Keys *et al.*, 1972). There are other anthropometric techniques to measure the body fatness as the lap size or circumference and skinfold thickness. The latter technique relies on the fact that the skin folds represent nearly half the fat body (De Saint Pol, 2007).

Despite its appeal, the BMI has drawbacks because this index does not take into account the shape of the individual or history of its body weight change. Moreover, it reflects not only fat mass as in the case of athletes who have very important muscle mass. Despite these limitations, some studies have shown a strong correlation between BMI and fat mass (Micozzi *et al.*, 1986; Leonhardt *et al.*, 1987). Table 2 shows the BMI threshold values used by the WHO. Based on these thresholds, we can distinguish those underweight with a BMI below 18.5. People who have a BMI between 18.5 and 24.9 are considered in a normal situation, pre-obese with a BMI between 25 and 29.9. From 30  $kg / m^2$ , three classes of obesity were defined according to the increasing value of BMI (Table 2).

**Table 2.** The threshold BMI values used by the WHO

Weight situation	BMI (Kg/m <sup>2</sup> )
Malnutrition	< 18,5
Class I or underweight	17,0 - 18,4
Class II	16,0 - 16,9
Class III	13,0 - 15,9
Class IV	10,0 - 12,9
Class V	< 10,0
<b>Reference values</b>	<b>18,5 - 24,9</b>
Overweight	25,0 - 29,9
Obesity	≥ 30
Class I	30,0 - 34,9
Class II	35,0 - 39,9
Class III	≥ 40

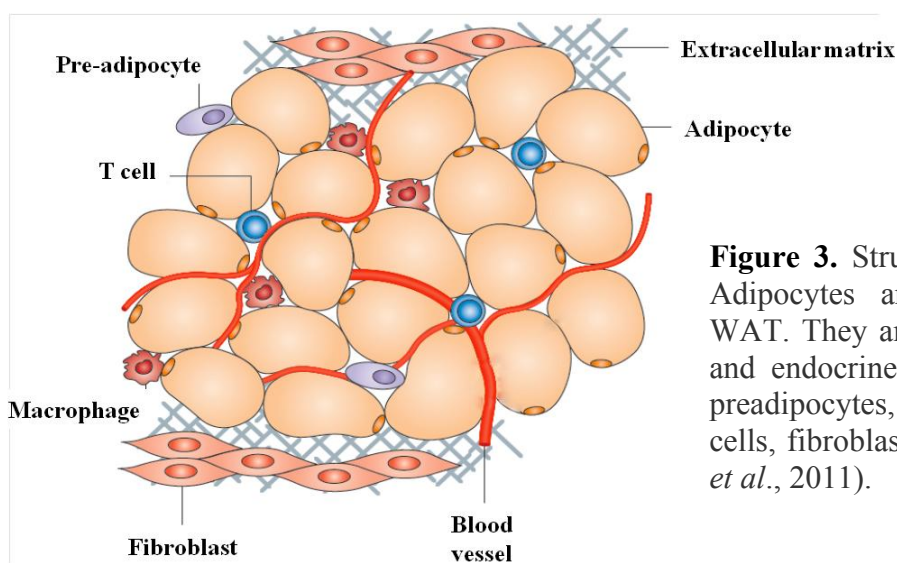
Another way to define obesity is using percentiles. This method is recommended especially for children. It is to observe the distribution of BMI or weight of the entire population, and therefore to determine the position of the weight of an individual by comparison to a reference population. When the weight of an individual is near the 50th percentile (median), this means that it is close to the average of the individuals in the population. Instead a weight close to the 10th percentile, the individual is considered underweight. The threshold for overweight situation is close to the 85th percentile of the population, while obesity is at the 95th percentile (De Saint Pol, 2007).

Other non-anthropometric methods can be used to estimate the level of adiposity. The bioelectrical impedance may calculate body fat by measuring the electrical conductivity of the tissue. A second method may be implemented, the hydrodensitometry, which is to calculate the body fat from the density of the individual obtained after emerging in water. Another approach is based on biphotonic absorption with X<sup>2</sup>-ray, and the body is scanned with X-rays at two energy levels. Data processing report attenuations of the two energy levels can distinguish and measure body fat and lean body mass and bone mineral content of the whole body (De Saint Pol, 2007). The limitation of this method is its difficult implementation because of the size of devices for people with severe obesity, as well as the cost of such measures.

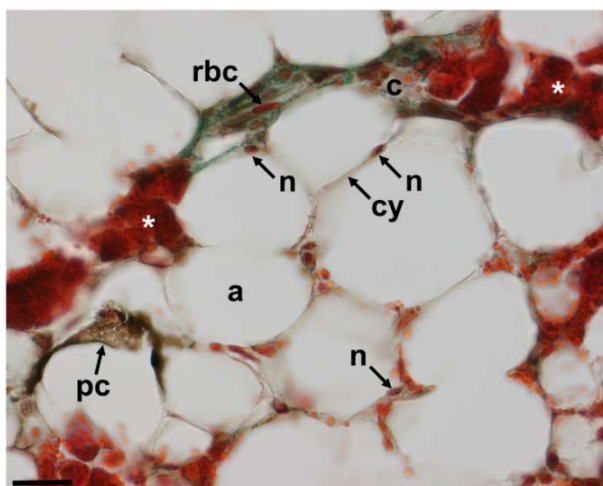
## **1.3. White adipose tissue**

### **1.3.1. Cell types of white adipose tissue.**

The WAT is able of massive expansion or rather a drastic reduction in size depending on the level of energy stored as lipid droplets in adipocytes. This remarkable plasticity is also illustrated by its ability to regenerate after surgery. This tissue may vary from 5% of body weight for athletes up to 60% in the case of extreme obesity (Cawthorn *et al.*, 2012). In vertebrates, the WAT is composed of a number of characteristic cell types (Figure 3). This tissue is made up mostly of adipocytes. Cell types typically observed in mammals are present in zebrafish WAT (Figure 4) (Tingaud-Sequeira *et al.*, 2012). In some vertebrates, such as teleost fish, the perivisceral WAT can be infiltrated by pancreatic islets, which is not the case in other body WAT locations of this animal (Tingaud-Sequeira *et al.*, 2012).



**Figure 3.** Structure and cell types of WAT. Adipocytes are the main components of WAT. They are important for energy storage and endocrine activity. Other cell types are preadipocytes, immune cells, endothelial cells, fibroblasts and blood cells (from Ouchi *et al.*, 2011).

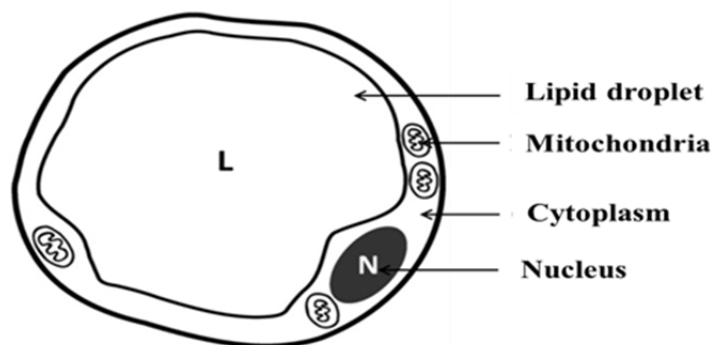


**Figure 4.** Histological section of perivisceral WAT of a female adult zebrafish. The WAT consists mainly of large unilocular adipocytes (a) linked by a loose and fibrous connective tissue and penetrated by blood capillaries (c). Each adipocyte has a thin strip of peripheral cytoplasm (cy) and a nucleus (n). The possible presence of infiltrated pancreatic islets is indicated by white asterisks. Other abbreviations: pc, cell pigmented rbc, red blood cell. Scale bar = 40  $\mu$ m (after Tingaud-Sequeira *et al.*, 2012).

### 1.3.2. The white adipocyte.

The differentiated white adipocyte is present as a spherical unilocular cell in adipose tissue (Figure 5). Its cytoplasm is entirely occupied by a huge lipid droplet, the nucleus of the

cell being rejected periphery against the plasma membrane. The adipocyte is specialized in the storage of fatty acids in the lipid droplet mainly as TAG. These molecules represent about 85% of WAT mass, whilst water and solids-non-fat in are respectively 10 and 5%. These TAG are mostly synthesized in WAT by lipogenesis from fatty acids taken up from the bloodstream. The dynamics of the lipid droplet is achieved by the concomitant presence of an intra adipocyte lipolysis activity.



**Figure 5.** Diagram of a unilocular white adipocyte (after Zhang *et al.*, 2012).

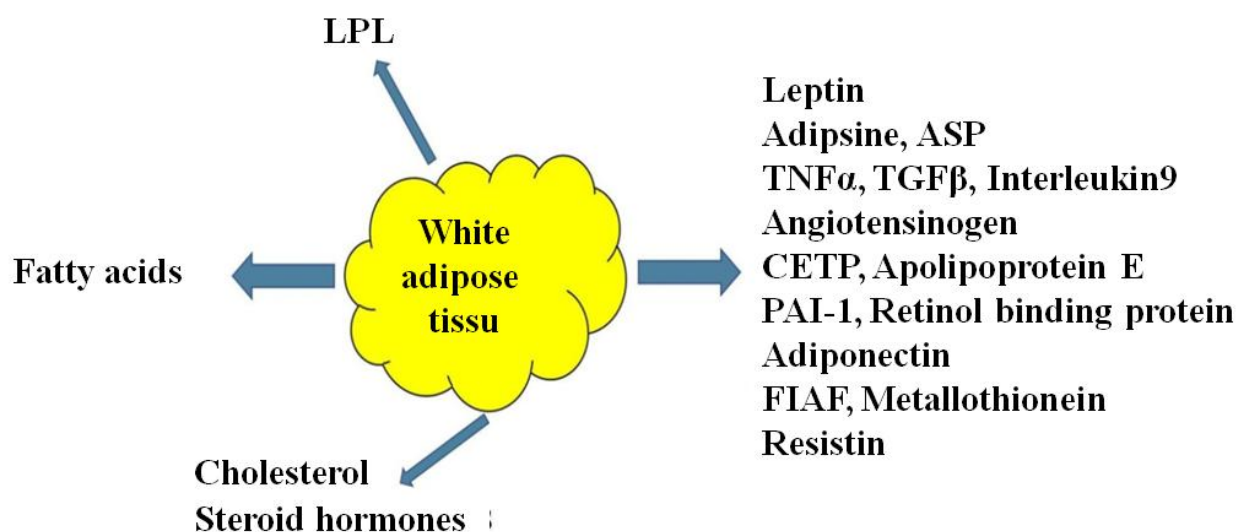
Numerous studies have shown a correlation between dietary fat intake, the degree of lipid storage in adipose tissue and weight gain (Tchoukalova *et al.*, 2010). Renewal of fatty acids in adipose tissue is very slow. For example, in human adults with normal and stable body weight, lipid turnover time is approximately 600 days, whereas the life of an adipocyte is to approximately 10 years (Arner *et al.*, 2011). Recently, it was shown the existence of an adipose tissue more beige in addition to white and brown adipose characterized in rodents and humans (Wu *et al.*, 2012). Brown adipose tissue is specialized in  $\beta$ -oxidation of fatty acids for thermogenesis. "Beige" fat cells are present in UCP1-positive WAT cells and come from a non myf-5 cell lineage, in contrast to the brown adipose tissue (Wu *et al.*, 2012).

### 1.3.3. Secretory activity of adipose tissue.

WAT plays a major role in lipid homeostasis due to its storage and release of fatty acids from endogenous or food sources. Over the last twenty years, WAT has proved to be a major site for the synthesis of molecules with important biological roles, particularly in the control of energy balance. For example, the mature adipocytes synthesize and release leptin into the bloodstream. This hormone plays a critical role in energy balance by controlling food intake at the central nervous system and insulin resistance. The endocrine function of the WAT is also revealed by the synthesis of other regulatory proteins such as angiotensinogen, adiponectin, acylation stimulating protein (ASP), adipisin, the retinol binding protein (RBP), the tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF), interleukin 6 (IL-6), and the plasminogen activator



inhibitor-1 (PAI-1) (Figure 6). Some of these proteins are inflammatory cytokines and others play a role in lipid metabolism. The specific effects of these proteins may be endocrine or paracrine (Trayhurn and Beattie, 2001). Obesity induces a change in the secretion of adipokines and increased WAT infiltration by macrophages and therefore inflammation of the tissue, as well as insulin resistance in peripheral tissues such as the liver and muscles (Galic *et al.*, 2010). Absence of WAT can have profound consequences, as in the case of lipodystrophic patients. They show severe cases of diabetes mellitus, which requires administration of leptin and / or thiazolidinediones (Javor *et al.*, 2005). Adipocytes exert pleiotropic actions through the production of numerous factors acting in autocrine, paracrine or endocrine pathways.



**Figure 6.** Some of the proteins secreted by WAT. ASP, acylation stimulating protein, CETP, cholesteryl ester transfer protein, FIAF, fasting induced adipose factor, LPL, lipoprotein lipase; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1, TGF, transforming growth factor beta, TNF, tumor necrosis factor alpha.

#### 1.2.4. Adipogenesis.

##### 1.2.4.1. The adipocyte development and differentiation.

WAT development is initiated during embryonic and fetal development. In humans, the number of adipocytes increases until the age of about 15 years and this hyperplasia is particularly important during the first few years of life. It is therefore important to ensure children's diets through adolescence to avoid preparing a fertile ground for adult obesity. After 15 years, we have thus usually a fixed number of adipocytes. In case of weight gain,

there will be mainly an increase of lipid storage in lipid droplets without the need to increase the number of adipocytes. This phase of hypertrophy can increase on average by a factor of 8 the size of the cell, which can multiply in extreme cases its size by 50. If hypertrophy is not sufficient and fat intake exceeds the storage capacity, a phase of hyperplasia is then implemented from stem cells resident in the stroma vascular fraction of this tissue (Bean *et al.*, 1998). The recruitment process can be implemented, especially in the case of obesity. Due to the fast dynamics of WAT lipogenesis and lipolysis, associated with a lifespan of about 10 years of adipocytes (Arner *et al.*, 2011), a low calorie diet will result in a drain of cells without major alteration in the number of fat cells. Any subsequent energy balance oriented to storage will lead to a rapid recovery of body weight.

#### **1.2.4.1.1. Adipocyte determination.**

As for bone and muscle derivatives, the WAT is of mesodermal origin. The adipogenesis is the result of a determination, during embryonic development, of stem cells to the adipocyte lineage and their subsequent differentiation. Some of these mesenchymal stem cells will spare their entire lifetime within the WAT. Stem cells can differentiate into several types of multipotent stem cells such as myoblasts, osteoblasts and adipoblasts, and this is done under the control of various cellular and molecular events (Figure 7) (Gesta *et al.*, 2007). The latter two cell types may have an inverse or reciprocal relationship (Nuttall and Gimble, 2012). Factors that influence the direction of stem cells to adipoblasts are not yet well known. Activation of the Wnt signaling pathway in mesenchymal stem cells was initially involved in the inhibition of adipocyte determination in favor of the myogenic and osteoblast determination (Ross *et al.*, 2000; Gesta *et al.*, 2007, Tang and Lane, 2012). This pathway seems to involve two levels: as an activator for the early specification of adipoblasts, then later as an inhibitor of adipocyte differentiation (Ross *et al.*, 2000; Tang and Lane, 2012). In addition, exposure of mesenchymal multipotent cells to bone morphogenic protein 4 (BMP-4) commits these cells to the adipocyte lineage (Tang *et al.*, 2012).

#### **1.2.4.1.2. Adipocyte differentiation.**

The process of adipocyte differentiation is a complex process, characterized by the ordered expression of certain genes and specific factors. Most information has been obtained by *in vitro* studies in cell cultures. The process of adipocyte differentiation is the passage of an adipoblast to a preadipocyte and then to a mature adipocyte. Morphologically, there is no

difference between adipoblasts and preadipocytes, the only difference being the expression of some early markers of differentiation of preadipocytes (Figure 7). It has been shown that these cells secrete factors involved in their differentiation (Ailhaud, 2006).

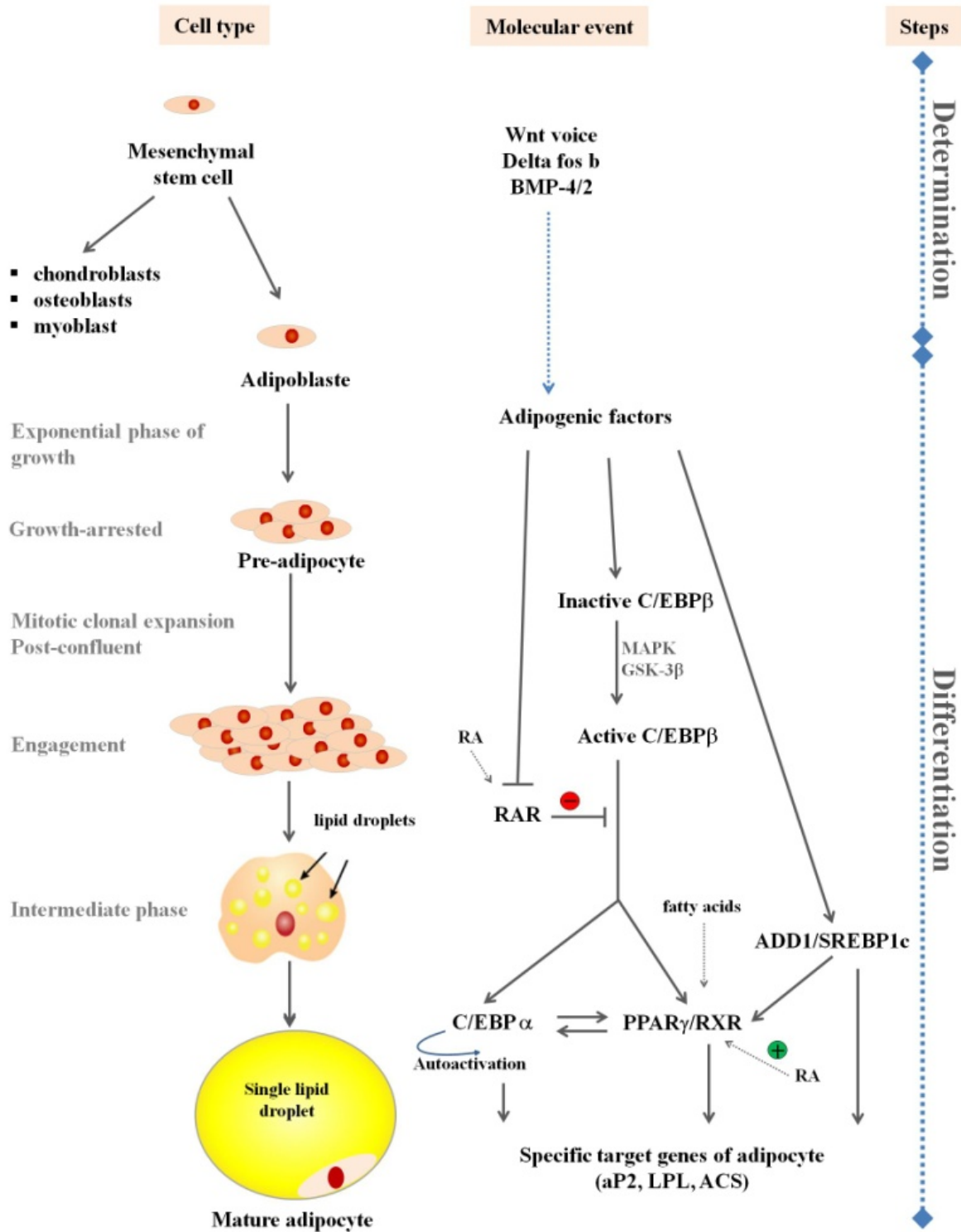
Preadipocytes then undergo mitotic clonal expansion or confluent position to engage then permanently in adipocyte differentiation. This process is accompanied by molecular, cellular and morphological changes of these cells. Indeed, after acquiring all of their metabolic properties, adipocytes will acquire the ability to store lipids, initially in small lipid droplets, which then arrive at confluence to achieve a single lipid vacuole in their cytoplasm (Gregoire *et al.*, 1998; Tang *et al.*, 2012).

#### **1.2.4.1.2.1. Control of adipocyte differentiation.**

Morphological and cellular changes that accompany adipocyte differentiation are the result of changes in gene expression. This molecular programming is influenced by pro-or anti-adipogenic transcription and hormonal factors. In the following sections, we will discuss some of the most important factors.

#### **1.2.4.1.2.2. The transcription factors.**

Transcriptional coordination of adipocyte differentiation is mainly performed by three types of factors: C / EBPs (CCAAT-enhancer binding protein) or proteins binding to CCAAT element, the three members of this family ( $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ ) are expressed at different times of adipogenesis, in particular in the triggering of the terminal maturation. The C/EBP $\alpha$  is induced later and will allow the transactivation of genes such as leptin, aP2 (fatty acid-binding protein 4, FABP4), peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) and himself (Rosen *et al.*, 2000). The transcription factor SREBP-1c is also known as promoting adipocyte differentiation, and it will encourage the expression of PPAR $\gamma$  (Figure 7). Factors like PPARs which belong to the family of nuclear receptors (NRs) will be detailed in Part 2 of Chapter I. Each of the three members of the PPARs,  $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  and  $\gamma$ , is encoded by a different gene whose expression is relatively tissue specific. PPAR  $\gamma$  is known as a key gene of adipogenesis (Janesick and Blumberg, 2011), and is preferentially expressed in adipose tissue and plays an important role in the final differentiation and maturation of adipocytes. This factor transactivates many genes markers of adipocyte differentiation such as LPL or the gene that codes for FABP4 to store fatty acids in the form of TAG in lipid droplets (Rosen *et al.*, 2000).



**Figure 7.** Diagram showing the cascade of events and molecular players involved in and adipocyte determination and differentiation. RA: retinoic acid, C/ BP: CAAT/enhancer binding protein; RAR: RA receptor, MAPK: mitogen-activated protein kinase, GSK-3: glycogen synthase kinase-3; ADD1: adipose differentiation and determination factor 1, SREBP1c: sterol regulatory binding protein 1c, PPAR $\gamma$ : peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$ , RXR: retinoic-X-receptor; aP2: fatty acid-binding protein, LPL: lipoprotein lipase ACS: acyl-CoA synthetase (after Gregoire *et al.*, 1998; Tang *et al.*, 2012).

### **1.2.4.1.2.3. Hormonal factors.**

The hormone best known for upregulating adipogenesis is insulin. Indeed, it is necessary for the *in vitro* differentiation of murine adipocyte cell lines 3T3-L1 and 3T3-F442A. Insulin significantly increases the number of adipocytes and lipid accumulation (Girard *et al.*, 1994). It will activate the insulin growth Factor 1 (IGF-1), at the level of pre-adipocytes. Activation of this receptor triggers clonal expansion via activation of the PI-3K pathway required for adipocyte differentiation (Sakaue *et al.*, 1998; Serrero and Xia 1999). Fatty acids are also known to induce adipocyte differentiation. From the diet or lipolysis, some fatty acids act positively on adipocytes by regulating the expression of many genes in adipocyte activation of certain nuclear receptors such as PPARs or RXRs (Forman *et al.*, 1997). There are other pro-adipogenic factors such as growth hormone, glucocorticoids, thyroid hormone T3 and "leukemia inhibitory factor".

There is also a negative regulation of adipocyte differentiation. Inflammatory cytokines have also been described as anti-adipogenic factors such as IL-1, IL-6, TNF $\alpha$  and interferon  $\gamma$  and  $\beta$ . Growth factors inhibit this differentiation such as EGF, TGF $\alpha$  or myostatin. Pref-1, a protein expressed only in pre-adipocytes, has been described as anti-adipogenic. It has been shown that the soluble form can inhibit differentiation, or at the opposite its inhibition can induce adipogenesis (Smas *et al.*, 1999).

## **1.2.5. Lipogenesis and lipolysis.**

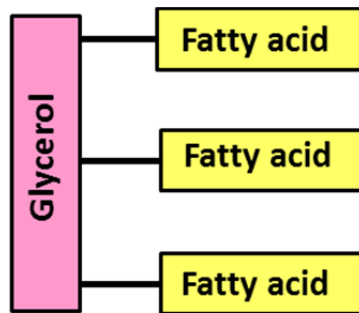
### **1.2.5.1. Some notions on lipids.**

#### **1.2.5.1.1. Apolar and polar lipids.**

Lipids are a family of organic molecules very heterogeneous. These are generally water-insoluble molecules and soluble in organic solvents, such as ether, chloroform, acetone, methanol or benzene. They can for most of them to be used as a source of energy by living organisms and hydrolysable lipids have fatty acids as main constituents.

#### ***Apolar lipids (neutral)***

TAG are the main class of neutral lipids, and are constituted by a molecule of glycerol esterified with three fatty acid molecules (Figure 8).

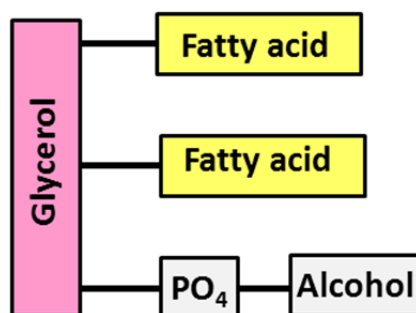


**Figure 8.** Diagram of a TAG.

Waxes represent the second largest class quantitatively of neutral lipids. It is composed of esters of a fatty acid esterified with a fatty alcohol. These molecules are present in marine zooplankton and body and eggs of certain fish zooplanktivorous (eels, capelin ...)

### ***Polar lipids***

Polar lipids quantitatively the most important in cells are the glycerophospholipids. They consist of a phosphatidic acid esterified with a polar head which determines the nature of glycerophospholipid (Figure 9). They are mainly integrated into biological membranes. The fluidity of these membranes is determined to a large extent by the degree of unsaturation of the constituent fatty acids of these phospholipids. Sphingolipids are a further category of phospholipids in which the skeleton is constituted by a long chain carbon amine alcohol, sphingosine.



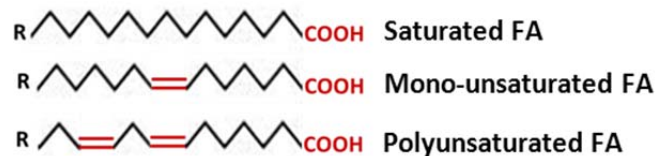
**Figure 9.** Diagram of a glycerophospholipid.

### ***Non-hydrolysable lipids***

Cholesterol is most common non-hydrolysable lipid among vertebrates. It is present as such in the cell membranes or may be present in the form of cholesteryl-ester in the cytoplasm of cells and then stored with other apolar lipids.

### 1.2.5.1.2. Fatty acids.

Fatty acids are the basic constituents of hydrolyzable lipid compounds. They have a methyl group CH<sub>3</sub> at one end of hydrocarbon chain and a carboxyl group COOH at the other end (Figure 10). Fatty acids are defined by their number of carbon atoms, degree of unsaturation, *i.e.* the number of double bond, and the position of these double bonds along the chain.



**Figure 10.** Different types of non-ramified fatty acids.

**Saturated fatty acids:** These are fatty acids that contain no double bond. For example, C14:0 fatty acid refers to 14 carbon chain atoms and no double bond, thus saturated.

**The mono-unsaturated fatty acids:** These are fatty acids that have a single double bond. For example, the C18:1 n-9 ( $\omega$ 9) means a fatty acid with 18 carbon atoms chain and a double bond located on the ninth carbon starting from the methyl end of the carbon chain.

**The polyunsaturated fatty acids:** These are with multiple double bonds. For example, C22:6 n-3 ( $\omega$ 3) fatty acid refers to a 22 carbon atoms chain and 6 double bonds with the first being located on the third carbon atom, starting from the methyl end.

### 1.2.5.2. Lipogenesis.

The synthesis of lipids and in particular TAG in the adipocyte occurs in two ways 1) from the uptake of circulating fatty acids, 2) *de novo* lipogenesis from acetyl-CoA.

#### 1.2.5.2.1. Fatty acids from extracellular origin.

The fatty acids can be provided to the adipocyte from two sources. Those linked to serum albumin and those esterified in hydrolysable lipids and incorporated into circulating lipoproteins. These fatty acids can be from endogenous or exogenous origin, the later being

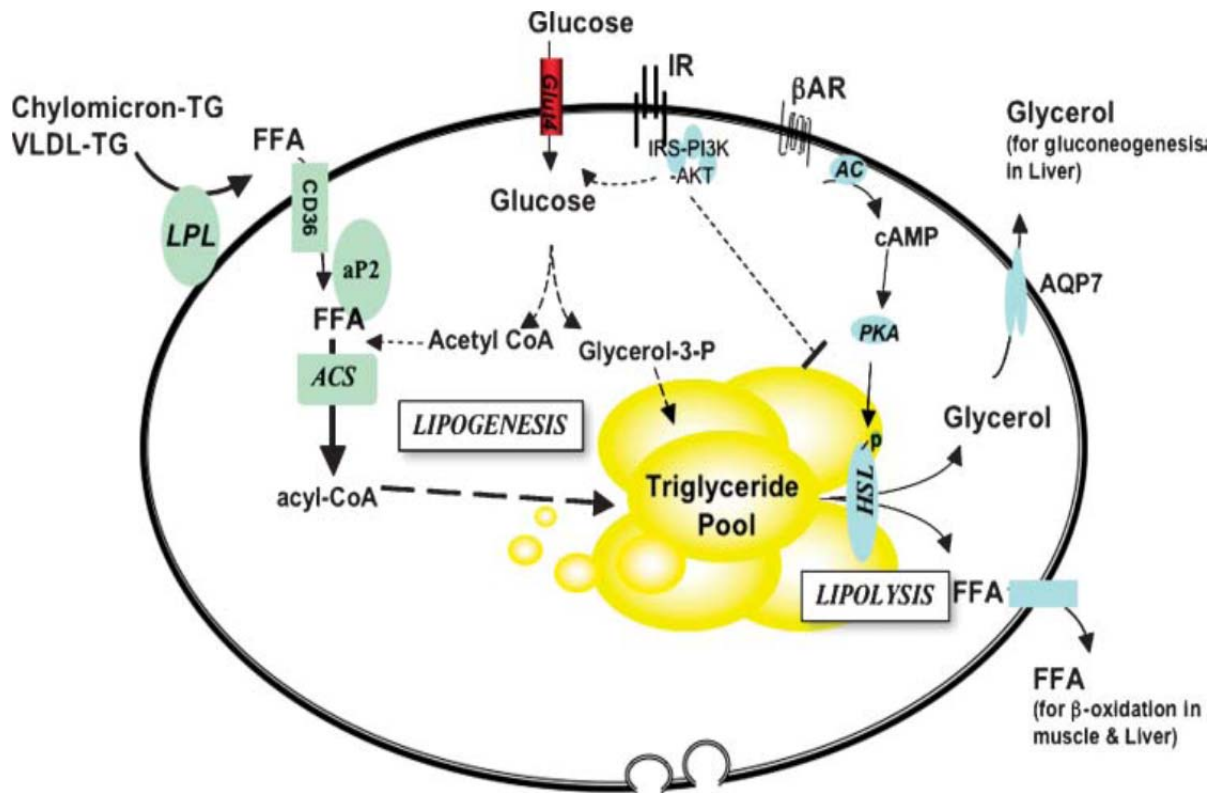
from foodborne and absorbed from the small intestine (Babin and Gibbons, 2009). Processes associated with the transfer of fatty acids from the intestinal lumen, into intestinal cells, and later into the circulatory system are difficult to study *in vivo*. Recent work by using the zebrafish model enabled to view this transfer by using fatty acids coupled to fluorescent Bodipy (Walters *et al.*, 2012, Babin *et al.*, unpublished). Fatty acids are mainly transported as TAG and incorporated into lipoproteins (chylomicrons, VLDL) by enterocytes or hepatocytes and released into the circulatory system. These lipoproteins undergo the action of LPL at the vascular endothelium surface and fatty acids are released and picked up by the adipocytes via specific plasma membrane carriers (*e.g.* CD36). Their conversion into acyl-CoA is the starting point of their esterification as TAG, phospholipids or cholesteryl esters (Figure 11).

#### **1.2.5.2.2. *De novo* lipogenesis.**

*De novo* lipogenesis in adipocytes allows the synthesis of fatty acid from the metabolism of extracellular glucose (Figure 11). The entry of glucose into the adipocyte is through specific transporters, GLUT-1 and GLUT-4 (Mueckler, 1990). Once in the cell, glucose is degraded to pyruvate by the process of glycolysis. Following this step, acetyl-CoA carboxylase (ACC) and fatty acid synthase (FAS) activities occurred successively to catalyze the formation of saturated fatty acids from acetyl-CoA. The action of various desaturases allows the synthesis of fatty acids more or less desaturated. The fatty acids are then esterified in the adipocyte through glycerol-3-phosphate pathway to yield TAG. *De novo* lipogenesis is mainly made in the liver of the human species. This pathway is enhanced in adipocytes after feeding a diet rich in carbohydrates (Letexier *et al.*, 2003).

Insulin controls lipogenesis at different stages. Under its action, the carrier GLUT-4 will be translocated to the membrane of adipocytes, which allows the entry of glucose into the cell. Insulin also has a positive effect on certain enzymes that control the biosynthesis of fatty acids from acetate.



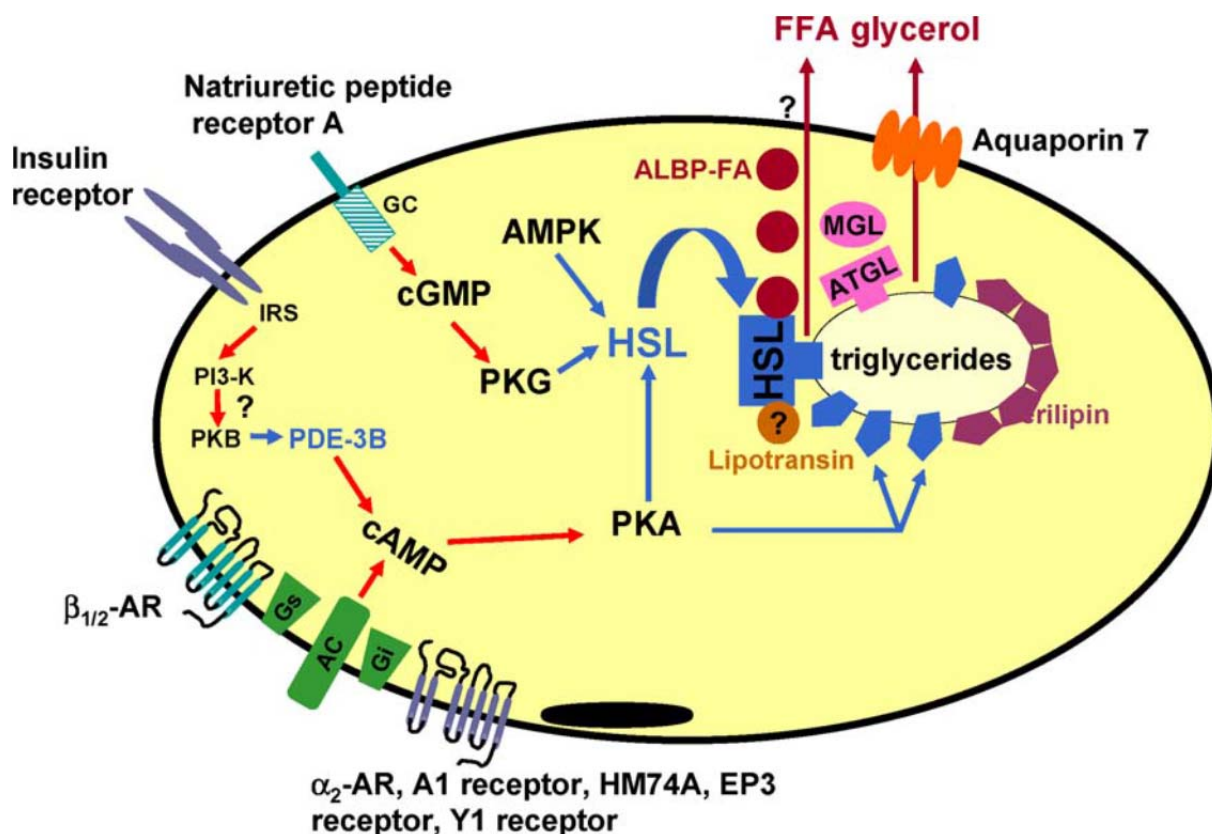


**Figure 11.** Lipid metabolism in white adipocytes. Lipogenesis and lipolysis coexist in the cell and are linked to lipid deposition or mobilization. The adipocyte is sensitive to changes in nutritional indices, such as blood levels of insulin. This hormone stimulates glucose uptake and lipogenesis and inhibits lipolysis. This lipolysis is controlled by  $\beta$ -adrenergic regulation. AC, adenylate cyclase ACS, acyl-CoA synthase AKT AKR mouse thymoma viral proto-oncogene, AR, adrenergic receptor; HSL, hormone sensitive lipase, IR, insulin receptor; PI3K, phosphatidylinositol 3 kinase, PKA, protein kinase A (after Sethi and Vidal-Puig, 2007).

### 1.2.5.3. Lipolysis.

Lipolysis allows the hydrolysis of TAG stored in the lipid droplet (Figure 11). This pathway originates after activation of  $\beta$ -adrenergic receptor type and is accomplished by a hormone dependent lipase activity which allows degradation of TAG in nonesterified fatty acids and glycerol (Osuga *et al.*, 2000; Zimmermann *et al.*, 2004, Jenkins *et al.*, 2004). Once produced by the adipocyte, fatty acids are released into the bloodstream after extracellular binding to serum albumin or undergo intra cellular  $\beta$ -oxidation or reesterified to TAG. By controlling the phosphorylation of protein kinase A, intracellular cAMP pool is the main regulator of lipolysis. The lipolytic activity of adipocytes depends on intracellular cAMP whose production is stimulated by small protein coupled receptors but inhibited by Gs-coupled receptors for small protein Gi. Insulin is a potent inhibitor of lipolysis and its action

goes through the reduction of intracellular cAMP concentration via the phosphatidylinositol-3 kinase and protein kinase B (Kitamura *et al.*, 1999).



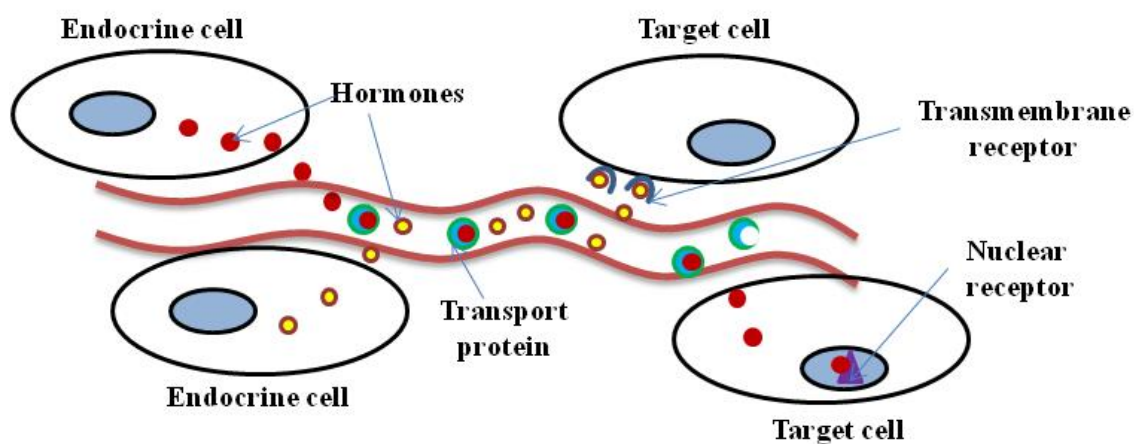
**Figure 12.** Control of human adipocyte lipolysis. Signal transduction pathways for catecholamines via adrenoceptor (AR), natriuretic peptides via type A receptor, insulin and other antilipolytic agents (prostaglandins E2 via EP3 receptors, adenosine via A1 receptors, nicotinic acid via HM74A and NPY/PYY via Y1 receptors) are described. Proteins phosphorylated by protein kinases (PKA, protein kinase A; PKB, protein kinase B; PKG, protein kinase G; AMPK, AMP-activated protein kinase) are shown in blue. Hormone-sensitive lipase (HSL) phosphorylation may promote its translocation from the cytosol to the surface of the lipid droplet. Perilipin phosphorylation may induce an important physical alteration of the droplet surface that facilitates the action of HSL and lipolysis. Docking of adipocyte lipid binding protein (ALBP) to HSL favors the evacuation of fatty acids (FA) released by the hydrolysis of triglycerides. Question marks show pathways which are still hypothetical or the relevance of which has not been fully demonstrated. AC, adenylyl cyclase; ATGL, adipocyte triglyceride lipase; GC, guanylyl cyclase; Gi, inhibitory GTP-binding protein; Gs, stimulatory GTP-binding protein; IRS, insulin receptor substrate; FFA, free fatty acid; MGL, monoglyceride lipase; PDE-3B, phosphodiesterase 3B; PI3-K, phosphatidylinositol-3-phosphate kinase.

Part of the work within this thesis has been to characterize the biological processes involved in the dynamics of WAT *in vivo* after exposure to chemical pollutants or pharmacological molecules in zebrafish. Some of these molecules may act via NRs and are considered as endocrine disruptors. We will therefore define in Parts 2 and 3 of Chapter I the main features of NRs and discuss some endocrine disruptors found in our chemical

environment that may have an effect on biological systems through these NRs.

## 2. Nuclear receptors

The endocrine pathway is one of the way used by cells to communicate remotely. Endocrine cell sends a message in the form of a hormone that will take the circulatory system either freely or bound to a carrier protein. This hormone leaves the circulation to reach the target cell and binds to a specific receptor that allows targeted action of the hormone (Figure 13). There are two types of hormone receptors: the transmembrane receptors and intracellular receptors.



**Figure 13.** Diagram of endocrine signaling.

NRs are intracellular receptors located primarily in the cell nucleus. They are able to directly regulate the transcriptional activity of target genes via an interaction with specific regulatory elements in the vicinity of these genes. These receptors are widespread in the animal kingdom, including invertebrates and seem to have appeared at the base of metazoan evolution (Escriva *et al.*, 1997). They function as transcription factors activated by the binding of small lipophilic molecules, such as hormones or metabolites including *e.g.* fatty acids, oxysterols and xenobiotics. The hydrophobic nature of these ligands allows them to easily cross cell membranes. These receptors are involved in the regulation of a broad spectrum of physiological phenomena (Gronemeyer *et al.*, 2004; Chambon, 2005).

Biochemical characterization of NRs began in the 60s by the ability of certain cell types to bind estradiol with high affinity, this binding then modifying their cellular activity (Jensen and Khan, 2004; Germain *et al.*, 2006). The human glucocorticoid receptor (GR, NR3C1) was one of the first NR cloned by R. Evans and his colleagues and during the same

period estrogen receptor (ER) was cloned by the laboratories of P. Chambon and G. Greene (Germain *et al.*, 2006). The cloning of these NRs showed a strong structural homology between their deduced proteins and has been grouped in the superfamily of NRs. This superfamily is now recognized as one containing the largest number of members among the families of eukaryotic transcription factors (Mangelsdorf and Evans, 1995). In mammals, humans included, this superfamily includes more than forty members (Robinson-Rechavi *et al.*, 2001; Robinson-Rechavi *et al.*, 2003, Zhang *et al.*, 2004). In recent decades, research on these transcription factors has been extremely active since these proteins are potent regulators of gene expression and are major pharmacological targets.

## 2.1. Classification of nuclear receptors.

There are several methods of classifying NRs: according to their homology, their mode of operation or function of the nature of the ligand (steroid receptors, nonsteroidal receptors, orphan receptors). However, in the 2000s, the classification of NRs was redesigned in terms of structural homology. They have been grouped into 7 families defined according to phylogenetic data (Table 3) (Laudet, 1997; Nuclear Receptors Nomenclature Committee, 1999; Giguere, 1999). The most diverse family within the superfamily is the family NR1, which includes thyroid hormone receptors (TR), RARs (Retinoic Acid Receptor), PPARs and LXRs (Liver X Receptor). All steroid receptors (androgen, estrogen, progesterone and corticosteroids) are grouped in the NR3 family of receptors, whereas RXRs (Retinoid X receptors) are part of the NR2 family. It should be noted that the seventh category of nuclear receptors has been defined, NR0 receptors comprising two members, NR0B1 (DAX1) and NR0B2 (Small Heterodimer Partner) which each have a single conserved C and E domains (Laudet, 1997 Nuclear Receptors Nomenclature Committee, 1999; Giguere, 1999).

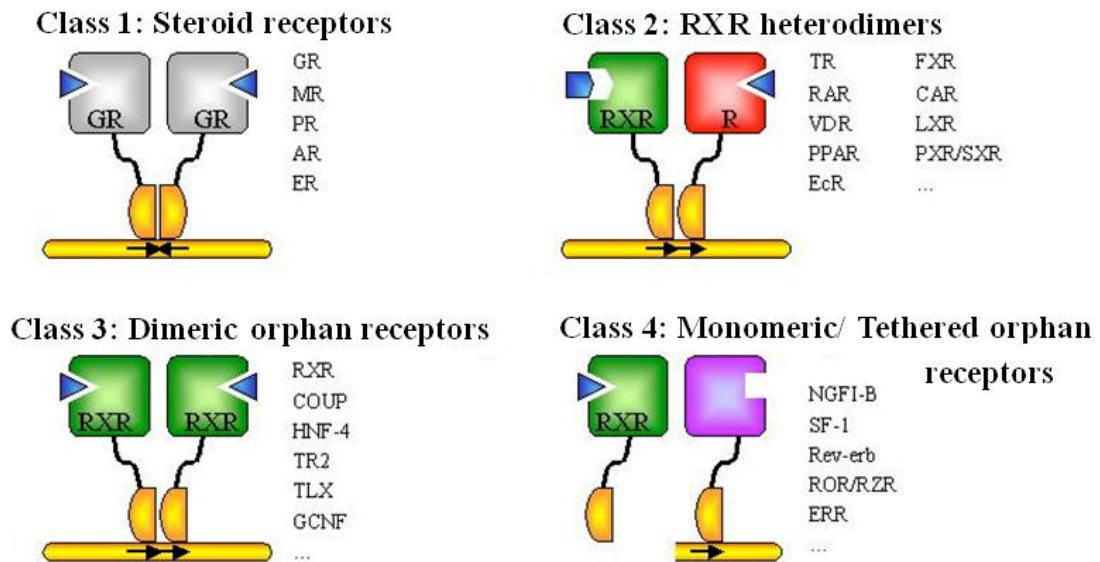
**Table 3.** Nomenclature and classification of human NRs according to their structural homology. This classification of NRs, proposed by the Nuclear Receptor Nomenclature Committee, is based on the analysis of sequence homologies of C, D and E domains. There are 48 NRs in humans classified into seven families, NR0 to NR6 (after Laudet, 1997; Nuclear Receptors Nomenclature Committee, 1999; Giguere, 1999).

Famille	Groupe	Membre	Acronyme	Nom
NR1	A	NR1A1	TR $\alpha$	Thyroid hormone Receptor alpha
		NR1A2	TR $\beta$	Thyroid hormone Receptor beta

	B	NR1B1	RAR $\alpha$	Retinoic Acid Receptor alpha
		NR1B2	RAR $\beta$	Retinoic Acid Receptor beta
		NR1B3	RAR $\gamma$	Retinoic Acid Receptor gamma
	C	NR1C1	PPAR $\alpha$	Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor alpha
		NR1C2	PPAR $\beta/\delta$	Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor beta
		NR1C3	PPAR $\gamma$	Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor gamma
	D	NR1D1	Rev-ErbA $\alpha$	Reverse ErbA alpha
NR1D2		Rev-ErbA $\beta$	Reverse ErbA beta	
F	NR1F1	ROR $\alpha$	RAR-related Orphan Receptor alpha	
	NR1F2	ROR $\beta$	RAR-related Orphan Receptor beta	
	NR1F3	ROR $\gamma$	RAR-related Orphan Receptor gamma	
H	NR1H2	LXR $\beta$	Liver X Receptor beta	
	NR1H3	LXR $\alpha$	Liver X Receptor alpha	
	NR1H4	FXR	Farnesoid X Receptor	
I	NR1I1	VDR	Vitamin D Receptor	
	NR1I2	PXR	Pregnane X Receptor	
	NR1I3	CAR	Constitutive Androstane Receptor	
NR2	A	NR2A1	HNF4 $\alpha$	Hepatocyte Nuclear Factor 4alpha
		NR2A2	HNF4 $\beta$	Hepatocyte Nuclear Factor 4beta
	B	NR2B1	RXR $\alpha$	Retinoid X Receptor alpha
		NR2B2	RXR $\beta$	Retinoid X Receptor beta
		NR2B3	RXR $\gamma$	Retinoid X Receptor gamma
	C	NR2C1	TR2	Testicular Receptor 2
		NR2C2	TR4	Testicular Receptor 4
E	NR2E1	TLX	drosophila Tailless homologue	
	NR2E3	PNR	Photoreceptor-specific Nuclear Receptor	
F	NR2F1	COUP-TFI	Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor I	
	NR2F2	COUP-TFII	Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor II	
	NR2F6	EAR-2	ErbA2-Related gene-2	
NR3	A	NR3A1	Er $\alpha$	Estrogen Receptor alpha
		NR3A2	Er $\beta$	Estrogen Receptor beta
	B	NR3B1	ERR $\alpha$	Estrogen receptor-Related Receptor alpha

		NR3B2	ERR $\beta$	Estrogen receptor-Related Receptor beta
		NR3B3	ERR $\gamma$	Estrogen receptor-Related Receptor gamma
	C	NR3C1	GR	Glucocorticoid Receptor
		NR3C2	MR	Mineralocorticoid Receptor
		NR3C3	PR	Progesterone Receptor
		NR3C4	AR	Progesterone Receptor
NR4	A	NR4A1	NGFIB	Nerve Growth Factor-Induced factor B
		NR4A2	NURR1	NUR Related factor 1
		NR4A3	NOR1	Neuron-derived Orphan Receptor 1
NR5	A	NR5A1	SF1	Steroidogenic Factor 1
		NR5A2	LRH-1	Liver Receptor Homologous protein 1
NR6	A	NR6A1	GCNF	Germ Cell Nuclear Factor
NR0	B	NR0B1	DAX1	Dosage-sensitive sex reversal, Adrenal hypoplasia critical region on X chromosome gene 1
		NR0B2	SHP	Small Heterodimer Partner

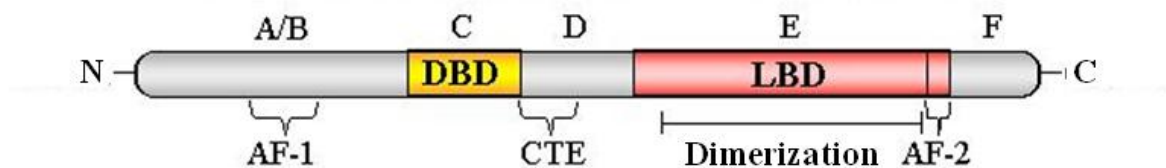
NRs can also be classified according to their mode of dimerization and the structure of their DNA binding domain. This domain consists of the repetition of a sequence that binds to DNA, separated by a variable number of nucleotides. Four classes of NRs have been made (Figure 14). The first class includes steroid hormone receptors (glucocorticoid receptor (GR), androgen (AR), ER, mineralocorticoid (MR) and progesterone (PR)) and binds to DNA as a homodimer. The second class consists of receptors that form heterodimers with the RXRs (receptor 9-cis retinoic acid), and binds to the direct repeats of DNA sequences. Class III and IV include receptors that differ depending on whether they bind to DNA as homodimers (*e.g.* RXR) or as monomers respectively; most orphan receptors belong to these two sub categories (Olefsky, 2001; Mangelsdorf and Evans, 1995). It should be noted that the dimeric receptors can bind to the DNA response elements defined as direct repeats (Direct Repeat, DR<sub>n</sub>), palindromes (Indirect Repeat, IR<sub>n</sub>) or inverted palindromes (everted Repeat, ER<sub>n</sub>).



**Figure 14.** Functional organization of NRs. The four classes according to their mode of NR dimerization and their DNA binding domains (according Olefsky, 2001).

## 2.2. Structure of nuclear receptors.

NRs have a very similar overall organization and contain different functional domains marked A to F (Figure 15). Each of these domains has a specific function and shows various degrees of conservation among members of the superfamily of NRs.



**Figure 15.** Structural organization of NRs. These proteins have a structure consisting of areas (AF) having different functions (based Olefsky, 2001).

### **Domain A / B:**

This area represents the amino-terminal region and shows a great variability in terms of size and protein sequence. A study of the human progesterone receptor showed that this domain has a transcriptional activity. This activity depends on the promoter and cell type (Vegeto *et al.*, 1993). This suggested that the A/B region of NRs can interact with coregulators specific to a given cell type. Domain A/B contains a region called AF-1 whose function is to activate transcription.

### ***The C domain (DNA binding domain):***

This is the binding domain to the DNA (DBD) of NRs for heterodimer, homodimer or monomer forms. This domain is the most conserved in the superfamily of NRs and consists of two zinc finger motifs (CI and CII), each composed of a zinc atom chelated by four cysteines residues. This connection is done on small target DNA sequences "HRE" or Hormone Response Element. This binding site contains one or two direct repeat (DRn), reversed (IRn) or everted (ERn) of half sites consensus hexanucleotide separated by a variable number of nucleotides (between 0 and 7). For example, steroid receptors recognize the consensus sequence "AGAACA", while ER and some other NRs recognize the sequence "AGGCTA."

### ***Domain D:***

This area represents a hinge part in the NR and consists of amino acids linking C and E/F (ligand binding domain) domains. This area provides some structural flexibility to the protein. This region can perform various functional configurations and is involved in the localization of NRs in the nucleus (Ylikomi *et al.*, 1992).

### ***Domain E/F (ligand binding domain (LBD)):***

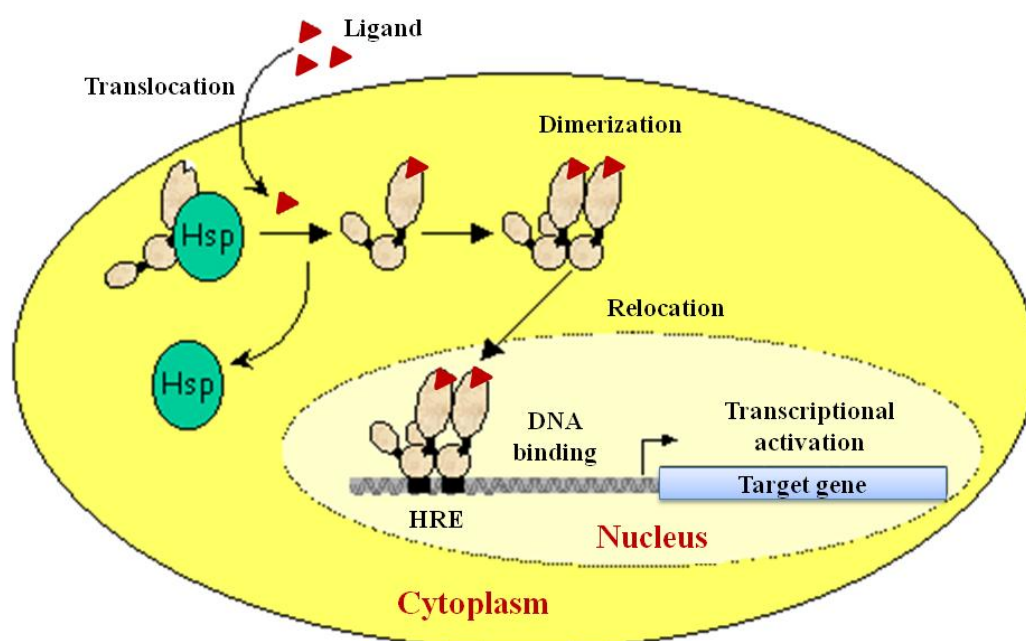
This area is home to several functions including the main ligand binding. The structure of this domain is characterized by the formation of a hydrophobic pocket in which the lipophilic nature of ligand can bind. This area does not only contain the ligand binding domain but also the dimerization between NRs and the transcriptional regulation ligand dependent. At the C-terminal part of the domain and located on the propeller 12, there is a region dénomée AF-2. This region is highly conserved between species and is required for ligand-dependent activation. It also plays an important role in ligand-dependent transactivation and recruitment of coactivators (Feng *et al.*, 1998). Finally, the most terminal region named F is not present in all NRs. Its role is not very well known, but appears to have a role in ER in ligand specificity and influence transcriptional activation (Weatherman *et al.*, 2001).

## **2.3. Mode of action of nuclear receptors.**

The NRs are very powerful transcription factors. They control the transcription of target genes by several different mechanisms including the activation and repression of certain activities. Depending on the location of the NR in the cell in the absence of ligand,



there are generally two modes of action for NRs (Sonoda *et al.*, 2008). In the first case, we have inactive cytoplasmic receptors in complex with heat shock proteins (HSP) (Figure 16). The presence of these HSPs in the inactive complex is essential for specific binding of the ligand (Chambraud *et al.*, 1990). Ligand binding to the NR hydrophobic cavity, allows the activation of the latter, and its dissociation from HSP complex. The receptor will then dimerize as a heterodimer or homodimer and then translocated into the nucleus. Dimer will bind to the region of the target gene HRE to activate transcription. The nature of the transcriptional regulation depends on the nature of the homodimer or heterodimer and the binding of coregulators to the AF-2 sequence of the NR (Nilsson *et al.* 2001).

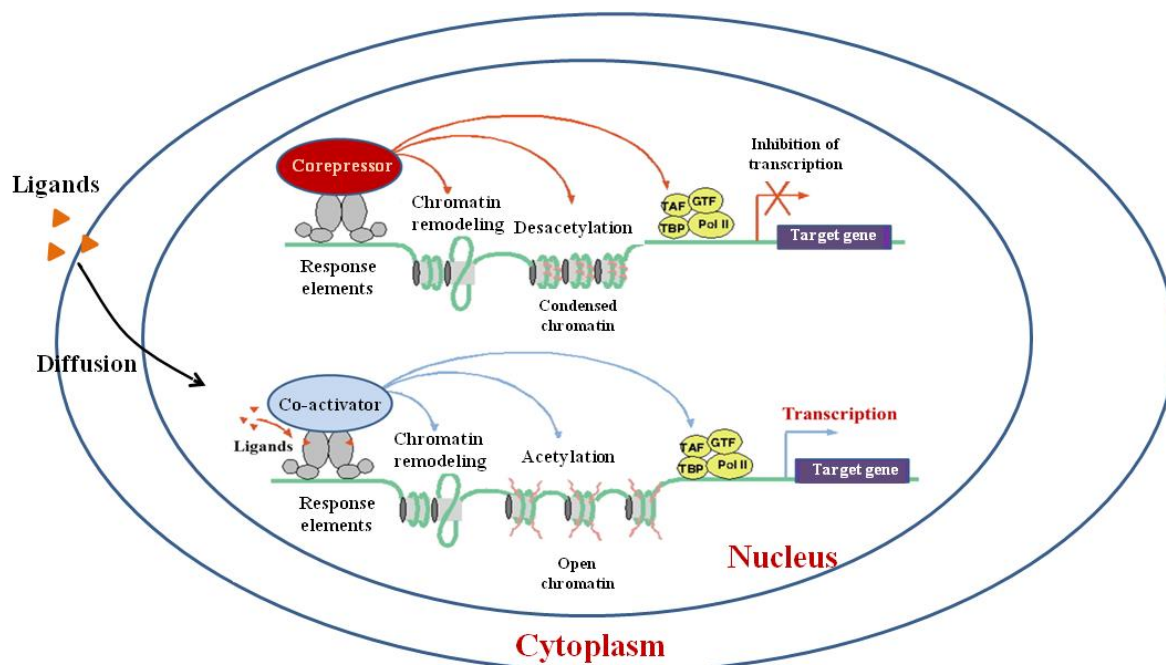


**Figure 16.** General mode of action of NRs located in the cytoplasm. Ligand binding causes the release of NR by the chaperones. NR dimerizes and is translocated into the nucleus to start the transcription of the target gene (after Chambraud *et al.*, 1990, Nilsson *et al.*, 2001; Sonoda *et al.*, 2008).

Although this activity model is true for steroid hormone receptors (Pratt and Toft, 1997), the majority of NRs is inside the nucleus after translation. To modulate the transcription of target genes, the NRs are associated with many coregulators of the transcriptional machinery, such as coactivators and corepressors (McKenna *et al.*, 1999). After ligand binding, the repressor complex dissociates from the receptor, and it can then recruit one or more coactivators. Some coactivators possess ATPase activity, leading to a

local remodeling of chromatin. Other coactivators possess histone acetyltransferase activity, allowing derepression of chromatin structure (Narlikar *et al.*, 2002).

In case of presence of a NR without ligand, the compacted chromatin is in a state of repression due to high histone deacetylation, and no transcription is possible. If the NR is activated by its ligand, unpacked chromatin becomes active with high levels of histone acetylation and leads to the initiation of transcription. However, the opening of the chromatin is not sufficient for the activation of transcription and therefore additional interactions between NRs and machinery will be required for transcriptional control of gene expression (Figure 17) (Narlikar *et al.*, 2002, Wong *et al.*, 1997). Genes can also be regulated by NRs via direct interactions with other transcription factors.



**Figure 17.** General mode of action of NRs located inside the nucleus and the mechanism of corepression and coactivation of transcription. In the absence of ligand, NRs are associated with corepressor complexes, recruiting proteins with histone deacetylase activity. Histone deacetylation leads to chromatin compaction, leading to transcriptional repression. Ligand binding causes release of corepressors, recruitment of coactivators and decompaction of chromatin, allowing transcriptional activation (after Narlikar *et al.*, 2002, Wong *et al.*, 1997).

Our knowledge of the mechanisms involved in regulating gene expression by NRs highlight the role of the specific interaction between the NR and its ligand and also the specific interaction of this complex with DNA. In the latter case, the important role of coactivators and corepressors are the subject of ongoing work. The NRs have a major role in

the morphogenesis, growth, differentiation, metabolism and reproduction. Given the importance of NRs in human and animal physiology, their role in the development of certain diseases and their importance as a therapeutic target for several diseases, a detailed understanding of their function will have an impact not only in human biology but also in the development of new drugs for the treatment of several diseases such as cancer, diabetes, atherosclerosis or obesity.

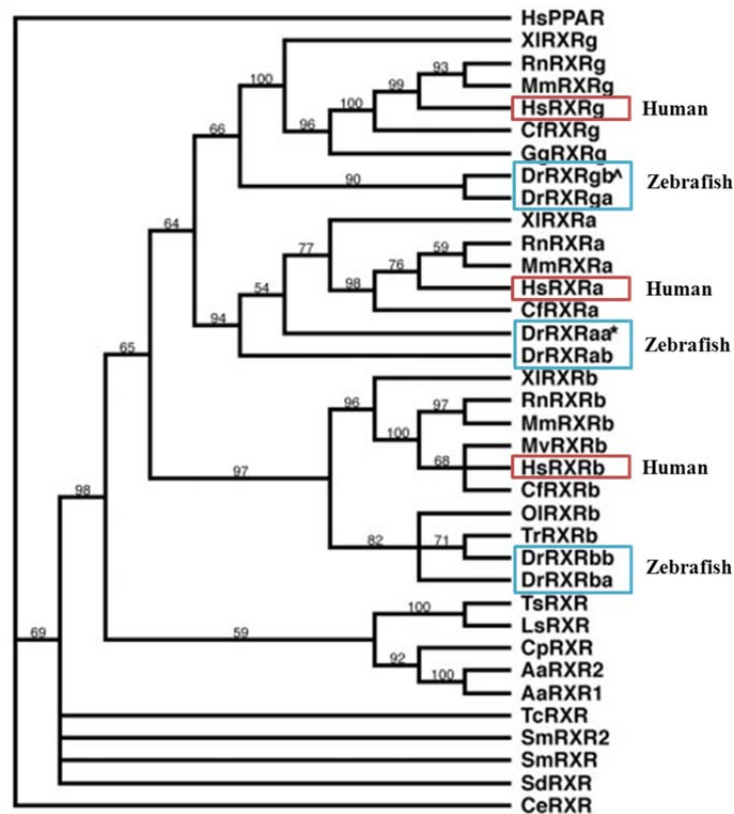
Part of the work carried out in the framework of this work was to evaluate the role of some NRs in the action of organotin compounds, e.g. tributyltin chloride (TBT) on the dynamics of WAT. It is therefore necessary to describe the mode of action of some NRs that may be involved.

## **2.4. Retinoid X Receptors (RXRs).**

### **2.4.1. Isotypes, phylogenetic conservation and ligands.**

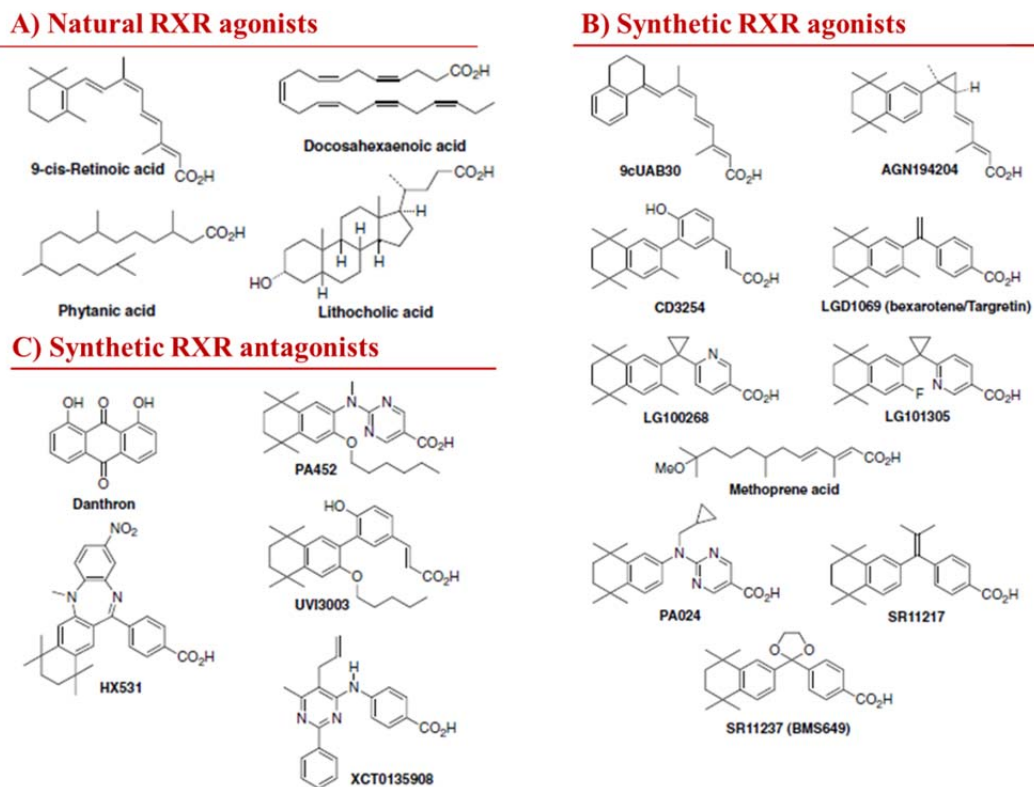
The Retinoid X receptors (RXRs) are members of NRs important and essential in the metabolism of steroid and thyroid hormones. They belong to the family of NR2 NRs (Table 3). RXRs are involved in various cellular processes, from cell proliferation to lipid metabolism (Lefebvre *et al.*, 2010). Three RXR isotypes ( $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ) are expressed, and their differential expression levels vary depending on cell type and differentiation state of the cells. RXR are more predominant in the epidermis, intestines, kidneys and liver, RXR $\beta$  are rather ubiquitous while RXR $\gamma$  are predominantly expressed in the brain, muscles and adipose tissues (Dawson and Xia, 2012).

The three RXR isotypes are well conserved between different vertebrate species with conservation syntenic groups around orthologous genes between mammals and teleost fish (Tallafuss *et al.*, 2006, Waxman *et al.*, 2007). The existence of co-orthologs of these genes in the genome of the medaka and zebrafish is the result of whole genome duplication in the ancestor of teleost fish (Figure 18) (Tallafuss *et al.*, 2006, Waxman *et al.*, 2007, Philip *et al.*, 2012).



**Figure 18.** Phylogenetic analysis of the sequence of RXR isotypes among different vertebrate species (after Waxman *et al.*, 2007). Human and zebrafish sequences are framed red and blue, respectively.

RXR<sub>s</sub> were initially classified as orphan receptors because their natural ligands were unknown. 9-*cis* retinoic acid has been proposed as the ligand for these receptors, but it could not be detected in cells *in vitro* and *in vivo* (Wolf, 2006). The polyunsaturated fatty acids (PUFAs) such as docosahexaenoic acid (DHA) and saturated metabolite of chlorophyll, phytanic acid, are also offered as RXR ligands (Dawson and Xia, 2012). Other synthetic compounds also exhibit activity as an agonist or antagonist of RXRs. This applies for fluorobexarotene (FBA), CD3254, and SR11237 (for a more exhaustive list, see Figure 19). Other synthetic compounds, such as TBT and triphenyltin (TPT) are contaminants in the environment and can be ligands for RXRs (Grün and Blumberg, 2006b; Shi *et al.*, 2012) (see Chapter III).

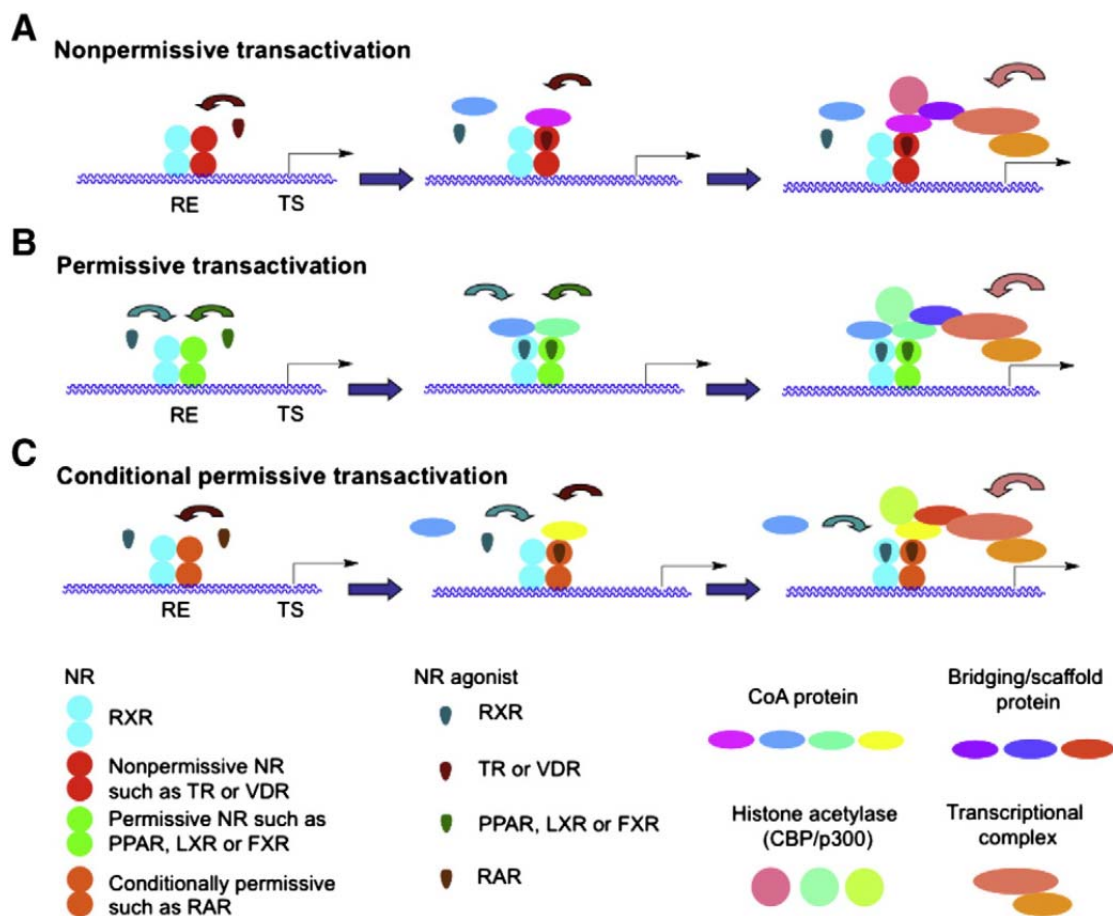


**Figure 19.** Chemical structure of some natural or synthetic ligands of RXRs (after Dawson and Xia, 2012).

#### 2.4.2. The transcriptional activation of target genes RXRs.

The identification of RXR was an important advance in our understanding of the mode of action of NRs because they represent the inevitable partner for heterodimerization of many NRs (Mangelsdorf et al., 1990), although they can also function as homodimers. RXRs are present ubiquitously in metazoans and their activation is achieved with low molecular weight ligands (Lima et al., 2011, Novák et al., 2008). Therefore these NRs play important roles in embryonic development, organogenesis and cell differentiation. It should be noted that relatively pleiotropic action of RXR comes from their ability to heterodimerization with other NRs but also because their ligands can stimulate transcriptional activation of the heterodimer partner in the case of permissive receptor (Figure 19) (Lefebvre et al., 2010). The RNs activated with a moderate affinity for their ligands, such as PPAR, LXR or the FXRS, permissive may be considered at their heterodimerization with the RXRs, whereas RNs that have a high affinity for their ligands, such as RAR, TR and VDR are generally non-permissive heterodimers with RXR (Lefebvre et al., 2010). The mechanism by which these NRs interact remains largely unknown.

Among the NRs that form heterodimers with RXR, we encounter three types of heterodimers as described in Figure 20.



**Figure 20.** The transcriptional activation by non-permissive, permissive and conditional permissive heterodimers. A) Transcriptional activation by non-permissive RXR partners, as TRs (thyroid hormone receptor) or VDRs (vitamin D receptor), B) transcriptional activation by permissive RXR partners, such as PPARs (peroxisome proliferator-activated receptor) or LXRs (liver (oxysterol) X receptor), C) Transcriptional activation by conditional permissive RXR partners, such as RARs (retinoic acid receptor) (after Dawson and Xia, 2012).

### *Non-permissive heterodimers*

This type of complex cannot be activated by the RXR ligand. Only the binding of a ligand of RXR partner enables the transactivation of target genes (Figure 20A). In this case, RXR is called "silent partner". For this type of heterodimer orientation is always the same: RXR occupies the 5' position on the response element while his partner holds the 3' position. Encountered in this particular category are heterodimers RXR/TR, RXR/VDR and RXR/RAR. The last one, however, presents a special heterodimer. Whereas the RXR ligand alone is not capable of activating the heterodimer, the binding of all-trans retinoic acid to the

binding site of the ligand (LBD) of RAR allow for the setting of a ligand of the RXR increases the transactivation of a gene placed under the control of a RAR response element (Minucci et al. 1997). So heterodimer RXR/RAR is qualified as a ***conditional permissive heterodimer*** (Figure 20C).

RXR specific ligand has been identified, the LG100754. This molecule acts as an antagonist of RXR homodimer for RXR/RXR agonist and as in the case of heterodimers RXR/PPAR ( $\alpha$ ,  $\beta$  /  $\delta$  and  $\gamma$ ) (Rosemary et al., 2001). This ligand does not activate other RXR heterodimers as RXR/LXR ( $\alpha$  and  $\beta$ ), RXR/FXR/BAR and RXR/NGFI-B (Rosemary *et al.*, 2001).

### ***Permissive heterodimers***

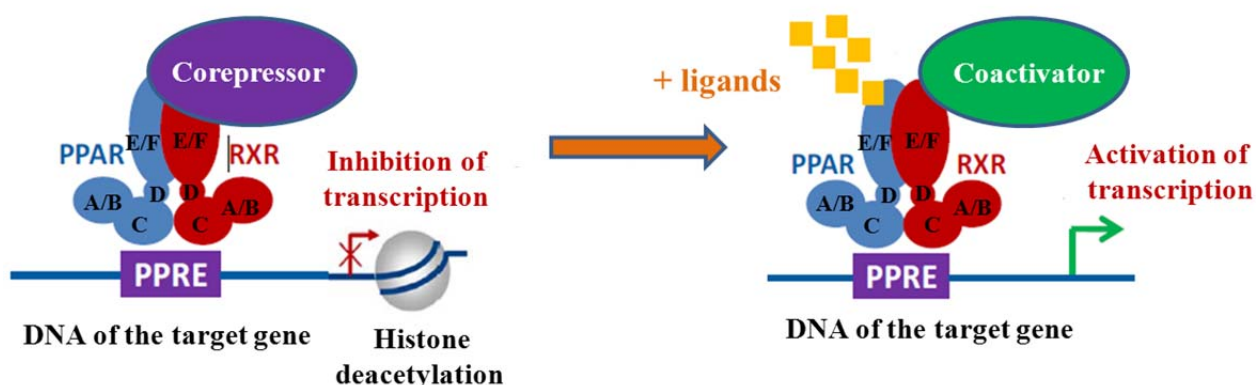
Permissive heterodimers are activated by ligands of the two partners of the heterodimer, that is to say, the RXR agonist may activate the other partner of the heterodimer as well as the partner agonist. Among such we can cite the heterodimer RXR/PPAR, RXR/FXR and RXR/LXR (Figure 20B).

In Zucker obese and insulin resistant rats, it has been shown that activation of RXR with a pan-agonist LG100268 causes a decrease in body weight and the rate of food consumption (Ogilvie *et al.*, 2004). Oral administration of this compound in rats for 6 weeks, causes a of five times increase in apoptosis of subcutaneous adipose tissue and a decrease in of this fat mass. Treatment also had adverse effects on the level of TAG which increased twice, and a decrease by 75% of the total thyroid hormone T4 level was also observed (Janesick and Blumberg, 2011). However, according to some authors the potential use of RXR ligand in order to reduce body weight may be limited due to the ability of such ligand to activate RXR/PPAR $\gamma$  heterodimer (Dawson and Xia, 2012). It is known that the RXR/PPAR $\gamma$  heterodimer are targeted by several obesogenic molecules (Grün et al., 2006; Janesick and Blumberg, 2011). The environmental obesogen TBT may activate RXR/PPAR $\gamma$  via RXR partner of the heterodimer because this molecule has the ability to bind with Cys 432 of helix 11 of RXR $\alpha$  (Le Maire *et al.*, 2009) (see Chapter III).

## **2.5. Peroxisome proliferator activated receptors (PPARs).**

Peroxisomes are cellular organelles surrounded by a single membrane and containing no genetic material. All proteins that constitute the peroxisome are encoded by nuclear genes and arise from the cytoplasm. Peroxisomes are responsible of cell detoxification by degradation of highly toxic hydrogen peroxide and the degradation of very long-chain fatty acids.

PPARs are transcription factors belonging to the superfamily of hormone NRs (NR1 family, Table 3) and were originally discovered in rodents by Isseman and Green (1990). These receptors can transform a wide variety of environmental signals, nutritional and inflammatory cellular responses. Their activity is modulated by the interaction with specific ligands of lipophilic nature, which can be natural such as long-chain fatty acids (LCFA) or synthetic (Escher and Wahli, 2000). Forming heterodimers with RXR, the complex RXR/PPAR modulate transcription after attachment to specific sequences named peroxisome proliferator response elements (PPRE) located in the regulatory region of their target genes (Figure 21). They thus control the expression of genes involved in lipid and carbohydrate metabolism (Berger and Moller, 2002; Barbier *et al.*, 2002). There are three PPAR isotypes that have been described  $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  and  $\gamma$ , also called FAAR or NU1C depending on the species in which they were cloned. These three isotypes are generally well conserved between species. For example, in zebrafish, the existence of three isoforms and their tissue expression appear similar to mammals (Ibabe *et al.*, 2002) with an expression of the three genes that depends on the sex and stage of development (Ibabe *et al.* 2005). As the same way as in mammals, PPAR $\gamma$  gene expression may serve as a marker of zebrafish adipocytes (Flynn III *et al.*, 2009).



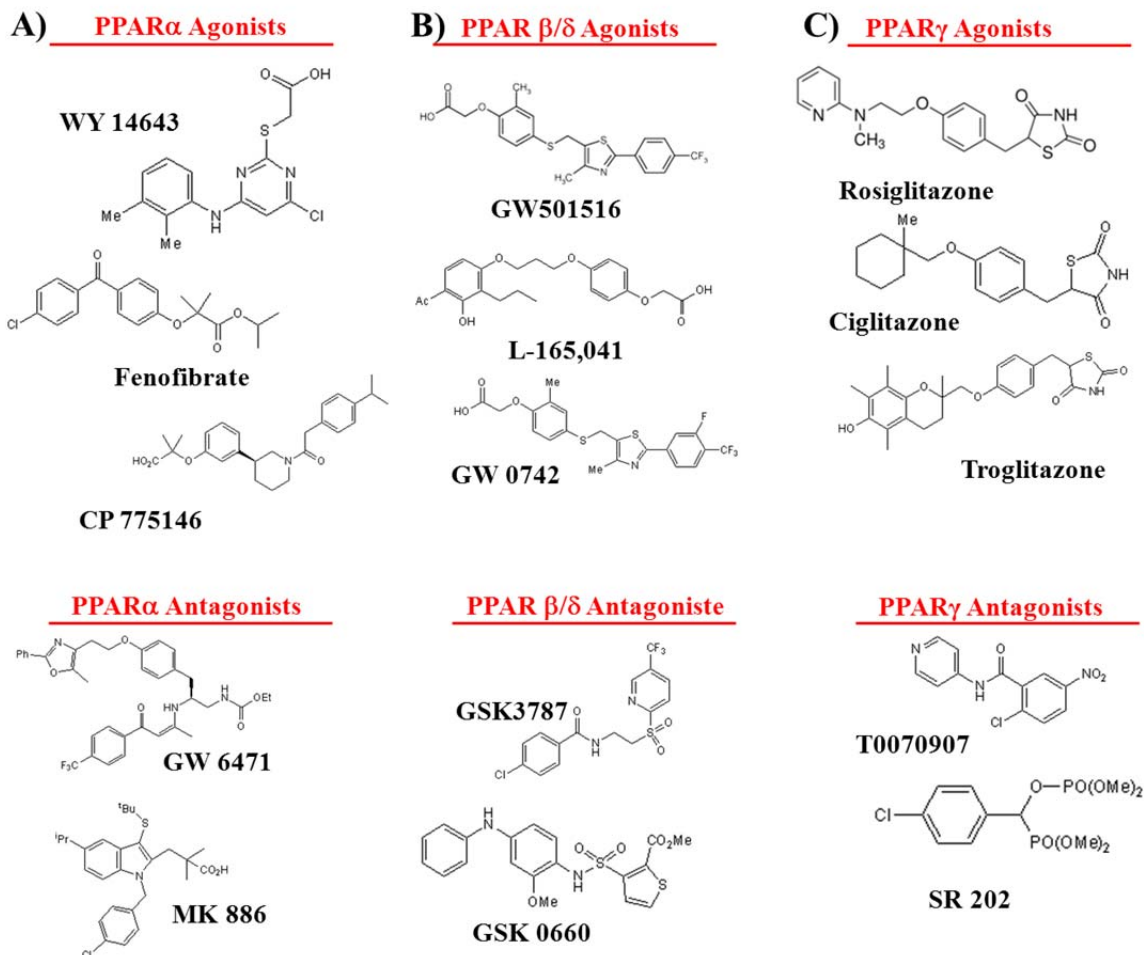
**Figure 21.** Mechanism of gene transcription by PPARs (modified after Desvergne *et al.*, 2006). In the absence of ligand, PPAR interacts with a corepressor complex which inhibits transcription of the gene by their deacetylase activity. Following the binding of natural or synthetic ligands, the corepressor is released, PPAR heterodimerizes with RXR. This



phenomenon leads to the recruitment of coactivators with acetylase activity that induces transcription of the target gene.

### **2.5.1. PPAR $\alpha$ .**

PPAR $\alpha$  (NR1C1) is expressed in various tissues including those having a high catabolic potential for fatty acids (Ibabe *et al.*, 2002), such as the liver, heart, kidney, brown adipose tissue and small intestine (Escher *et al.*, 2001). The involvement of PPAR $\alpha$  in the catabolism of fatty acids is via its role as regulator of key enzymes of mitochondrial and peroxisomal fatty acid  $\beta$ -oxidation and (Desvergne *et al.*, 2006). PPAR $\alpha$  are activated by natural eicosanoids derived from arachidonic acid such as acid, 8-S-hydroxyeicosatetraenoic (8S-HETE), leukotriene B<sub>4</sub>, as well as oxidized phospholipids from oxLDL (Willson and Wahli, 1997). In addition, fibrates, ligands and pharmacological activators of PPAR $\alpha$ , are used clinically to treat dyslipidemia. Fibrates exert their hypo-TAG activity by stimulating the catabolism of fatty acids, leading to a decrease in hepatic production of VLDL, and secondly, in the hydrolysis of lipoproteins activate via the induction of LPL and a decreased of liver ApoC-III (Staels *et al.*, 1998). Figure 22A represents some of PPAR $\alpha$  ligands.



**Figure 22.** Examples of the chemical structure of some PPAR  $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  and  $\gamma$  ligands.

### 2.5.2. PPAR $\beta/\delta$ .

PPAR $\beta/\delta$  (NR1C2) is the most ubiquitous of PPARs. It is present in many tissues such as muscles, adipose tissues, lungs, brain, and intestines. In the latter organ, PPAR $\beta$  isoform is the main expressed PPAR isotype (Escher *et al.*, 2001). This NR has several synthetic ligands (Figure 21B). It is involved in the oxidation and lipid metabolism as well as the mechanisms of cell proliferation. Treatment with PPAR $\beta$  agonist GW501516 or L165041 appears to have lipid-lowering effects through an effect on muscle fatty acid uptake and catabolism which secondarily modulate lipoprotein metabolism (Karpe and Ehrenborg, 2009). Treatment of db/db mice with PPAR $\beta$  agonists shows a positive effect on the reduction of TAG (Leibowitz *et al.*, 2000).

A comprehensive study in Atlantic salmon shows the existence of four genes for PPAR $\beta$ . These genes are separated in two families ssPPAR $\beta$ 1 and ssPPAR $\beta$ 2 and each family contains two isotypes, ssPPAR $\beta$ 1A and  $\beta$ 1B, and ssPPAR $\beta$ 2A and  $\beta$ 2B (Leaver *et al.*, 2007).

It has been shown that ssPPAR $\beta$ 1A isoform can be activated by monounsaturated fatty acids, 2-bromopalmitate but also the PPAR $\beta$  agonist of mammals, GW501516 (Leaver *et al.*, 2007).

It has been shown that PPAR $\beta$  have an important role in lipid metabolism and adipocyte differentiation in cell culture. Using cells with a deteriorated PPAR $\beta$  expression, researchers observed a significant decrease in cell differentiation and lipid accumulation that may not be recoverable even in the presence of the PPAR $\gamma$  agonist, troglitazone. However, the addition of L165041 PPAR $\beta/\delta$  agonist in the culture medium potentiated the action of the PPAR $\gamma$  agonist in stimulating adipocyte differentiation and lipid accumulation (Matsusue *et al.*, 2004).

### **2.5.3. PPAR $\gamma$ .**

PPAR $\gamma$  (NR1C3) is predominantly expressed in adipose tissue where it controls cell differentiation (Matsubara *et al.*, 2005), lipid storage and modulates the action of insulin. PPAR $\gamma$  is also expressed in the intestinal mucosa at higher levels in the colon and cecum than in the small intestine. At this level, its expression decreases from the duodenum to the jejunum (Lefebvre *et al.*, 1999, Chen *et al.*, 2006). PPAR $\gamma$  is considered the key regulator of adipogenesis and could lead to the direct link between obesity and type 2 diabete (Janesick and Blumberg, 2011). Activation of this NR by natural ligands such as certain fatty acids and their derivatives or xenobiotics showed a positive effect on the stimulation of adipogenesis either *in vitro* or *in vivo* (Janesick and Blumberg, 2011). The family of thiazolidinediones (TZDs) (Figure 20C) such as glitazones (rosiglitazone, troglitazone ...) represents potent and selective ligands for PPAR $\gamma$  (Lehmann *et al.*, 1995 Good, 2005). However, PPAR $\gamma$  agonists are often used to reduce insulin resistance, which is accompanied by a reduction of hypertriglyceridemia and thus improves the lipid profile of patients (Pourcet *et al.*, 2006). PPAR $\gamma$  also presents a good drug target against the retinal and choroidal neovascularization by blocking the expression of the receptors for vascular endothelial growth factor (VEGF) (Good, 2005). Blockage by PPAR $\gamma$  antagonist GW9662 prevents the development of obesity induced by high fat feeding in mice *in vivo*, without having an impact on the rate of food intake (Nakano *et al.*, 2006). Another study also showed a 50% decrease in the activity of PPAR $\gamma$  induces protection against obesity caused by a high fat diet and insulin resistance (Takasawa *et al.*, 2008). Concomitant inhibition of PPAR $\gamma$  and RXRs with antagonists specific for each of the two isoforms shows a significant decrease in rate of TAG content in WAT, skeletal muscles and liver (Yamauchi *et al.*, 2001).

PPAR $\gamma$  is also a target for obesogenic molecules as certain pharmaceuticals or endocrine disruptors. Among these molecules, halogenated bisphenol A has an obesogenic activity indentified in humans, zebrafish and *Xenopus* (Riu et al., 2011), phthalates such as monoethylhexyphtalate, or organotins such as TBT (Kanayama *et al.*, 2005; Janesick and Blumberg, 2011).

## 2.6. Liver X receptors (LXRs).

LXRs are part of NR1 NR family. They bind to the DNA of target genes as permissive heterodimers with RXRs (Lefebvre *et al.*, 2010). In humans and mice, they exist in two isoforms, LXR $\alpha$  (NR1H3) and LXR $\beta$  (NR1H2), arising from two distinct genes. In zebrafish, a single *lxr* copy has been characterized with high sequence identities of the deduced protein with mammalian LXR $\alpha$  (Table 4) (Archer et al., 2008).

**Table 4.** Percentage of identical amino acids between homologous proteins encoded by LXR $\alpha$  between different species of vertebrates (after Archer *et al.*, 2008).

	Length (aa)	Zebrafish	Human	Mouse	Rat	Chicken	Fugu
<i>Overall similarity</i>							
Zebrafish	412						
Human	447	69					
Mouse	445	70	91				
Rat	445	70	91	97			
Chicken	409	76	75	76	76		
Fugu	363	93	78	78	77	83	
Oryzias	390	88	73	74	73	77	96

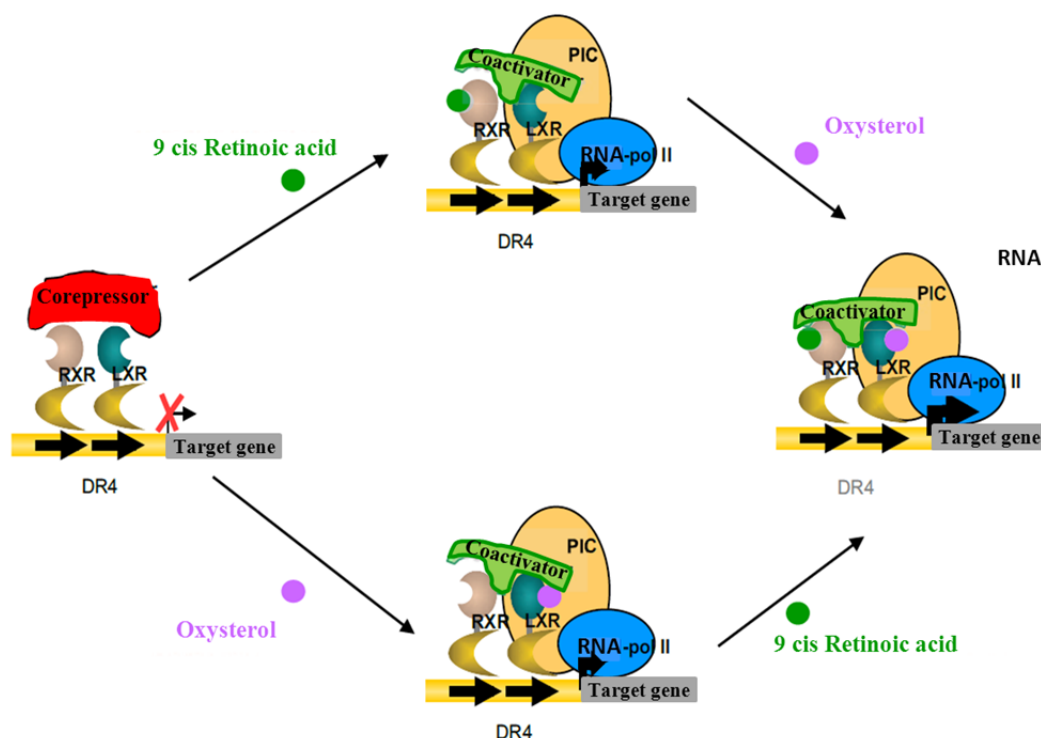
Since their discovery in 1995, LXRs have emerged as powerful metabolic regulators in many tissues and cell types (Laurencikiene and Rydén, 2012). Like most NRs, the LXRs are activated by small lipophilic ligands. In the case of LXRs, oxysterols and some cholesterol derivatives are natural ligands (Wójcicka *et al.*, 2007; Laurencikiene and Rydén, 2012). Other synthetics have been identified such as T0901317 or GW3965 (Wójcicka *et al.*, 2007).

An analysis of the expression profile of LXRs showed that the expression of the  $\beta$  form is rather ubiquitous while the form  $\alpha$  has higher transcript levels in the organs which have an active lipid metabolism such as adipose tissue or steroidogenic organs (Mouzat *et al.*,

2009). The results obtained in recent years suggest that LXRs may have important roles in the metabolism of adipocytes. However, almost all of these studies were performed in non-fat cells or tissues and it is hard to know the exact role of these NRs in the WAT (Laurencikiene and Rydén, 2012). Work conducted in KO mice and analysis of LXR $\alpha$  and LXR $\beta$  gene expression suggested that LXRs would be involved in the regulation of some number of genes involved in cholesterol and fatty acids metabolisms in the liver, macrophages and intestine (Ulven *et al.*, 2005). LXR $\alpha$  and LXR $\beta$  are the expressed and activated by endogenous and synthetic ligands in adipose tissue, which leads to lipid accumulation in adipocytes. This indicates an important regulatory role of LXR signaling in several metabolic cascades in the adipose tissue, such as glucose metabolism and *de novo* fatty acid synthesis (Ulven *et al.*, 2005). The LXRs stimulate fatty acid synthesis by stimulating the transcription of lipogenic genes such as SREBP-1c (sterol regulatory element-binding protein-1c) (Wójcicka *et al.*, 2007). Treatment of adult zebrafish with the LXR synthetic agonist GW3965 induced a strong up-regulation of genes involved in lipid metabolism in the liver (Archer *et al.*, 2008). From embryonic stages, and in the first 24 hours post fertilization (hpf), *lxr* is ubiquitously expressed, followed by a greater specificity for the liver at 3 days post fertilization (dpf), and the intestines at 4 dpf, while in adults almost all organs analyzed in this study demonstrated an *lxr* expression (Archer *et al.*, 2008). In cultured rainbow trout preadipocytes the expression of LXR is shows a significant increase during differentiation. Increased LXR expression after treatment with agonist T091317 was concomitant with a higher level of lipolysis in freshly isolated adipocytes". In the same paragraph it should be included a comment on another work done in fish myocytes in which it is demonstrated the possible lipogenic role of LXR acting through different identified LXR target genes in rainbow trout cultured myocytes (Cruz-Garcia *et al.* 2011). Treatment of muscle cells (myotubes) with human T091317 for 4 days increases lipogenesis by increasing the *de novo* synthesis of lipids and lipid accumulation (Kase *et al.*, 2007). This is confirmed with another study on human preadipocyte cultures, LXR agonist T0901317 strongly stimulated the expression of SREBP-1c and lipogenic enzymes ACC-1, FAS and SCD-1 in Chub-S7 human preadipocyte cell line as in the stroma vascular fraction of primary cell culture. Effects on gene expression have been associated with the stimulation of *de novo* lipogenesis in both cell models, which leads to the accumulation of lipids (Darimont *et al.*, 2006).

LXRs form heterodimers with RXRs and bind to DNA mainly on the LXR response elements (LXRE). In the absence of ligand, the RXR/LXR heterodimer is constitutively attached to the LXRE. In this inactive state, these NRs act as repressors of gene transcription by recruiting corepressors (Lobaccaro *et al.*, 2001). Otherwise, in the presence of the ligand,

the binding of a LXR agonist or RXR on the heterodimer causes the departure of corepressors and binding of coactivators creating a permissive environment for the transcription (Figure 23).



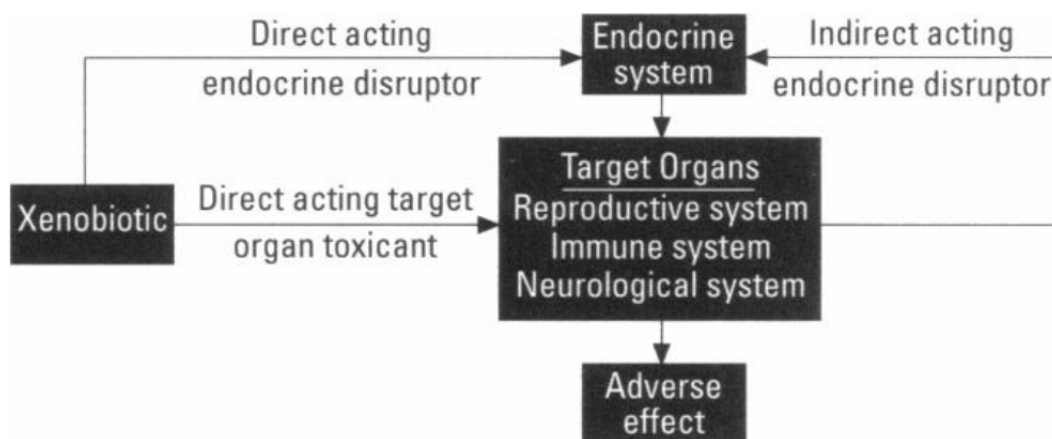
**Figure 23.** Mode of action of the RXR/LXR heterodimer. RXR/LXR complex can be activated both by the 9-cis retinoic acid and/or one oxysterol. Double induction leads to additive or synergistic activity probably by more efficient recruitment of coactivators. RNA pol II: RNA polymerase II PIC: Pre-Initiation-Complex; DR4: Direct Repeat 4; LXR: Liver X receptor, RXR: Retinoid X receptor (after Peet *et al.*, 1998).

### 3. Endocrine disruptors

The spill quantity and diversity of many compounds arising from human and industrial activities raises the question of their impact on human and animal health. A number of molecules of natural or synthetic origin can induce unwanted changes of the endocrine system. An endocrine disruptor (ED) can be defined as an "exogenous substance capable of interfering with the synthesis, secretion, transport, binding, action or elimination of natural hormones responsible for maintaining homeostasis, the development, reproduction and behavior" (Kavlock *et al.*, 1996). According to WHO, "an ED is a substance or mixture of exogenous substances that alter the functions of the endocrine system and induce harmful effects on the health of an intact organism, its progeny, or (sub) populations" (WHO, 2002). ED are not related to a chemical class or defined by a particular mechanism of action. The

only common feature of these xenobiotics is their ability to induce changes in the endocrine system, which eventually will have negative consequences for the healthy organisms and their offspring.

Indeed, ED can directly interact with the endocrine system, *e.g.* pancreas, testes, ovaries, thyroid and parathyroid, WAT... as they can also impact the structure and/or function of other non-endocrine tissues and organs and therefore indirectly affect the endocrine system (Figure 24) (Kavlock *et al.*, 1996).



**Figure 24.** Pattern of interactions between the endocrine system and the reproductive, neurological and immune systems to illustrate the complexity of the potential mode of action of xenobiotics (according to Kavlock *et al.*, 1996).

It is long been known that exogenous substances can interfere with the endocrine system. Natural compounds have been used since immemorial times to modulate what we will call later hormonal or endocrine system. Farmers have long since established the correlation between the dietary intake of a particular species of clover by some ruminants and reproductive problems. This feed contains oestrogenomimetic molecules such as coumestrol (Adams, 1995). The ability of natural or synthetic chemicals to interact with endogenous hormone receptors was already established in the 1930s (Marty *et al.*, 2011). From the 1940s, steroidal compounds began to be used in order to regulate the reproductive cycle of cattle and improve the efficiency and rate of weight gain. In the same context, products such as ethinyl estradiol, mestranol or norethynodrel were developed as contraceptive agents for the purpose of treating human diseases (Marty *et al.*, 2011). To 50 years, scientists have discovered the biocidal properties of organotin compound (organotins) and their use has increased steadily as

active agents in many industrial products, such as fungicides, repellants for rodents, protective timber in antifouling paints and stabilizers of polyvinyl chloride (PVC) (Hoch, 2001).

### 3.1. Classification of endocrine disruptors.

Classification of ED can be based on different parameters: their use, their origin or chemical nature. ED may be of natural origin such as phytoestrogens or synthetic such as fungicides, herbicides or insecticides, or pharmaceutical molecules such as hormones or synthetic cosmetics as UV (Ultraviolet) filters. Table 5 shows some examples of ED, mainly environmental toxicants.

**Table 5.** The main classes of endocrine disruptors (after Colborn *et al.*, 1993; Colborn, 1996).

HERBICIDES and FUNGICIDES		INSECTICIDES	
<b>Fungicides</b>	Vinclozolin Procymidione Fenarimol Ziram nitrofen Trifuraline Benomyl Mancozeb Maneb Amitrole <b>Tributyltin</b> Zineb	<b>Organochlorine</b>	DDE Methoxychlor DDT Lindane Dieldrin Heptachlor Endosulfan Toxaphene Mirex
		<b>Synthetic pyrethroids</b>	Dicofol Cypermethrin
<b>Herbicides</b>	Atrazine Alachlore Linuron	<b>Organophosphate</b>	Parathion
		<b>Carbamates</b>	Methomyl Carbaryl
INDUSTRIAL CHEMICALS		PHYTOESTROGENES	
Hexachlorobenzene Polychlorinated biphenyls (PCBs) and dioxins Bisphenol A Styrenes Alkylphenols Phthalates		Genistein Coumestrol Daidzein Enterolactone Zearalenone	



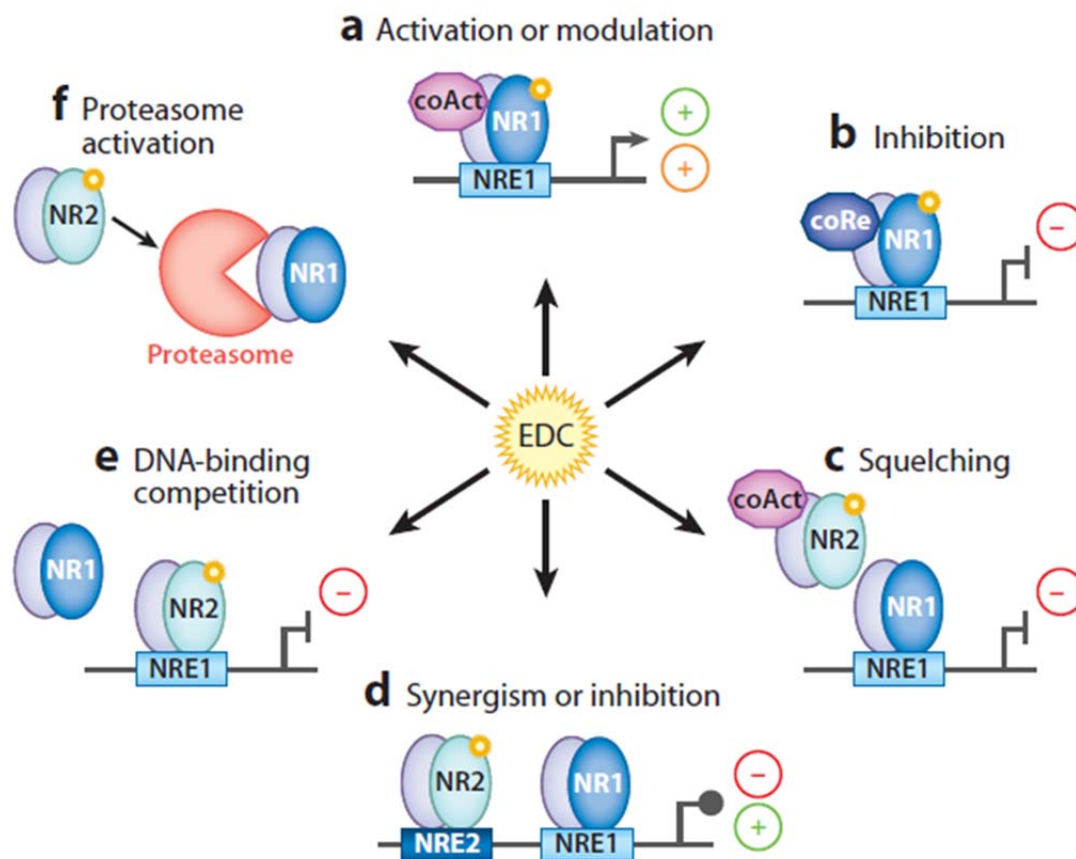
The effects observed following the massive release of ED in the environment are characterized, among other things, by the observation of developmental abnormalities in animals, very high mortality of certain animal populations and reproductive defects. One of the first people to have attracted the attention of the public on the adverse effects of ED was R. Carson in her book "Silent Spring" in 1962. She described the effects of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) on bird populations which contributed to the prohibition of the use of this product in the USA from 1972. The 1970s were marked by the case of diethylstilbestrol (DES), a synthetic estrogen that is prescribed for more than thirty years to pregnant women to prevent spontaneous abortions, prematurity and the risk of bleeding of pregnancy. This molecule is now banned. Scientists have indeed been able to link the prescription of this drug to the mother and the emergence of major abnormalities of the genital tract of women arising of these pregnancies (Treffers *et al.*, 2001). This molecule is also a powerful obesogen (Newbold *et al.*, 2009).

Numerous scientific studies have established a causal link between the presence of xenobiotics in the environment and the appearance of anomalies in animal populations, especially waterfowl. This applies for example to organotin compounds (Chagot *et al.*, 1990). Bisphenol A is another example of a substance widely used and that the ban should be permanent. This molecule is widely used in polycarbonate plastics, polystyrene resins and dental sealants. It is also used as an additive to other plastics such as PVC (Casals-Casas and Desvergne, 2011). This molecule causes adverse effects during critical periods of fetal and postnatal development, which leads to metabolic disorders in adulthood. It can be acting at very low doses well below the currently acceptable daily intake (50 µg/kg/day) (Nalbone *et al.*, 2011). Recent data have been reported demonstrating that bisphenol could be eliminated by human renal system more efficiently than in experimental animals (Teeguarden *et al.*, 2011).

### **3.2. Mechanisms of action of endocrine disruptors.**

Endocrine disruption is not characterized by a toxic effect, but by a modification of the endocrine system that may result in a toxic effect when the homeostatic regulation is disrupted. Targets of xenobiotics are numerous. As several studies shows, the ED may interfere with NRs by several mechanisms (Figure 25). They can act as:

- Agonists: they can mimic the action of a natural hormone by binding to the cellular receptor and causes a normal response. They can also encourage the recruitment of coactivators by the heterodimer and after the initiation of transcription of the target gene (Figure 25a) (Casals-Casas and Desvergne, 2011).
- Antagonists: they can bind to hormone receptor and inhibit its DNA binding and thus prevent transcription of a target gene by taking the place of the natural hormone, they promote conformational changes that allow the recruitment of corepressors (Figure 25b) (Casals-Casas and Desvergne, 2011).
- Competitive agents in the recruitment of coactivators or of the binding site on DNA: The ED may interfere in an indirect way, the binding of a ED with a NR (*e.g.* RN2) can interfere with another NR (*e.g.* RN1) via molecular interference as competition to recruit coactivators (Figure 24c) or for connecting sites of DNA binding (Figure 25e) (Casals-Casas and Desvergne, 2011).
- Other indirect mechanisms are: 1) the binding of two NRs, RN1 and RN2, to neighboring DNA sequences, which can lead to either synergy or inhibition of regulatory activity (Figure 25d), 2 ) a transcription activation stimulated by the binding of ED on the two NRs, which results in the degradation of the other receptor activation by the proteasome (Figure 24f) (Casals-Casas and Desvergne, 2011).



**Figure 25.** Diagram showing the different modes of action of xenobiotics via NRs. ED, endocrine disruptor; NR1/NR2, nuclear receptors type 1 and 2; coAct, coactivators, Core corepressor; NRE1/NRE2, response element nuclear receptor 1 and 2 (Casals-Casas and Desvergne, 2011).

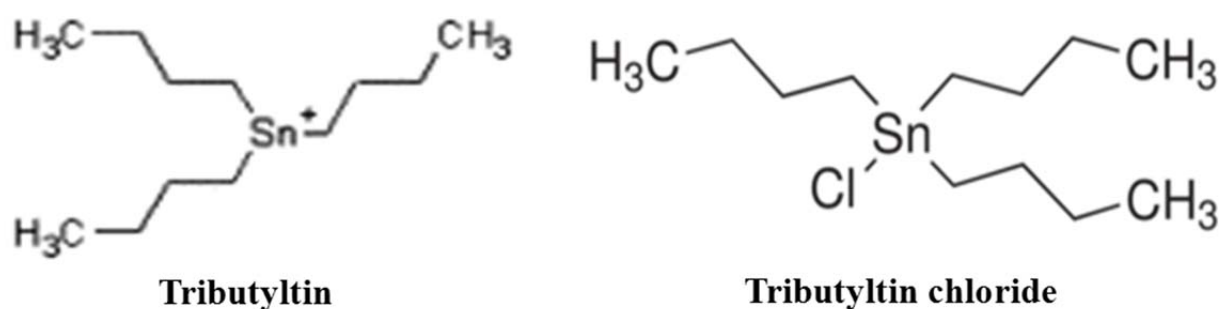
### 3.3. Organotin compounds.

Organotin compounds (organotins) are synthetic industrial products. They are organic compounds of tin (Sn 4+) and are characterized by the presence of at least one covalent bond between a carbon atom and a tin atom. Organotin compounds are designated as mono-, di-, tri-, tetra-organic compounds of tin and have the general formula (n-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>), Sn-X, wherein X is an anion or a group bonded so covalently via a heteroatom (Okoro *et al.*, 2011). Pollution by organotins in the aquatic environment is a global concern. Two groups of compounds are toxic to aquatic life, TBT and triphenyltins. In this work, we have determined what NR signaling pathway TBT is using on zebrafish WAT to induce its obesogenic effect (Chapter III).

#### 3.3.1. Tributyltin.

From an economic standpoint, the ships and boats that have hulls clean and smooth move faster and consume less fuels. However, objects floating on the surface of the water are quickly covered of living organisms under the waterline because they serve as a support for the development of them (Alzieu *et al.*, 1980). Biological fouling can cause significant damage in particular the loss of the ship speed, the fuel consumption, the development of corrosion points, increasing the weight of buoys and floating equipment and narrowing of the ducts (Alzieu *et al.*, 1980). During the 1960s, antifouling paints have been developed by the chemical industry. These paintings are mainly comprised of organotin products, such as TBT. This type of paint has proven extremely effective against the adhesion and growth of algae and organisms on the hulls of boats. Massive amounts of compounds of this type were thus released into our environment.

Tributyltin compounds are organotin compound with the chemical formula  $(n-C_4H_9)_3Sn-H$ , include several sub-products: Tributyltin oxide, tributyltin fluoride, tributyltin chloride (Figure 26), tributyltin hydroxide, tributyltin naphthenate and tris (tributylstanyl) phosphate are the main organotin biocides used in the industry (Clark *et al.*, 1988).

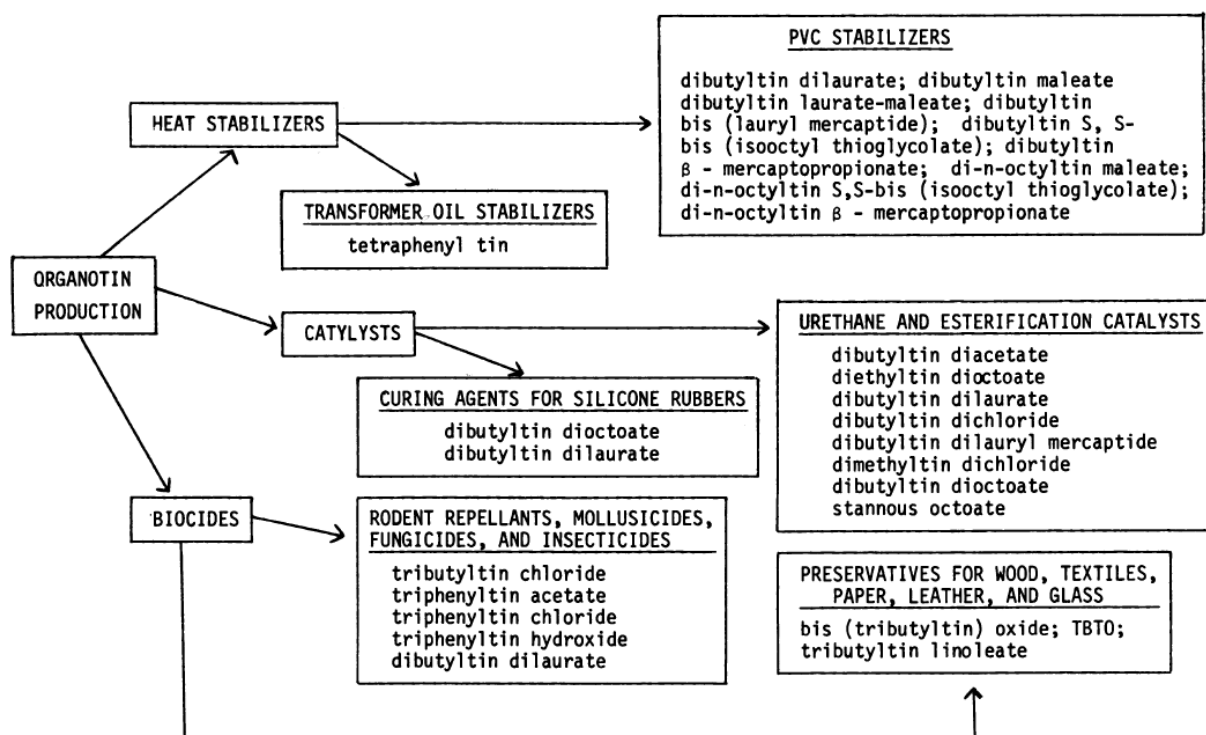


**Figure 26.** Structures of tributyltin and tributyltin chloride.

### 3.3.1.1. Areas of use of TBT.

The use of TBT in antifouling paints and agrochemical activities has been of particular interest because they are the most important ways to release it in the environment (Ayanda *et al.*, 2012). Organotins were also used as PVC stabilizers with a percentage up to 70% (Ayanda *et al.*, 2012). Used as slimicides as in cooling towers, they act as fungicides, bactericides, insecticides but also as preservatives for wood, textiles, paper, leather, and electrical equipment (Clark *et al.*, 1988; Hoch, 2001). Figure 27 gives an overview of

pathways used for products containing organotin. It is interesting to note that the derivatives dialkyltins are used as heat stabilizers and catalysts, while the trialkyl derivatives triaryltins and are mainly used as biocides (Piver, 1973). The numerous commercial applications of organotin compounds has led to a strong increase in world production, about tons in the years 50 to around 30-35 000 tons/year in the early 80s to more than 50 000 tons in 1992 (Alzieu *et al.*, 1998; Ayanda *et al.*, 2012).



**Figure 27.** Schematic distribution of the use of products containing organotins (after Piver, 1973).

### 3.3.1.2. Physico-chemical properties of organotins.

The solubility of organotins is variable depending on the type of by-product, for example it is 17 mg/l in distilled water and  $5.7 \pm 2.3$  mg/l in the vapor pressure of 4.2, pH > 7 and a salinity of 18% for TBT (Ayanda *et al.*, 2012). In organotin molecules, the carbon-tin is a point of least resistance, degradation of organotins is performed by biotic and abiotic factors. The cleavage of the Sn-C can occur under UV irradiation, which is the process of the most important abiotic degradation (Alzieu *et al.*, 1998; Okoro *et al.*, 2011). The half-life of TBT in seawater depends on environmental conditions (temperature, pH, turbidity, light), it can range from a few days to a few weeks. Degradation is faster in water containing suspended matter, and the calculated half-lives ranging from 5.8 days in summer for turbid

waters, to 127 days in winter in waters devoid of particulate material (Alzieu *et al.*, 1998), its degradation is slowed sharply in cold environments.

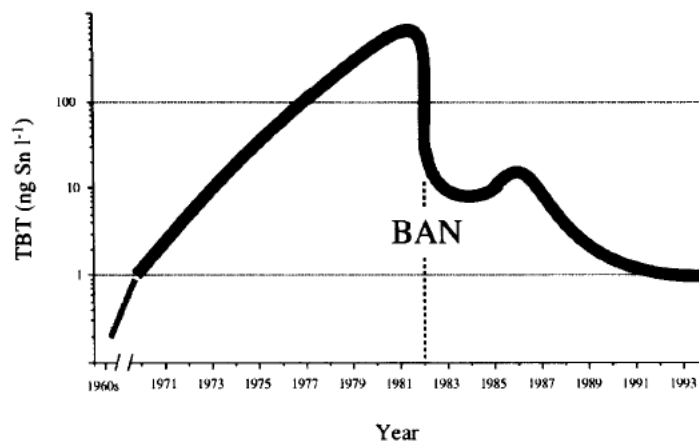
TBT has a hydrophobic behavior which promotes its sequestration in sediments and therefore its removal from the aqueous phase leading to long-term storage of this contaminant. The half-life of TBT in sediments is estimated over a year and a few decades (Alzieu *et al.*, 1998; Ayanda *et al.*, 2012). This phenomenon of absorption of TBT in sediments appears to be a reversible process depending on the conditions (Ma *et al.*, 2000).

### **3.3.1.3. TBT into the environment and its bioaccumulation.**

Uncontrolled and deleterious effects of TBT from antifouling paints have been documented since the late 1970s in the Arcachon bay (South-West of France) by researchers from IFREMER. At that time these researchers took the alarm, and showed that the responsible major problems with oysters, *Crassostrea gigas*, such as the high mortality in the larval stage and the appearance of abnormal calcification of shells adults were due to strong contamination by TBT. These problems have caused a sharp decline in the value of marketable shellfish stocks (Evans *et al.*, 1995; Alzieu, 2000). In the Arcachon bay, between 1977 and 1981, the values determined TBT concentrations in water exceeded 100 ng/l, while following the regulations in January 1982 on the use of TBT paints in France anti-fouling, values are ironed at 1 ng/l in the late 80s and early 90s (Figure 28) (Ruiz *et al.*, 1996).

In order to assess the problems caused by TBT and its derivatives, several environmental studies have been conducted in freshwater, marine sediments and in some biological organisms in the world. Contamination by TBT and its derivatives have been detected in marine environments everywhere with concentrations that vary over time and space. The researchers noticed that the highest rates are found in coastal areas where vessel traffic and water activity are strongest.

Before the use of TBT is regulated, analyzes of product concentrations in marine waters were very high. For example, in 1983, concentrations between <30 and 630 ng/l in the river Crouche in Britain, while in the waters of the Chesapeake Bay ranged from <1 to 1342 ng/l, between 5 and 235 ng/l in the basin of San Diego (Seligman *et al.*, 1986, Huggett *et al.*, 1992). Regarding France, a study carried out on the Atlantic coast between 1986 and 1987, shows values of TBT between 4 and 63 ng/l, while in the Mediterranean coast, a study in 1988 showed that concentration can up to 250 ng/l (Alzieu *et al.*, 1998).



**Figure 28.** Estimate of the historical evolution of TBT concentrations in the open waters of the Bassin d'Arcachon (France) (after Ruiz *et al.*, 1996).

#### 3.3.1.4. Legislation based products and TBT concentrations.

The economic and environmental consequences have forced some countries to quickly implement a regulation banning the use of TBT. Organotin compounds used for the treatment of antifouling boat hulls are prohibited in France since January 1982 in antifouling paints for boats under 25m. The ban in France was soon followed by Great Britain in 1987, the United States in 1988 and Canada in 1989. Since 2003, the prohibition of use was extended to all vessels flying the flag of the EU (except Navy) before the OMI in 2008 proscribes all anti-fouling systems may release organotin compounds (Andral *and al.*, 2011).

A number of bibliographical data regarding the rate of TBT in marine waters, sediments and also some biological organisms at different points in the world and France are shown in Table 6. This information can be useful to know the level of the contaminant distribution.

Years after the ban on the use of TBT in Europe, Devier and colleagues conducted a study on various sites in the region of Arcachon. They noticed that, in general, the rate of TBT are relatively low, except the entrance of the basin (site Banc d'Arguin), the values of TBT detected after the summer season (month of August) were twice the values detected initially (early season). The explanation consists of an input of TBT due to the movement of water during the summer unlawful use of antifouling paints containing TBT, in addition to the closed geometry of the site, surrounded by numerous sandbanks (Divert *et al.*, 2005). Other reports show that despite these prohibitions, significant concentrations of TBT and its derivatives are observed near major port areas in France, like Picardy, Brittany and Provence. Overall contamination levels appear higher in the Mediterranean than in the Atlantic, which

could be due to the absence of tides and therefore lower renewal coastal water near the source port (Andral *et al.*, 2011). The other reason is the lack of regulation in the countries of North Africa that could contaminate the French coast. A 1999 study shows that there are still sources of contamination to the French coast in all ports even after the ban (Michel and Averty, 1999). This scenario observed in France is similar to several other countries, such as Canada for example. Researchers found high levels of contamination in several sites around 1995 (Chaux *et al.*, 1997).

Due to the widespread use of large quantities of TBT, this molecule has entered various ecosystems. This compound deserves our attention because it is described as the most toxic substance ever introduced into the marine environment and ranked as one of the most powerful ED product (Evans *et al.*, 1995, Pereira *et al.*, 1999, Ayanda *et al.*, 2012). This molecule has a high toxicity to aquatic life even at very low concentrations (Chagot *et al.*, 1990).

The use of TBT as additives in antifouling paints is one of the most important ways of introduction of TBT in the aquatic environment, with participation of industrial and agricultural applications (Clark *et al.*, 1988; Hoch, 2001). This category of harmful substances pose a risk not only to aquatic ecosystems but also terrestrial (Chagot *et al.*, 1990). The hydrophobic character of TBT is the most important criteria are that promotes accumulation and persistence in the environment. Accumulation in the surface microlayer promotes its photo-decomposition by UV, but in aquatic and terrestrial ecosystems this process is very limited because their trapping sediment appears to be the main route (Hoch, 2001).

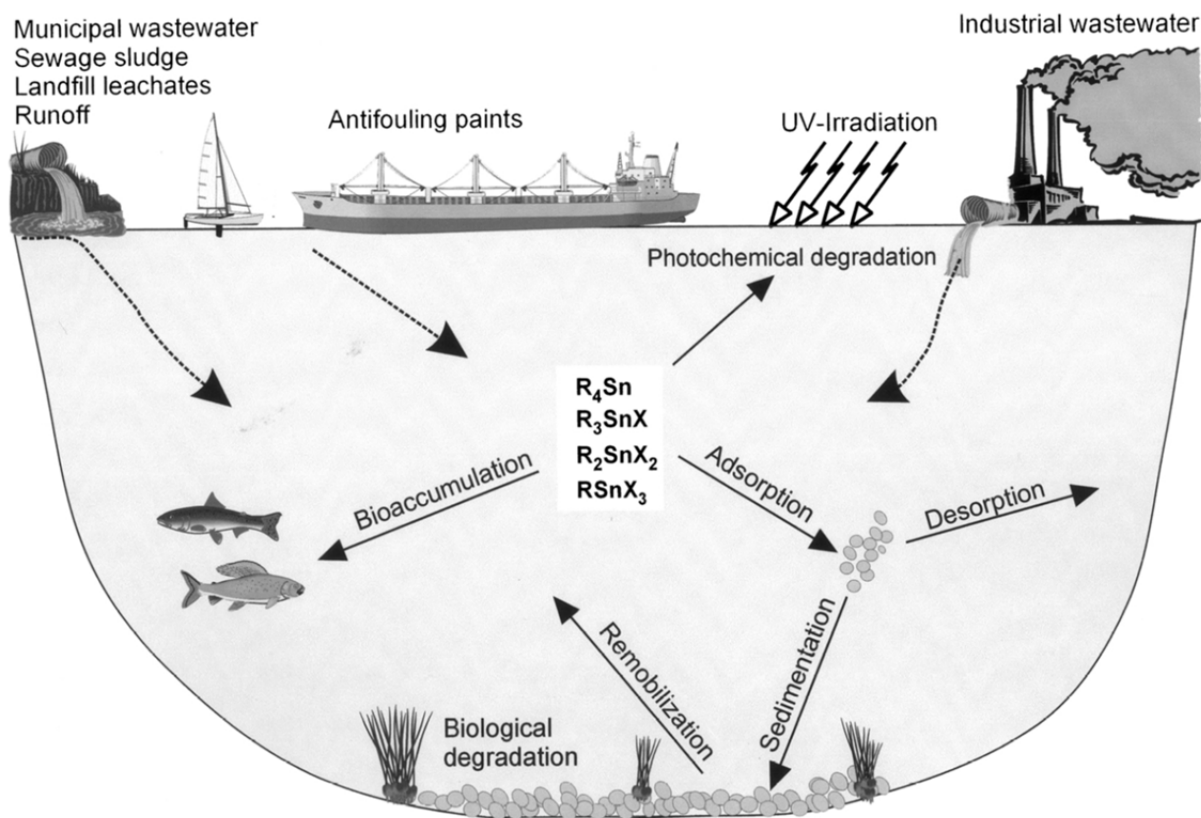
Figure 29 shows the sources of organotins and their distributions in the aquatic environment. Bacteria were noted to have a remarkable ability to accumulation of organotins. Marine bivalves are able to accumulate large amounts of TBT (up to 5 mg/g). Fish and shellfish accumulate smaller amounts as bacteria and bivalves because of their possession of enzymatic mechanisms of degradation of organotin (Okoro *et al.*, 2011). Their absorption in mice is also low with a primary excretion via the feces. Mammals and birds accumulate high levels of butyltin in organs and tissues (Iwata *et al.*, 1995). In some mammals, TBT compounds may be metabolized DBT (dibutyltin) and other metabolites of TBT can be identified in adipose tissue, liver and kidneys (Adeeko *et al.*, 2003).



**Table 6.** Some bibliographical data concerning the levels of TBT in marine waters, sediments, but also in some biological tissues, in different parts of the world (according to Michel and Averty, 1999; Okoro *et al.*, 2011).

Tributyltin in sediments			Tributyltin in seawater			Tributyltin in some biological tissues			
Sampling location	Year	TBT (ng/g dw)	Sampling location	Year	TBT (ng/l)	Sampling location	Biological sample	Year	TBT (ng/g dw)
West and east coast, Canada Crystal Lake, US	1995 2001-2003	< d.l-5100 1.5-14,000a	West and east coast, Canada Coast, Korea North coast of Kyoto, Japan	1995 1997-1998 2003	< d.l,-500 < d.l,-4.5 3.9-27	Coast, Canada	Mussel Mussel	1995 1996	20-1198 < 1440a,b
Port of Osaka, Japan Coast, Malaysia Great Barrier Reef World Heritage Area, Australia Alexandra harbour, Egypt Kochi harbour, India Mumbai harbour, India Fishing harbours, Taiwan West coast, India North coast of Kyoto, Japan Coast, Vietnam Sanriku coast, Japan	1995-1996 1997-1998 1999 1999 2000-2001 2000-2001 2001-2004 2002-2003 2003 2003 2005	10-2100 2.8-1100a,b < d.l-1275 1-2076 16.4-16,816b 4.5-1193b 2.4-8548b 5-2384b 1.2-19 8.3-51 2-14,000	South west coast, Spain South east coast, France Coastal waters, Greece North west coast, Spain	1993 1998 1998-1999 Not provide	9.1-79 < 0.015-0.12 < d.l.-70 0.4-196.6	Japan sea, Japan Bangladesh Aomori, Japan Coast, Korea Coast, Korea Coast, Malaysia Aqua culture area, Taiwan North coast of Kyoto, Japan Coast, Vietnam Coastline of Hong Kong, China Coastline of Hong Kong, China Sanriku coast, Japan	Walley pollock Fish Fish Vivalves Starfish Fish Oyster Mussel Clam T. Clavigera T. Luteostoma Mussel	1991 1994 1996 1997-1998 1997-1998 1998 2002 2003 2003 2004 2004 2005	2.2-6.4 a 0.47-3 < d.l. -240 a,b, b 7-323 2.4-190 a, b < 3.8-417 a, b 0.8-11a 3.8-15 < d.l.-18 3.8-170 3-287
			<b>Marinas areas along the French coasts monitored in 1997</b>		<b>Harbours along the French coasts monitored in 1997</b>				
			<b>English Channel</b>		<b>English Channel</b>				
			Dunkerque	16.8	Dunkerque	7-15.4			
			Calais	87.7	Calais	18.7-43			
			Boulogne	49	Boulogne	2.3-86.3			
			Ouistreham	46	Le Havre	7.3-17.4			
			Port en Bessin	58.6	Ouistreham	18.7			
			Cherbourg	50-61.3	Cherbourg	55-280.1			
			Saint Malo	9.8-11.6	Cherbourg	24			
			Roscoff	1.7					
			<b>Atlantic</b>		<b>Atlantic</b>				
			Brest	8.6-11.1	Brest	11.6-37.4			
			La Trinité sur Mer	1.8-3.8	Concarneau	129			
			Le Croesty	1.4-4.4	Lorient	15.5-98.5			
			Pornic	15.8	Saint Nazaire	8.4-30			
			St Gilles Croix de Vie	1.9	St Gilles Croix de Vie	1.9			
			Les Sables d'Olonne	2.1-2.2	Les Sables d'Olonne	2.1-2.2			
			La Rochelle	3.4-16.4	La Rochelle	3.3-78.4			
			Arcachon	12.7-21.9	Hendaye	3.3-4			
			Hendaye	6.7					
			<b>Mediterranean</b>		<b>Mediterranean</b>				
			Banyuls	12.5-13.6	Port Vendres	5.7-13.6			
			Gruissan	10-11.8	Sète	3.8-21.4			
			Cap d'Agde	4.6-27.1	Fos sur Mer	5.0-5.3			
			Port Camargue	66.1-115.2	Marseille	40.2-109.3			
			Marseille	40.2-137.2	Toulon	42-237.3			
			Toulon	37.7-67.9					
			Cannes	59.2-189.1					
			Nice	72.9-199.3					
West coast, France River Thames, UK South west coast Tagus Estuary, Portugal Danish harbours and marinas, Demark North west Sicilian coast, Italy North east coast, Spain Coast, Portugal North coast, Spain South west, France Barcelona harbour, Spain North west coast, Spain	1993 1994 1998 1998-1999 1998 1999-2000 1995-2000 1999-2000 2000 2001 2002 2005	7-30 1-60 1.2-130 5.4-35b 100-5000b 3-27 51-7673 < 3.8 -12.4 50-5480 < d.l-89 98-4702 0.6-303	Northwestern Mediterranean, Spain River Elbe and North Sea The Netherlands South west Coast, Spain Strait between Denmark and Sweden Baltic Sea, Poland South west coast, Spain Coast, Portugal Northwestern Sicilian coasts, Italy West coast, Portugal Aegean Sea, Greece North west coast, Spain North west coast, Spain	1996 1993 1993 1993-1994 1997 1998 1999 1999-2000 1999-2000 2000 2001-2003 2005 2005	Deep sea fish Fish Fish Oyster Vivalve Mussel H. Trunculus Mussel H. Trunculus Mussel Bivalves Oyster Mussel	1.0-52a 66-490 a, b 9.2-67 a, b 269-96 200-300a,b 2.2-39 a 48 < 5.7-489 < d.l,-91 11-789 < 5.7-489 74-193 52.8-96			

Dw, dry weight; TBT = Tributyltin; < d.l = below detection limit. a, Wet weight; b, ng organotin instead of Sn; c, It is not specified whether concentration is given on basis of dry or wet weight



**Figure 29.** Distribution and sources of organotins in the aquatic environment (after Hoch, 2001).

### 3.3.1.5. TBT effects on organisms.

Scientific research carried out in the 1970s showed that TBT is highly toxic to a large number of aquatic organisms (Smith, 1981). The first effects of toxic TBT on the coastal environment were observed in the Arcachon Basin in the early 1980s. In 1975, oyster production was highly disturbed, first by an apparition of some distortion at the calcification oysters "*Crassostrea gigas*" (Figure 29). In some cases, these defects give shells lamellar structure in which there are pockets containing a gelatinous substance. These malformations are even more pronounced than it is in the immediate vicinity of the port areas. Disturbances attributed to TBT were then also observed by the progressive decrease in reproduction and juvenile recruitment thresholds to near zero (Alzieu *et al.*, 1982).

A study on the effect of TBT on larvae of "*Crassostrea gigas*" showed a high sensitivity of these organisms to TBT even at very low concentrations (0.7 ng/l). The researchers of this study have established a scale of correlation between the concentrations of

TBT and effect on embryogenesis and larval development, since the no-effect level of 0.7 ng/l TBT it to a complete inhibition of reproduction at 35 mg/l of TBT (His and Robert, 1983).



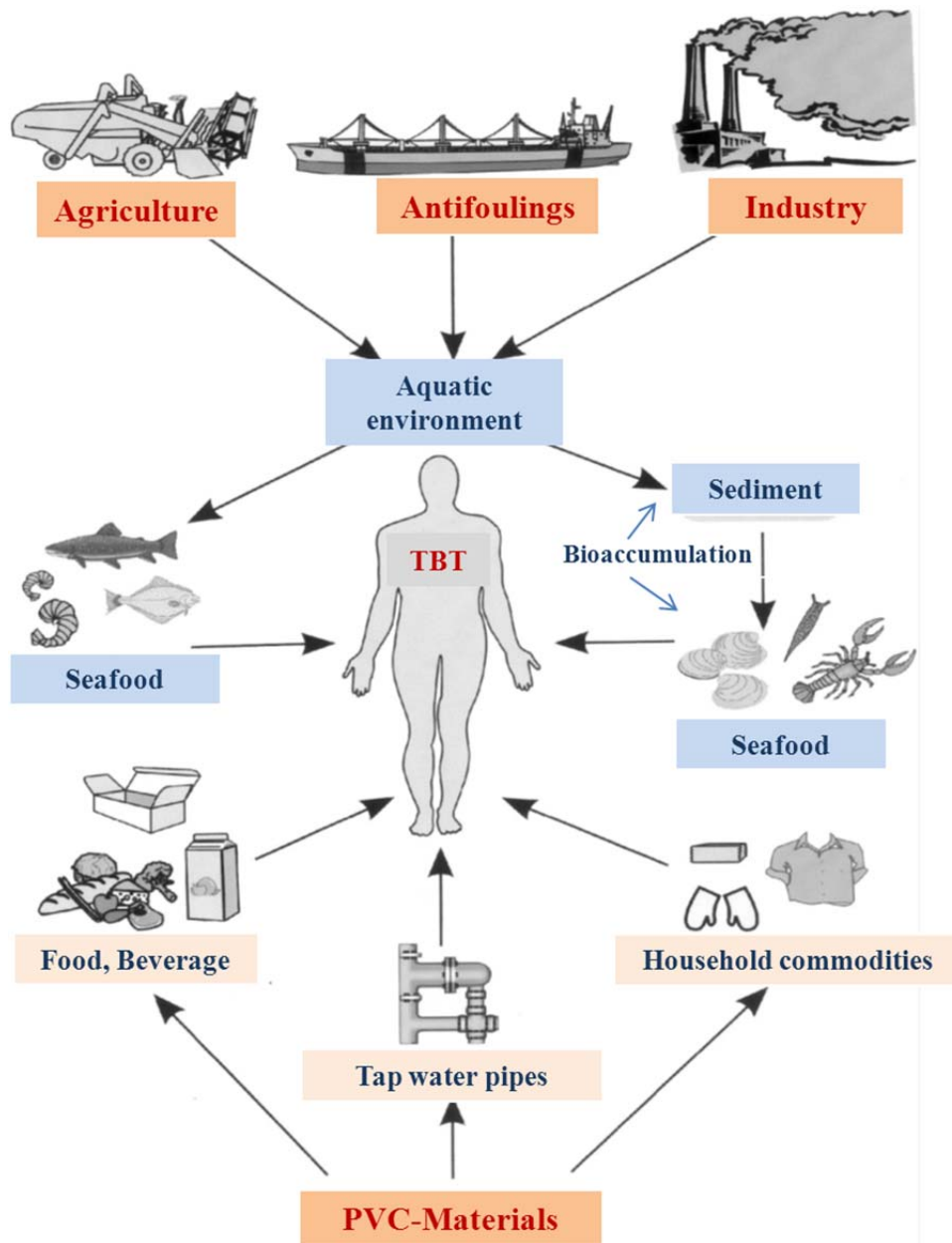
**Figure 29.** Abnormalities of the upper valve calcification oysters (A and B) compared with the normal appearance of control oysters (C) (According Alzieu et al., 1982).

Among the most notable alteration observed in molluscs, TBT induces a drastic change in the sexuality of these animals called imposex. TBT induced endocrine disruption by decreasing the activity of ovarian aromatase. This results in an increased level of testosterone, growth of the penis and sterility in females of some species of gastropods as *Nucella lapillus* (Oberdörster and McClellan-Green, 2002). In this species, a recent study showed induction of imposex by a RXR agonist, HX630 (Stange *et al.*, 2012). The early stages of imposex may occur at concentrations below 1 ng/l of TBT. Field observations have shown that this change resulted in a drop in populations (Bryan *et al.*, 1988; Coray *et al.*, 2007). This phenomenon also occurs in other species of snails for a large number of coastal sites worldwide, such as the North Sea and the Mediterranean (Morcillo and Porte, 1997). Exposure to TBT can also transform females into males as in the zebrafish (McAllister *et al.*, 2003). The phenomenon of imposex is to date the most sensitive biomarker for the presence of TBT in aquatic environments (Smith, 1981). TBT also has the ability to inhibit the activity of NADH/NADPH cytochrome C reductase of molluscs (Morcillo and Porte, 1997).

### **3.3.1.6. Risks to humans.**

The toxicity of organotins in humans was highlighted in 1954 by the death of more than one hundred patients treated with a drug containing 10% triethyltin iodide "triethyltin

iodide" (Smith, 1981). The widespread use of organotins in agricultural, urban and industrial activities during the past decades causes an environmental risk to humans (Hoch, 2001). Exposure to organotins, and more precisely to TBT can be considered in two ways 1) by direct exposure through ingestion of contaminated food. This route is considered the main route of human contamination by organotin (Antizar-Ladislao, 2008), 2) indirect exposure through the use of household products containing residues of organotin compounds (Figure 31). There is very little data on contamination levels and associated health risks for humans (Okoro *et al.*, 2011). A study on dust samples taken in vacuum bags of 28 apartments in Germany showed the existence of 7.2 mg/kg of organotins with 0.08 mg/kg TBT (Fromme *et al.*, 2005). Analyzes on wine in Canada showed that 29 of 90 samples analyzed (32%) contained traces of organotin (monobutyltin, dibutyltin or tributyltin) at different percentages of 0.08 to 1.44 ng/ml for dibutyltin example (Forsyth *et al.*, 1994).



**Figure 31.** Sources of human exposure to organotin compounds (Hoch, 2001).

Based on work carried out in rodents, a tolerable daily intake (TDI) value of 0.25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  body weight/day was established (Penninks 1993; DGHCP, 2003). Due to the uncertainties of extrapolating toxicity between humans and rats, the kinetics of rat-man extrapolation but also inter-individual differences in toxicity and kinetics, a safety factor of 100 was used for the final calculation of the TDI. This TDI is based on the results as weight reduction power of adult rats with TBT oxide. This TDI value was adopted by WHO (WHO, 1999). Data from the literature on work carried out in 22 countries for which data exists on

the amount of TBT in food that 9 of them, including France, Canada, Italy, Japan, Korea, Poland, Taiwan, Thailand and the United States exceed the residual tolerable or acceptable average residue levels (TARL) (Belfroid *et al.*, 2000). This index is calculated from the TDI. For example, a person who weighs 60 kg, the formula is as follows:

$$\text{TARL} = \frac{(\text{TDI} \times 60 \text{ kg})}{\text{Average daily consumption}}$$

In Norway, the average intake of consumption was 33 ng/kg body weight (bw)/day, and large consumers of contaminated food had an average of 70 ng/kg bw/day. Although these values are lower than the TDI adopted by WHO (WHO, 1999; DGHCP, 2003), but there may be a potential for large consumers and those weighing less like children (Belfroid *et al.*, 2000). Consumption of contaminated seafood in Taiwan was transferred to the general population and fishermen. In general, the concentration of TBT in oysters ranges from 0.32 to 1.51 mg/g dry weight, the values of oysters consumed by the fishermen were 94.1 and 250 g/day for the general population and individuals most exposed respectively as fishermen (Chien *et al.*, 2002). In addition, TBT concentrations were measured in barnacles, mussels and fish along the eastern coast of the Aegean Sea. Mean concentrations of TBT were found to 235 ng/g in fish, and 116 and 635 in mussels and barnacles respectively. The highest concentrations of organotins were observed in barnacles that were sampled in marinas and ports. All mussels had values sampled below the TARL. This indicates an absence of risk to the consumer molds. However, 7 fish samples from the 15 analyzed showed levels of TBT above TARL, which indicates a risk for consumers (Kucuksezgin *et al.*, 2011). TBT levels were monitored in fish commonly consumed in Iran. The samples were purchased from fish markets at seasonal intervals in 2010 along the north coast of Iran. TBT concentrations in the muscle of these fish were of the order of n (undefined) to  $4.31 \pm 0.95$  ng/g (wet weight), which was lower than TARL for this country (Rastkari *et al.*, 2012).

Among the few studies on the effects of TBT on humans, one study showed that TBT may have an inhibitory effect very low concentration on ER in human in the same way that the 4-Hydroxytamoxifen (OHT) or ICI 182,780, which are specific antagonists of ER (Cho *et al.*, 2012). In addition, it has been shown that many cell types undergo apoptosis after treatment with TBT and cell death of immune cells. After 4 hours of treatment with 1  $\mu\text{M}$

TBT, Jurkat T cells show morphological and biochemical changes characteristic of apoptosis (Krug, 2012).

### 3.3.1.7. Tributyltin is an obesogenic molecule.

The incidence and prevalence of overweight and obesity have increased dramatically over the last three decades in almost every country in the world. This is not easy to explain with changes in lifestyle in populations with very different initial patterns. This raises questions about the influence of environmental chemicals in the increased prevalence of obesity.

Obesogens are chemical compounds or pharmaceuticals that directly or indirectly may promote obesity by increasing fat storage in fat cells and/or the number of adipocytes by altering the amount of calories burned at rest, changing the balance of the energy balance and/or modifying mechanisms regulating appetite and satiety. There is evidence of the obesogenic effect of certain chemicals or pharmaceuticals following experiments on cell cultures or animals. Very few data are available for mankind, but a body of evidence suggests that organotins and in particular TBT would be obesogenic for the human species.

TBT, in addition to its toxic effects, shows a very powerful obesogenic effect. This molecule may lead to epigenetic changes that predispose individuals exposed to weight gain and later to obesity (Janesick and Blumberg, 2012). Several researchers have identified the TBT as an obesogenic xenobiotics (Kanayama *et al.*, 2005; Grün and Blumberg, 2009a; Grün *et al.*, 2006a; Janesick and Blumberg, 2012). This molecule induces adipocyte differentiation in cell culture models and increases fat mass *in vivo* in *Xenopus*, mouse (Grün *et al.*, 2006a) but also zebrafish (see Chapter III). TBT has a high affinity at concentrations in the nM range with some NRs such as RXR, the PPAR $\gamma$  (Kanayama *et al.*, 2005; Grün *et al.*, 2006b) and LXRs (Inadera and Shimomura, 2005; Cui *et al.*, 2011) and more specifically the heterodimer RXR/LXR $\alpha$  but not RXR/LXR $\beta$  (Cui *et al.*, 2011). Exposure of *Xenopus* tadpoles at low concentrations of TBT induces an increase in the amount of fat cells (Grün *et al.*, 2006a). In mice, prenatal exposure to TBT during pregnancy resulted in a premature accumulation of fat in adipose tissue at birth and causes an increase in the size of lipid deposits at an age of 10 weeks, although mice exposed had a size slightly smaller than controls (Grün *et al.*, 2006a).

Further experiments aimed at understanding the mechanisms underlying the effects of prenatal exposure to TBT showed that a single treatment with prenatal TBT or a pharmaceutical obesogenic, rosiglitazone (Rosi), may alter the cell fate multipotent mesenchymal stem cells (MSC). These stem cells, under conditions of normal development, can differentiate into a number of cells including bone cells (osteoblasts), cartilage cells (chondrocytes) and fat cells (adipocytes) (Pittenger *et al.*, 1999). MSCs derived from WAT pregnant females treated with a single dose of TBT or Rosi, were predisposed to become adipocytes. MSCs derived from animals treated with obesogens were about twice as likely to differentiate into adipocytes in culture by comparison to control cells, and this frequency was increased thereafter with *in vitro* treatment with TBT or Rosi (Kirchner *et al.*, 2010). The ability of these cells to differentiate into bone cells was consequently inhibited (Kirchner *et al.*, 2010). In these *in vitro* studies it has been shown that the ability of TBT or Rosi to induce adipogenesis from MSC (Kirchner *et al.*, 2010) or 3T3-L1 preadipocytes (Li *et al.*, 2011) was entirely dependent on the activation of the PPAR $\gamma$  and RXR (Kanayama *et al.*, 2005). TBT also shows an obesogenic effect via ER in mice, but it seems to depend on the concentration of TBT (Penza *et al.*, 2011). TBT induced a strong accumulation of lipids in cell cultures, but a PPAR $\gamma$  antagonist fails to inhibit the effect of TBT and it has been concluded that TBT does not pass through PPAR $\gamma$  (Inadera and Shimomura, 2005). This assumption is in contradiction with more recent work on the role of TBT as adipogenesis inducing factor (Kirchner *et al.*, 2010). It should be noted that almost all of these works are done with cell cultures and does not reflect the situation found for adipocyte cells *in vivo*. The aim of the work presented in Chapter III was to clarify the *in vivo* mode of action of TBT on the WAT using the zebrafish model.

## **4. Biological model**

### **4.1. The use of zebrafish as a model system.**

The zebrafish (*Danio rerio*) is a teleost fish of the Cyprinidae family belonging to the order of Osteichthyes includes nearly 6 500 species. It is a tropical freshwater fish native to



the Ganges delta (north-eastern regions of India). Natural habitats of these fish are rice fields, backwaters and small slow rate watercourses. It is part of poikilothermic animals and has an optimum temperature at about 28 ° C. It is an omnivorous fish measuring an average of 4 to 5 cm in adulthood. It is sexually dimorphic in adulthood visible at 3 months (Figure 32). It is easy to rise and very inexpensive. It is an oviparous animal whose females can lay up to a hundred eggs from ovarian cycle lasting about 10 days. Male fish can be differentiated from female fish because the latter have an oviduct papilla at the ano-urogenital level just before the anal fin, as well as their shape and color characteristics. The observation of the morphogenesis *Danio rerio* is facilitated by the development outside of the body females. This allows minimally invasive *in vivo* observations due to the transparency of the embryos/larvae until a relatively late stage of development.

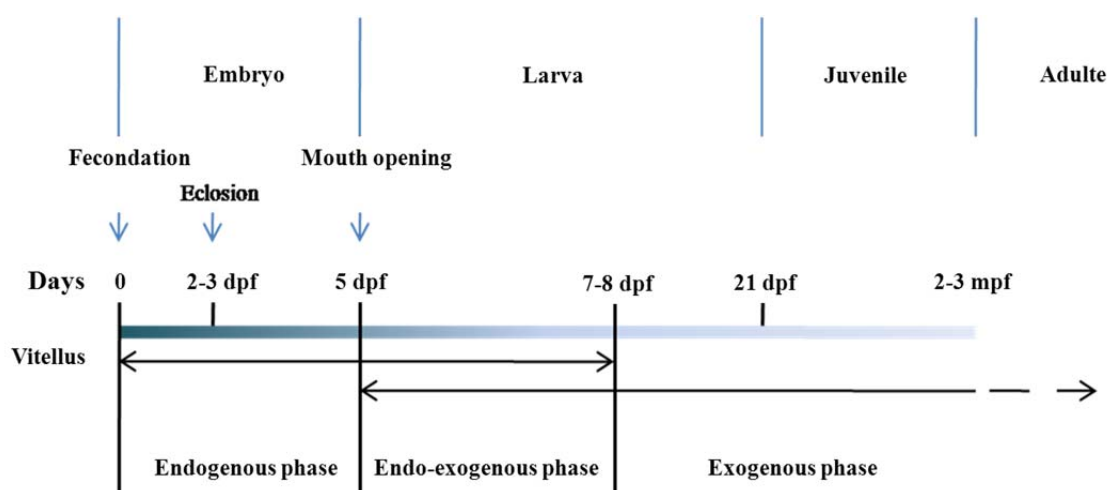


**Figure 32.** Pictures representative of an individual female or male zebrafish (*Danio rerio*).

Teleost fish go through three major nutritional phases during development. These phases are distinguished by the origin of nutrients used (Figure 33). Between fertilization and 4 dpf, this is the phase of endogenous nutrition. The embryo and the larva develop through the reserves contained within the yolk sac. After the opening of the mouth between 4 and 5 dpf, the larvae are able to ingest exogenous food and nutrition mixed phase (or endo-exogenous) is set up in which the larva exhausts its yolk reserves and simultaneously consume a suitable exogenous food. This period ends with the complete absorption of yolk reserves to 7-8 dpf. Subsequently, the strictly period of exogenous nutrition is taking place.

The zebrafish is a model recognized and widely used in molecular genetics of vertebrate development, medical genetics, toxicology and pharmacology (see *e.g.* Jagadeeswaran, 2005; Sullivan and Kim, 2008; Raldúa and Babin, 2009; Fraysse *et al.* , 2006; Berghmans *et al.*, 2008, Jones *et al.*, 2008; Hölttä-Vuori *et al.*, 2010). The popularity of the

zebrafish comes from the many advantages it has over other models such as the mouse or the rat: its small size, a high fecundity, a very short generation time, and also a large number of fish that would be maintained in a reduced space. Plus it is less expensive to maintain than many of the other popular models. All this facilitates are used especially when there is a need for a large-scale screening of molecules. Other benefits of using the model are a fully sequenced genome, a large number of transgenic lines available, a very large community of researchers and a remarkable knowledge of the model (e.g. 17,867 entries in PubMed Nov. 2, 2012).

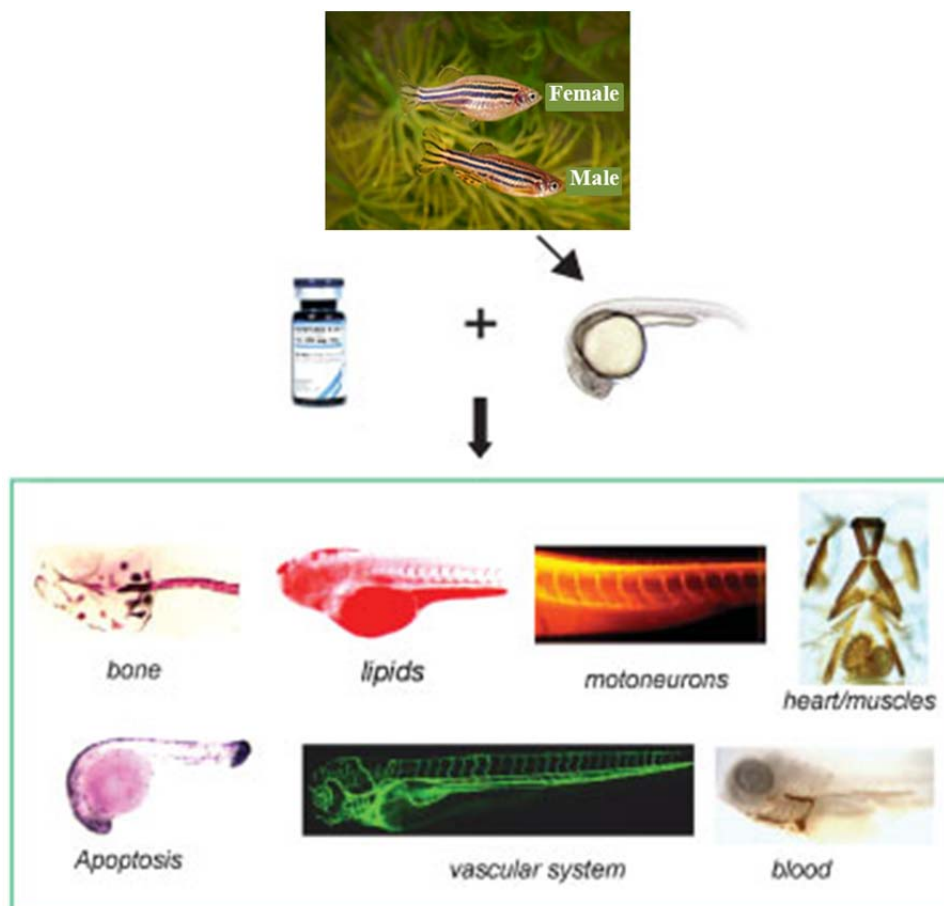


**Figure 33.** Nutritional phases during zebrafish development.

In pharmacology, experiments have shown that cardiovascular drugs, anti-angiogenic and anti-cancer treatments on zebrafish embryos have responses comparable to those in mammals (Langheinrich, 2003). All data indicate that the zebrafish is a useful organism for different types of pharmacological studies (Figure 34), such as screening of chemical libraries, guide the validation and optimization studies, modes of action molecules, analysis of gene expression, predictive toxicology and teratogenicity, pharmacogenomics and toxicogenomics (Langheinrich, 2003). This model has several advantages for pharmacological studies compared to studies on *in vitro* cell cultures and *in vivo* in rodents.

The zebrafish is recommended in regulatory aquatic ecotoxicity tests. In addition, this model is recognized in the context of endocrine disruption (Segner, 2009). In fact, it is used both for screening endocrine active substances but also for the identification of their effects

and the study of their mechanisms of action at different levels of biological organization (Segner, 2009). Among these studies, the work of D. Raldúa and his collaborators on the disruption of the functioning of the thyroid gland in the embryo and larval by synthetic or natural origin chemical molecules should be noted (Raldúa and Babin, 2009; Thienpont *et al.*, 2011; Raldúa *et al.*, 2012).



**Figure 34.** Diagram showing some possible pharmacological tests using zebrafish as a model (after Langheinrich, 2003).

## 4.2. Lipid metabolism and adipocyte lineage ontogeny in zebrafish.

The zebrafish is a very relevant model for studying lipid metabolism in vertebrates during development and in the adult because of the experimental facilities attached to the model and a lipid metabolism similar to that of mammals (see *e.g.* Babin and Vernier, 1989;

Babin *et al.*, 1997, André *et al.*, 2000, Farber *et al.*, 2001; Marza *et al.*, 2005; Morais *et al.*, 2007; Raldúa and Babin, 2007; Babin and Gibbons, 2009 Flynn III *et al.*, 2009; Oka *et al.*, 2010; Hölttä-Vuori *et al.*, 2010; Tingaud-Sequeira *et al.*, 2011; Tingaud-Sequeira *et al.* 2012). Obesity induced by food can be obtained with this model (Oka *et al.*, 2010; Song and Cone, 2007). Most of the key genes of lipid metabolism have been characterized in zebrafish, including NRs. In addition, response to inhibitors of lipid metabolic pathways generally is similar to that obtained in mammals.

The global obesity epidemic requires a better understanding of developmental and environmental factors that affect lipid storage in adipocytes. Transparency of the zebrafish to a relatively advanced stage of development allows us to study the mechanisms and factors involved in the establishment of the adipocyte lineage and its modulation.

Recent work has allowed visualizing adipocytes *in vivo* in the zebrafish with Nile Red vital staining (Flynn III *et al.*, 2009; Tingaud-Sequeira *et al.* 2011). TAG present in the adipocyte lipid droplets are colored and visualized and quantified with a fluorescence microscope. These studies have shown that visceral adipocytes are first and appear during the larval period around the swim bladder and increase in number and distribution with larval growth (Flynn III *et al.*, 2009). Adipocyte differentiation is dependent on the growth of the animal and is not correlated with age (Imrie and Sadler, 2010). Structure WAT in zebrafish is similar to that found in mammals (Figure 4) (Flynn III *et al.*, 2009; Tingaud-Sequeira *et al.* 2012). The expression of PPAR $\gamma$  is an indicator of the development of adipocytes during development (Flynn III *et al.*, 2009). Many works in mammals have shown that this gene has a key role in the development of WAT and could be a prime target for therapeutic treatment (Farmer, 2005; Tontonoz and Spiegelman, 2008).

## **5. Scientific background and objectives of the thesis**

Diet and certain xenobiotics can alter endocrine signaling and lipid homeostasis, which may in some situations cause excessive deposition of fat reserves in the WAT. Detailed understanding of hormonal and lipid metabolisms underlying lipid homeostasis has made considerable progress in recent decades. This was achieved in particular by a characterization

of molecular players involved and the use of cellular and animal models such as rodents. However, the use of these models faces two main difficulties. Cellular models cannot account for complex *in vivo* cellular and metabolic interactions and maintenance and differentiation of adipocytes in cell culture require the use of cocktails of hormonal and growth factors which may not correspond to the actual situation observed by cells *in vivo*. In addition, the development *in utero* of rodent does not facilitate investigations on how the implementation of the adipocyte lineage occurs during development and how it is modulated by endogenous and exogenous factors. For two main reasons, there is necessity to have access to an animal model that would easily study *in vivo* the development of the adipocyte lineage and its qualitative and quantitative modulation.

In this context, my thesis consisted in a first time period to perform work on the characterization of the establishment of the adipocyte lineage during zebrafish development. These results are not shown in the context of this thesis manuscript. This area of research is the subject of a competition between several research teams. Following the publication of the work of the team of J. Rawls (Flynn III *et al.*, 2009) and that of KC Sadler (Imrie and Sadler, 2010), we decided to proceed to the second stage of the work program, *i.e.* to study the effects of exogenous factors on the *in vivo* modulation of adipocyte physiology and WAT deposition and mobilization.

The main objectives of the work have been:

- To develop a simple and rapid method, by using the zebrafish model to study *in vivo* the effects of diet, pharmacological molecules or certain environmental pollutants on the dynamics of WAT. We have developed the "zebrafish obesogenic (ZO) test" in defining a more rigorous way possible an experimental protocol which takes into account the critical parameters to consider for such a test. This work is presented in Chapter II and has been published in the *Journal of Lipid Research* in 2011 (Tingaud-Sequeira, Ouadah, Babin, 2011).
- To study the effects of certain molecules, already identified as potential obesogen or anti-obesogen in mammals or whether not characterized for such potential, on zebrafish

adiposity. We used the ZO test to perform a screening of these molecules. The results for some of these molecules are presented in Chapters II to IV.

- To analyze the effect of interactions between molecules and the effect of nutritional conditions. The results for some of the molecules studied are presented in Chapters II to IV.
- To study and characterize the *in vivo* mode of action of one obesogen, the TBT, in order to clarify the signaling pathway used in the adipocyte. The results are presented in Chapter III and are subject to a manuscript that will be submitted for publication (Ouadah-Boussouf and Babin, 2012).

All work performed and results obtained allow proposing the zebrafish as an *in vivo* model highly relevant to study the effects of food composition, chemical and pharmacological molecules, including EDC, on WAT dynamics.

***CHAPTER II:***

***ZEBRAFISH OBESOGENIC TEST:  
A TOOL FOR SCREENING  
MOLECULES THAT TARGET  
ADIPOSITY***

# Zebrafish obesogenic test: a tool for screening molecules that target adiposity

Angèle Tingaud-Sequeira, Nafia Ouadah, and Patrick J. Babin<sup>1</sup>

Maladies Rares: Génétique et Métabolisme (MRGM), University Bordeaux, F-33400 Talence, France

**Abstract** Dietary and xenobiotic compounds may alter endocrine signaling and lipid homeostasis, thus inducing obesity. We describe a short-term assay method, the zebrafish obesogenic (ZO) test, for examining the effects of diet, drugs, and environmental contaminants, singly or in combination, on white adipose tissue (WAT) dynamics in live larvae. The ZO test is an intermediate step in obesity research, between *in vitro* and rodent assays, and may be also used to study the effect of environmental toxicants on the adiposity of aquatic species. The procedure, using Nile Red (NR) fluorescent probe to reveal adipocyte lipid droplets, is suitable for pharmaceutical or toxicological screening. Larvae treated at an environmentally-relevant concentration of tributyltin chloride (TBT), an environmental obesogen, exhibited a remarkable increase in adiposity, irrespective of the lipid composition of the background diet. Exogenous compounds, e.g., rosiglitazone or TBT, known to increase adiposity in the fasting state, were classified as obesogenic. Anti-obesogenic compounds favored a decrease in adiposity in the fasting state. The ZO test, using adipocyte lipid droplet size and adiposity as its endpoints, is a whole-organism alternative testing assay for obesogenic and anti-obesogenic compounds and mixtures and provides relevant information for environmental and human risk assessments.—Tingaud-Sequeira, A., N. Ouadah, and P. J. Babin. **Zebrafish obesogenic test: a tool for screening molecules that target adiposity.** *J. Lipid Res.* 2011. 52: 1765–1772.

**Supplementary key words** obesity • adipose tissue • tributyltin • endocrine disrupting chemicals • Nile Red • adipocyte • lipid droplet • organotins • human risk assessment

Obesity is the result of interplay between genetic and environmental factors and is characterized by excess fat storage in white adipocytes. Due to the increasing prevalence of obesity all over the world, research into this issue has become one of the main public health priorities. Food quality and quantity is probably the main cause of obesity; however, increasing evidence for environmental factors

has recently been revealed, such as exposure to endocrine disrupting chemicals (EDC) during early life (1, 2). Obesogens are a special class of EDCs that target adipose tissue formation and the lipid metabolism (2).

Overweight and obesity are characterized by overrepresentation of white adipose tissue (WAT). Several studies have investigated xenobiotic molecules able to modulate adipogenesis and the adipocyte lipid metabolism. Some obesity-causing chemicals are hypothesized to act as peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) agonists or estrogen receptor- $\alpha$  antagonists (2). In addition to rodent assays, most of these studies used cell models and focused mainly on adipocyte differentiation (3). The *Caenorhabditis elegans* nematode was recently used as a whole organism to screen for molecules able to regulate fat storage (4). However, one limitation of this nonvertebrate model is that the major fat storage compartment is the intestine. Evidence supporting the action mechanism of obesity-causing chemicals is under active investigation, but there is not, as yet, any convenient *in vivo* method for screening the obesogenic and anti-obesogenic molecules that target vertebrate WAT.

Zebrafish, a model organism of vertebrate development and organogenesis, is receiving increasing attention as a model for human diseases, drug discovery, and toxicology studies. Thus, zebrafish are increasingly used in drug-screening assays as an intermediate step after cell-based evaluation to prioritize drug candidates for conventional animal testing, thus reducing the number and cost of mammalian studies (5). Semitransparent zebrafish larvae offer a unique opportunity to study the effects of molecules on adipocyte biology and whole-organism adiposity in live vertebrates, as data on WAT development are now available for this species (6, 7). WAT is not found in embryos and early larvae (6, 7), although these stages are sensitive to fat metabolism effectors (8). An obesity syndrome

*This work was supported by Conseil Régional d'Aquitaine (CRA) Project 200881301031/TOD (P.J.B.) and postdoctoral fellowship (A.T.S.); by French Ministry of Research and Education predoctoral fellowship (N.O.); and by Université Bordeaux 1 BQR 2009 (P.J.B.).*

*Manuscript received 11 May 2011 and in revised form 30 June 2011.*

*Published, JLR Papers in Press, July 1, 2011  
DOI 10.1194/jlr.D017012*

Abbreviations: API, average pixel intensity; EDC, endocrine disrupting chemical; HFD, high-fat diet; NR, Nile Red; PPAR $\gamma$ , peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ ; SD, standard diet; SL, standard length; TBT, tributyltin chloride; WAT, white adipose tissue; ZO, zebrafish obesogenic.

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed.  
e-mail: p.babin@gpp.u-bordeaux1.fr



may be induced at adult stages by genetic and dietary factors (9, 10).

We describe a simple, rapid zebrafish larva bioassay, the zebrafish obesogenic (ZO) test, for in vivo assessment of the potential impact of diet composition, chemical pollutants, and drugs on white adipocyte lipid droplet size and adiposity.

## METHODS

### Animals

All zebrafish experiments were conducted in conformity with the Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals using protocols approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Université Bordeaux 1 (UFR Biologie). Wild-type adult zebrafish (*Danio rerio*) were initially purchased from a commercial source (Exomarc, Lormont, France). In some cases, the transparent *casper* line was used (11). Embryos and larvae were obtained by natural mating and raised in embryo water (90 µg/ml Instant Ocean [Aquarium Systems, Sarrebourg, France], 0.58 mM CaSO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O, dissolved in reverse-osmosis purified water) at 28.5°C with an 11L:13D photoperiod. Animal stages were recorded according to standard length (SL), i.e., the distance from the rostral tip of the larva to the base of the caudal fin. From five days postfertilization until they were used in the ZO test, larvae were maintained in static 5 l tanks at a density of around 30 larvae per liter and fed ad libitum with a commercial formulated food adapted for zebrafish larvae (ZF Biolabs, Tres Cantos, Spain).

### Chemicals and larva treatment

Rosiglitazone (71740) and T0070907 (10026) were purchased from SPI-BIO (Montigny le Bretonneux, France). Phenylephrine (P6126) and tributyltin chloride (TBT) (T50202) were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). 1000× stock solutions of 1 mM rosiglitazone, 10 mM T0070907, and 0.05 mM TBT were prepared in DMSO on the day of the experiment. A 20 mM stock solution of phenylephrine was prepared in purified water. The three-day animal treatment protocol included adiposity recordings before and after chemical treatment (Fig. 1). Larvae with an SL between 7.5 and 9 mm were selected for enrollment in the ZO test and incubated individually in glass containers containing 25 ml water. There was no significant variation in SL during the three-day experimental period. The first day of the protocol was devoted to ad libitum feeding with a standard diet (SD) for late larvae (TetraMin Baby, Tetra GmbH, Melle, Germany) or hard-boiled chicken egg yolk as a high-fat diet (HFD), with food remaining inside the container at the end of the period. It was not

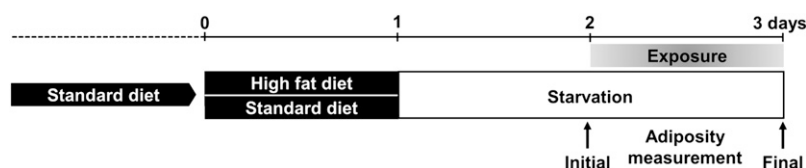
possible to detect differences in feeding rates between SD and HFD fish, and large amounts of food were detectable in the lumen of the intestine under the microscope, irrespective of the nutrient used. Total fat content by weight of SD and HFD was 10% and 55%, respectively. The starvation period started on the second day and initial adiposity was measured at the end of the second day using Nile Red (NR) staining and fluorescence microscopy or triacylglycerol content (see below). Each group of animals consisted of 10 larvae of similar size and initial adiposity. They were incubated individually in glass containers containing 25 ml medium and remained in the fasting state under static conditions during exposure to selected compounds or vehicle alone (0.1% DMSO) for one additional day. No mortality was observed at the concentrations used in either control or 24 h exposed animals. Final adiposity in exposed and control animals was recorded after 24 h using NR staining and fluorescence microscopy. Apart from changes in adiposity levels, there was no apparent qualitative behavioral or morphological phenotype associated with these dietary and pharmacological treatments.

### Nile Red staining

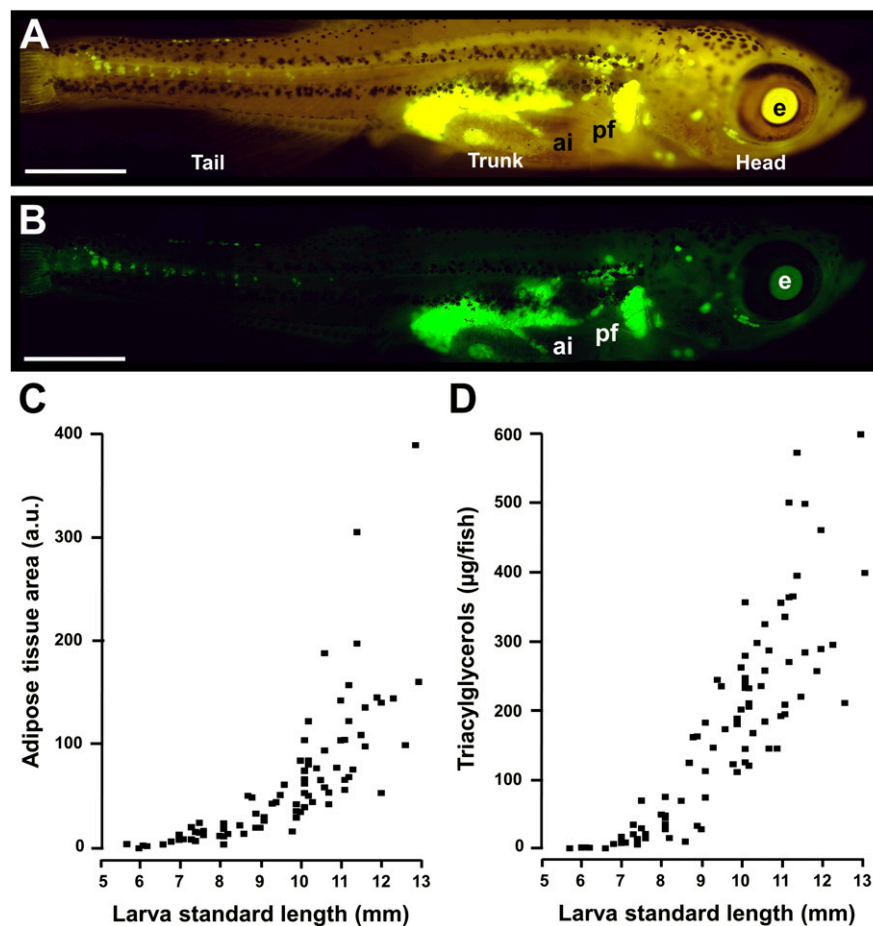
A 500 µg/ml stock NR (N3013) (Sigma-Aldrich) solution was prepared in acetone. Just before use, the working solution was obtained by 1/100 dilution of the stock solution in fish water. Live fish were then exposed to NR working solution in the dark for 30 min at 28°C. Under these conditions, adipocyte NR staining was saturated, as the intensity of the fluorescent signal did not increase after longer exposure. The fish were then rinsed twice with fish water for 5 min, anesthetized in 2-phenoxyethanol (P1126) (Sigma-Aldrich) diluted 1/2000 in fish water for 5 min, and observed under a fluorescence microscope. NR staining was performed twice, once before the one-day exposure period, to measure initial adiposity, and again afterwards, to measure final adiposity. The initial staining dissipated to background levels before the second staining (data not shown).

### Quantitative analysis of whole-mount fluorescence signals

Image acquisition quality is a critical point for further analyses, and the presence of food inside the intestinal lumen may interfere by quenching signals from NR-labeled perivisceral WAT. As 24 h starvation is sufficient to empty the zebrafish larva digestive tract, all fish processed for image analyses were starved for that period prior to NR staining. Differential interference contrast and fluorescence images were obtained on anesthetized larvae using a Nikon Eclipse E1000 (Nikon, Champigny sur Marne, France) microscope fitted with Nomarski optics and a Nikon Intensilight C-HGFI unit. Larvae were imaged in water and returned to the medium within approximately 1.5 min. A TRITC filter (EX 540/25, BA 605/55) was used for differential interference contrast and fluorescence image superposition (Fig. 2A)



**Fig. 1.** Diagram of the ZO test protocol used to prepare larva exposure and measure adiposity. Zebrafish larvae were nourished with SD during their growth and then divided into two groups. The first one received SD for one day and the second HFD for one day. This was followed by a one-day starvation for both groups. Larvae were then exposed to the selected compounds or to vehicle alone for one additional day in a fasting state. Whole-body adiposity was measured, using Nile Red staining and fluorescence signal quantification, before and after exposure to the compounds. Evaluations were carried out on control animals at the same times.



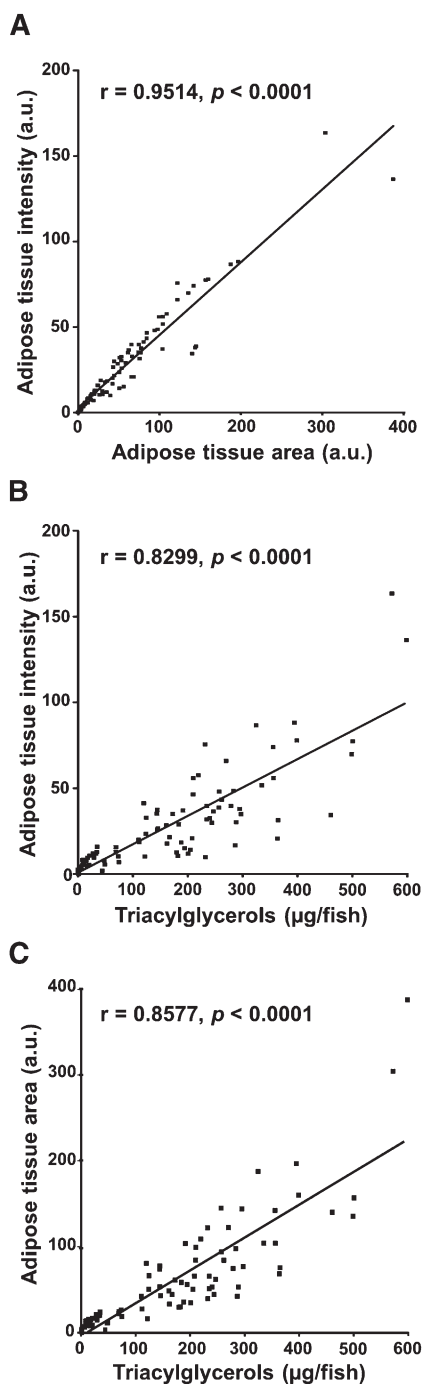
**Fig. 2.** In vivo quantitative assessment of WAT in zebrafish larvae. A: Lateral view under a fluorescence microscope after NR staining, using a TRITC filter. Anterior part to the right and dorsal part to the top. SL of the larva was 8.2 mm. B: Lateral view of the same animal under an HQ-FITC-BP filter with adipocytes stained green. C: Relationship between WAT fluorescence area after NR staining and larva SL. D: Relationship between triacylglycerol content per larva and larva SL. A total of 88 larvae were selected, with a broad distribution of SL, from 5 to 13 mm. Larvae, on a SD background, were starved for one day before sampling. Scale bar, 1 mm. ai, anterior intestine; e, eye; pf, pectoral fin.

and an HQ-FITC-BP filter (Ex 460-500, BA 510-560) for fluorescence quantification (Fig. 2B). Images were acquired with a Nikon DXM1200 camera and LUCIA G software (version 4.81) and saved in high-resolution (3,840 × 3,005 pixels) tagged image file format (TIFF). All image series for quantification were obtained at the same settings. Quantitative analysis of NR fluorescence signals was performed using free-processing ImageJ software (National Institutes of Health, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), according to the protocol previously described (12). Three images (head, trunk, and tail) were recorded per larva at the magnification used. The images were combined to produce an overall view of the larva for fluorescence quantitation (Fig. 2B). Background fluorescence was estimated by analyzing average pixel intensity (API) values in image areas that did not contain any WAT, i.e., the background threshold, and this background was calculated individually for each image. To calculate the background levels, the images were first converted to 8-bit grayscale, inverted, and thresholded. WAT and individual adipocytes were then selected using the “wand tool” function of the computer program. Selected areas were transferred to the original three-channel image (red, green, and blue), the inverse selection was created, and the API for the background was calculated. This background threshold was then removed by subtracting the background API from each pixel in the image. Selected WAT areas,

including individual adipocytes, were transferred to the subtracted image, and finally, the API of the selected areas was calculated (see ref. 12 for more details). Signal area and intensity were measured and expressed in arbitrary units. FocalCheck™ fluorescence microscope test slide 1 (Invitrogen) was used to evaluate microscope excitation-source stability by plotting the area and signal intensity of the beads over time. Periodic imaging of microbeads using the same acquisition parameters did not reveal any differences ( $P > 0.05$ ) over at least a two-day period, demonstrating the stability of the excitation source (ref. 12, data not shown). The analytical precision of the quantification method was determined from blind duplicate pairs of NR fluorescence signal areas and was defined as the mean absolute difference between duplicates divided by the mean of the duplicates times 100. The precision value was 0.49%.

#### Triacylglycerol assay

The area and intensity of NR fluorescence signals were recorded for each larva and were then processed to assay the whole-body triacylglycerol content using a previously described protocol (13) with modifications. Animals were starved for 24 h before NR staining and euthanasia to avoid any contamination from food triacylglycerols in the digestive tract. Glass tubes were used throughout triacylglycerol extraction. Briefly, whole animals



**Fig. 3.** Relationship between WAT fluorescence intensity and area after NR staining and triacylglycerol content per larva. A total of 88 larvae were selected, with a broad distribution of SL, from 5 to 13 mm. Larvae, on a SD background, were starved for one day before sampling. Adipose tissue intensity and area values were expressed in arbitrary units (a.u.). A: Relationship between adipose tissue fluorescence intensity and area after NR staining of live zebrafish larvae. B: Triacylglycerol content per larva was plotted against WAT fluorescence intensity. C: Triacylglycerol content per larva was plotted against WAT area values. The slopes of the calculated linear regressions were significantly different from zero at  $P < 0.0001$ , and the variables were significantly correlated, with nonparametric Spearman correlation ( $P$ , two-tailed) as shown on the graph.

were homogenized mechanically in 400  $\mu$ l homogenizing buffer (PBS, pH 7.4, containing 10 mM EDTA). Homogenates were transferred to tubes containing 2 ml isopropanol:hexane (4:1) solution. After shaking, samples were left in the dark for 30 min. Hexane:diethylether (500  $\mu$ l,1:1) solution was then added. Samples were mixed and left in the dark for 10 min. One milliliter water was then added, samples were mixed and left standing until the two phases separated (20 to 30 min). Eight hundred microliters of the supernatant were transferred to new tubes and processed until complete evaporation. Two hundred and fifty microliters of colorimetric reagent were added per tube, and the triacylglycerol content was evaluated by microassay, using a commercially available kit (Biolabo S.A., Maizy, France). In parallel, a standard curve was plotted using 0, 10, 20, 30, 40, and 50  $\mu$ g triolein in 400  $\mu$ l homogenizing buffer. Added triolein was extracted, processed, and treated identically to the other samples. The reaction was allowed to develop at 37°C for 1.5 h, with shaking at 220 rpm. Only samples within the standard curve were taken into account for data analysis.

### Statistics

All statistical analyses were conducted using SPSS 17.0 micro-computer software (SPSS, Chicago, IL). At least three independent experiments were performed per condition with 10 larvae per group. To offset the variability among independent experiments in terms of the decrease in adiposity in control groups after a one-day starvation period and to have a view of negative or positive quantitative variations from initial adiposities, values presented in graphs are mean  $\pm$  SEM of representative experiments. This procedure did not preclude highly reproducible absolute differences in adiposity between control and chemically treated groups in independent similar experiments. Normality of the distribution was assessed using the Shapiro-Wilk test (0.01% risk). Levene's test was used to verify the equality of variances. In experiments comparing a control and a chemically treated group with animals that received the same background diet, the statistical significance of difference in mean values was determined by Student's  $t$ -test. In experiments combining PPAR $\gamma$  agonist and antagonist and their controls, the statistical significance was determined by single-factor ANOVA followed by the post hoc Dunnett's test. A  $P$  value of 0.05 or less was considered significant. In the experiment combining rosiglitazone or TBT treatment with HFD, we used the univariate general linear model to check the individual effect of each factor and to determine whether there was any interaction between factors.

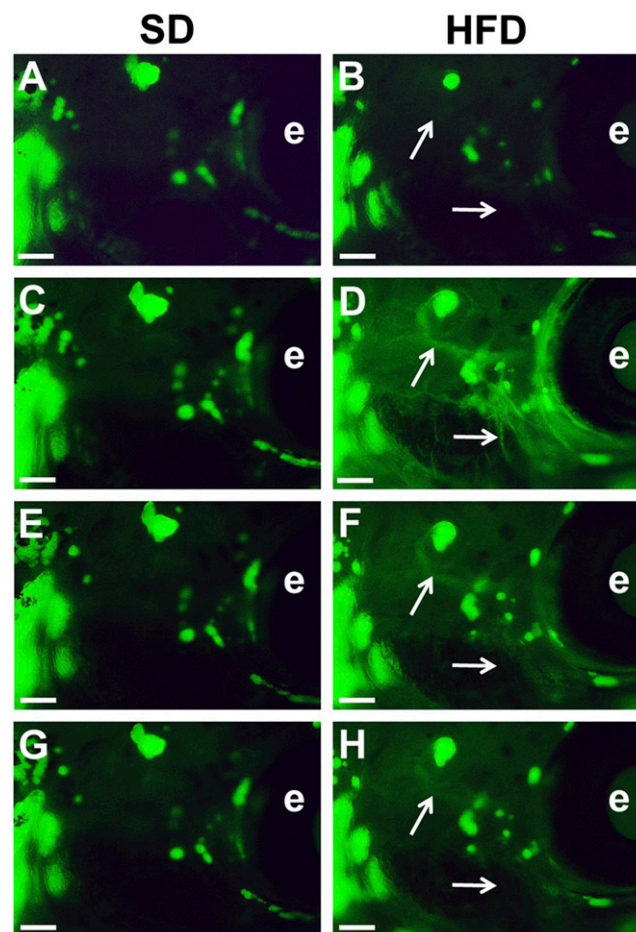
## RESULTS AND DISCUSSION

The first step was to perform *in vivo* staining of zebrafish adipocytes with vital NR using a rigorous feeding protocol (Fig. 1). As previously described, NR was found to be a selective fluorescent vital dye for adipocyte intracellular lipid droplets (6, 14). Relationships between WAT fluorescence area and SL and between triacylglycerol content and SL were established (Fig. 2C, D). The adipose tissue signal area was strongly correlated with intensity in larvae with an SL of 5 to 13 mm (Fig. 3A). There was also a very good correlation between whole-mount NR fluorescence adipose tissue signal intensity and area and whole-larva triacylglycerol content (Fig. 3B, C). During postembryonic zebrafish development, WAT appearance is correlated with size rather than age (7). We found that larvae suitable to the ZO test had to have an SL between 7.5 and 9 mm to

obtain an adipose tissue fluorescence area ranging from 10 to 60 arbitrary units after NR staining. These values were within the linear range between adipose tissue fluorescent area and triacylglycerol content of individual larvae (Fig. 3C). In this SL range, the main anatomic locations of WAT were established (Fig. 2B). The main perivisceral WAT mass spreads from the anterior dorsal limits of the general/visceral cavity to the rectum, above and around the two swim bladder chambers, closely associated with the first loop of the anterior intestine, as well as the posterior intestine, close to the rectum. Other main locations are at the base of the pectoral fins, surrounding the eyes (individual adipocytes or clusters), and in the dermis of the tail.

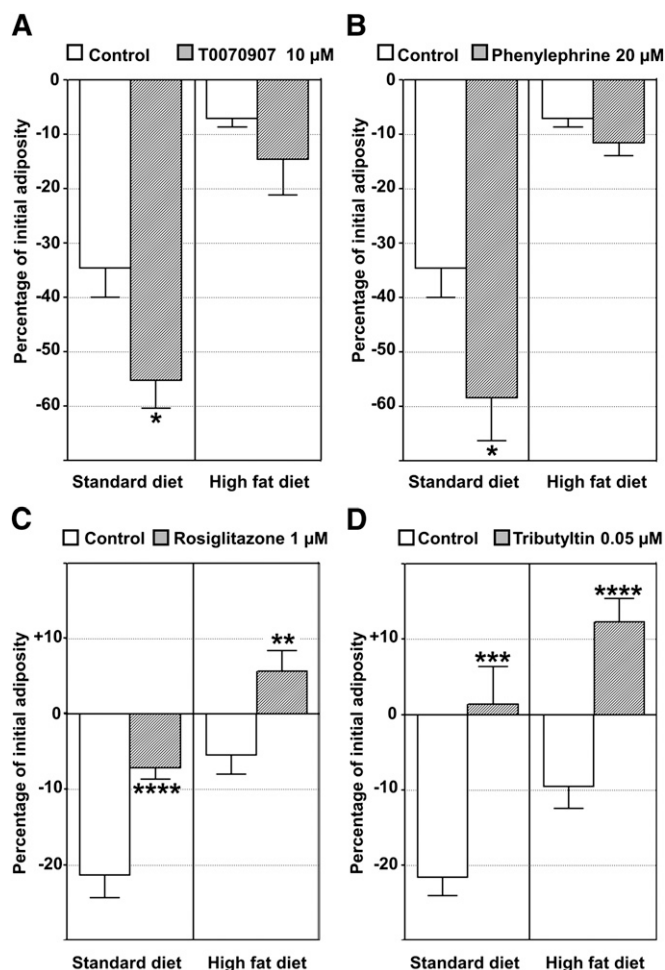
We then investigated the effect of starvation and initial diet lipid content on the adiposity of live animals. Under the experimental conditions used, individual adipocytes were easily identified under the microscope, and their size was rapidly sensitive to the conditions applied. Zebrafish larvae were fed SD or HFD for one day, starved for one day, and then exposed or not to the chemicals for one additional day in starved condition (Fig. 1). HFD induced an increase in NR lipid staining in the blood vessels of the larvae after feeding (Fig. 4D), which gradually returned to basal levels during fasting (Fig. 4B, F, H). These variations in NR staining in the circulatory system were not observed in SD larvae (Fig. 4A, C, E, G). A one-day starvation in the presence of 0.1% DMSO as a vehicle control induced a decrease in whole-body adiposity, as evaluated by NR fluorescent staining ( $-19.77 \pm 1.87\%$  in SD versus  $-11.83 \pm 0.93\%$  in HFD background,  $P < 0.005$ ,  $n = 10$  independent experiments analyzed).

Given these findings, the ZO test was used to study WAT dynamics after exposure to pharmaceuticals and environmental pollutants in interaction with the initial diet lipid content. Food intake ability and/or nutrient absorption at the intestinal level may be altered during exposure to exogenous molecules. In addition, the presence of food inside the intestinal lumen may interfere by quenching signals from NR-labeled perivisceral WAT. We found that starting starvation one day before exposure to compounds and extending it throughout the exposure period avoided any interference by these confounding factors, thus focusing on the exogenous compound's effect on adiposity regulation. However, it was still possible to study the interaction between the initial diet composition and the chemicals used, as nutritional history has proved to be a significant factor in the effects of these molecules (see below). The following compounds were selected: *i*) T0070907 used as a PPAR $\gamma$  antagonist (15, 16), *ii*) phenylephrine used as an  $\alpha$ 1-adrenergic receptor agonist capable of eliciting an increase in lipolytic activity of human WAT (17), *iii*) rosiglitazone as a member of the thiazolidinedione family used for type II diabetes treatment and a well-known potent PPAR $\gamma$  agonist (16), and *iv*) TBT, a biocide found in antifouling paints capable of binding to PPAR $\gamma$  but also to its heterodimeric partner retinoid X receptor (18, 19). The whole-body adiposity dynamics of each larva were expressed as percentage decrease or increase in NR fluorescence signal



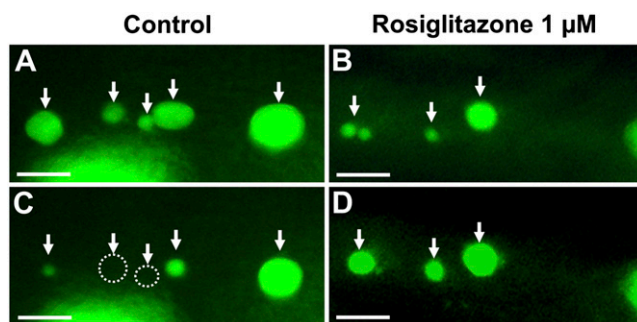
**Fig. 4.** The effect of lipid content of the diet on Nile Red fluorescent signal in the circulatory system of live larvae. Lateral view under a fluorescence microscope after NR staining. Anterior part to the right and dorsal part to the top. Images of the head region of representative larvae enrolled in ZO test represent animals initially nourished for one day on SD (A, C, E, G) or HFD (B, D, F, H) diet. A, B: Before feeding. C, D: At the end of the one-day feeding period (day 1). E, F: At the end of the one-day fast (day 2). G, H: After two days of fasting (day 3). See Fig. 1 for details of ZO test diagram. Initial SL of the larva was 8.9 mm in (A) and 8.8 mm in (B). Adipocytes are stained green, and the positions of selected blood vessels that may be labeled on HFD are indicated by white arrows. Scale bar, 200  $\mu$ m. e, eye.

areas after the one-day exposure period. The results of representative experiments are depicted in Fig. 5. Exposure to T0070907 (Fig. 5A) and phenylephrine (Fig. 5B) caused a decrease in adiposity compared with controls on an SD nutrient background. These exogenous compounds favored a decrease in adiposity in the fasting state and were classified as anti-obesogenic. In SD fish, rosiglitazone demonstrated the ability to prevent adiposity loss in the unfed condition (Fig. 5C). Adiposity even increased after this treatment on an HFD background (Fig. 5C). Compared with controls, Rosiglitazone-treated larvae had  $16.09\% \pm 2.17$  more adiposity than controls on an HFD background ( $n = 5$  independent experiments). In addition, the ZO test made it possible to monitor individual adipocytes in vivo at higher magnification (Fig. 6). As in other vertebrates, zebrafish-differentiated adipocytes were unilocular (6, 7).



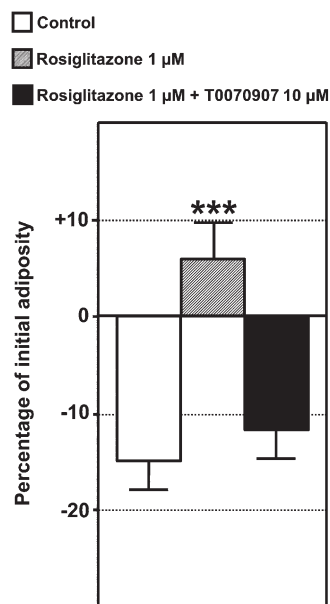
**Fig. 5.** ZO test as a tool for screening molecules and nutritional factors that target adiposity in living zebrafish. A, B: Molecules with a lipogenic (anti-obesogenic) effect. C, D: Molecules with an adipogenic (obesogenic) effect. Quantitative analysis was performed by recording the image area of NR fluorescence signals. WAT dynamics is expressed as a percentage of initial adiposity value. Representative experiments are presented. Quantification was assayed in the presence of 0.1% DMSO as a vehicle control or 0.1% DMSO plus the molecule to be tested at the indicated concentration on a SD or HFD background. T0070907 (A) and phenylephrine (B) exposure induced a decrease in adiposity compared with control groups on SD, whereas no significant difference was found on HFD. Rosiglitazone exposure induced a smaller decrease in adiposity compared with controls on an SD background, whereas an increase in adiposity was observed on an HFD background (C). TBT induced an increase in adiposity, irrespective of the lipid content of the diet (D). Rosiglitazone-induced adipogenesis was additive to the effect of a high-fat diet (C). TBT, an environmental contaminant, also had an additive effect and was strongly obesogen at this environmentally relevant level (D). Values are mean  $\pm$  SEM,  $n = 10$  animals per group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.005$ , \*\*\*\* $P < 0.0005$  by comparison of means using the same background diet.

Whereas control larvae exhibited a decrease or disappearance of NR-stained lipid droplets (Fig. 6A, C), rosiglitazone induced an increase in droplet size (Fig. 6B, D). The effect of rosiglitazone was completely abolished by PPAR $\gamma$  antagonist T0070907, indicating that rosiglitazone had a specific effect on adipocyte hypertrophy (Fig. 7).

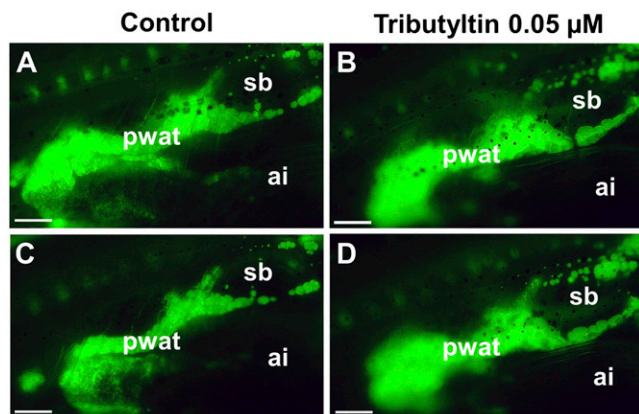


**Fig. 6.** In vivo adipocyte lipid droplet dynamics using the ZO test. Representative clusters of individual adipocytes from live unfed larvae were selected after NR staining, and images were recorded from the same animal before (A, B) and after (C, D) a 24-h exposure to the compounds. Adipocytes are stained green. C: Control larva recorded in (A) (SL = 8.9 mm) exposed to 0.1% DMSO, used as a vehicle control. D: Rosiglitazone-treated larva recorded in (B) (SL = 8 mm) exposed to 0.1% DMSO plus 1  $\mu$ M rosiglitazone. Transparent casper line was used to avoid any pigmented cell optical artifact at the magnification used. Whole-body variations in initial versus final adiposity of the two selected animals were -5.6% and +5.6% in control and rosiglitazone-treated animals, respectively. Scale bar, 150  $\mu$ m.

TBT is a recognized environmental obesogen (19–21). Larvae treated at an environmentally relevant concentration (22–24) exhibited a remarkable increase in adiposity, irrespective of the lipid composition of the background



**Fig. 7.** ZO test as a tool for studying molecular mechanisms underlying adiposity dynamics in living zebrafish. Quantitative analysis was performed by recording the image area of NR fluorescence signals. WAT dynamics is expressed as a percentage of initial adiposity value. A representative experiment is presented. Quantification was assayed in the presence of 0.1% DMSO as a vehicle control or 0.1% DMSO plus rosiglitazone 1  $\mu$ M or 0.1% DMSO plus rosiglitazone 1  $\mu$ M and T0070907 10  $\mu$ M on an HFD background. Rosiglitazone-induced adipogenesis was abolished by PPAR $\gamma$  antagonist T0070907, indicating that rosiglitazone had a specific effect on adipocyte hypertrophy. Values are mean  $\pm$  SEM,  $n = 10$  animals per group. \*\*\* $P < 0.001$  by comparison with control group using ANOVA and Dunnett's test.



**Fig. 8.** In vivo adiposity dynamics under the effect of TBT using the ZO test. Representative perivisceral WAT from live unfed larvae were selected after NR staining and images were recorded before (A, B) and after (C, D) a 24-h exposure or not to the compounds. Lateral view and anterior part to the right and dorsal part to the top. Larvae on an HFD background were starved for 24 h before initial adiposity recording (see Fig. 1 for details of ZO test diagram). C: Control larva recorded in (A) (SL = 8.2 mm) exposed to 0.1% DMSO, used as a vehicle control. D: TBT-treated larva recorded in (B) (SL = 8.1 mm) exposed to 0.1% DMSO plus 0.05  $\mu\text{M}$  TBT. Adipocytes are stained green. Perivisceral and whole-body variations in initial versus final adiposity of the two selected animals was  $-23\%$  and  $-19.14\%$  in control and  $+12\%$  and  $+12.81\%$  in TBT-treated animals, respectively. Scale bar, 500  $\mu\text{m}$ . ai, anterior intestine; pwat, perivisceral white adipose tissue; sb, swim bladder.

diet (Fig. 5D and Fig. 8). Compared with controls, TBT-treated larvae had  $15.75\% \pm 2.45\%$  more adiposity than controls on an HFD background ( $n = 5$  independent experiments). Statistical analysis using a univariate general linear model of the effect of factors, rosiglitazone or TBT treatment, combined with HFD, indicated that each of these two factors had a significant effect ( $P < 0.0001$ ). However, there was no interaction between the chemical and diet factors that resulted in an additive effect. The observed effect of TBT was limited to WAT, as no significant NR signal was found in the circulatory system, intestines (Fig. 8), or other anatomic locations (e.g., liver and gall bladder; data not shown). There is currently evidence to suggest that prenatal exposure to TBT or rosiglitazone activates the PPAR $\gamma$ , a key adipogenesis regulator (16), thereby altering the fate of multipotent stromal stem cells, predisposing them to become adipocytes (23, 25). However, due to its short-term, one-day window of exposure at larval stage, the ZO test is probably not suitable for evaluating the potential of chemicals and drugs to induce adipocyte hyperplasia. Adipocyte lipid droplet size results from a balance between the actions of various physiological stimuli and factors that promote triacylglycerol lipolysis and those that promote lipogenesis, irrespective of the mechanisms involved. HFD induced an increase in lipid content in the circulatory system of the larvae compared with SD, indicated by an increase in the NR signal after feeding (Fig. 4). Consequently, the fatty acids available for triacylglycerol synthesis may be more abundant, facilitat-

ing neutral lipid deposition in adipocytes even in the fasting state. It should be pointed out that, at the time of initial adiposity recording (i.e., after a one day fast) and at the image magnification and fluorescent microscope settings used (e.g., the background subtracted method used), there was no significant nonadipose NR fluorescence signal likely to interfere with WAT quantitation (Fig. 2B, Fig. 4F, Fig. 8). The nutritional condition used favored a lipolysis state, as demonstrated by the decrease in lipid droplet size in controls (Fig. 6A, C). However, exposure to obesogenic molecules (e.g., rosiglitazone) induced an increase in lipid droplet size, as evidenced on an HFD background (Fig. 6B, D). Exogenous compounds (e.g., rosiglitazone or TBT) that increased adiposity in the fasting state were classified as obesogenic.

In summary, our data demonstrated that zebrafish larvae provided a suitable vertebrate model for screening chemicals and mixtures likely to impair adipocyte fat storage and mobilization in interaction with diet lipid content. The ZO test is an intermediate step in obesity research, between in vitro and rodent assays, and it also may be used to study the effect of environmental toxicants on the adiposity of aquatic species. One major advantage of the described method is that the complex, dynamic, interactive, multi-organ events that occur in vivo remain intact, thus making it easier to characterize potentially obesogenic or anti-obesogenic substances. [\[Full\]](#)

## REFERENCES

1. Newbold, R. R., E. Padilla-Banks, R. J. Snyder, T. M. Phillips, and W. N. Jefferson. 2007. Developmental exposure to endocrine disruptors and the obesity epidemic. *Reprod. Toxicol.* **23**: 290–296.
2. Grün, F., and B. Blumberg. 2009. Endocrine disruptors as obesogens. *Mol. Cell. Endocrinol.* **304**: 19–29.
3. Lea-Currie, Y. R., D. J. Duffin, and B. M. Buehrer. 2011. Use of adipose-derived stem cells in high-throughput screening to identify modulators of lipogenesis. *Methods Mol. Biol.* **702**: 359–368.
4. Lemieux, G. A., J. Liu, N. Mayer, R. J. Bainton, K. Ashrafi, and Z. Werb. 2011. A whole-organism screen identifies new regulators of fat storage. *Nat. Chem. Biol.* **7**: 206–213.
5. McGrath, P., and C. Q. Li. 2008. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. *Drug Discov. Today*. **13**: 394–401.
6. Flynn III, E. J., C. M. Trent, and J. F. Rawls. 2009. Ontogeny and nutritional control of adipogenesis in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Lipid Res.* **50**: 1641–1652.
7. Imrie, D., and K. C. Sadler. 2010. White adipose tissue development in zebrafish is regulated by both developmental time and fish size. *Dev. Dyn.* **239**: 3013–3023.
8. Jones, K. S., A. P. Alimov, H. L. Rilo, R. J. Jandacek, L. A. Woollett, and W. T. Penberthy. 2008. A high throughput live transparent animal bioassay to identify non-toxic small molecules or genes that regulate vertebrate fat metabolism for obesity drug development. *Nutr. Metab. (Lond.)*. **5**: 23.
9. Song, Y., and R. D. Cone. 2007. Creation of a genetic model of obesity in a teleost. *FASEB J.* **21**: 2042–2049.
10. Oka, T., Y. Nishimura, L. Zang, M. Hirano, Y. Shimada, Z. Wang, N. Umamoto, J. Kuroyanagi, N. Nishimura, and T. Tanaka. 2010. Diet-induced obesity in zebrafish shares common pathophysiological pathways with mammalian obesity. *BMC Physiol.* **10**: 21.
11. White, R. M., A. Sessa, C. Burke, T. Bowman, J. LeBlanc, C. Ceol, C. Bourque, M. Dovey, W. Goessling, C. E. Burns, et al. 2008. Transparent adult zebrafish as a tool for in vivo transplantation analysis. *Cell Stem Cell.* **2**: 183–189.

12. Raldua, D., and P. J. Babin. 2009. Simple, rapid zebrafish larva bioassay for assessing the potential of chemical pollutants and drugs to disrupt thyroid gland function. *Environ. Sci. Technol.* **43**: 6844–6850.
13. Schwartz, D. M., and N. E. Wolins. 2007. A simple and rapid method to assay triacylglycerol in cells and tissues. *J. Lipid Res.* **48**: 2514–2520.
14. Greenspan, P., and S. D. Fowler. 1985. Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red. *J. Lipid Res.* **26**: 781–789.
15. Lee, G., F. Elwood, J. McNally, J. Weiszmann, M. Lindstrom, K. Amaral, M. Nakamura, S. Miao, P. Cao, R. M. Learned, et al. 2002. T0070907, a selective ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma, functions as an antagonist of biochemical and cellular activities. *J. Biol. Chem.* **277**: 19649–19657.
16. Tontonoz, P., and B. M. Spiegelman. 2008. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu. Rev. Biochem.* **77**: 289–312.
17. Boschmann, M., G. Krupp, F. C. Luft, S. Klaus, and J. Jordan. 2002. In vivo response to alpha(1)-adrenoreceptor stimulation in human white adipose tissue. *Obes. Res.* **10**: 555–558.
18. Le Maire, A., M. Grimaldi, D. Roecklin, S. Dagnino, V. Vivat-Hannah, P. Balaguer, and W. Bourguet. 2009. Activation of RXR-PPAR heterodimers by organotin environmental endocrine disruptors. *EMBO Rep.* **10**: 367–373.
19. Li, X., J. Ycaza, and B. Blumberg. The environmental obesogen tributyltin chloride acts via peroxisome proliferator activated receptor gamma to induce adipogenesis in murine 3T3-L1 preadipocytes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* Epub ahead of print. March 21, 2011; doi:10.1016/j.jsbmb.2011.03.012.
20. Inadera, H., and A. Shimomura. 2005. Environmental chemical tributyltin augments adipocyte differentiation. *Toxicol. Lett.* **159**: 226–234.
21. Zuo, Z., S. Chen, T. Wu, J. Zhang, Y. Su, Y. Chen, and C. Wang. 2011. Tributyltin causes obesity and hepatic steatosis in male mice. *Environ. Toxicol.* **26**: 79–85.
22. Guo, S., L. Qian, H. Shi, T. Barry, Q. Cao, and J. Liu. 2010. Effects of tributyltin (TBT) on *Xenopus tropicalis* embryos at environmentally relevant concentrations. *Chemosphere.* **79**: 529–533.
23. Grün, F., and B. Blumberg. 2006. Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. *Mol. Endocrinol.* **20**: 2141–2155.
24. Zhang, J., Z. Zuo, Y. Wang, A. Yu, Y. Chen, and C. Wang. 2011. Tributyltin chloride results in dorsal curvature in embryo development of *Sebastiscus marmoratus* via apoptosis pathway. *Chemosphere.* **82**: 437–442.
25. Kirchner, S., T. Kieu, C. Chow, S. Casey, and B. Blumberg. 2010. Prenatal exposure to the environmental obesogen tributyltin predisposes multipotent stem cells to become adipocytes. *Mol. Endocrinol.* **24**: 526–539.

***CHAPTER III:***

***THE ENVIRONMENTAL OBESOGEN  
TRIBUTYL TIN CHLORIDE AND ACTS  
THROUGH RXR AND LXR BUT NOT  
PPAR $\gamma/\delta$  ISOFORMS TO INDUCE  
ADIPOCYTE HYPERTROPHY IN LIVE  
ZEBRAFISH***



**The environmental obesogen tributyltin chloride acts through RXR and LXR but not PPARgamma/delta isoforms to induce adipocyte hypertrophy in live zebrafish**

**Nafia Ouadah-Boussouf, Patrick J. Babin\***

*University of Bordeaux, Maladies Rares : Génétique et Métabolisme (MRGM), EA 4576, F-33400 Talence, France*

\*Corresponding author at: Maladies Rares : Génétique et Métabolisme (MRGM), EA 4576, University of Bordeaux, Bât. B2, avenue des facultés, 33405 Talence, France. Tel.: +33 (0)5 4000 8776; Fax: +33 (0)5 4000 8915.

*E-mail address:* p.babin@gpp.u-bordeaux1.fr (P.J. Babin).

## Abstract

**Introduction:** Overweight and obesity are defined as a disease in which abnormal excessive body fat accumulation causes adverse effects on health. A proposed contributor to the rise in obesity is exposure to endocrine disrupting chemicals (EDC's). Obesogens are EDCs that directly or indirectly may promote obesity by increasing fat storage in fat cells and/or the number of adipocytes by altering the lipid homeostasis and the energy balance. The organotin tributyltin chloride (TBT) induces adipogenesis in cell culture models and increases adipose mass *in vivo* in two vertebrate model organisms, frogs and mice. It has been suggested that TBT acts through use of peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) $\gamma$ .

**Methods:** We recently designed the zebrafish obesogenic (ZO) test; adiposity is measured using a fluorescent probe that stains lipid droplets (Tingaud-Sequeira *et al.*, J. Lipid Res. 2011). Zebrafish is one of the most important models in environmental toxicology and is rapidly becoming a major model for studies on human health and disease.

**Results:** Zebrafish larvae treated at environmentally-relevant nano molar concentrations of TBT exhibited a remarkable increase in adiposity. By using the ZO test, we demonstrated that PPAR $\gamma$ /retinoid X receptor (RXR) heterodimers may be recruited to modulate adiposity in living zebrafish but were not involved in TBT obesogenic effect. We found that RXR/RXR homodimers and RXR/liver X receptor (LXR) heterodimers are *in vivo* effectors of the obesogenic effect of TBT on zebrafish adipose tissue.

**Conclusion:** TBT acts *in vivo* to induce triacylglycerol storage in white adipocytes via nuclear receptors LXR and RXR, and not via the PPAR $\gamma$  and  $\delta$  isoforms.

Grant support: N.O. was supported by a predoctoral fellowship from the French Ministry of Research and Education. This work was supported by the Conseil Régional d'Aquitaine (200881301031/TOD project) to P.J.B.

*You will find below a resume and discussion of the manuscript content including the final version of the Figures. The right place of this text is on Section 2 of Chapter IV. It has been reproduced here in attend to have the definitive version of this manuscript. Sorry for the inconvenience.*

An obesogenic molecule can promote lipid deposition in adipocytes by disrupting lipid homeostasis at one or multiple levels and may an ED from xenobiotic origin. It can substitute for natural ligands blocking or over-regulating hormone receptors. They can also lead to a disruption of hormone biosynthesis and consequently alter lipid homeostasis. Finally, an obesogenic molecule can change the energy balance by inducing alterations in metabolic programming during development and/or in processes controlling satiety (Grün and Blumberg, 2009a, 2009b)

Among the molecules we screened with the ZO test, TBT has proven to be one of the most powerful obesogen we have used and can induce its action at a concentration incredibly low, of the order of nM (Figure 3, Chapter III, Ouadah-Boussouf and Babin, 2012). This concentration is related to the concentration of TBT which can be measured in human blood. For example, the average concentration observed in a study conducted in the USA in 1998 was  $23.4 \pm 44.04$  nM (Kannan *et al.*, 1999). TBT can be considered obesogenic at concentrations usually found in animal organisms for hormones. The data obtained on the zebrafish larvae confirms that this molecule is one of the most toxic products ever introduced by man into the environment. TBT is classified as one of the most powerful EDs (Evans *et al.*, 1995, Pereira *et al.*, 1999; Ayanda *et al.*, 2012) and was previously identified as highly obesogenic (Kanayama *et al.*, 2005 , Grün and Blumberg, 2009a; Grün *et al.*, 2006a; Janesick and Blumberg, 2012).

*In vitro* studies show that the ability of TBT or Rosi induce adipogenesis from multipotent stem cells of the vascular stroma (MSCs) (Kirchner *et al.*, 2010) or the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes (Li *et al.*, 2011) was dependent on the activation of the heterodimer RXR/PPAR $\gamma$  (Kanayama *et al.*, 2005; Nishikawa *et al.*, 2004; Nakanishi *et al.*, 2005, 2006; Nakanishi, 2007; 2008; Grün *et al.*, 2006a; Grün and Blumberg, 2006b). In cell culture, TBT appears to bind to PPAR $\gamma$  and operates in a competitive manner against Rosi, by blocking the binding of the latter with the PPAR $\gamma$  (Hiromori *et al.*, 2009). TBT can activate the heterodimer forms containing PPAR $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  and  $\gamma$  via their partner RXR (Le Maire

*et al.*, 2009). Indeed, a covalent bond between the tin atom of TBT and cysteine 432 of helix H11 of the human RXR $\alpha$  can be established (Le Maire *et al.*, 2009). Other authors have also shown that TBT interacts with RXRs to influence the expression of genes regulated by permissive heterodimers (Wang *et al.*, 2011). Moreover, imposex in gastropod molluscs can be induced via RXR ligands similarly to the inductive effect of TBT (Castro *et al.*, 2007; Sousa *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2011; Stange *et al.*, 2012).

The starting point of our investigations on the mode of action of TBT was using a PPAR $\gamma$  antagonist, the T0070907 because previous work carried out on cell cultures of 3T3-L1 preadipocytes were shown that this antagonist could block the obesogenic effect of TBT (Kirchner *et al.*, 2010). This result was in contradiction with the work done previously on the adipocyte line where a lack of blocking the action of TBT by the antagonist GW9662 of PPAR $\gamma$  was observed (Inadera and Shimomura, 2005). The lack of effect of GW9662 to block the differentiation of preadipocytes would be due to the short half-life time of this antagonist in cell culture. TBT can therefore carry out its work after activation of the heterodimer RXR/PPAR $\gamma$  (Li *et al.*, 2011).

Using Rosi as a positive control, we could show, by using the ZO test, that T0070907 blocks the action of this well-known PPAR $\gamma$  agonist (Figure 7 of Chapter II-Tingaud Sequeira *et al.*, 2011; Figure 4 of Chapter III, Ouadah-Boussouf and Babin, 2012). However, the PPAR $\gamma$  antagonist is unable to block the action of TBT on zebrafish WAT (Figure 4 of Chapter III, Ouadah-Boussouf and Babin, 2012). From this result, inconsistent with that obtained in cell culture of preadipocytes, we investigated the *in vivo* mode of action of TBT on the zebrafish WAT in order to characterize the NRs potentially involved.

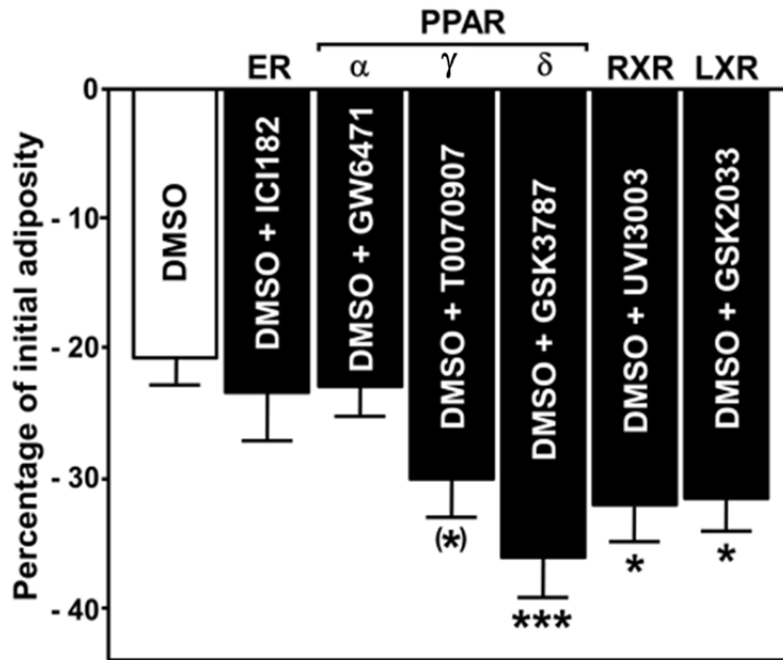
NRs, and in particular their ligand binding site, are highly conserved during evolution. This generally allows the use of specific agonists and antagonists in interspecies conditions. Among some NRs known to regulate lipid metabolism, *e.g.* ER, PPAR $\alpha$ ,  $\gamma$  and  $\delta$ , RXR and LXR, the use of specific antagonists resulted in a number of cases, compared to controls, by a higher decrease of adiposity observed during fasting (Figure 1 of Chapter III, Ouadah-Boussouf and Babin, 2012). This concerns T0070907 and GSK3787 respectively antagonists and PPAR $\gamma$  and  $\delta$ , the UVI3003 used as an antagonist of RXR and GSK2033 used as an LXR antagonist. The activity of these NRs may be modulated *in vivo* to modify the level of adiposity in larval zebrafish. So we then focused our work on these NRs.

As indicated in Chapter I (Part N° 2), RXRs represent mandatory heterodimerization partner for many NRs (Mangelsdorf *et al.*, 1990). RXR ligands can stimulate transcriptional activation of their partners when it they are permissive receptors such as PPARs and LXRs (Lefebvre *et al.*, 2010). Using the ZO test, we showed that RXR/PPAR $\gamma$  and RXR/LXR heterodimers may be recruited as modulators of adiposity in larval zebrafish (Figure 2 of Chapter III, Ouadah-Boussouf and Babin, 2012). Concerning the heterodimer RXR/PPAR $\gamma$ , separate use of the agonist of both partners of the heterodimer or both agonists simultaneously shows an obesogenic effect and hypertrophy of adipocytes. PPAR $\gamma$  is known for its obesogenic effect on zebrafish, *Xenopus* and humans (Riu *et al.*, 2011). It has been suggested that this NR is a major target for obesogenic molecules (Kanayama *et al.*, 2005; Janesick and Blumberg, 2011). RXRs are also the target for obesogens and blocking this receptor by the antagonist HX531 may have an anti-diabetic and anti-obesogenic effect. This antagonist could inhibit hypertrophy of adipocytes derived from OLETF rats (Nakatsuka *et al.*, 2012). Our work shows that three different RXR agonists, fluorobexarotene, SR11237 and DHA had an obesogenic activity that can be inhibited by the antagonist UVI3003. Our results show also that inhibition of one of the partners of the RXR/PPAR $\gamma$  heterodimer by its specific antagonist, causes inhibition of the obesogenic effect of the agonist of the other partner. The same result was observed with RXR/LXR heterodimer (Figure 2 of Chapter III, Ouadah-Boussouf and Babin, 2012). This indicates that the fatness of the zebrafish larva can be modulated by these NRs heterodimer forms.

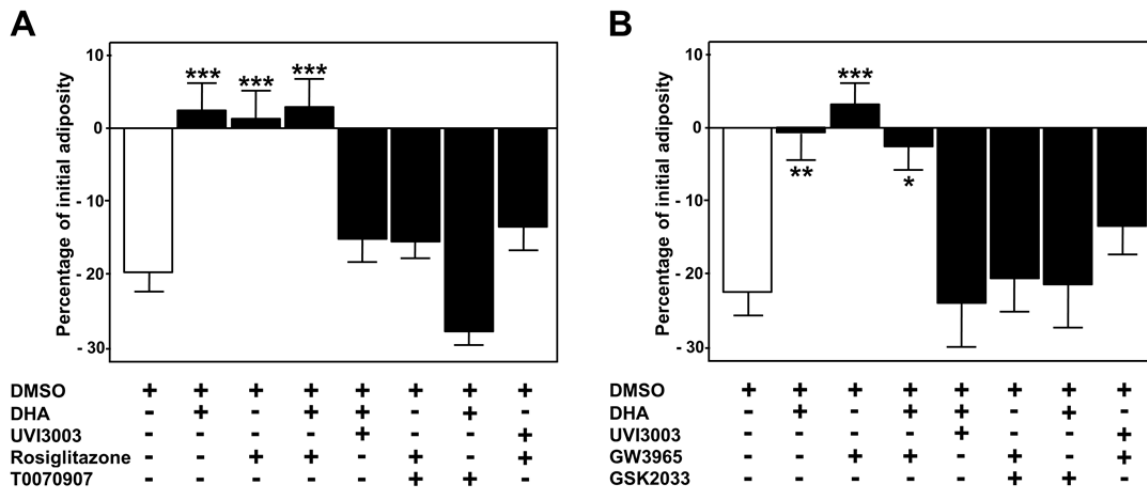
A 24-hour exposure of zebrafish larvae according to the procedure of ZO test with Rosi and GW501516, PPAR $\gamma$  and PPAR $\beta/\delta$  agonists, respectively, induced an increase in adiposity compared to animals exposed to the vehicle (DMSO) alone. This is in agreement with previous observations on the increase in the amount of lipids in cells in culture (Schmuth *et al.*, 2004; Kirchner *et al.*, 2010). In both cases, this effect could be inhibited by specific antagonists of these two NRs, T0070907 and GSK3787, respectively. These two antagonists have no effect on the obesogenic effect of TBT observed by the ZO test suggesting that TBT does not use PPAR $\gamma$  and PPAR $\beta/\delta$  (Figure 4 of Chapter III, Ouadah-Boussouf and Babin, 2012 ). DHA and GW3965, respectively agonists of RXRs and LXRs, are obesogenic in the same way as TBT (Figure 5 of Chapter III, Ouadah-Boussouf and Babin, 2012). The antagonist of RXR, UVI3003, completely inhibits the effect of DHA and also the obesogenic effect of TBT. GSK2033, an LXRs antagonist, completely inhibits the obesogenic effect of

GW3965 but partially the effect of TBT. These results indicate that in WAT of larval zebrafish, TBT achieves its obesogenic effect via RXR/RXR homodimers and LXR/RXR heterodimers. RXR/PPAR $\gamma$  heterodimers does not seem to be involved in the obesogenic effect of TBT but have the potential to be recruited separately in the presence of TBT to modulate adiposity in zebrafish (Figure 6 of Chapter III, Ouadah-Boussouf and Babin, 2012).

Our results indicate that TBT stimulates the deposition of TAG in zebrafish WAT by activating RXR/RXR homodimers and RXR/LXR heterodimers. The schematic representation of the signaling NR pathways involved in TBT-induced hypertrophic adipocytes in living zebrafish is depicted in Figure 7 of Chapter III). This is consistent with the hypothesis originally formulated by Inadera and Shimomura in 2005. The contradictory results obtained by other authors by using cell cultures could possibly be explained by the action of hormonal and/or growth factors present in the culture medium. It should be noted that RXR/RXR homodimer may selectively bind to PPREs (Ijpenberg *et al.*, 2004). In addition, activation of LXRs is involved not only in lipogenesis but also in adipogenesis with an expression of the adipocyte-specific genes in 3T3-L1 cells (Juvet *et al.*, 2003; Seo *et al.*, 2004). The unique counterpart to LXR found in the zebrafish genome is closer to human LXR $\alpha$  that form  $\beta$  (Archer *et al.*, 2008). In mouse macrophage RAW264 cells the transcriptional response to TBT is through the RXR/LXR $\alpha$  heterodimer (Cui *et al.*, 2011), indicating that these ED may also, in this cell type, use this heterodimer to carry out its action. The terms of the TBT binding to RXR $\alpha$  are known (Le Maire *et al.*, 2009), but there is no data, to our knowledge, on the ability of TBT to link directly LXR.

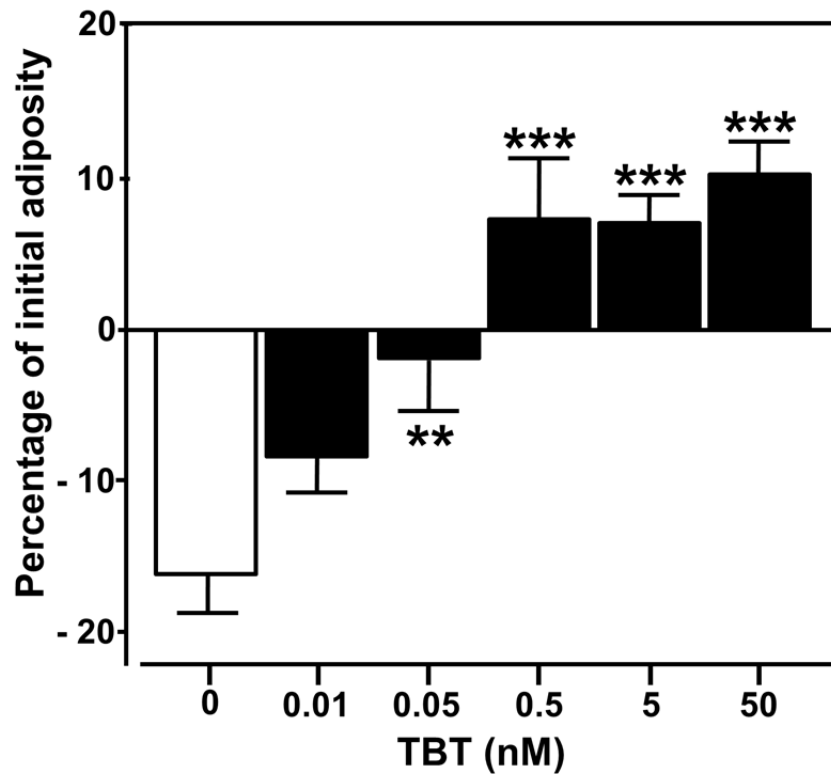


**Figure 1. Identification of nuclear receptor antagonists able to decrease adiposity in live zebrafish larvae.** ZO test was conducted to larvae initially nourished with SD. WAT dynamics is expressed as a percentage of initial adiposity value (see the Experimental Procedures section for details about ZO test and quantitative analysis protocols). A representative experiment is presented. Quantification was assayed in the presence in fish water of 0.1% DMSO as a vehicle control or 0.1% DMSO plus the selected nuclear receptor antagonist. The concentration of each antagonist used was 10  $\mu$ M with the exception of UVI3003 where 0.1  $\mu$ M has been applied. In the conditions used, antagonists ICI182 to ER and GW6471 to PPAR $\alpha$  were unable to modulate adiposity by comparison to vehicle control. T0070907 and GSK3787 used as antagonists of PPAR $\gamma$  and PPAR $\delta$ , respectively and UVI3003 and GSK2033 used as antagonists of RXR and LXR, respectively were able to decrease adiposity by comparison to vehicle control. Values are mean  $\pm$  SEM, n = 10 animals per group. (\*) $P$  = 0.085, \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.001 by comparison with control group using ANOVA and Dunnett's test.

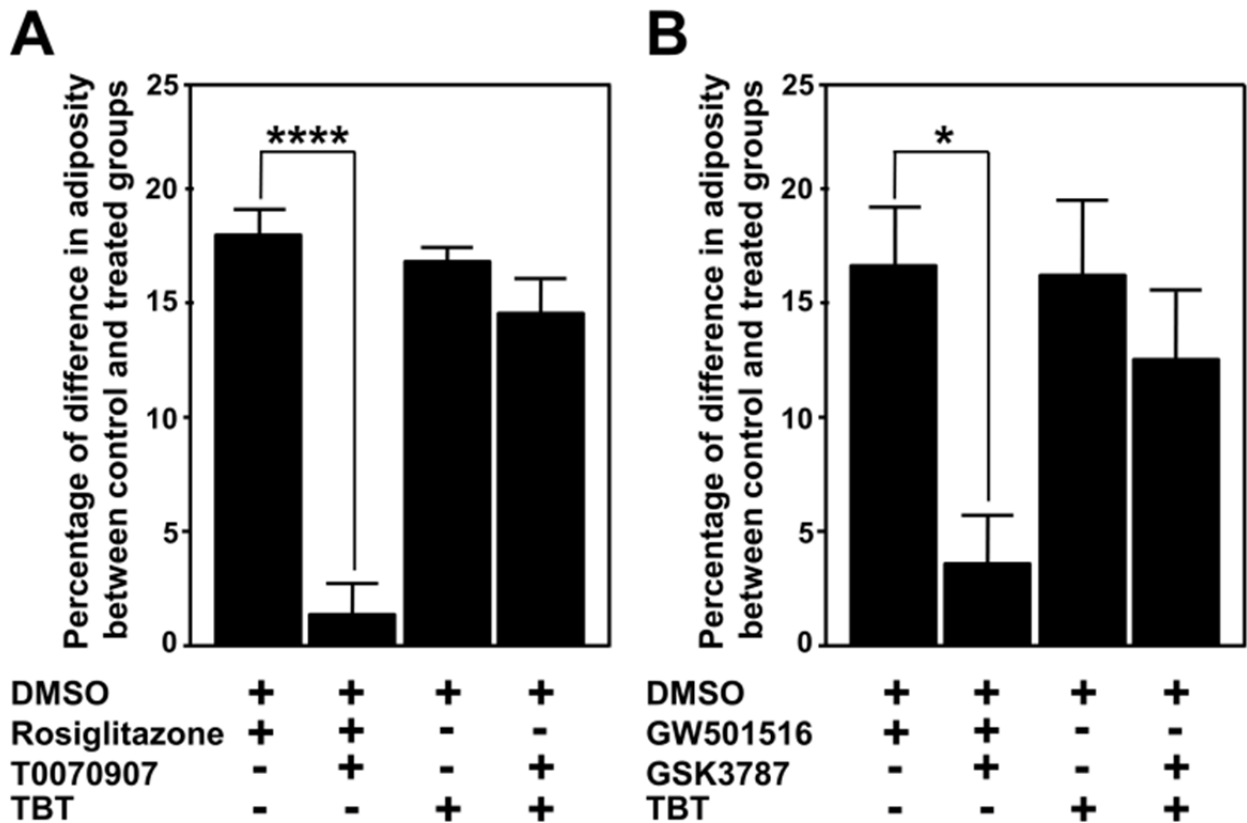


**Figure 2. RXR/PPAR $\gamma$  and RXR/LXR heterodimers may be recruited to modulate adiposity in living zebrafish.** A) Characterization of RXR/PPAR $\gamma$  heterodimer involvement. B) Characterization of RXR/LXR heterodimer involvement. Representative experiments are presented. ZO test was applied to larvae previously nourished with HFD. Quantification was assayed in the presence in fish water of 0.1% DMSO as a vehicle control or 0.1% DMSO plus the combination of the indicated compounds. DHA (1  $\mu$ M) and UVI3003 (0.1 $\mu$ M) were used as RXR agonist and antagonist, respectively. Rosiglitazone (1  $\mu$ M) and T0070907 (10  $\mu$ M) were used as PPAR $\gamma$  agonist and antagonist, respectively. GW3965 (1  $\mu$ M) and GSK2033 (10  $\mu$ M) were used as LXR agonist and antagonist, respectively. Values are mean  $\pm$  SEM, n = 10 animals per group. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001 by comparison with control group using ANOVA and Dunnett's test.

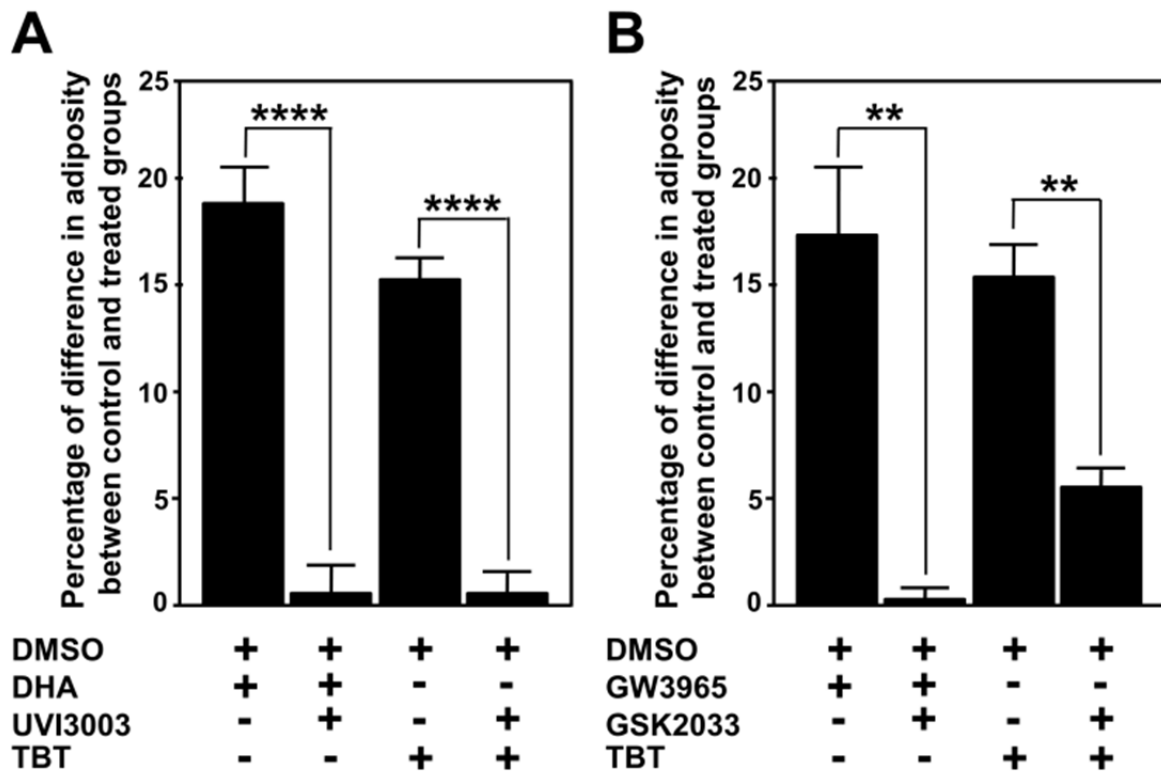




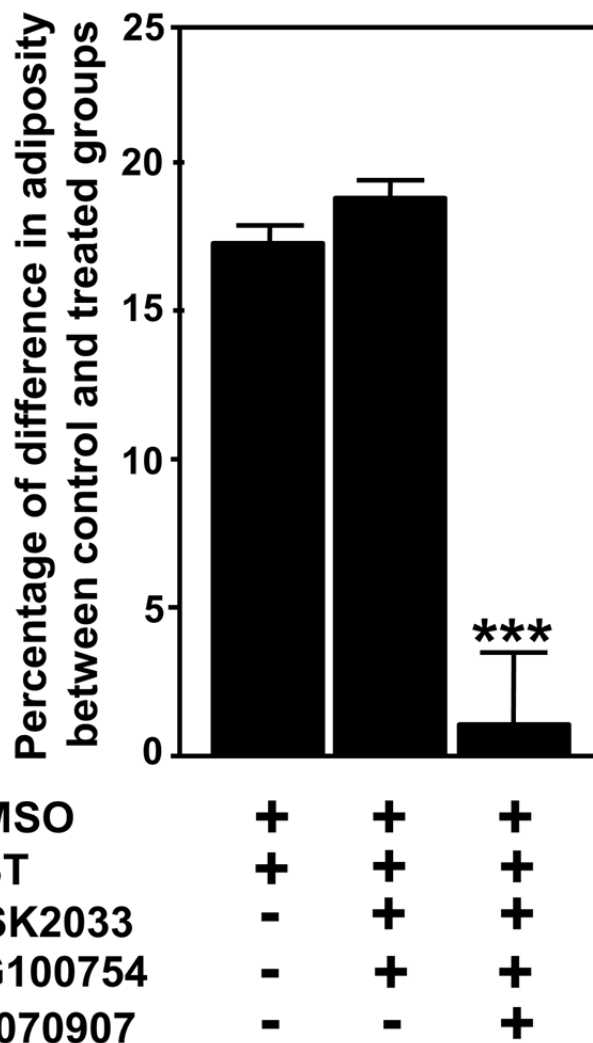
**Figure 3. TBT is a potent *in vivo* obesogenic compound effective at a nanomolar concentration in live zebrafish larvae.** A representative experiment is presented. ZO test was applied to larvae previously nourished with HFD. Quantification was assayed in the presence in fish water of 0.1% DMSO as a vehicle control or 0.1% DMSO plus TBT at the indicated concentrations. Values are mean  $\pm$  SEM, n = 10 animals per group. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  by comparison with control group using ANOVA and Dunnett's test.



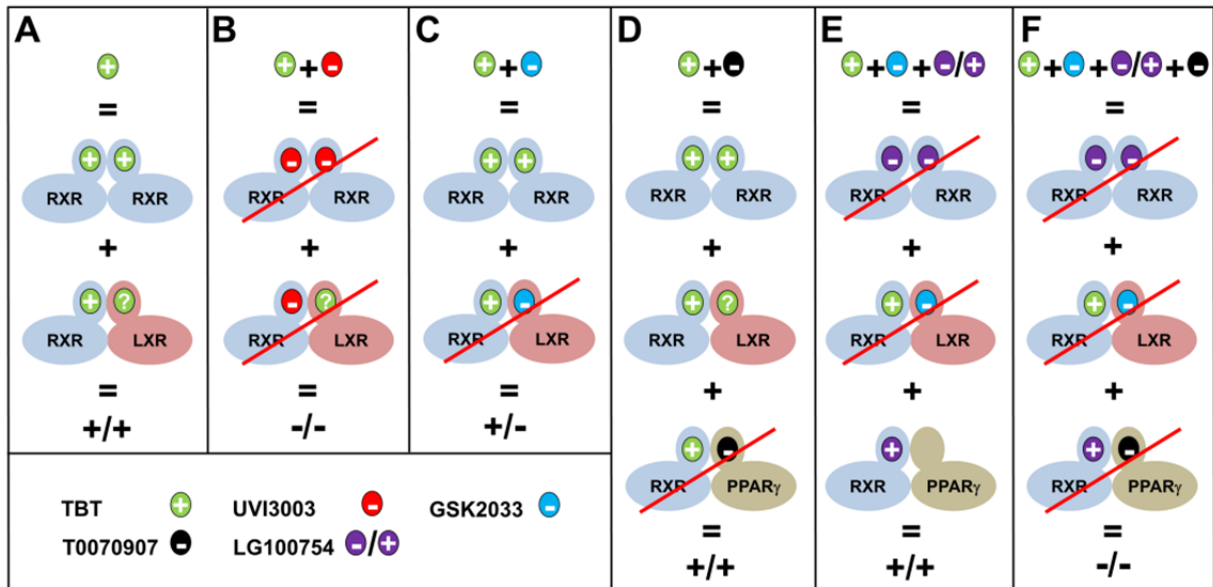
**Figure 4. Antagonists to PPAR $\gamma$  and  $\delta$  isoforms are not able to block the obesogenic effect of TBT on white adipose tissue of live zebrafish larvae.** *A*, PPAR $\gamma$  pathway. Values are mean  $\pm$  SEM of five and four independent experiments of rosiglitazone and TBT treated groups, respectively. *B*, PPAR $\delta$  pathway. Values are mean  $\pm$  SEM of three independent experiments of GW501516 and TBT treated groups, respectively. ZO test was applied to larvae previously nourished with HFD. Quantification was assayed in the presence in fish water of 0.1% DMSO as a vehicle control or 0.1% DMSO plus the combination of the indicated compounds. Rosiglitazone (1  $\mu$ M) and T0070907 (10  $\mu$ M) were used as PPAR $\gamma$  agonist and antagonist, respectively. GW501516 (1  $\mu$ M) and GSK3787 (10  $\mu$ M) were used as PPAR $\delta$  agonist and antagonist, respectively. TBT was used at 25 nM. In each independent experiment, n = 10 animals per group. \* $P$  < 0.05, \*\*\*\* $P$  < 0.0001 by comparison with the corresponding agonist treated group using one-tailed unpaired  $t$ -test.



**Figure 5. RXR/RXR homodimers and RXR/LXR heterodimers are *in vivo* effectors of the obesogenic effect of TBT on zebrafish adipose tissue.** *A*, RXR/RXR pathway. Values are mean  $\pm$  SEM of eight and seven independent experiments of DHA and TBT treated groups, respectively. *B*, RXR/LXR pathway. Values are mean  $\pm$  SEM of four and six independent experiments of GW3965 and TBT treated groups, respectively. ZO test was applied to larvae previously nourished with HFD. Quantification was assayed in the presence in fish water of 0.1% DMSO as a vehicle control or 0.1% DMSO plus the combination of the indicated compounds. DHA (1  $\mu$ M) and UVI3003 (0.1  $\mu$ M) were used as RXR agonist and antagonist, respectively. GW3665 (1  $\mu$ M) and GSK2033 (10  $\mu$ M) were used as LXR agonist and antagonist, respectively. TBT was used at 25 nM. In each independent experiment, n = 10 animals per group. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  by comparison with the corresponding agonist treated group using one-tailed unpaired *t*-test.



**Figure 6. RXR/PPAR $\gamma$  heterodimers are not involved in the obesogenic effect of TBT but have the potential to be recruited separately in the presence of TBT to modulate adiposity in living zebrafish.** ZO test was applied to larvae previously nourished with HFD. Quantification was assayed in the presence in fish water of 0.1% DMSO as a vehicle control or 0.1% DMSO plus the combination of the indicated compounds. LG100754 (0.1  $\mu$ M) was used as RXR homodimer antagonism and RXR heterodimer agonist. GSK2033 (10  $\mu$ M) and T0070907 (10  $\mu$ M) were used as LXR and PPAR $\gamma$  antagonists, respectively. TBT was used at 25 nM. Values are mean  $\pm$  SEM of three independent experiments with n = 10 animals per group in each independent experiment. \*\*\* $P$  < 0.001 using ANOVA followed by the post hoc Tukey's test.



**Figure 7 (Graphical abstract).** Schematic representation of the signaling NR pathways involved in TBT-induced hypertrophic adipocytes in living zebrafish. A plus symbol indicates an agonist effect, a negative symbol an antagonist one. The question mark inside the TBT graphic symbol indicates that there was uncertainty about the ability of TBT to bind LXR. Antagonist compounds have been used in a concentration range of the order of  $\mu\text{M}$ , while the TBT was in a range of the nM. TBT was fully ( $+/+$ ), partially ( $+/-$ ) or no ( $-/-$ ) obesogenic according to the combination of agonists and antagonists used. A) TBT induced adipocyte hypertrophy through RXR/RXR and RXR/LXR pathways. B) This effect was fully abolished with RXR antagonist UVI3003. C) In the presence of LXR antagonist GSK2033, TBT was partially active due to inhibition of RXR/LXR heterodimers while RXR homodimers were still active. D) The obesogenic effect of TBT was not inhibited by PPAR $\gamma$  antagonist T0070907 precluding a role of RXR/PPAR $\gamma$  heterodimer in TBT action. E) RXR/PPAR $\gamma$  heterodimers were still active *in vivo* even after RXR/RXR and RXR/LXR pathway blockage. These pathways were antagonized with LG100754 and GSK2033, respectively. However, LG100754 was also a RXR heterodimer agonist that had the potential to recruit RXR/PPAR $\gamma$  and therefore induced hypertrophic adipocyte independently to the presence of TBT. This was consistent with adipocyte hypertrophy induced by rosiglitazone treatment, a PPAR $\gamma$  agonistic effect that was inhibited by T0070907 (not shown on the graph, see Fig. 4A). F) The agonistic effect of LG100754 on RXR/PPAR $\gamma$  heterodimer was also abolished by the PPAR $\gamma$  antagonist T0070907.

***CHAPTER IV:***

***GENERAL DISCUSSION,  
PERSPECTIVES AND CONCLUSION***

# 1. Originality of ZO test and application for the identification of obesogenic and anti-obesogenic molecules.

## 1.1. The measurement methods of adiposity.

There are several methods to estimate the amount of body fat in animals or humans. The most used and the easiest to implement is BMI as discussed in Chapter I. This index is often used clinically to determine underweight, overweight and obesity. This index is insufficient to finely characterize the distribution of WAT and therefore the shape of the individual and the history of its weight change. It may still be a correlation between BMI and fat mass (Micozzi *et al.*, 1986; Leonhardt *et al.*, 1987). There are other methods of displaying the WAT, such as those involving the imaging (Shen *et al.*, 2003). For small animal models, experimental methods exist to measure the fat content. This includes invasive methods, *e.g.* by measuring *ex vivo* fat deposition. This technique long and tedious does not provide a complete dissection of all the fat body of the animal. The total lipid extraction with organic solvents may be tempted, but again it is difficult to implement in the case of large experimental series. Other non-invasive methods exist, for example, the X-ray photon absorption or nuclear magnetic resonance. Each of these methods has a relative compromise (Sasser *et al.*, 2012). Called invasive methods used to obtain information on the distribution of fat in organs or specific regions. However, the sacrifice of animals prevents an individual assessment of longitudinal changes in adiposity according to a particular treatment. In contrast, the non-invasive methods can have this longitudinal evaluation but give few details on specific organs and regions because of their limited resolution (Sasser *et al.*, 2012).

It should be noted that the quantification of lipids from cell cultures, cultures of adipocytes for example, can be achieved by lipid extraction and quantification and/or by staining the cells with Oil Red O or Nile Red.

After rigorously defined the nutrition protocol and suitable duration of exposure to molecules, the compounds are directly dissolved, usually in the presence of DMSO in the culture water fish. The skin of these animals in the larval stage is very thin which greatly facilitates the diffusion of molecules inside the animal and its rapid distribution via the

circulatory system. Mature adipocytes were unilocular and staining the lipid droplet, which is almost exclusively composed of TAG is performed using the Nile red. This vital dye has a specific fluorescence emission peak after excitation (Figure 34) (Greenspan and Fowler, 1985; Flynn *et al.*, 2009; Romek *et al.*, 2011). The protocol is to take a screenshot of the fluorescence image of the larva before and after exposure to a given compound, exhibition itself was preceded by a diet with a dietary lipid composition known. This protocol allows to study, on one hand, the effect of exposure to a given molecule on the fat of the animal, but also to assess the interaction between this effect and the nutritional history of the animal.

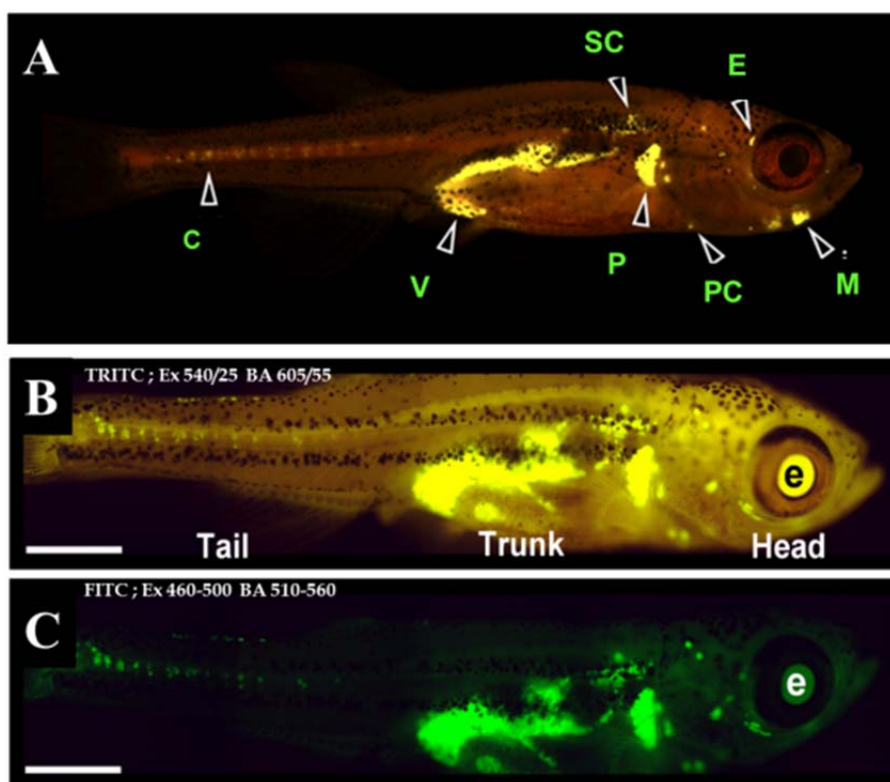
## **1.2. The ZO test.**

The ZO test developed during this work is a simple, fast and reliable to evaluate the effect of exogenous molecules alone or in a mixture, in interaction or not with dietary factors, on zebrafish adiposity. This test uses the live larvae of zebrafish and its originality primary draws from the use of a specific staining of neutral lipids present in adipocytes and easy viewing by fluorescence microscopy because of the transparency of the animal's body. The method employed allows vital individual monitoring of live animals. The small size of these, allows for experimental series with a large number of animals, which allows large-scale experiments and statistical analysis appropriate for the observed effects.

The analysis of the WAT fluorescence signal, even for deep body locations, is possible because of the transparency of the larva at the used stages. The area or the intensity of the fluorescence signal after Nile red staining was measured by computerized processing of images (ImageJ software (NIH), royalty-free) using a procedure similar to that previously developed in the laboratory. This procedure is fully optimized andf routinely used in the context of the implementation of another test developed by the team, the "T4 immunofluorescence quantitative disruption test" (TIQDT) (Raldúa and Babin, 2009; Thienpont *et al.*, 2011; Raldúa *et al.*, 2012). In the case of ZO test, we demonstrated that there is a highly significant correlation between the area and the intensity of the fluorescence signal of the WAT and the amount of TAG assayed in biochemistry from whole larvae. The amount of WAT present in the larva is related to the size of the animal and not for his age. A similar observation has been published (Imrie and Sadler, 2010). The implementation of the ZO test



must be carried out with larvae whose size is between 7.5 and 9 mm. This provides fluorescence between 10 and 60 arbitrary units after Nile red staining for animals with different locations of the WAT in place. The WAT is then disposed at visceral level, at the base of the pectoral fins and caudal to the jaw and around the eyes, in the pericardial region, and limited to the subcutaneous level (Figure 35A) (Flynn *et al.*, 2009). The size range of animals used keeps the fat from the skin to an acceptable level to allow visualization by transparency of other body sites distribution of WAT. HQ-FITC filter-BP of fluorescence microscope was used to minimize the maximum background noise during image capture (Figure 35C) compared to the previously used TRITC (Figure 35B) (Flynn *et al.*, 2009).

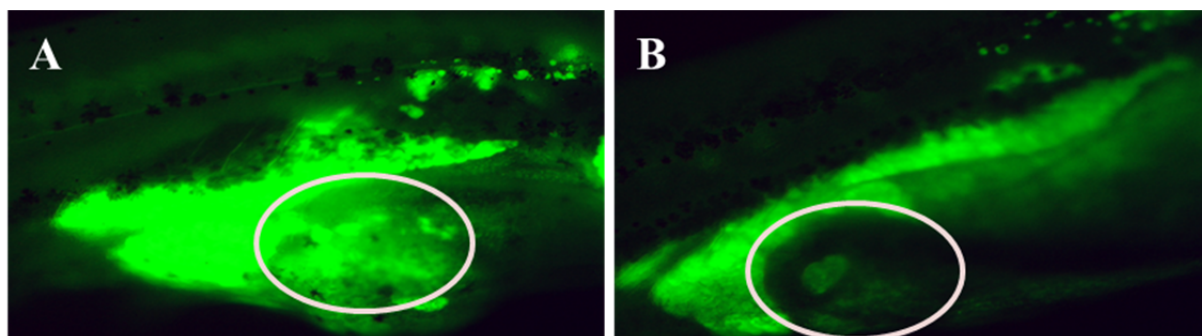


**Figure 35.** *In vivo* imaging of the fluorescence signal of adipocyte lipid droplets after staining with Nile Red in living zebrafish larva. (A) The different locations of the WAT of the larva in lateral view (after Flynn *et al.*, 2009), (B) Side view under a microscope with a TRITC filter, (C) Side view of the same animal in HQ-FITC filter-BP. (E), eye (SC) subcutaneous, (M), jaw (V), visceral (P), pectoral, (C), caudal; (PC) pericardial area. Scale bar: 1 mm (after Tingaud-Sequeira *et al.*, 2011).

The ZO test provides an original and unique opportunity, not only for the visualization of WAT *in vivo* in an animal model, but can also display longitudinal individual assessment of specific WAT distribution and quantity (see for example Figure 8 of Chapter II, Tingaud-

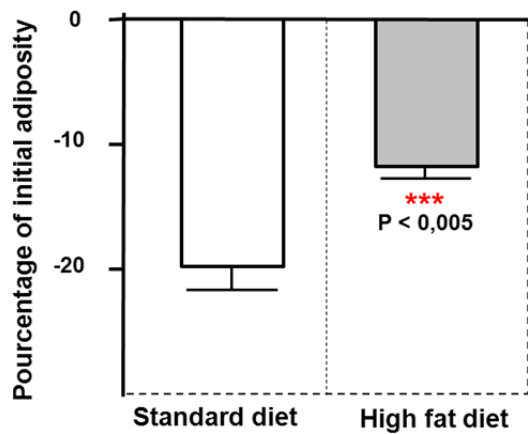
Sequeira *et al.*, 2011). An *in vivo* analysis at adipocyte scale can also be achieved, which is a remarkable progress, from our point of view, to study the *in vivo* dynamics of adipocytes and the factors involved (see example in Figure 6 of Chapter II, Tingaud-Sequeira *et al.*, 2011).

Larval zebrafish allows studying the effect of diet quantity and content on the dynamics of WAT in the short and long terms. The ZO test is especially dedicated to this short term evaluation. A high-fat diet (55% fat) results in a rapid and highly significant fluorescence signal in the bloodstream compared to the standard diet (10% fat) (Figure 4 of Chapter II-Tingaud Sequeira *et al.*, 2011). The protocol takes account the requirement of 24 hours of fasting before exposure to molecules to prevent quenching of the WAT perivisceral fluorescence signal related to the presence of food in the lumen of the digestive tract (Figure 36). This fasting is not enough to drastically reduce the amount of fat circulating in the bloodstream of animals fed a high fat diet (Figure 4 of Chapter II, Tingaud-Sequeira *et al.*, 2011).



**Figure 36.** Visualization of perivisceral WAT of larval zebrafish after Nile red staining and observation under a fluorescence microscope. A) Larva 24 hours after food intake. B) Larva 3 hours after food intake. The difference in fluorescence observed in the digestive tract (white circle) is the result of quenching of fluorescence due to the presence of food in the lumen of the digestive tract.

Fasting of the larvae causes a very rapid decrease in body fat (Figure 37). This decrease is dependent on the nature of the diet ingested. Control larvae treated with 0.1% DMSO and initially fed with standard diet, losing  $19.77 \pm 1.87\%$  of their body fat in 24 hours, whereas larvae fed initially with a food rich in fat lose only  $11,83 \pm 0.93\%$  of their body fat (Figure 36).



**Figure 37.** Effect of diet lipid composition on the percentage of fat loss after the fasting of zebrafish larva. Values are the mean  $\pm$  SEM of nine independent experiments, N = 10 larvae per group, \*\*\*  $p < 0.005$  for comparison of means using the one-tailed unpaired t-test.

The opportunity to study the interactions between nutritional factors and exposure to molecules that modulate adiposity is one of the most representative qualities of ZO test. We illustrated as follows (Tingaud-Sequeira *et al.*, 2011). PPAR $\gamma$  is considered the key NR regulator of adipogenesis (Tontonoz and Spiegelman, 2008) and can make the link between obesity and type 2 diabetes (Janesick and Blumberg, 2011). Rosi is a well know PPAR $\gamma$  agonist and is able to induce adipocyte differentiation in cell culture at a concentration of about 10  $\mu$ M (Velebit *et al.*, 2008). This agonist is able to quickly reduce the expression of certain key enzymes of glucose metabolism in zebrafish larvae after treatment at a concentration of 1  $\mu$ M (Elo *et al.*, 2007). T0070907 is a potent antagonist of PPAR $\gamma$  and can be used at a concentration of 10  $\mu$ M in cell culture (Lee *et al.*, 2002; Tontonoz and Spiegelman, 2008). We also tested another molecule, phenylephrine, which is involved in another signaling pathway and is a  $\alpha$ 1-adrenergic receptor agonist. This molecule is capable of increasing lipolysis in the human WAT (Boschmann *et al.*, 2002). T0070907 and phenylephrine produce a significant lipolytic effect compared to controls when zebrafish larvae were previously fed a standard diet; this effect could not be observed with a high-fat diet (Figure 5 of Chapter II, Tingaud-Sequeira *et al.*, 2011). Taking into account the past nutritional history is an important criterion for identification of molecules with anti-obesogenic nature. Larvae treated with Rosi increased their level of adiposity whichever the diet initially applied (Figure 5 of Chapter II, Tingaud-Sequeira *et al.*, 2011). Under the effect of Rosi, the balance between TAG mobilization following the fast situation and lipogenesis is oriented on lipid storage which results in an increase in the size of the lipid droplet present in differentiated adipocytes (Figure 6 of Chapter II, Tingaud-Sequeira *et al.*, 2011). This quite remarkable obesogenic effect of Rosi can be inhibited by co-incubation with the PPAR $\gamma$

antagonist T0070907 (Figure 7 of Chapter II, Tingaud-Sequeira *et al.*, 2011). This result confirms a result obtained previously in cell culture (Kirchner *et al.*, 2009) and demonstrates that the ZO test can be used as a tool for studying the molecular mechanisms underlying the *in vivo* dynamics of zebrafish WAT. This property has been used to better define the molecular mechanisms involved in the effect of a powerful obesogenic environmental contaminant, TBT (Chapter III).

## **2. Study of the *in vivo* mechanism of action of TBT on WAT.**

An obesogenic molecule can promote lipid deposition in adipocytes by disrupting lipid homeostasis at one or multiple levels and may be an ED from xenobiotic origin. It can substitute for natural ligands blocking or over-regulating hormone receptors. They can also lead to a disruption of hormone biosynthesis and consequently alter lipid homeostasis. Finally, an obesogenic molecule can change the energy balance by inducing alterations in metabolic programming during development and/or in processes controlling satiety (Grün and Blumberg, 2009a, 2009b)

Among the molecules we screened with the ZO test, TBT has proven to be one of the most powerful obesogen we have used and can induce its action at a concentration incredibly low, of the order of nM (Figure 3, Chapter III, Ouadah-Boussouf and Babin, 2012). This concentration is related to the concentration of TBT which can be measured in human blood. For example, the average concentration observed in a study conducted in the USA in 1998 was  $23.4 \pm 44.04$  nM (Kannan *et al.*, 1999). TBT can be considered obesogenic at concentrations usually found in animal organisms for hormones. The data obtained on the zebrafish larvae confirms that this molecule is one of the most toxic products ever introduced by man into the environment. TBT is classified as one of the most powerful EDs (Evans *et al.*, 1995, Pereira *et al.*, 1999; Ayanda *et al.*, 2012) and was previously identified as highly obesogenic (Kanayama *et al.*, 2005, Grün and Blumberg, 2009a; Grün *et al.*, 2006a; Janesick and Blumberg, 2012).

*In vitro* studies show that the ability of TBT or Rosi induce adipogenesis from multipotent stem cells of the vascular stroma (MSCs) (Kirchner *et al.*, 2010) or the

differentiation of 3T3-L1 preadipocytes (Li *et al.*, 2011) was dependent on the activation of the heterodimer RXR/PPAR $\gamma$  (Kanayama *et al.*, 2005; Nishikawa *et al.*, 2004; Nakanishi *et al.*, 2005, 2006; Nakanishi, 2007; 2008; Grün *et al.*, 2006a; Grün and Blumberg, 2006b). In cell culture, TBT appears to bind to PPAR $\gamma$  and operates in a competitive manner against Rosi, by blocking the binding of the latter with the PPAR $\gamma$  (Hiromori *et al.*, 2009). TBT can activate the heterodimer forms containing PPAR $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  and  $\gamma$  via their partner RXR (Le Maire *et al.*, 2009). Indeed, a covalent bond between the tin atom of TBT and cysteine 432 of helix H11 of the human RXR $\alpha$  can be established (Le Maire *et al.*, 2009). Other authors have also shown that TBT interacts with RXRs to influence the expression of genes regulated by permissive heterodimers (Wang *et al.*, 2011). Moreover, imposex in gastropod molluscs can be induced via RXR ligands similarly to the inductive effect of TBT (Castro *et al.*, 2007; Sousa *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2011; Stange *et al.*, 2012).

The starting point of our investigations on the mode of action of TBT was using a PPAR $\gamma$  antagonist, the T0070907 because previous work carried out on cell cultures of 3T3-L1 preadipocytes were shown that this antagonist could block the obesogenic effect of TBT (Kirchner *et al.*, 2010). This result was in contradiction with the work done previously on the adipocyte line where a lack of blocking the action of TBT by the antagonist GW9662 of PPAR $\gamma$  was observed (Inadera and Shimomura, 2005). The lack of effect of GW9662 to block the differentiation of preadipocytes would be due to the short half-life time of this antagonist in cell culture. TBT can therefore carry out its work after activation of the heterodimer RXR/PPAR $\gamma$  (Li *et al.*, 2011).

Using Rosi as a positive control, we could show, by using the ZO test, that T0070907 blocks the action of this well-known PPAR $\gamma$  agonist (Figure 7 of Chapter II-Tingaud Sequeira *et al.*, 2011; Figure 4 of Chapter III, Ouadah-Boussouf and Babin, 2012). However, the PPAR $\gamma$  antagonist is unable to block the action of TBT on zebrafish WAT (Figure 4 of Chapter III, Ouadah-Boussouf and Babin, 2012). From this result, inconsistent with that obtained in cell culture of preadipocytes, we investigated the *in vivo* mode of action of TBT on the zebrafish WAT in order to characterize the NRs potentially involved.

NRs, and in particular their ligand binding site, are highly conserved during evolution. This generally allows the use of specific agonists and antagonists in interspecies conditions. Among some NRs known to regulate lipid metabolism, *e.g.* ER, PPAR $\alpha$ ,  $\gamma$  and  $\delta$ , RXR and

LXR, the use of specific antagonists resulted in a number of cases, compared to controls, by a higher decrease of adiposity observed during fasting (Figure 1 of Chapter III, Ouadah-Boussouf and Babin, 2012). This concerns T0070907 and GSK3787 respectively antagonists of PPAR $\gamma$  and  $\delta$ , the UVI3003 used as an antagonist of RXR and GSK2033 used as an LXR antagonist. The activity of these NRs may be modulated *in vivo* to modify the level of adiposity in larval zebrafish. So we then focused our work on these NRs.

As indicated in Chapter I (Part N° 2), RXRs represent mandatory heterodimerization partner for many NRs (Mangelsdorf *et al.*, 1990). RXR ligands can stimulate transcriptional activation of their partners when it they are permissive receptors such as PPARs and LXRs (Lefebvre *et al.*, 2010). Using the ZO test, we showed that RXR/PPAR $\gamma$  and RXR/LXR heterodimers may be recruited as modulators of adiposity in larval zebrafish (Figure 2 of Chapter III, Ouadah-Boussouf and Babin, 2012). Concerning the heterodimer RXR/PPAR $\gamma$ , separate use of the agonist of both partners of the heterodimer or both agonists simultaneously shows an obesogenic effect and hypertrophy of adipocytes. PPAR $\gamma$  is known for its obesogenic effect on zebrafish, *Xenopus* and humans (Riu *et al.*, 2011). It has been suggested that this NR is a major target for obesogenic molecules (Kanayama *et al.*, 2005; Janesick and Blumberg, 2011). RXRs are also the target for obesogens and blocking this receptor by the antagonist HX531 may have an anti-diabetic and anti-obesogenic effect. This antagonist could inhibit hypertrophy of adipocytes derived from OLETF rats (Nakatsuka *et al.*, 2012). Our work shows that three different RXR agonists, fluorobexarotene, SR11237 and DHA had an obesogenic activity that can be inhibited by the antagonist UVI3003. Our results show also that inhibition of one of the partners of the RXR/PPAR $\gamma$  heterodimer by its specific antagonist, causes inhibition of the obesogenic effect of the agonist of the other partner. The same result was observed with RXR/LXR heterodimer (Figure 2 of Chapter III, Ouadah-Boussouf and Babin, 2012). This indicates that the fatness of the zebrafish larva can be modulated by these NRs heterodimer forms.

A 24-hour exposure of zebrafish larvae according to the procedure of ZO test with Rosi and GW501516, PPAR $\gamma$  and PPAR $\beta/\delta$  agonists, respectively, induced an increase in adiposity compared to animals exposed to the vehicle (DMSO) alone. This is in agreement with previous observations on the increase in the amount of lipids in cells in culture (Schmuth *et al.*, 2004; Kirchner *et al.*, 2010). In both cases, this effect could be inhibited by specific antagonists of these two NRs, T0070907 and GSK3787, respectively. These two antagonists

have no effect on the obesogenic effect of TBT observed by the ZO test suggesting that TBT does not use PPAR $\gamma$  and PPAR $\beta/\delta$  (Figure 4 of Chapter III, Ouadah-Boussouf and Babin, 2012 ). DHA and GW3965, respectively agonists of RXRs and LXRs, are obesogenic in the same way as TBT (Figure 5 of Chapter III, Ouadah-Boussouf and Babin, 2012). The antagonist of RXR, UVI3003, completely inhibits the effect of DHA and also the obesogenic effect of TBT. GSK2033, an LXRs antagonist, completely inhibits the obesogenic effect of GW3965 but partially the effect of TBT. These results indicate that in WAT of larval zebrafish, TBT achieves its obesogenic effect via RXR/RXR homodimers and LXR/RXR heterodimers. RXR/PPAR $\gamma$  heterodimers does not seem to be involved in the obesogenic effect of TBT but have the potential to be recruited separately in the presence of TBT to modulate adiposity in zebrafish (Figure 6 of Chapter III, Ouadah-Boussouf and Babin, 2012).

Our results indicate that TBT stimulates the deposition of TAG in zebrafish WAT by activating RXR/RXR homodimers and RXR/LXR heterodimers. The schematic representation of the signaling NR pathways involved in TBT-induced hypertrophic adipocytes in living zebrafish is depicted in Figure 7 of Chapter III). This is consistent with the hypothesis originally formulated by Inadera and Shimomura in 2005. The contradictory results obtained by other authors by using cell cultures could possibly be explained by the action of hormonal and/or growth factors present in the culture medium. It should be noted that RXR/RXR homodimer may selectively bind to PPREs (Ijpenberg *et al.*, 2004). In addition, activation of LXRs is involved not only in lipogenesis but also in adipogenesis with an expression of the adipocyte-specific genes in 3T3-L1 cells (Juvet *et al.*, 2003; Seo *et al.*, 2004). The unique counterpart to LXR found in the zebrafish genome is closer to human LXR $\alpha$  than to LXR $\beta$  (Archer *et al.*, 2008). In mouse macrophage RAW264 cells the transcriptional response to TBT is through the RXR/LXR $\alpha$  heterodimer (Cui *et al.*, 2011), indicating that these ED may also, in this cell type, use this heterodimer to carry out its action. The terms of the TBT binding to RXR $\alpha$  are known (Le Maire *et al.*, 2009), but there is no data, to our knowledge, on the ability of TBT to link directly LXR.

### 3. Outlook and conclusion.

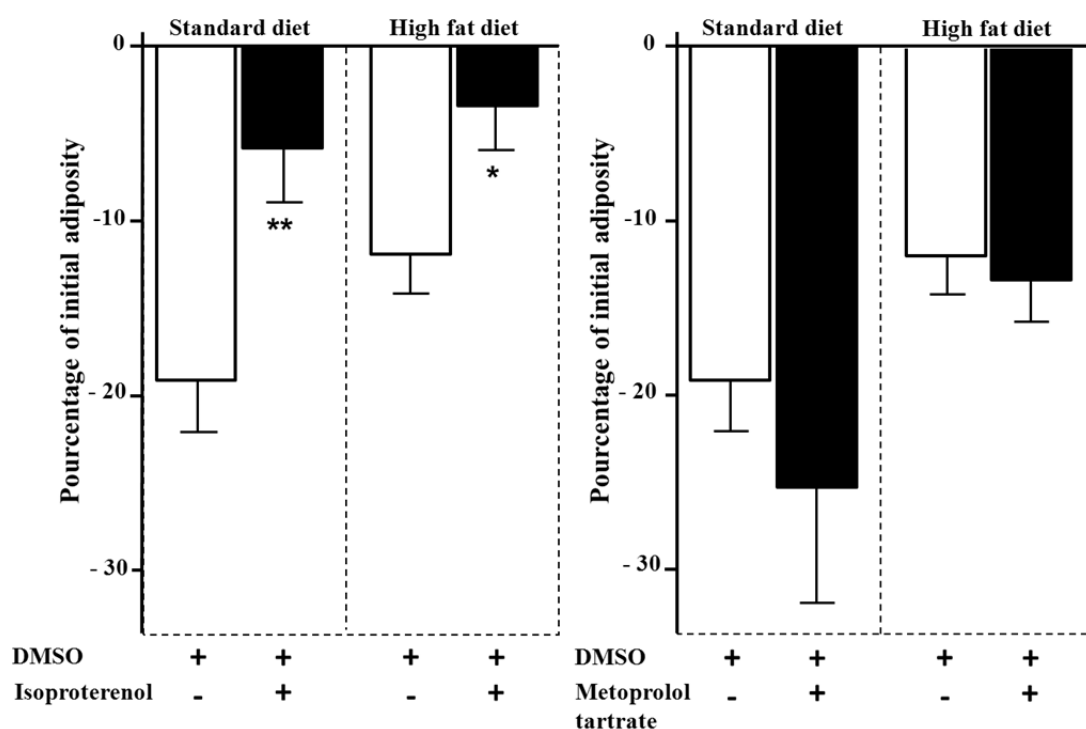
The work carried out within the framework of this work is based on the possibility of using the ZO test. Due to the small size of the larva and very high fecundity of zebrafish, analyzes performed to describe the *in vivo* mode of action of TBT were made possible after using thousands of larvae. This allowed the use of experimental series containing a large number of animals, paired analyzes, and produce a number of interesting independent replicates for each experiment. This power analysis, made possible by the implementation of the ZO test, is very difficult affordable by the use of a rodent model, due to the experimental cost and ethical difficulty engendered to use a large number of mammals.

The ZO test, because of its principle, uses as endpoint the size of the adipocyte lipid droplet, enable to ultimately obtain a quantitative estimate of the level of fat in the live animal. As it has been illustrated by the characterization of the *in vivo* mode of action of TBT via the NRs, we believe that this endpoint is the most appropriate integration level to describe the action of obesogenic or anti-obesogenic molecules. However, a more detailed analysis of the cascade of molecular events that lead to the variation of this endpoint may be necessary. This concerns, for example, the study of the variation of target genes of RXR/RXR homodimer and RXR/LXR heterodimer in the action of TBT. This type of analysis could be easily achieved by real-time quantitative PCR on zebrafish larvae but only in the case of genes, presumably very rare, expressed only in white adipocytes. *In situ in toto* hybridization could be an alternative to the more ubiquitous genes, but this method is only semi-quantitative. It should be noted that in some experimental situations, the variation of transcript levels do not correspond to a concomitant variation of the corresponding proteins and in some cases the observed molecular response can be inverse to the expected physiological response (*e.g.* Thienpont *et al.* 2011).

The ZO test is not limited only to test the effect of molecules via the NRs. In this work we screened molecules, pharmaceuticals, pesticides and other environmental contaminants whose effects may or may not be made by other cellular signaling pathways. For example, phenylephrine, an  $\alpha$ 1-adrenergic agonist, capable of inducing an increase in the lipolytic activity of human WAT (Boschmann *et al.*, 2002), caused a decrease in body fat compared to controls if the larvae were previously fed with a standard diet (Figure 5 of Chapter II, Tingaud-Sequeira *et al.*, 2011). The activity of membrane receptors, *e.g.* of adrenergic type,



can therefore be studied with ZO test. We illustrated this possibility with a second example. It is known that the  $\beta$ 1-adrenergic receptor may be involved in the stimulation of lipolysis in both the WAT and brown adipose tissue of mammals (Atgié *et al.*, 1997, Jimenez *et al.*, 2002). In a teleost, tilapia, measurements on isolated adipocytes showed that the  $\beta$ 1-adrenergic receptor has an opposite role compared to mammals, that is to say, it seems to inhibit lipolysis (Vianen *et al.*, 2001). Using the ZO test, we demonstrated that isoproterenol, an agonist  $\beta$ 1-adrenergic receptor, inhibited the reduction of body fat due to fast. This effect was observed whatever the animals were previously fed with standard or high-fat diets (Figure 38). An antagonist of the same receptor, metoprolol tartrate, had no significant effect by comparison to controls (Figure 38). This result confirms the effectiveness and sensitivity of the ZO test to study *in vivo* the mode of action of different types of molecules on the metabolic activity of WAT.



**Figure 38.** The ZO test is useful to test  $\beta$ 1-adrenergic receptor signaling pathway. A) Isoproterenol is a  $\beta$ 1-adrenergic receptor agonist in mammals but appears to have an opposite activity in zebrafish adipocytes. It inhibited the reduction of body fat due to fast, whatever the animals were previously fed with standard or high-fat diets. B) Metoprolol tartrate is a  $\beta$ 1-adrenergic receptor antagonist in mammals with no significant effect by comparison to controls. The two molecules were tested at a concentration of 10  $\mu$ M. Values are mean  $\pm$  SEM, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 by comparison of averages of control and treated groups using the one-tailed unpaired t-test.

The protocol implemented in the ZO test allows, by a short term exposure to molecules, to determine their ability to modulate the size of adipocyte lipid droplets. The principle used, Nile red staining and acquisition and processing of fluorescence images, can easily be used to study long-term effects of these molecules on the establishment and hyperplasia of adipocyte lineage during development. In this context, preliminary work has been done in this thesis (data not shown). Individual variability in the size of the animals during their development has made it difficult to interpret the data. Optimization of the experimental protocol is therefore necessary for this type of work.

In conclusion, research performed during this PhD program has helped to develop a simple and rapid method, called ZO test, to identify *in vivo*, by use of zebrafish larvae, factors that may increase or decrease the size of the white adipocyte and thus modulate the level of adiposity. This test is implemented in a vertebrate model and enables to identify molecules that target WAT and to study the mechanisms underlying the effect obesogenic and anti-obesogenic molecules. For example, we clarified the mode of action of TBT which acts on the zebrafish WAT via LXR and RXR RNRs and not via PPAR $\gamma/\delta$  isoforms.

***BIBLIOGRAPHIE / REFERENCES***

## A

- Adams NR. Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle. *J Anim Sci* 73, 1509-1515 (1995).
- Adeeko A, Li D, Forsyth DS, Casey V, Cooke GM, Barthelemy J, Cyr DG, Trasler JM, Robaire B, Hales BF. Effects of in Utero Tributyltin Chloride Exposure in the Rat on Pregnancy Outcome. *Toxicol Sci* 74, 407-415 (2003).
- Ailhaud G. Adipose tissue as a secretory organ: from adipogenesis to the metabolic syndrome. *C R Biol* 329(8), 570-7 (2006).
- Alzieu C, Heral M, Thibaud Y, Dardignac MJ, Feuillet M. Influence des peintures Antisalissures à Base d'Organostanniques sur la Calcification de la Coquille de l'Huitre *Crassostrea gigas*. *Rev Trav Inst Peches Marit* 45(2), 101-116 (1982).
- Alzieu C, Michel P. L'étain et les organoétains en milieu marin: Biogéochimie et écotoxicologie. *Rapport scientifiques de l'IFREMER* (1998).
- Alzieu C, Thibaud Y, Héral M, et Boutier B. Evolution des risques dus à l'emploi des peintures anti-salissures dans les zones conchyliocoles. *Rev Trav Inst Peches Marit* 44, 301-349 (1980).
- Alzieu C. Environmental impact of TBT: the french experience. *Sci Total Environ* 258, 99-102 (2000).
- Andral, B, Claisse D, Desbois T, et Percelay J. Bilan de présence des micropolluants dans les eaux littorales. *Ministère de l'écologie, du développement durable, des transports et du logement*. n°54, octobre (2011).
- André M, Ando S, Ballagny C, Durliat M, Poupard G, Briançon C, Babin PJ. Expression of intestinal fatty acid binding protein gene reveals the cephalocaudal patterning during zebrafish gut morphogenesis. *International Journal of Developmental Biology* 44, 249-252 (2000).
- Antizar-Ladislao B. Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT)-contaminated marine environment. A review. *Environ Int* 34(2), 292-308 (2008).
- Archer A, Lauter G, Hauptmann G, Mode A, Gustafsson JA. Transcriptional activity and developmental expression of liver X receptor (lxr) in zebrafish. *Dev Dyn* 237, 1090-1098 (2008).
- Arner P, Bernard S, Salehpour M, Possnert G, Liebl J, Steier P, Buchholz BA, Eriksson M, Arner E, Hauner H, Skurk T, Rydén M, Frayn KN, Spalding KL. Dynamics of human

- adipose lipid turnover in health and metabolic disease. *Nature* 478, 110-113 (2011).
- Atgié C, D'Allaire F, Bukowiecki LJ. Role of beta1- and beta3-adrenoceptors in the regulation of lipolysis and thermogenesis in rat brown adipocytes. *Am J Physiol* 273(4 Pt 1), C1136-42. (1997)
- Ayanda OS, Fatoki OS, Adekola FA, Ximba BJ. Fate and Remediation of Organotin Compounds in Seawaters and Soils. *Chem Sci Trans* 1(3), 470-481 (2012).

## B

- Babin PJ, Vernier JM. Plasma lipoproteins in fish: a review. *J Lipid Res* 30, 467-489, (1989).
- Babin PJ, Gibbons GF. The evolution of plasma cholesterol: direct utility or a "spandrel" of hepatic lipid metabolism? *Prog Lipid Res* 48(2):73-91 (2009).
- Babin PJ, Thisse C, Durliat M, André M, Akimenko MA, Thisse B. Both apolipoprotein E and A-I genes are present in a nonmammalian vertebrate and are highly expressed during embryonic development. *Proceeding National Academy Sciences USA* 94, 8622-8627 (1997).
- Barbier O, Torra IP, Duguay Y, Blanquart C, Fruchart JC, Glineur C, Staels B. Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22(5), 717-726 (2002).
- Belfroid AC, Purperhart M, Ariese F. Organotin Levels in Seafood. *Mar Pollut Bull* 40(3), 226-232 (2000).
- Berger J, Moller DE. The mechanism of action of PPARs. *Annu Rev Med* 53, 409-435 (2002).
- Berghmans S, Butler P, Goldsmith P, Waldron G, Gardner I, Golder Z, Richards FM, Kimber G, Roach A, Alderton W, Fleming A. Zebrafish based assays for the assessment of cardiac, visual and gut function--potential safety screens for early drug discovery. *J Pharmacol Toxicol Methods* 58(1), 59-68 (2008).
- Bo E, Viglietti-Panzica C, Panzica GC. Acute exposure to tributyltin induces c-fos activation in the hypothalamic arcuate nucleus of adult male mice. *Neurotoxicology* 32(2), 277-80 (2011).
- Bonne C. PPAR gamma: a novel pharmacological target against retinal and choroidal neovascularization. *J Fr Ophtalmol* 28(3), 326-330 (2005).
- Boschmann M, Krupp G, Luft FC, Klaus S, Jordan J. *In vivo* response to alpha (1)-adrenoreceptor stimulation in human white adipose tissue. *Obes Res* 10(6):555-8 (2002).

- Boucher J, Castan-Laurell I, Daviaud D, Guigne C, Buleon M, Carpéné C, Saulnier-Blache JS, Valet P. Adipokine expression profile in adipocytes of different mouse models of obesity. *Horm Metab Res* 37(12), 761-767 (2005).
- Bryan GW, Gibbs PE, Burt GR. A Comparison of the Effectiveness of Tri-N-Butyltin Chloride and Five other Organotin Compounds in Promoting the Development of Imposex in the Dog-Whelk, *Nucella Lapillus*. *J Mar Biol Assoc U. K.* 68(04), 733-744 (1988).
- Burr GO, Burr MM. A new deficiency disease produced by rigid exclusion of fat from the diet. *J Biol Chem*, vol, LXXXII, 2(1929).

## C

- Casals-Casas C, Desvergne B. Endocrine Disruptors: From Endocrine to Metabolic Disruption. *Annu Rev Physiol* 73, 135-162 (2011).
- Castro LF, Lima D, Machado A, Melo C, Hiromori Y, Nishikawa J, Nakanishi T, Reis-Henriques MA, Santos MM. Imposex induction is mediated through the Retinoid X Receptor signalling pathway in the neogastropod *Nucella lapillus*. *Aquat Toxicol* 15;85(1), 57-66 (2007).
- Cawthorn WP, Scheller EL, MacDougald OA. Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future. *J Lipid Res* 53, 227-246 (2012).
- Cesario RM, Klausning K, Razzaghi H, Crombie D, Rungta D, Heyman RA, Lala DS. The rexinoid LG100754 is a novel RXR:PPAR $\gamma$  agonist and decreases glucose levels *in vivo*. *Mol Endocrinol* 15(8), 1360-9 (2001).
- Chagot D, Alzieu C, Sanjuan J, and Grizel H. Sublethal and histopathological effects of trace levels of tributyltin fluoride on adult oysters *Crassostrea gigas*. *Aquat Living Resour* 3, 121-130 (1990).
- Chambon P. The nuclear receptor superfamily: A personal retrospect on the first two decades. *Mol Endocrinol* 19(6), 1418-1428 (2005).
- Chambraud B, Berry M, Redeuilh G, Chambon P, Baulieu EE. Several Regions of Human Estrogen Receptor Are Involved in the Formation of Receptor-Heat Shock Protein 90 Complexes. *J Biol Chem* 265, 20686-20691(1990).
- Chaux YK, Yang F, Brown M. Evaluation of derivatization techniques for the analysis of organotin compounds in biological tissue. *Analytica Chimica Acta* 338, 51-55 (1997).
- Chen L, Bush CR, Necela BM, Su W, Yanagisawa M, Anastasiadis PZ, Fields AP, Thompson

- EA. RS5444, a novel PPAR $\gamma$  agonist, regulates aspects of the differentiated phenotype in nontransformed intestinal epithelial cells. *Mol Cell Endocrinol* 251, 17-32 (2006).
- Chien LC, Hung TC, Choang KY, Yeh CY, Meng PJ, Shieh MJ, Ha BC. Daily intake of TBT, Cu, Zn, Cd and As for fishermen in Taiwan. *Sci Total Environ* 285, 177-185 (2002).
- Cho EM, Lee HS, Moon JS, Kim IS, Sim S, Ohta A. Organotin compounds act as inhibitor of transcriptional activation with human estrogen receptor. *J Microbiol Biotechnol* 22(3), 378-384 (2012).
- Clark EA, Stemt RM, Leste JN. The fate of tributyltin in the aquatic environment. *Environ. Sci. Technol* 22, 6 (1988).
- Colborn T, vom Saal FS, Soto AM. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* 101(5), 378-84 (1993).
- Colborn T. Statement from the Work Session on Chemically-induced Alterations in the Developing Immune System: The Wildlife/Human Connection. *Environ Health Perspect* 104(Suppl 4), 807-808(1996).
- Coray C, Bard SM. Persistence of Tributyltin-Induced Imposéx in Dogwhelks(*Nucella lapillus*) and Intersex in Periwinkles (*Littorina littorea*) in Atlantic Canada. *Water Qual Res J Canada* 42, 111-122 (2007).
- Cruz-Garcia L, Sánchez-Gurmaches J, Gutiérrez J, Navarro I. Role of LXR in trout adipocytes: Target genes, hormonal regulation, adipocyte differentiation and relation to lipolysis. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 163(1), 120-126 (2012).
- Cui H, Okuhira K, Ohoka N, Naito M, Kagechika H, Hirose A, Nishimaki-Mogami T. Tributyltin chloride induces ABCA1 expression and apolipoprotein A-I-mediated cellular cholesterol efflux by activating LXR $\alpha$ /RXR. *Biochem Pharmacol* 81(6), 819-24 (2011).

## D

- Dardour JC. New anatomical approach of adipose tissue. *Ann Chir Plast Esthet* 57(5), 454-464 (2012).
- Darimont C, Avanti O, Zbinden I, Leone-Vautravers P, Mansourian R, Giusti V, Macé K. Liver X receptor preferentially activates de novo lipogenesis in human preadipocytes. *Biochimie* 88, 309-318 (2006).
- Dawson MI, Xia Z. The retinoid X receptors and their ligands. *Retinoid and Lipid Metabolism*

- 1821, 21-56 (2012).
- de Saint Pol T. comment mesurer la corpulence et le poids" idéal"? Histoire, intérêts et limites de l'indice de masse corporelle. *Notes et documents, Paris, OSC*, Mai (2007).
- Desvergne B, Michalik L, Wahli W. Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol Rev* 86(2), 465-514 (2006).
- Devier MH, Augagneur S, Budzinski H, Le Menach K, Mora P, Narbonne JF, Garrigues P. One-year monitoring survey of organic compounds (PAHs, PCBs, TBT), heavy metals and biomarkers in blue mussels from the Arcachon Bay, France. *J Environ Monit* 7, 224-240 (2005).
- DGHCP. Assessment of the dietary exposure to organotin compounds of the population of the EU Member States. *Directorate-General Health and Consumer Protection* (2003).
- Ducharme NA, Bickel PE. Lipid Droplets in Lipogenesis and Lipolysis. *Endocrinology* 149(3), 942-949 (2008).

## E

- Eckel RH, Krauss RM. American Heart Association call to action: obesity as a major risk factor for coronary heart disease. *Circulation* 97(21), 2099-2100 (1998).
- Elo B, Villano CM, Govorko D, White LA. Larval zebrafish as a model for glucose metabolism: expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase as a marker for exposure to anti-diabetic compounds. *J Mol Endocrinol* 38(4), 433-40 (2007).
- Escher P, Braissant O, Basu-Modak S, Michalik L, Wahli W, Desvergne B. PPARs: quantitative analysis in adult rat tissues and regulation in fasting and refeeding. *Endocrinology* 142, 4195-4202 (2001).
- Escher P, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. *Mutat Res* 448: 121-138 (2000).
- Escriva H, Safi R, Hanni C, Langlois MC, Saumitou-Laprade P, Stehelin D, Capron A, Pierce R, Laudet V. Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:6803-6808 (1997).
- Evans SM, Leksono T, McKinnell PD. Tributyltin pollution: Adiminishing problem following legislation limiting the use of TBT-based anti-fouling paints. *Marine Pollution Bulletin* 30(1), 14-21 (1995).



## F

- Farber SA, Pack M, Ho SY, Johnson ID, Wagner DS, Dosch R, Mullins MC, Hendrickson HS, Hendrickson EK, Halpern ME. Genetic Analysis of Digestive Physiology Using Fluorescent Phospholipid Reporters. *Science* 292 (5520), 1385-1388 (2001).
- Farmer SR. Regulation of PPARgamma activity during adipogenesis. *Int J Obes (Lond)* 2005 29, S13-6 (2005).
- Farnier C, Krief S, Blache M, Diot-Dupuy F, Mory G. Adipocyte functions are modulated by cell size change: potential involvement of an integrin/ERK signalling pathway. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27, 1178-1186 (2003).
- Feng W, Ribeiro RC, Wagner RL, Nguyen H, Apriletti JW, Fletterick RJ, Baxter JD, Kushner PJ, West BL. Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors. *Science* 280, 1747-1749 (1998).
- Fève B, Moldes M, El hadri K, Lasnier F, Pairault J. La différenciation adipocytaire: tout un programme. *Médecine/sciences* 14, 848-857 (1998).
- Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Curtin LR. Prevalence and Trends in Obesity Among US Adults, 1999-2008. *JAMA* 303(3), 235-241 (2010).
- Flynn III EJ, Trent CM, Rawls JF. Ontogeny and nutritional control of adipogenesis in zebrafish (*Danio rerio*). *J Lipid Res* 50(8), 1641-52 (2009).
- Forman BM, Chen J, Evans RM. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(9), 4312-4317(1997).
- Forsyth DS, Sun WF, Dalglisch K. Survey of organotin compounds in blended wines. *Food Addit Contam* 11(3), 343-350 (1994).
- Fraysse B, Mons R, Garric J. Development of a zebrafish 4-day embryo-larval bioassay to assess toxicity of chemicals. *Ecotoxicol Environ Saf* 63(2), 253-267 (2006).
- Fromme H, Mattulat A, Lahrz T, Rüden H. Occurrence of organotin compounds in house dust in Berlin (Germany). *Chemosphere* 58(10), 1377-1383 (2005).

## G

- Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol* 316, 129-139 (2010).
- Germain P, Staels B, Daquet C, Spedding M, Laudet V. Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* 58, 685-704 (2006).

- Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* 131, 242-256 (2007).
- Gimble JM, Nuttall ME. The relationship between adipose tissue and bone metabolism. *Clin Biochem* 45(12), 874-9 (2012).
- Greenspan P, Fowler SD. Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red. *J Lipid Res* 26, 781-789 (1985).
- Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78, 783-809 (1998).
- Gronemeyer H, Gustafsson JA, Laudet V. Principles for modulation of the nuclear receptors superfamily. *Nat Rev Drug Discov* 3(11), 950-964 (2004).
- Grün F, Blumberg B. Endocrine disruptors as obesogens. *Mol Cell Endocrinol* 304(1-2): 19-29 (2009b)
- Grün F, Blumberg B. Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. *Endocrinology* 147, S50-5 (2006b).
- Grün F, Blumberg B. Minireview: The Case for Obesogens. *Mol Endocrinol* 23(8), 1127-1134 (2009a).
- Grün F, Watanabe H, Zamanian Z, Maeda L, Arima K, Cubacha R, Gardiner DM, Kanno J, Iguchi T, Blumberg B. Endocrine-disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. *Mol Endocrinol* 20(9), 2141-55 (2006a).

## H

- Han TS, Tajar A, Lean ME. Obesity and weight management in the elderly. *Br Med Bull* 97, 169-196 (2011).
- Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor- $\alpha$  knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(23), 12729-1273 (2000).
- Hiromori Y, Nishikawa J, Yoshida I, Nagase H, Nakanishi T. Structure-dependent activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma by organotin compounds. *Chem Biol Interact* 15;180(2):238-44 (2009).
- His E, Robert R. Développement des veligères de *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon. Etudes sur les mortalités larvaires. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 47, 63-88 (1983).

- Hoch, M . Organotincompounds in the environment - an overview. *Applied Geochemistry* 16, 7-8 (2001).
- Hölttä-Vuori M, Salo VT, Nyberg L, Brackmann C, Enejder A, Panula P, Ikonen E. Zebrafish: gaining popularity in lipid research. *Biochem J* 429(2), 235-42 (2010).
- Huggett RJ, Unger MA, Seligman PF, Valkirs AO. The marine biocide tributyltin. Assessing and managing the environmental risks. *Environ Sci Technol* 26 (2), 232-237 (1992).

## I

- Ibabe A, Bilbao E, Cajaraville MP. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in zebrafish (*Danio rerio*) depending on gender and developmental stage. *Histochem Cell Biol* 123(1), 75-87 (2005).
- Ibabe A, Grabenbauer M, Baumgart E, Fahimi HD, Cajaraville MP. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in zebrafish (*Danio rerio*). *Histochem Cell Biol* 118, 231-239 (2002).
- Ijpenberg A, Tan NS, Gelman L, Kersten S, Seydoux J, Xu J, Metzger D, Canaple L, Chambon P, Wahli W, Desvergne B. *In vivo* activation of PPAR target genes by RXR homodimers. *EMBO J* 19;23(10):2083-91 (2004).
- Imrie D, Sadler KC. White Adipose Tissue Development in Zebrafish Is Regulated by Both Developmental Time and Fish Size. *Dev Dyn* 239, 3013-3023 (2010).
- Inadera H, Shimomura A. Environmental chemical tributyltin augments adipocyte differentiation. *Toxicol Lett* 159(3), 226-34 (2005).
- Iwata H, Tanabe S, Mizuno T, Tatsukawa R. High accumulation of toxic butyl-ins in marine mammals from Japanese coastal waters. *Environ Sci Technol* 29, 2959-2962 (1995).

## J

- Jagadeeswaran P. Zebrafish: a tool to study hemostasis and thrombosis. *Curr Opin Hematol* 12, 149-152 (2005).
- Janesick A, Blumberg B. Minireview: PPAR $\gamma$  as the target of obesogens. *J Steroid Biochem Mol Biol* 127, 4-8 (2011).
- Janesick, A, Blumberg B. Obesogens, stem cells and the developmental programming of obesity. *Int J Androl* 35(3), 437-448 (2012).
- Javor ED, Cochran EK, Musso C, Young JR, DePaoli AM, Gorden P. Long-Term Efficacy of

- Leptin Replacement in Patients With Generalized Lipodystrophy. *Diabetes* 54, 1994-2002 (2005).
- Jenkins CM, Mancuso DJ, Yan W, Sims HF, Gibson B, Gross RW. Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *J Biol Chem* 19:279(47), 48968-75 (2004)
- Jensen EV, Khan SA. A two-site model for antiestrogen action. *Mech Ageing dev* 125, 679-682 (2004).
- Jimenez M, Léger B, Canola K, Lehr L, Arboit P, Seydoux J, Russell AP, Giacobino JP, Muzzin P, Preitner F. Beta(1)/beta(2)/beta(3)-adrenoceptor knockout mice are obese and cold-sensitive but have normal lipolytic responses to fasting. *FEBS Lett* 530(1-3), 37-40 (2002).
- Jones KS, Alimov AP, Ril HL, Jandacek RJ, Woollett LA, Penberthy WT. A high throughput live transparent animal bioassay to identify non-toxic small molecules or genes that regulate vertebrate fat metabolism for obesity drug development. *Nutr Metab (Lond)* 5, 23 (2008).
- Juvet LK, Andresen SM, Schuster GU, Dalen KT, Tobin KA, Hollung K, Haugen F, Jacinto S, Ulven SM, Bamberg K, Gustafsson JA, Nebb HI. On the role of liver X receptors in lipid accumulation in adipocytes. *Mol Endocrinol* 17(2),172-82 (2003).

## K

- Kanayama T, Kobayashi N, Mamiya S, Nakanishi T, Nishikawa J. Organotin compounds promote adipocyte differentiation as agonists of the peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ /retinoid X receptor pathway. *Mol Pharmacol* 67(3), 766-774 (2005).
- Kannan K, Senthilkumar K, Giesy JP. Occurrence of Butyltin Compounds in Human Blood. *Environ Sci Technol* 33(10), 1776-1779 (1999).
- Karpe F, Ehrenborg EE. PPARdelta in humans: genetic and pharmacological evidence for a significant metabolic function. *Curr Opin Lipidol* 20(4), 333-336 (2009).
- Kase ET, Thoresen GH, Westerlund S, Højlund K, Rustan AC, Gaster M. Liver X receptor antagonist reduces lipid formation and increases glucose metabolism in myotubes from lean, obese and type 2 diabetic individuals. *Diabetologia* 50(10), 2171-80 (2007).
- Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, Lucier G, Luster M,

- Mac MJ, Maczka C, Miller R, Moore J, Rolland R, Scott G, Sheehan DM, Sinks T, Tilson HA. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect* 104(Suppl 4), 715-740 (1996).
- Keys A, Fidanza F, Karvonen MJ, Kimura N, Taylor HL. Indices of relative weight and obesity. *J Chronic Dis* 25, 329-343(1972).
- Kirchner S, Kieu T, Chow C, Casey S, Blumberg B. Prenatal exposure to the environmental obesogen tributyltin predisposes multipotent stem cells to become adipocytes. *Mol Endocrinol* 24(3), 526-39 (2010).
- Kitamura T, Kitamura Y, Kuroda S, Hino Y, Ando M, Kotani K, Konishi H, Matsuzaki H, Kikkawa U, Ogawa W, Kasuga M. Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt. *Mol Cell Biol* 19(9), 6286-6296 (1999).
- Krug HF. Caspase-10 is the key initiator caspase involved in tributyltin-mediated apoptosis in human immune cells. *J Toxicol* 2012, 395482 (2012).
- Kucuksezgin F, Aydin-Onen S, Gonul LT, Pazi I, Kocak F. Assessment of organotin (butyltin species) contamination in marine biota from the Eastern Aegean Sea, Turkey. *Mar Pollut Bull* 62(9), 1984-8 (2011).

## L

- Langheinrich U. Zebrafish: a new model on the pharmaceutical catwalk. *Bioessays* 25(9), 904-912 (2003).
- Laudet V. Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J Mol Endocrinol* 19, 207-226 (1997).
- Laurencikienė J, Rydén M. Liver X receptors and fat cell metabolism. *Int J Obes (Lond)* doi:10.1038/ijo.2012.21 (2012).
- le Maire A, Grimaldi M, Roecklin D, Dagnino S, Vivat-Hannah V, Balaguer P, Bourguet W. Activation of RXR-PPAR heterodimers by organotin environmental endocrine disruptors. *EMBO reports* 10(4), 367-373 (2009).
- Leaf A, Weber PC. A new era for science in nutrition. *Am J Clin Nutr* 45, 1048-1053(1987).
- Leaver MJ, Ezaz MT, Fontagne S, Tocher DR, Boukouvala E, Krey G. Multiple peroxisome proliferator-activated receptor beta subtypes from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J Mol*

- Endocrinol* 38, 391-400 (2007).
- Lee G, Elwood F, McNally J, Weiszmann J, Lindstrom M, Amaral K, Nakamura M, Miao S, Cao P, Learned RM, Chen JL, Li Y. T0070907, a selective ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma, functions as an antagonist of biochemical and cellular activities. *J Biol Chem* 277(22):19649-57(2002).
- Lefebvre M, Paulweber B, Fajas L, Woods J, McCrary C, Colombel JF, Najib J, Fruchart JC, Datz C, Vidal H, Desreumaux P, Auwerx J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is induced during differentiation of colon epithelium cells. *J Endocrinol* 162(3), 331-340 (1999).
- Lefebvre P, Benomar Y, Steals B. Retenoid X receptors: common heterodimerization partners with distinct functions. *Cell* 21, 676-683 (2010).
- Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem* 270(22), 12953-6 (1995 ).
- Leibowitz MD, Fiévet C, Hennuyer N, Peinado-Onsurbe J, Duez H, Bergera J, Cullinan CA, Sparrow CP, Baffic J, Berger GD, Santini C, Marquis RW, Tolman RL, Smith RG, Moller DE, Auwerx J. Activation of PPARdelta alters lipid metabolism in db/db mice. *FEBS Lett* 473, 333-336 (2000).
- Leonhardt W, Hanefeld M, Julius U, Schulze J, Fischer S, Weck M, Haller H. Predictive value of the index of desirable body weight for total body fat mass as measured by dilution of tritiated water - problems and limitations. *Int J Obes* 11, 221-228 (1987).
- Letexier D, Pinteur C, Large V, Frering V, Beylot M. Comparison of the expression and activity of the lipogenic pathway in human and rat adipose tissue. *J Lipid Res* 44(11),2127-2134 (2003).
- Li X, Ycaza J, et B Blumberg. The environmental obesogen tributyltin chloride acts via peroxisome proliferator activated receptor gamma to induce adipogenesis in murine 3T3-L1 preadipocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 127(1-2), 9-15 (2011).
- Lima D, Reis-Henriques MA, Silva R, Santos AI, Castro LF, Santos MM. Tributyltin-induced imposex in marine gastropods involves tissue-specific modulation of the retinoid X receptor. *Aquat Toxicol* 17,101(1), 221-7 (2011).
- Lobaccaro JM, Repa JJ, Lu TT, Caira F, Henry-Berger J, Volle DH, Mangelsdorf DJ. Regulation of lipid metabolism by the orphan nuclear receptors. *Ann Endocrinol (Paris)* 62(3), 239-247 (2001).

## M

- Ma H, Dai S, Huang G. Distribution of tributyltin chloride in laboratory simulated estuarine microcosms. *Water Research* 34(10), 2829–2841 (2000).
- Mangelsdorf DJ, Evans RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83, 841-850 (1995).
- Mangelsdorf DJ, Ong ES, Dyck JA, Evans RM. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* 345, 224-229 (1990).
- Marty MS, Carney EW, Rowlands JC. Endocrine disruption: historical perspectives and its impact on the future of toxicology testing. *Toxicol Sci* 120 (Suppl 1), S93-108 (2011).
- Marza E, Barthe C, Andre M, Villeneuve L, Helou C, Babin PJ. Developmental expression and nutritional regulation of a zebrafish gene homologous to mammalian microsomal triglyceride transfer protein large subunit. *Developmental Dynamics* 232: 506-518 (2005).
- Matsubara Y, Sato K, Ishii H, Akiba Y. Changes in mRNA expression of regulatory factors involved in adipocyte differentiation during fatty acid induced adipogenesis in chicken. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 141(1), 108-15 (2005).
- Matsusue K, Peters JM, Gonzalez FJ. PPARbeta/delta potentiates PPARgamma-stimulated adipocyte differentiation. *FASEB J* 18(12), 1477-9 (2004).
- McAllister BG, Kime DE. Early life exposure to environmental levels of the aromatase inhibitor tributyltin causes masculinisation and irreversible sperm damage in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol* 19;65(3):309-16 (2003 ).
- McGinnis CL, Crivello JF. Elucidating the mechanism of action of tributyltin (TBT) in zebrafish. *Aquat Toxicol* 103(1-2), 25-31 (2011).
- McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 20(3), 321-344 (1999).
- Michel P, Averty B. Contamination of French Coastal Waters by Organotin Compounds: 1997 Update. *Mar Pollut Bull* 38(4), 268-275 (1999).
- Micozzi MS, Albanes D, Jones DY, Chumlea WC. Correlations of body mass indices with weight, stature, and body composition in men and women in NHANES I and II. *Am J Clin Nutr* 44, 725-735 (1986).
- Minucci S, Leid M, Toyama R, Saint-Jeannet JP, Peterson VJ, Horn V, Ishmael JE,

- Bhattacharyya N, Dey A, Dawid IB, Ozato K. Retinoid X receptor (RXR) within the RXR-retinoic acid receptor heterodimer binds its ligand and enhances retinoid-dependent gene expression. *Mol Cell Biol* 17(2), 644-655 (1997).
- Morais S, Knoll-Gellida A, André M, Barthe C, Babin PJ. Conserved expression of alternative splicing variants of peroxisomal *acyl-CoA oxidase 1* in vertebrates and developmental and nutritional regulation in fish. *Physiological Genomics* 28: 239-252 (2007).
- Morcillo Y, Porte C. Interaction of tributyl- and triphenyltin with the microsomal monooxygenase system of molluscs and fish from the Western Mediterranean. *Aquat Toxicol* 38, 35-46 (1997).
- Mouzat K, Alves G, Pommier A, Viennois E, Pihen T, Caira F, Baron S, A Lobaccaro JM. Nuclear liver X receptors are involved in the biology of reproduction. *Med Sci (Paris)* 25, 141-144 (2009).
- Mueckler M. Family of glucose-transporter genes. Implications for glucose homeostasis and diabetes. *Diabetes* 39(1), 6-11 (1990).
- Murphy TK, Calle EE, Rodriguez C, Kahn HS, Thun MJ. Body Mass Index and Colon Cancer Mortality in a Large Prospective Study. *Am J Epidemiol* 152(9), 847-54 (2000).

## N

- Nakanishi T, Nishikawa J, Hiromori Y, Yokoyama H, Koyanagi M, Takasuga S, Ishizaki J, Watanabe M, Isa S, Utoguchi N, Itoh N, Kohno Y, Nishihara T, Tanaka K. Trialkyltin compounds bind retinoid X receptor to alter human placental endocrine functions. *Mol Endocrinol* 19(10), 2502-2516 (2005).
- Nakanishi T, Nishikawa J, Tanaka K. Molecular targets of organotin compounds in endocrine disruption: do organotin compounds function as aromatase inhibitors in mammals? *Environ Sci* 13(2), 89-100 (2006).
- Nakanishi T. Endocrine disruption induced by organotin compounds: organotins function as a powerful agonist for nuclear receptors rather than an aromatase inhibitor. *J Toxicol Sci* 33(3), 269-276 (2008).
- Nakanishi T. Potential toxicity of organotin compounds via nuclear receptor signaling in mammals. *J Health Sci* 53(1), 1-9 (2007).
- Nakano R, Kurosaki E, Yoshida S, Yokono M, Shimaya A, Maruyama T, Shibasaki M. Antagonism of peroxisome proliferator-activated receptor gamma prevents high-fat diet-



- induced obesity *in vivo*. *Biochem Pharmacol* 72(1), 42-52 (2006).
- Nakatsuka A, Wada J, Hida K, Hida A, Eguchi J, Teshigawara S, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Ogawa D, Kagechika H, Makino H. RXR antagonism induces G0 /G1 cell cycle arrest and ameliorates obesity by up-regulating the p53-p21(Cip1) pathway in adipocytes. *J Pathol* 226(5), 784-95 (2012).
- Nalbone, G, Cicolella A, Laot-Cabon S. L'exposition humaine au bisphénol A : un facteur de risque environnemental des maladies métaboliques et cardiovasculaires. *Médecine & Longévité* 3(1), 42-51 (2011).
- Narlikar GJ, Fan HY, Kingston RE. Cooperation between Complexes that Regulate Chromatin Structure and Transcription. *Cell* 108(4), 475-487 (2002).
- Newbold RR, Padilla-Banks E, Jefferson WN. Environmental estrogens and obesity. *Mol Cell Endocrinol* 304(1-2), 84-89 (2009).
- Nguyen T, Lau DC. The obesity Epidemic and its Impact on Hypertension. *Can J Cardiol* 28, 326-333(2012).
- Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson J. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 81(4), 1535-1565 (2001).
- Nishikawa J, Mamiya S, Kanayama T, Nishikawa T, Shiraishi F, Horiguchi T. Involvement of the retinoid X receptor in the development of imposex caused by organotins in gastropods. *Environ Sci Technol* 38(23), 6271-6276 (2004).
- Novák, J, Beníšek M, Hilscherová K. Disruption of retinoid transport, metabolism and signaling by environmental pollutants. *Environ Int* 34 , 898-913 (2008).
- Nuclear Receptors Nomenclature Committee. A Unified Nomenclature System for the Nuclear Receptor Superfamily. *Cell* 97, 161–163 (1999).

## O

- Oberdörster E, McClellan-Green P. Mechanisms of imposex induction in the mud snail, *Ilyanassa obsoleta*: TBT as a neurotoxin and aromatase inhibitor. *Mar Environ Res* 54(3-5), 715-718 (2002).
- Ogden, Cynthia L, Margaret D Carroll, Brian K. Kit, et Katherine M. Flegal. Prevalence of obesity and trends in body mass index among US children and adolescents, 1999-2010. *JAMA* 307(5), 483-490 (2012):

- Ogilvie KM, Saladin R, Nagy TR, Urcan MS, Heyman RA, Leibowitz MD. Activation of the Retinoid X Receptor Suppresses Appetite in the Rat. *Endocrinology* 145(2), 565-573 (2004).
- Oka T, Nishimura Y, Zang L, Hirano M, Shimada Y, Wang Z, Umemoto N, Kuroyanagi J, Nishimura N, Tanaka T. Diet-induced obesity in zebrafish shares common pathophysiological pathways with mammalian obesity. *BMC Physiol* 10:21 (2010).
- Okoro HK, Fatoki OS, Adekola FA, Ximba BJ, Snyman RG, Opeolu B. Human exposure, biomarkers, and fate of organotins in the environment. *Rev Environ Contam Toxicol* 213, 27-54 (2011).
- Olefsky, JM. Nuclear receptor minireview series. *J Biol Chem* 276, 36863-36864 (2001).
- OMS. Concise International Chemical Assessment Document 14, TRIBUTYLTIN OXIDE. Geneva,; *World Health Organization* (1999).
- OMS. Obésité et surpoids. *Organisation mondiale de la santé*, Aide-mémoire N°311, Mai 2012.
- Osuga J, Ishibashi S, Oka T, Yagyu H, Tozawa R, Fujimoto A, Shionoiri F, Yahagi N, Kraemer FB, Tsutsumi O, Yamada N. Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(2), 787-792 (2000).
- Ouadah-Boussouf N, Babin PJ. The environmental obesogen tributyltin chloride acts through RXR and LXR but not PPARgamma/delta isoforms to induce hypertrophic adipocytes in live zebrafish. *In preparation* (2012).
- Ouchi, N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 11, 85-97 (2011).

## P

- Peet DJ, Janowski BA, Mangelsdorf DJ. The LXRs: a new class of oxysterol receptors. *Curr Opin Genet Dev* 8(5), 571-575 (1998).
- Penninks AH. The evaluation of data-derived safety factors for bis(tri-n-butyltin)oxide. *Food Addit Contam.* 10(3), 351-61 (1993).
- Penza M, Jeremic M, Marrazzo E, Maggi A, Ciana P, Rando G, Grigolato PG, Di Lorenzo D. The environmental chemical tributyltin chloride (TBT) shows both estrogenic and adipogenic activities in mice which might depend on the exposure dose. *Toxicol Appl*

*Pharmacol* 255(1), 65-75 (2011).

Pereira WE, Hostettler FD, Wade TL. Butyltin Contamination in Sediments and Lipid Tissues of the Asian Clam, *Potamocorbula amurensis*, near Mare Island Naval Shipyard, San Francisco Bay. *Mar Pollut Bull* 38(11), 1005-1010 (1999).

Philip S, Castro LF, da Fonseca RR, Reis-Henriques MA, Vasconcelos V, Santos MM, Antunes A. Adaptive evolution of the Retinoid X receptor in vertebrates. *Genomics* 99(2), 81-89 (2012).

Pittenger, MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R., Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Mars DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147 (1999).

Piver WT. Organotin Compounds: Industrial Applications and Biological Investigation. *Environ Health Perspect* 4, 61-79 (1973).

Pourcet B, Fruchart JC, Staels B, Glineur C. Selective PPAR modulators, dual and pan PPAR agonists: multimodal drugs for the treatment of type 2 diabetes and atherosclerosis. *Expert Opin Emerg Drugs* 11(3), 379-401 (2006).

Pratt WB, Toft DO. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* 18(3), 306-360 (1997).

## R

Raldúa D, Babin PJ. BLT-1, a specific inhibitor of the HDL receptor SR-BI, induces a copper-dependent phenotype during zebrafish development. *Toxicology Letters* 175(1-3), 1-7 (2007).

Raldúa D, Babin PJ. Simple, rapid zebrafish larva bioassay for assessing the potential of chemical pollutants and drugs to disrupt thyroid gland function. *Environ Sci Technol* 43(17), 6844-50 (2009).

Raldúa D, Thienpont B, Babin PJ. Zebrafish eleutheroembryos as an alternative system for screening chemicals disrupting the mammalian thyroid gland morphogenesis and function. *Reprod Toxicol* 33(2), 188-97 (2012).

Rastkari N, Mesdaghinia A, M Yunesian , et R Ahmadkhaniha . «Butyltin compounds in fish commonly sold in north of Iran. *Bull Environ Contam Toxicol* 88(1), 74-77 (2012).

Riu A, Grimaldi M, le Maire A, Bey G, Phillips K, Boulahtouf A, Perdu E, Zalko D, Bourguet W, Balaguer P. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  is a target for halogenated

- analogs of bisphenol A. *Environ Health Perspect* 119(9), 1227-1232 (2011).
- Robinson-Rechavi M, Escriva Garcia H, Laudet V. The nuclear receptor superfamily. *J Cell Sci* 116, 585-586 (2003).
- Robinson-Rechavi, M, Carpentier AS, Duffraisse M, Laudet V. How many nuclear receptors are there in the human genome?. *Trends in Genetics* 17, 554-556 (2001).
- Romek M, Gajda B, Krzysztofowicz E, Kepczynski M, Smorag Z. New technique to quantify the lipid composition of lipid droplets in porcine oocytes and pre-implantation embryos using Nile Red fluorescent probe. *Theriogenology* 75, 42-54 (2011).
- Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes development* 14, 950-953 (2000).
- Ross SE, Hematie N, Longo KA, Bennet CN, Lucas PC. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science* 289, 950-953 (2000).
- Ruiz, JM, Bachelet G, Caumette P, Donarda OFX. Threedecades of tributyltin in the coastal environment with emphasis on Arcachon Bay, France. *Environ Poll* 93(2), 195–203 (1996).

## S

- Sakaue H, Ogawa W, Matsumoto M, Kuroda S, Takata M *et al.*, Posttranscriptional control of adipocyte differentiation through activation of phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 273(44): 28945-28952(1998).
- Sasser TA, Chapman SE, Li S, Hudson C, Orton SP, Diener JM, Gammon ST, Correcher C, Leevy WM. Segmentation and measurement of fat volumes in murine obesity models using X-ray computed tomography. *J Vis Exp* 62, e3680 (2012).
- Schmuth M, Haqq CM, Cairns WJ, Holder JC, Dorsam S, Chang S, Lau P, Fowler AJ, Chuang G, Moser AH, Brown BE, Mao-Qiang M, Uchida Y, Schoonjans K, Auwerx J, Chambon P, Willson TM, Elias PM, Feingold KR. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-beta/delta stimulates differentiation and lipid accumulation in keratinocytes. *J Invest Dermatol* 122(4), 971-83 (2004).
- Segner H. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 149(2), 187-95 (2009).
- Seligman PF, Grovhoug JG, Richter K. Measurement of Butyltins in San Diego Bay, CA: A Monitoring Strategy. *Organotin Symposium. Washington, DC, USA: OCEANS* 86

- (1986).
- Seo JB, Moon HM, Kim WS, Lee YS, Jeong HW, Yoo EJ, Ham J, Kang H, Park MG, Steffensen KR, Stulnig TM, Gustafsson JA, Park SD, Kim JB. Activated liver X receptors stimulate adipocyte differentiation through induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression. *Mol Cell Biol* 24(8), 3430-44 (2004).
- Sethi JK, Vidal-Puig AJ. Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J Lipid Res* 48(6),1253-62 (2007).
- Shen W, Wang Z, Punyanita M, Lei J, Sinav A, Kral JG, Imielinska C, Ross R, Heymsfield SB. Adipose tissue quantification by imaging methods: a proposed classification. *Obes Res* 11(1), 5-16 (2003).
- Shi, H, Zhu P, Sun Z, Yang B, Zheng L. Divergent teratogenicity of agonists of retinoid X receptors in embryos of zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology* 21, 1465-1475 (2012).
- Smas CM, Chen L, Zhao L, Latasa MJ, Sul HS. Transcriptional repression of pref-1 by glucocorticoids promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 274(18), 12632-12641 (1999).
- Smith BS. Tributyltin compounds induce male characteristics on female mud snails *Nassarius obsoletus* = *Ilyanassa obsoleta*. *J Appl Toxicol* 1(3), 141-144 (1981).
- Song Y, Cone RD. Creation of a genetic model of obesity in a teleost. *FASEB J* 21(9):2042-9 (2007).
- Sonoda J, Pei L, Evans RM. Nuclear receptors: decoding metabolic disease. *FEBS Letters* 582, 2-9 (2008).
- Sousa ACA, Barroso CM, Tanabe S, Horiguchi T. Involvement of Retinoid X Receptor in Imposex Development in *Nucella lapillus* and *Nassarius reticulatus*-Preliminary Results. *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry - Biological Responses to Contaminants*, 189-196 (2010).
- Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, Schoonjans K, Leitersdorf E, Fruchart JC. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation* 98, 2088-2093 (1998).
- Stange D, Sieratowicz A, Oehlmann J. Imposex development in *Nucella lapillus*--evidence for the involvement of retinoid X receptor and androgen signalling pathways *in vivo*. *Aquat Toxicol* 15, 106-107, 20-4 (2012).
- Stange D, Sieratowicz A, Oehlmann J. Imposex development in *Nucella lapillus*--evidence for the involvement of retinoid X receptor and androgen signalling pathways *in vivo*. *Aquat Toxicol* 106-107, 20-4 (2012).

Sullivan C, Kim CH. Zebrafish as a model for infectious disease and immune function. *Fish Shellfish Immunol* 25, 341-350 (2008).

## T

Takasawa K, Kubota N, Terauchi Y, Kadowaki T. Impact of increased PPARgamma activity in adipocytes *in vivo* on adiposity, insulin sensitivity and the effects of rosiglitazone treatment. *Endocr J* 55(4), 767-776 (2008).

Tallafuss A, Hale LA, Yan YL, Dudley L, Eisen JS, Postlethwait JH. Characterization of retinoid-X receptor genes rxra, rxrba, rxrbb and rxrg during zebrafish development. *Gene Expr Patterns* 6, 556-565 (2006).

Tang QQ, Lane MD. Adipogenesis: From stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem* 81, 715-736 (2012).

Teeguarden JG, Calafat AM, Ye X, Doerge DR, Churchwell MI, Gunawan R, Graham MK. Twenty-four hour human urine and serum profiles of bisphenol a during high-dietary exposure. *Toxicol Sci.* 123, 48-57 (2011).

Tchoukalova YD, Votruba SB, Tchkonina T, Giorgadze N, Kirkland JL, Jensen MD. Regional differences in cellular mechanisms of adipose tissue gain with overfeeding. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 18226-18231 (2010).

Thibault H, Conrand B, Saubusse E, Baine M, Maurice-Tison S. Risk factors for overweight and obesity in French adolescents: Physical activity, sedentary behavior and parental characteristics. *Nutrition* 26(2),192-200 (2009).

Thienpont B, Tingaud-Sequeira A, Prats E, Barata C, Babin PJ, Raldua D. Zebrafish Eleutheroembryos Provide a Suitable Vertebrate Model for Screening Chemicals that Impair Thyroid hormone Synthesis. *Environ Sci Technol* 45(17):7525-32 (2011).

Tingaud-Sequeira A., Ouadah N., Babin PJ. Zebrafish obesogenic test: a tool for screening molecules that target adiposity. *Journal of Lipid Research* 52, 1765-1772 (2011).

Tingaud-Sequeira A., Knoll-Gellida A., André M., Babin PJ. (2012). Vitellogenin expression in teleost fish female white adipose tissue. *Biol Reprod*, 86 (2) 38, 1-11.

Tontonoz P, Spiegelman BM. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu Rev Biochem* 77, 289-312 (2008).

Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc* 60, 329-339 (2001).

Treffers PE, Hanselaar AG, Helmerhorst TJ, Koster ME, van Leeuwen FE. Consequences of diethylstilbestrol during pregnancy; 50 years later still a significant problem. *Ned Tijdschr Geneeskd* 145(14), 675-680 (2001).

## U

Ulven SM, Dalen KT, Gustafsson JA, Nebb HI. LXR is crucial in lipid metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73(1), 59-63 (2005).

## V

Vegeto E, Shahbaz MM, Wen DX, Goldman ME, O'Malley BW, McDonnell DP. Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol Endocrinol* 7(10), 1244-1255 (1993).

Velebit J, Kovacic PB, Prebil M, Chowdhury HH, Grilc S, Kreft M, Jensen J, Isenović ER, Zorec R. Rosiglitazone modulates insulin-induced plasma membrane area changes in single 3T3-L1 adipocytes. *J Membr Biol* 223(3), 141-9 (2008).

Vianen GJ, Obels PP, van den Thillart GE, Zaagsma J. Beta-adrenoceptors mediate inhibition of lipolysis in adipocytes of tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282(2), E318-25 (2002).

## W

Walters JW, Anderson JL, Bittman R, Pack M, Farber SA. Visualization of lipid metabolism in the zebrafish intestine reveals a relationship between NPC1L1-mediated cholesterol uptake and dietary fatty acid. *Chem Biol* 19(7), 913-925 (2012).

Wang YH, Kwon G, Li H, Leblanc GA. Tributyltin synergizes with 20-hydroxyecdysone to produce endocrine toxicity. *Toxicol Sci* 123(1), 71-9 (2011)

Waxman JS, Yelon D. Comparison of the expression patterns of newly identified zebrafish retinoic acid and retinoid X receptors. *Dev Dyn* 236(2), 587-595 (2007).

Weatherman RV, Thomas TS. Unique Protein Determinants of the Subtype-selective Ligand Responses of the Estrogen Receptors (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ) at AP-1 Sites. *J Biol Chem* 276(6), 3827-3832 (2001).

WHO. global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. *International Programme on Chemical Safety*. WHO/PCS/EDC/02.2 (2002).

- WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. *Report of a WHO consultation*, Report N° 0512-3054 (2000).
- Willson MT, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Curr Opin Chem Biol* 1, 235-241 (1997).
- Wójcicka G, Jamroz-Wiśniewska A, Horoszewicz K, Beltowski J. Liver X receptors (LXRs). Part I: structure, function, regulation of activity, and role in lipid metabolism. *Postepy Hig Med Dosw.* 61, 736-759 (2007).
- Wolf G. Is 9-cis-retinoic acid the endogenous ligand for the retinoic acid-X receptor?. *Nutr. Rev* 64, 532–538 (2006).
- Wong J, Shi YB, Wolffe AP. Determinants of chromatin disruption and transcriptional regulation instigated by the thyroid hormone receptor: hormone-regulated chromatin disruption is not sufficient for transcriptional activation. *EMBO J* 16(11), 3158-3171 (1997).
- Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, Khandekar M, Virtanen KA, Nuutila P, Schaart G, Huang K, Tu H, van Marken Lichtenbelt WD, Hoeks J, Enerbäck S, Schrauwen P, Spiegelman BM. Beige Adipocytes Are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human. *Cell* 150, 366-376 (2012).

## X

- Xia X, Serrero G. Inhibition of adipose differentiation by phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors. *J Cell Physiol* 178(1), 9-16(1999).

## Y

- Yamauchi T, Waki H, Kamon J, Murakami K, Motojima K, Komeda K, Miki H, Kubota N, Terauchi Y, Tsuchida A, Tsuboyama-Kasaoka N, Yamauchi N, Ide T, Hori W, Kato S, Fukayama M, Akanuma Y, Ezaki O, Itai A, Nagai R, Kimura S, Tobe K, Kagechika H, Shudo K, Kadowaki T. «Inhibition of RXR and PPARgamma ameliorates diet-induced obesity and type 2 diabetes. *J Clin Invest*, 108(7) , 1001-13 (2001).
- Ylikomi T, Bocquel MT, Berry M, Gronemeyer H, Chambon P. Cooperation of protosignals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors. *EMBO Journal* 11, 3681-3694 (1992).



## Z

- Zhang Y, Zeng X, Jin S. Autophagy in adipose tissue biology. *Pharmacol Res* pii: S1043-6618(12)00168-5. doi: 10.1016/j.phrs.2012.09.004 (2012).
- Zhang Z, Burch PE, Cooney AJ, Lanz RB, Pereira FA, Wu J, Gibbs RA, Weinstock G, Wheeler DA. Genomic Analysis of the Nuclear Receptor Family: New Insights Into Structure, Regulation, and Evolution From the Rat Genome. *Genome Res* 14(4), 580-90 (2004).
- Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, Lass A, Neuberger G, Eisenhaber F, Hermetter A, Zechner R. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 306(5700), 1383-1386 (2004).
- Zuo Z, Chen S, Wu T, Zhang J, Su Y, Chen Y, Wang C. Tributyltin Causes Obesity and Hepatic Steatosis in Male Mice. *Environ Toxicol* 26(1):79-85 (2011).

***LISTE DES PUBLICATIONS ET  
COMMUNICATIONS / LIST OF PUBLICATIONS  
AND COMMUNICATIONS***

**1. Publications dans des revues internationales à comité de lecture / Publications in international journals with peer review.**

Ouadah-Boussouf N, Babin PJ. The environmental obesogen tributyltin chloride acts through RXR and LXR but not PPARgamma/delta isoforms to induce hypertrophic adipocytes in live zebrafish. Manuscript in preparation.

Tingaud-Sequeira A, Ouadah N, Babin PJ. (2011). Zebrafish obesogenic test: a tool for screening molecules that target adiposity. *J Lipid Res* 52, 1765-1772 (Impact factor = 6.11).

**2. Communications orales dans un congrès international ou un colloque national ou local / Oral communications in an international conference or national or local symposium.**

Ouadah N, Tingaud-Sequeira A, Babin PJ. (2012). *In vivo* analysis of white adipose tissue dynamics after exposure to chemical pollutants and drugs in zebrafish. Journée scientifique de l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé de l'Université Bordeaux, in March 28th, Arcachon, France.

Tingaud-Sequeira A, Ouadah N, Babin PJ. (2012). Zebrafish obesogenic test: a tool for screening molecules that target adiposity. Séminaire du réseau EFOR (Réseau d'Etudes Fonctionnelles sur les Organismes modèles). 10-11 janvier, Paris, France.

Tingaud-Sequeira A, Ouadah N, Knoll-Gellida A, André M, Babin PJ (2010). *In vivo* dynamics of zebrafish adipocyte lipid droplets in response to nutritional status and pharmaceuticals regulating lipid metabolism. 9<sup>th</sup> Conference of the International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids. May 29-June 2, Maastricht, The Netherland.

**3. Communications par poster dans un congrès international ou un colloque national ou local / Poster communications in an international conference or national or local symposium.**

Quadah-Boussouf N, Babin PJ. (2012). The environmental obesogen tributyltin chloride acts through RXR and LXR but not PPARgamma/delta isoforms to induce adipocyte hypertrophy in live zebrafish. Journée Scientifique SFR TransBioMed, 4 Décembre, Bordeaux, France.

Quadah N, Babin PJ. (2012). Identification of new molecules that target adiposity by using the zebrafish obesogenic test. 19<sup>th</sup> European Congress on Obesity. May 9-12, Lyon, France.

Quadah N, Tingaud-Sequeira A, Babin PJ. (2011). Zebrafish obesogenic test: a tool for screening molecules that target adiposity. Journée scientifique de l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé de l'Université Bordeaux, 7 avril, Arcachon, France.

## RESUME

Un régime alimentaire déséquilibré et/ou la présence de composés contaminants exogènes peuvent modifier la signalisation endocrine et l'homéostasie des lipides et induire l'obésité. Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse ont permis, dans un premier temps, de développer une méthode simple et rapide, dénommée "zebrafish obesogenic (ZO) test", pour identifier *in vivo*, par utilisation de la larve de poisson zèbre, des facteurs qui peuvent augmenter ou diminuer la taille de l'adipocyte blanc et ainsi moduler le niveau de l'adiposité (Tingaud-Sequeira, Ouadah, Babin, *J. Lipid Res.* 52, 1765-1772, 2011). Ce test permet d'identifier des composés et des mélanges de molécules obésogènes et anti-obésogènes et fournit des informations pertinentes pour l'évaluation des risques liés leur présence mais également pour élucider les mécanismes impliqués. Les travaux ont, dans un second temps, permis d'apporter des réponses quant aux modalités d'action d'un obésogène puissant, le chlorure de tributylétain, contaminant retrouvé très largement dans notre environnement. Cette molécule agit sur l'adipocyte blanc à une concentration de l'ordre du nano molaire via les récepteurs nucléaires RXR et LXR, et non pas via les isoformes PPARgamma/delta (Ouadah et Babin, manuscrit en préparation).

**Mots clés :** obésité, tissu adipeux blanc, poisson zèbre, polluant environnemental, tributylétain, RXR, LXR, PPARg, obésogène, anti-obésogène, modèle, ZO test.

## ABSTRACT

An unbalanced diet and / or the presence of exogenous compounds contaminants may alter endocrine signaling and lipid homeostasis and induce obesity. The work done in this thesis have, at first, developed a simple and rapid method, called "zebrafish obesogenic (ZO) test" to identify *in vivo* by using the zebrafish larva, the factors that may increase or decrease the size of the white adipocyte and therefore modulate the level of adiposity (Tingaud-Sequeira, Ouadah, Babin, *J. Lipid Res.* 52, 1765-1772, 2011). This test helps to identify compounds and mixtures of obesogenic and anti-obesogenic molecules and provides information relevant to the risk assessment of their presence but also to elucidate the mechanisms involved. Work in a second time allowed to answer as to how the action of tributyltin chloride, a powerful obesogenic contaminant found widely in the environment. This molecule acts *in vivo* on white adipocytes in a concentration of the order of nano molar via nuclear receptors LXR and RXR, and not via the PPARgamma isoforms / delta (Ouadah and Babin, manuscript in preparation).

**Keywords:** obesity, white adipose tissue, zebrafish, environmental pollutant, tributyltin, RXR, LXR, PPARg, obesogenic, anti-obesogenic, model, ZO test.