



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III - Paul Sabatier

Discipline ou spécialité :

Biologie & Santé - Innovation pharmacologique

Présentée et soutenue par **Alice MARMUGI**

Le 21 décembre 2012

Titre :

Perturbations métaboliques hépatiques: implication des xénosenseurs CAR (Constitutive Androstane Receptor) et PXR (Pregnane X Receptor) et d'un perturbateur endocrinien, le Bisphénol A.

JURY

Professeur Philippe VALET

Docteur Marie-Anne ROBIN

Docteur Jean-Marc PASCUSI

Docteur Patrick BALAGUER

Docteur Laila MSELLI-LAKHAL

Docteur Thierry PINEAU

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse

Directeur de thèse

Ecole doctorale :

Biologie, Santé et Biotechnologie

Unité de recherche :

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

Equipe de Toxicologie Intégrative & Métabolisme

Directeurs de thèse :

Docteur Laila MSELLI-LAKHAL & Docteur Thierry PINEAU

A mes parents,

A ma famille,

A Florent.

REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements s'adressent à la région Midi-Pyrénées et à l'Institut National de la Recherche Agronomique de Toulouse pour avoir assuré le financement de ces trois années de thèse. Sans cela, ce travail n'aurait pu émerger.

Mes remerciements s'adressent également aux membres du jury:

*Je remercie vivement le **Professeur Philippe Valet**, directeur de l'unité INSERM U1048 de Toulouse, pour avoir accepté de présider le jury d'évaluation de ce travail de doctorat.*

*J'adresse ma profonde reconnaissance au **Docteur Marie-Anne Robin**, directrice de recherche dans l'unité INSERM U991 de Rennes, et au **Docteur Jean-Marc Pascussi**, chargé de recherche dans l'unité INSERM U661 de Montpellier, pour avoir accepté d'évaluer mon travail en tant que rapporteurs. Merci pour votre investissement dans la correction et l'évaluation de ce travail et pour vos nombreuses remarques constructives.*

*J'exprime toute ma gratitude au **Docteur Patrick Balaguer**, directeur de recherche dans l'unité INSERM U896 de Montpellier, pour sa disponibilité en tant qu'examineur et pour les discussions scientifiques que nous avons pu avoir.*

*Je tiens à exprimer ma reconnaissance et tout mon respect au **Docteur Thierry Pineau**, directeur du département de Santé Animale de l'INRA pour avoir accepté de co-encadrer ma thèse. Merci Thierry de m'avoir fait confiance et pour vos conseils éclairés.*

*J'adresse mes chaleureux remerciements au **Docteur Laila Mselli-Lakhal**, qui a également assuré le co-encadrement de ma thèse. Laila, je te remercie pour ta disponibilité, ton encadrement et pour la richesse de nos discussions scientifiques et personnelles. Tu as été un pilier pour moi... Tu vas me manquer!*

*Je remercie vivement le **Docteur Hervé Guillou**, chargé de recherche et animateur de l'équipe de Toxicologie Intégrative et Métabolisme de l'INRA ToxAlim, pour son accueil dans l'équipe et nos*

échanges scientifiques sur le métabolisme des lipides. Merci Hervé pour tes encouragements tout au long de la thèse, ton investissement et ton amitié!

*J'exprime toute ma gratitude au **Docteur Pascal Martin**, ingénieur de recherche à l'INRA ToxAlim, pour toutes les discussions scientifiques que nous avons pu avoir. Merci Pascal pour ta sympathie et le panel d'outils informatiques que tu m'as appris à utiliser.*

*Je remercie également les autres **membres de l'équipe de Toxicologie Intégrative et Métabolisme** pour m'avoir accompagnée dans la réalisation de ces travaux de doctorat. Merci pour votre disponibilité sans faille et pour les moments que nous avons passés ensemble, que ce soit au laboratoire ou à l'extérieur. Je pense tout particulièrement à **Arnaud Polizzi**, pour ton amitié, ton humour "étonnant" et toutes les compétences techniques que tu as accepté de me transmettre; à **Simon Ducheix**, pour ton amitié, nos recherches assidues sur le net toujours pleines de surprises et tes Western Blot ! ; au **Docteur Alexandra Montagner** pour notre complicité, ta gentillesse et ton enthousiasme dès que nous parlons des manip; à **Frédéric Lasserre** pour ton humour, nos conversations plus sérieuses à l'animalerie et toutes les techniques et astuces que tu m'as transmises; au **Docteur Nicolas Loiseau** pour ta sympathie et tes conseils avisés; à **Nabila Moussaoui** pour les moments passés que nous nous remémorons encore avec le même sourire. Merci également à **Colette Bétoulières** pour ton soutien technique incontestable à l'animalerie!*

*Je remercie également le **Docteur Laurence Huc**, le **Docteur Eric Houdeau** et le **Docteur Nicolas Cabaton** pour nos interactions scientifiques, qui je l'espère se perpétueront dans le temps, et pour vos avis critiques lors de la rédaction du manuscrit ou de la préparation de l'oral.*

*J'adresse mes sincères remerciements et ma reconnaissance à nos autres **collaborateurs** : le Docteur Alain Paris, le Docteur Nathalie Priymenko, le Docteur Marthe Moldes, le Docteur Catherine Postic, le Docteur Justine Bertrand-Michel, le Docteur Daniel Zalko, le Docteur Isabelle Castan, le Docteur Sabine Gerbal-Chaloin, le Docteur Roger Rahmani et le Professeur Walter Wahli.*

*Je remercie de tout cœur le **Docteur Viorica Braniste** et le **Docteur Afifa Ait-Belgnaoui** pour tout ce que nous avons pu partager ensemble scientifiquement et personnellement.*

*Mes remerciements vont également vers les **collègues** actuels et passés des laboratoires ToxAlim: Diane, Cécile, Zeina, Graziela, Amine, Patricia, Julie, Béatrice, Joëlle, Aurélie, Matthieu, Adeline, Mélanie, Selma, Edwin, Vincent, Houda, Sarah, Cathy, Marie-Jo, Bertrand. A ceux qui auront été oubliés dans cette liste, veuillez bien m'excuser.*

*Merci à tous mes amis toulousains pour leur soutien et leur amitié. Je pense plus particulièrement à **Anthony, Anaïs, Fanny**: vous avez été ma deuxième famille à Toulouse, nos soirées vont me manquer. Merci à mes amis de toujours, **Sophie, Virginie et Florian**, je me rappelle encore nos TP de SVT et de physique au lycée ou encore l'histoire du Sac....*

*Mes derniers remerciements et non les moindres s'adressent à **ma famille**.*

*Je remercie infiniment mes parents **Chantal et Pierre** pour leur amour et pour leur soutien inconditionnel. Je n'aurais jamais pu réussir cela sans vous! Merci également à ma sœur **Karine** et à **Steve** pour avoir toujours été à mes côtés dans les moments importants et tous les autres d'ailleurs! Merci à Perrine et Jérémie, à mes 7 nièces, à la famille Marmugi et Fleury: Lolo, Ghyslaine, William, Henry, Marilyne, pour votre bienveillance et vos encouragements. Vous êtes tous bien trop loin!*

Un merci affectueux à ma belle famille pour votre gentillesse, l'intérêt que vous portez à mon travail et votre affection.

*Enfin, j'adresse tout mon amour à **Florent**. Merci d'avoir été si présent et de m'avoir soutenue dans cette aventure qu'est la thèse et dans mon projet de post-doc. Tu me combles de bonheur...*

Merci à vous tous !

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	1
RÉSUMÉ	7
ABSTRACT.....	8
PRINCIPALES ABRÉVIATIONS	9
TABLES DES ILLUSTRATIONS	11
SITUATION DU SUJET.....	13
DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES	15
Partie 1 : Le foie, un organe clé pour la régulation du métabolisme énergétique	16
I. Métabolisme glucido-lipidique	18
1. Homéostasie glucidique.....	18
2. La lipogenèse <i>de novo</i>	20
3. Synthèse des triglycérides et échanges inter-organes	25
4. Catabolisme des acides gras	27
II. Rôle du foie dans le métabolisme du cholestérol	29
1. Synthèse hépatique de cholestérol	29
2. Gestion des besoins en cholestérol	30
III. Régulation transcriptionnelle du métabolisme énergétique hépatique.	33
1. Rôle de SREBP dans la régulation du cholestérol et de la lipogenèse	33
2. CHREBP, un régulateur transcriptionnel du métabolisme des carbohydrates et des lipides.....	35
3. Régulation du métabolisme énergétique par les récepteurs nucléaires.....	37
Partie 2 : Les récepteurs nucléaires CAR et PXR à l'interface entre détoxification et régulation du métabolisme énergétique hépatique	39
I. Principales caractéristiques structurales et fonctionnelles de CAR et PXR	39
1. Structure commune et spécificités des récepteurs CAR et PXR	39
2. Les ligands de CAR et PXR	41
3. Caractéristiques des éléments de réponse.....	43
4. Mécanismes d'activation	45
II. Régulation du métabolisme des xénobiotiques par les récepteurs nucléaires CAR et PXR	48
I. CAR et PXR, des régulateurs du métabolisme énergétique	52
1. Modulation du métabolisme énergétique hépatique par le récepteur PXR.....	52

1.1. Induction de la lipogenèse et répression de la β -oxydation	52
1.2. Répression des enzymes de la néoglucogenèse	53
1.3. Régulation du métabolisme du cholestérol.....	54
2. Modulation du métabolisme énergétique hépatique par le récepteur CAR.....	56
2.1 Répression de la β -oxydation des acides gras	56
2.2 Un rôle controversé de CAR dans la régulation de la lipogenèse de novo	56
2.3 Implication dans le catabolisme des hormones thyroïdiennes	58
2.4 Répression des enzymes de la néoglucogenèse	58
2.5 Régulation de l'homéostasie du cholestérol et des acides biliaires	58
Partie 3 : Les maladies hépatiques non alcooliques, origine génétique et environnementale.....	60
I. Les maladies hépatiques non alcooliques.....	61
1. Accumulation de triglycérides dans le foie ou stéatose hépatique	62
2. Contexte physiopathologique de la stéatose.....	64
II. Rôle des facteurs génétiques dans le développement de NAFLD, l'adiponutrine comme exemple	65
1. PNPLA3 et la famille des PNPLA	66
2. Les fonctions de Pnpla3 et du variant I148M.....	68
3. Une régulation nutritionnelle de PNPLA3	69
4. Variant I148M de PNPLA3 et désordres métaboliques associés	70
III. Implication des xénobiotiques dans la survenue des stéatoses hépatiques non alcooliques.....	72
1. Les perturbateurs médicamenteux	73
2. Impact des polluants environnementaux	76
2.1. Les composés organo-métalliques.....	76
2.2. Les polluants organiques persistants (POPs).....	77
2.3. Les plastifiants.....	78
Partie 4 : Le Bisphénol A, un perturbateur métabolique	79
I. Origine et production du Bisphénol A.....	79
II. Les usages du Bisphénol A	79
III. Les voies d'exposition pour l'Homme	80
IV. Métabolisme du Bisphénol A.....	81
V. Imprégnation des populations	82
1. Les techniques de dosage du Bisphénol A	82
2. Estimations de l'exposition humaine au Bisphénol A.....	83
3. Taux plasmatiques de Bisphénol A	83
4. Taux urinaires de Bisphénol A	84

5. Taux de Bisphénol A dans les autres fluides	84
VI. Le Bisphénol A, un perturbateur endocrinien dont l’usage est soumis à réglementation	86
1. Notion de perturbateur endocrinien	86
2. Législation française, européenne et mondiale	86
3. Estimation des doses de référence par les autorités	88
VII. Bisphénol A et risques sanitaires	89
1. Etudes épidémiologiques	89
2. Effets d’expositions au Bisphénol A chez l’animal	90
2.1 <i>Fonction de reproduction et de développement des organes génitaux</i>	90
2.2 <i>Fonctions cérébrales et comportementales</i>	91
2.3 <i>Fonction immunitaire</i>	92
2.4 <i>Fonctions métaboliques</i>	92
2.4.1 Poids des animaux	92
2.4.2 Pancréas	93
2.4.3 Tissu adipeux	95
2.4.4 Foie	96
2.4.5 Muscle	97
VIII. Les cibles du BPA	98
1. La signalisation par les récepteurs nucléaires	98
2. La signalisation par d’autres récepteurs	100
3. Signatures épigénétiques	101
OBJECTIFS	103
RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX	103
Article 1 : Low doses of bisphenol A induce gene expression related to lipid synthesis and trigger triglyceride accumulation in adult mouse liver	107
Article en préparatio N°1: Impact of long term BPA exposure on hypercholesterolemia	108
Article en préparation N°2: Adiponutrin/PNPLA3, a marker of hepatic steatosis is regulated by the Constitutive Androstane Receptor.	121
DISCUSSION & PERSPECTIVES	167
CONCLUSIONS GENERALES	175
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	177
ANNEXES	209

Les travaux présentés dans ce mémoire ont donné lieu aux

publications et communications suivantes :

PUBLICATIONS

Marmugi A, Ducheix S, Lasserre F, Polizzi A, Paris A, Priymenko N, Bertrand-Michel J, Pineau T, Guillou H, Martin PG, Mselli-Lakhal L. **Low doses of Bisphenol A induce gene expression related to lipid synthesis in adult mouse liver.** *Hepatology*, 2012.55(2): p.395-407.

Article en préparation n°1: **Marmugi A**, et al. **Impact of long term BPA exposure on hypercholesterolemia.**

Article en préparation n°2: **Marmugi A**, et al. **Adiponutrin/PNPLA3, a marker of hepatic steatosis is regulated by the Constitutive Androstane Receptor.**

Article en préparation n°3: Lasserre F, **Marmugi A**, et al. **Co-exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) influences the hepatic effects of Bisphenol A.**

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Communications orales:

Marmugi A, Ducheix S, Lasserre F, Polizzi A, Paris A, Pineau T, Guillou H, Martin PG, Mselli-Lakhal L. **Low doses of Bisphenol A induce gene expression related to lipid synthesis and trigger triglyceride accumulation in adult mouse liver.** *4th health food symposium*, Toulouse (France), 18-19 juillet 2012.

Marmugi A, Ducheix S, Lasserre F, Polizzi A, Paris A, Pineau T, Guillou H, Martin PG, Mselli-Lakhal L. **Effects of Bisphenol A low doses on lipid accumulation in the liver.** *Imperial College London*, Londres (Angleterre), 25 avril 2012.

Marmugi A, Ducheix S, Lasserre F, Polizzi A, Paris A, Pineau T, Guillou H, Martin PG, **Mselli-Lakhal L**. **Effects of Bisphenol A low doses on lipid accumulation in the liver.** *Colloque de l'Association pour la Recherche en Toxicologie*, Paris (France), 20-21 juillet 2011.

Marmugi A, Ducheix S, Lasserre F, Polizzi A, Paris A, Pineau T, Guillou H, Martin PG, Mselli-Lakhal L. **Non-monotonic effects of Bisphenol A low doses on hepatic lipid metabolism.** *Journées d'animation scientifique du département de santé animale*, Fréjus (France), 22-25 juin 2011.

Ducheix S., Podechard N., Bertrand-Michel J., Polizzi A., Lasserre F., **Marmugi A.**, Baron S., Lobaccaro J.M., Martin P., Guillou H. **A nutrigenomic approach reveals that LXR is required for hepatic steatosis induced by essential fatty acid deficiency.** *9th Conference of the International Society for the Study of Fatty Acids and Lipoproteins (ISSFAL)*, Maastricht (Hollande), 29 mai- 2juin 2010.

Eveillard A., **Marmugi A.**, Lakhal L., Lasserre F., Polizzi A., Pineau T., Guillou H., **Martin P.** **Evaluating the impact of transcriptomic products of plastics and their impact on metabolism.** *Colloque de l'Association pour la Recherche en Toxicologie*, Paris (France), 10-11 juin 2010.

COMMUNICATIONS AFFICHÉES:

Marmugi A, Ducheix S, Lasserre F, Polizzi A, Paris A, Pineau T, Guillou H, Martin PG, Mselli-Lakhal L. **Low doses of Bisphenol A induce gene expression related to lipid synthesis and trigger triglyceride accumulation in adult mouse liver.** *29ème Congrès National Société Française d'Endocrinologie*, Toulouse (France), 10-13 octobre 2012.

Marmugi A, Montagner A, Goron A, Lasserre F, Polizzi A, Ducheix S, Martin PG, Moldes M, Postic C, Guillou H, Mselli- Lakhal L. **Regulation od Adiponutrin/Pnpla3 gene expression by the Constitutive Androstane nuclear Receptor**, *4th health food symposium*, Toulouse (France), 18-18 juillet 2012

Lasserre F, **Marmugi A**, Ducheix S, Polizzi A, Priymenko N, Canlet C, Pineau T, Martin PG, Guillou H, Mselli- Lakhal L. **Co-exposure to DEHP influences the hepatic effects of BPA**, *4TH health food symposium*, Toulouse (France), 18-19 juillet 2012

Marmugi A, Ducheix S, Lasserre F, Polizzi A, Paris A, Pineau T, Guillou H, Martin PG, Mselli- Lakhal L. **Non-monotonic effects of Bisphenol A low doses on hepatic lipid metabolism**, *Gordon Research Conference "Environmental Endocrine Disruptors"*, Les Diablerets (Suisse), 30 mai- 4 juin 2010

Ducheix S., Podechard N., Bertrand-Michel J., Polizzi A., Lasserre F., **Marmugi A.**, Baron S., Lobaccaro J.M., Martin P., Guillou H. **A nutrigenomic approach reveals that LXR is required for steatosis induced by essential fatty acid deficiency.** *FEBS/IUBMB Workshop "Eukaryotic lipids; Treasure of regulatory information"*, Spetes (Grèce), 19-24 juin 2010

RÉSUMÉ

De nombreuses études expérimentales, cliniques et épidémiologiques récentes montrent que l'exposition à des contaminants de notre environnement pourrait perturber les fonctions métaboliques et endocriniennes des organismes. Ceci contribuerait au développement de l'obésité et des pathologies métaboliques associées telles que la stéatose hépatique non alcoolique, caractérisée par une accumulation massive de triglycérides dans le foie, et qui est susceptible d'évoluer vers des pathologies plus sévères (inflammation, fibrose, cirrhose, carcinome hépatocellulaire), regroupées sous le terme de NAFLD (*Non-Alcoholic Fatty Liver Diseases*).

Nos études réalisées chez le rongeur nous ont permis de mettre en évidence un impact sur le métabolisme hépatique suite à une exposition chronique au Bisphénol A (BPA), un contaminant œstrogéno-mimétique largement exploité dans l'industrie des emballages alimentaires plastiques. Il modifie l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des lipides, des glucides et du cholestérol et favorise l'accumulation de triglycérides et d'esters de cholestérol au niveau hépatique. Ces effets, qui pourraient contribuer à l'émergence de la stéatose hépatique, ont été observés en deçà de la dose de référence en toxicologie réglementaire (la dose journalière admissible) et suivent une courbe dose-réponse non monotone en U inversé. Ces résultats renforcent l'idée que le BPA est un perturbateur métabolique, surtout lors d'expositions à faibles doses.

Les récepteurs nucléaires représentent des cibles potentielles des perturbateurs métaboliques. Plusieurs études récentes montrent que les récepteurs nucléaires CAR (*Constitutive Androstane Receptor*) et PXR (*Pregnane X Receptor*), initialement identifiés comme des récepteurs clés du système de détoxification, sont également impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique. Nos travaux ont permis d'identifier une nouvelle cible de ces xénosenseurs : le gène codant pour l'adiponutrine/PNPLA3 (*Patatin-like phospholipase domain-containing*). Nous avons montré, *in vivo* et sur des lignées d'hépatocytes en culture, que les récepteurs CAR et PXR régulent l'expression du gène Pnpla3. Cette protéine présente une activité à la fois transacylase et lipase qui lui confère un rôle central dans la régulation du métabolisme lipidique hépatique. Chez l'Homme, un variant du gène Pnpla3 (*SNP I148M*) a été identifié comme un nouveau marqueur de la stéatose hépatique et est associé à un risque accru de développement de NAFLD. Les xénosenseurs CAR et PXR étant activés par de nombreux médicaments et polluants environnementaux, nos résultats mettent en exergue le risque de développement de stéatoses hépatiques suite à leur activation. L'ensemble de ces résultats renforce l'idée d'un risque de développement de pathologies métaboliques suite à l'exposition à différents contaminants environnementaux, qu'il s'agisse de perturbateurs endocriniens de type métaboliques ou d'activateurs des xénosenseurs CAR et PXR.

ABSTRACT

Numerous experimental, clinical and epidemiological studies show that exposure to environmental contaminants may disrupt endocrine and metabolic functions of our organism. This would contribute to the development of obesity and associated metabolic disorders such as nonalcoholic hepatic steatosis, characterized by an excessive accumulation of triglycerides in the liver, which may lead to more severe forms of NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Diseases) such as inflammation, fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma.

In this work, *in vivo* studies have highlighted that chronic exposure to the xenoestrogen BPA, widely used in plastic food packaging industry, affects hepatic energy metabolism. It promotes the storage of triglycerides and cholesterol ester in the liver, in association with the induction of the hepatic transcriptome, more particularly of genes involved in lipid, carbohydrates and cholesterol synthesis. These effects, which could contribute to promote hepatic steatosis, follow an inverted U shape non-monotonic dose-response curve and were observed below the reference dose in regulatory toxicology: the tolerable daily intake. These results strengthen the idea that BPA act as a metabolic disruptor, particularly at low doses.

Nuclear receptors are targets through which metabolic disruptors may influence gene expression. Recent studies showed that the nuclear receptors CAR (Constitutive Receptor Androstane) and PXR (Pregnane X Receptor), initially identified as key receptors of the detoxification process, are also involved in the regulation of energy metabolism. We identified the gene coding for adiponutrin/PNPLA3 (Patatin-like phospholipase domain-containing) as a new target of these xenosensors. We have shown with transgenic animal models and with hepatocyte cell lines that the CAR and PXR receptors regulate the Pnpla3 gene expression. This protein has a central role in hepatic lipid metabolism through its dual transacylase and lipase activity. In human, a variant of the Pnpla3 (*SNP I148M*) gene has been identified as a new marker of hepatic steatosis and is associated with an increased risk of NAFLD. Since the xenosensors CAR and PXR are known to be activated by many drugs and environmental pollutants, our results highlight the risk of a development of hepatic steatosis after their activation.

Taken together, these results highlight the risk of metabolic disruptions after exposure to various environmental contaminants such as endocrine disruptors and CAR activators.

PRINCIPALES ABRÉVIATIONS

4-HNE : 4-Hydroxynonéal
ABC : *ATP-binding cassette*
ACAT : Acyl-CoA cholesterol acyltransférase
ACC : Acétyl-CoA carboxylase
ACLY : ATP citrate lyase
ADPN : Adiponutrine
AG : Acides gras
AGPAT : AcylGlycérol Phosphate AcylTransférase
AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique
AMPK : kinase activée par l'AMP
Apo : Apolipoprotéine
ALAT : Alanine amino transférase
ASAT : Aspartate amino transférase
ATGL : Lipase spécifique des triglycérides
BADGE : Bisphénol A Diglycidil Ether
BPA : Bisphénol A
BPA-Gluc : BPA-glucuronide
CAR : Récepteur constitutif aux androstanes
CCRP : Protéine de rétention cytoplasmique de CAR
CD36 : Cluster of Différenciation 36
ChoRE : Elément de réponse aux carbohydrates
ChREBP : *Carbohydrate Response Element Binding Protein*
CoA : Co enzyme A
CrAT : carnitine acétyl transférase
CrOT : carnitine octanoyl transférase
CYP : Cytochrome P450
DAG : Diacylglycérol
DEHP : Bis(2-ethylhexyl)phthalate
DES : diéthylstilbestrol
DGAT : Diacylglycérol AcylTransférase
DJA : Dose Journalière Admissible
EC : Esters de cholestérol
EFSA : Autorités européennes de sécurité des aliments
Elovl : Elongase des acides gras à très longue chaîne
EPA : *Environmental protection agency*
ER : Récepteur aux estrogènes
ERR : Récepteur relatif aux estrogènes
FAS : Acide gras synthase
FATP : Protéine de transport des acides gras
FDA : *Food and drug administration*
FOX : Forkhead box
G6Pase : Glucose 6-phosphatase
GPAT : Glycérol 3-phosphate acyltransférase
GK : Glucokinase
GL : Gouttelette lipidique
GLUT : Glucose transporteur
GPAT : Glycérol 3-phosphate acyltransférase
GPR30 : *G Protein coupled Receptor 30*
GST : Glutathione S-transférase
HDL : Lipoprotéine de haute densité
HMG-CoA : 3-hydroxy-3-methylglutarate-CoA

HMGCR : HMG-CoA réductase
 HMGCS : HMG-CoA synthase
 HNF4 : *Hepatocyte nuclear factor 4*
 HSP90 : *Heat Shock Protein 90*
 IL : Interleukine
 IMC : Indice de masse corporelle
 INSIG : *Insulin induced gene*
 LDL : Lipoprotéine de faible densité
 LDLR : Récepteur au LDL
 LPA : Acide lysophosphatidique
 L-PK : *Liver-Pyruvate kinase*
 LPL : Lipoprotéine lipase
 LPPAT : Lysophosphatidic acid acyltransférase
 LXR : *Liver X receptor*
 MAG : Monoacylglycerols
 MDR : *Multidrug resistance protein*
 MEHP : Mono-(2-ethylhexyl) phthalate
 MGPAT : Monoacylglycérol Acyltransférase
 NAFLD : *Non-alcoholic fatty liver disease*
 NASH : *Non-alcoholic steatohepatite*
 NOAEL : *No Observed Adverse Effect Level*
 OGT : O-GlcNAc transférase
 OMS : Organisation mondiale de la santé
 PA : Acide phosphatidique
 PAP : Phosphohydrolase des acides phosphatidiques
 PB : Phénobarbital
 PBREM : *PB-responsive enhancer module*
 PCN : Pregnenolone 16 α -carbonitrile
 PDH : Pyruvate déshydrogénase
 PEP : Phosphoénolpyruvate
 PEPCK : Phosphoénolpyruvate carboxykinase
 PGC1 α : *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1-alpha*
 PL : Phospholipides
 PNPLA : *Patatin-like phospholipase domain containing protein*
 POP : Polluants organiques persistants
 PP2A : Protéine phosphatase 2A
 PPAR : Récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes
 PXR : *Pregnane X Receptor*
 RCPG : Récepteurs couplés aux protéines G
 RE : Reticulum endoplasmique
 RXR : Récepteur de l'acide rétinoïque
 SCAP : *SREBP cleavage activating protein*
 SCD-1 : Stearoyl-CoA désaturase
 SERM : Modulateur sélectif des récepteurs aux estrogènes
 SNP : Polymorphisme d'un seul nucléotide
 SREBP : *Sterol regulatory element binding protein*
 SULT : Sulfotransférase
 TAG : Triacylglycérol
 TBT : Tributylétain
 TCPOBOP : 1,4-Bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene
 TG : Triglycéride
 TGH : Triglycéride hydrolase hépatique
 TNF α : *Tumor Necrosis Factor α*
 VLDL : Lipoprotéine de basse densité
 XREM : *Xenobiotic responsive element module*

TABLES DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Le lobule hépatique, une unité fonctionnelle du foie	17
Figure 2. La glycogénogenèse et la glycogénolyse	19
Figure 3. Les enzymes clés de la glycolyse et de la néoglucogenèse à partir de précurseurs non glucidiques	21
Figure 4. Enzymes clés de la lipogenèse <i>de novo</i>	22
Figure 5. Structure et nomenclature des acides gras	23
Figure 6. Transformation des acides gras en acides gras à plus longue chaîne.	24
Figure 7. Le devenir des acides gras à longue chaîne	25
Figure 8. Structure d'une gouttelette lipidique.....	26
Figure 9. Le métabolisme mitochondrial et peroxysomal des acides gras	28
Figure 10. Métabolisme hépatique du cholestérol.....	32
Figure 11. Activation protéolytique du facteur de transcription SREBP	34
Figure 12. Régulation de ChREBP dans le foie	36
Figure 13. Régulation par les récepteurs nucléaires des fonctions métaboliques selon les tissus, et conditions physiopathologiques associées.....	38
Figure 14. La superfamille des récepteurs nucléaires et leur structure commune	40
Figure 15. Les différents éléments de réponse des récepteurs nucléaires	44
Figure 16. Illustration schématique de l'activation du récepteur nucléaire CAR.....	46
Figure 17. Illustration schématique de l'activation du récepteur nucléaire PXR.....	47
Figure 18. Représentation schématique de la régulation du métabolisme des xénobiotiques par les récepteurs nucléaires CAR et PXR au niveau hépatique	50
Figure 19. Implication du récepteur PXR dans la régulation du métabolisme lipidique et glucidique.	55
Figure 20. Origines multi-factorielles du syndrome métabolique et tissus cibles	60
Figure 21. Schéma de la progression de la stéatose hépatique non alcoolique	61
Figure 22. Modèle structural de PNPLA3, forme sauvage et mutée	69
Figure 23. Régulation transcriptionnelle et stabilisation de la protéine PNPLA3 par l'intermédiaire du facteur de transcription SREBP-1c	70
Figure 24. Association entre les variants SNP du gène Pnpla3 et le contenu en triglycérides hépatiques chez la souris	71
Figure 25. Implication des perturbateurs endocriniens environnementaux dans la survenue de désordres métaboliques ...	73
Figure 26. Le Diethylstilbestrol (DES) peut contribuer à l'émergence du syndrome métabolique.....	75
Figure 27. Modifications histologiques de foie de souris adultes exposées 45 jours au TBT	77
Figure 28. La molécule de Bisphénol A.....	79

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Exemples de molécules agonistes ou antagonistes des formes humaine ou murine des récepteurs nucléaires PXR et CAR.....	42
Tableau 2. Principaux gènes cibles de CAR et PXR, impliqués dans le métabolisme et le transport des xénobiotiques dont les médicaments	51
Tableau 3. Description des neuf PNPLA humaines et activités enzymatiques associées	67
Tableau 4. Exemple de médicaments provoquant des stéatoses micro- ou macrovésiculaires et leur mode d'action	74
Tableau 5. Exemple de médicaments provoquant une obésité ou une lipoatrophie favorisant la survenue d'une résistance à l'insuline et de NAFLD	75
Tableau 6. Concentrations urinaires de Bisphénol A dans différentes études épidémiologiques	85
Tableau 7. Doses de référence en toxicologie réglementaire tirées de l'évaluation des risques par dates et pays	88

SITUATION DU SUJET

Dans les pays industrialisés, la prévalence de nombreuses pathologies associées au dérèglement de l'homéostasie énergétique est en constante augmentation. Les deux causes majeures de cette augmentation sont une diminution de l'activité physique et une alimentation trop riche en lipides et en glucides. Mais des facteurs génétiques et environnementaux sont suspectés de jouer un rôle dans l'apparition et le développement de ces pathologies. En 2002, un nouveau concept a émergé, celui « d'obésogène environnemental » qui stipule que les produits chimiques de notre environnement pourraient jouer un rôle actif dans l'étiologie de l'obésité (Neel and Sargis 2011). Ce concept est né du constat selon lequel l'épidémie actuelle d'obésité ne peut pas être expliquée uniquement par un mode de vie sédentaire et une suralimentation. Il a depuis été appuyé par de nombreuses études épidémiologiques et expérimentales faisant le lien entre les troubles métaboliques et certains produits chimiques comme les phtalates, le bisphénol A (BPA) ou encore les organo-étains (Grun 2010; La Merrill and Birnbaum 2011). La plupart des études expérimentales rapportent des effets de ces contaminants sur le tissu adipeux et sur le pancréas. Ils perturbent le fonctionnement du tissu adipeux en induisant l'adipogenèse et en dérégulant la sécrétion d'adipokines (Thayer, Heindel et al. 2012). Au niveau du pancréas, ils dérégulent la production et l'excrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques (Nadal, Alonso-Magdalena et al. 2009). Peu d'études se sont intéressées aux effets hépatiques du BPA. Le foie étant situé entre le tube digestif et le reste de l'organisme, toutes les molécules absorbées, que ce soit des nutriments ou des xénobiotiques, y subissent un effet de premier passage hépatique.

L'implication des récepteurs nucléaires dans l'effet « obésogène » des contaminants environnementaux a été suggérée par de nombreuses études (Janesick and Blumberg 2011; Janesick and Blumberg 2012). Les perturbateurs endocriniens sont suspectés d'exercer leur effet délétère par un effet oestrogéno-mimétique lié à leur interaction avec les récepteurs aux oestrogènes ER α et ER β . Mais il est maintenant admis que cet effet oestrogéno-mimétique ne peut expliquer, à lui seul, l'ensemble des différents effets induits par ces perturbateurs endocriniens. D'autres récepteurs nucléaires sont suspectés d'y jouer un rôle. Deux récepteurs, le *Constitutive androstane receptor* (CAR) et le *Pregnane X Receptor* (PXR), présentent un intérêt particulier de par leur fonction de carrefour entre la détoxification et le métabolisme hépatique. Initialement identifiés comme des récepteurs clés du système de détoxification, des données bibliographiques récentes leur attribuent également un rôle dans la régulation du métabolisme énergétique. Ils constituent donc des cibles d'étude intéressantes pour expliquer les perturbations métaboliques induites par des xénobiotiques.

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés à deux types de dérégulation du métabolisme énergétique hépatique induite par les xénobiotiques. La première concerne les effets hépatiques d'une exposition chronique à de faibles doses de BPA, dont les effets sur le foie avaient été peu appréhendés jusqu'alors. La seconde concerne la régulation du gène *Pnpla3* (*Patatin-like phospholipase*

domain-containing protein 3) par les xénorécepteurs CAR et PXR. Chez l'Homme, un variant du gène de l'Adiponutrine/Pnpla3 (*SNP* I148M) a été identifié comme un nouveau marqueur de la stéatose hépatique et est associé à un risque accru de développement de stéatoses hépatiques non alcooliques.

DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

PARTIE 1 : LE FOIE, UN ORGANE CLÉ POUR LA RÉGULATION DU MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE

Chez l'homme, le foie se situe dans la cavité abdominale, sous le pôle diaphragmatique droit. C'est le viscère le plus volumineux. Très vascularisé, il reçoit environ 1500 ml/min de sang et en contient en permanence 450 ml (Bradley, Ingelfinger et al. 1945). Il est composé de plusieurs lobes, subdivisés en segments hépatiques délimités par des cloisons fibreuses qui vont le diviser en unités fonctionnelles plus petites, appelées espaces porte ou lobules. Les lobules comprennent les cellules hépatiques épithéliales nommées hépatocytes, les cellules endothéliales (cellules sinusoidales), les macrophages résidents (cellules de Kupffer) et les cellules stellaires (cellules de Ito) (**Figure 1**) (Malarkey, Johnson et al. 2005).

Le foie est un organe aux fonctions variées indispensables au bon fonctionnement de l'organisme. Placé entre le tube digestif et le reste de l'organisme, toutes les molécules absorbées subissent un effet de premier passage hépatique que ce soit les nutriments ou les xénobiotiques. Il représente de ce fait un carrefour entre deux fonctions importantes de l'organisme : le métabolisme énergétique et la détoxification (Zmrzljak and Rozman 2012).

Le foie est le régulateur clé des taux de glucose sanguin, c'est le seul organe à la fois producteur et stockeur de glucose selon l'état nutritionnel de l'organisme (Nordlie, Foster et al. 1999). Il peut convertir certains acides aminés, l'acide lactique, certains glucides comme le fructose ou le galactose en glucose en cas de besoin (Nordlie, Foster et al. 1999; Hardie 2012). Il régule également le métabolisme des lipides, la production de triglycérides ainsi que la synthèse du cholestérol et sa dégradation en acides biliaires (Francis, Fayard et al. 2003; Bechmann, Hannivoort et al. 2012).

Les xénobiotiques y subissent des réactions de fonctionnalisation (Cytochromes P450) et de conjugaison afin de les rendre plus hydrophiles et donc plus faciles à éliminer, ou pour neutraliser leurs groupements réactifs, les rendant généralement moins toxiques que le composé parent. Les molécules ainsi transformées peuvent être éliminées par l'intermédiaire de la bile, emmagasinées dans la vésicule biliaire, puis libérées dans l'intestin grêle (Maronpot, Yoshizawa et al. 2010). Il peut également convertir de l'ammoniac en urée ou transformer la bilirubine libre, toxique, en bilirubine conjuguée, non toxique (Zollner and Trauner 2006). Le foie permet le métabolisme des acides aminés par des transaminations et désaminations oxydatives et emmagasine les vitamines liposolubles (A, D, E et K) et les oligo-éléments (fer, cuivre). Il intervient dans la synthèse de certains facteurs de coagulation et de l'albumine, et dans la dégradation des hématies et leucocytes vieillissants, ainsi que de certaines bactéries présentes dans la circulation (Kmiec 2001). Il possède également des fonctions immunitaires (activité phagocytaire des cellules de Kupffer) (Bottcher, Knolle et al. 2011).

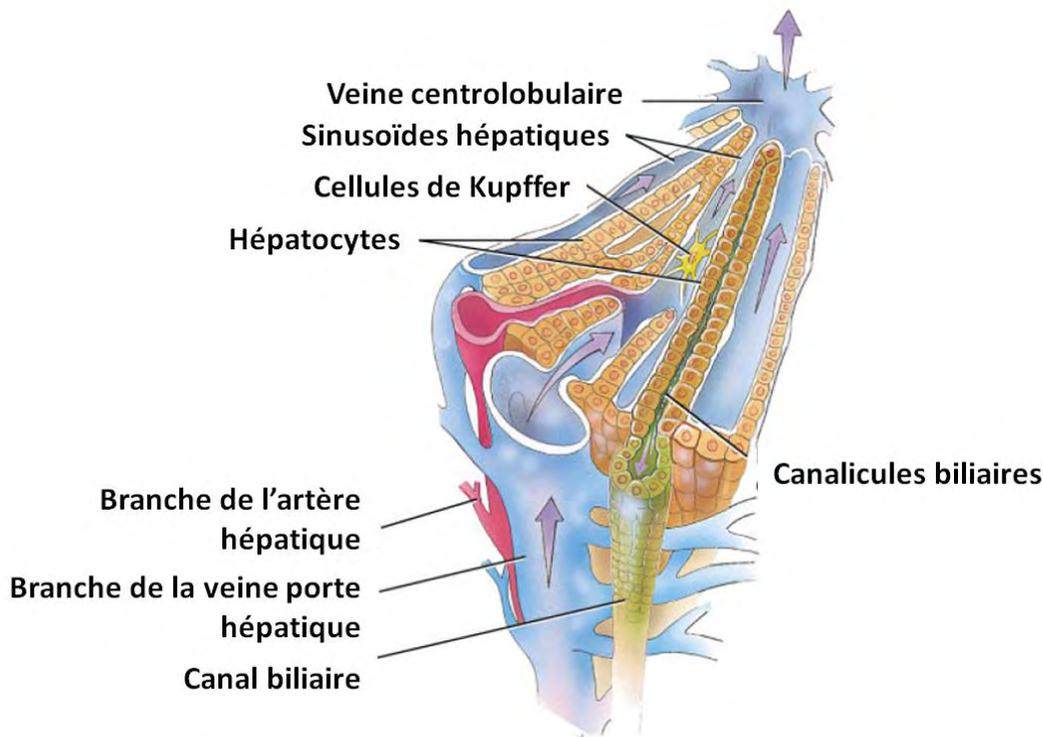


Figure 1. Le lobule hépatique, une unité fonctionnelle du foie. D'après (Maher 1997; Malarkey, Johnson et al. 2005).

Le lobule hépatique se présente comme une structure hexagonale, organisée autour de la veine centrolobulaire et entourée d'espaces porte, où sont groupées les branches de l'artère hépatique, de la veine porte et des canaux biliaires. Le sang provient de deux sources distinctes : l'artère hépatique, une branche du tronc coeliaque, qui apporte au foie du sang oxygéné, et la veine porte hépatique qui apporte du sang pauvre en oxygène mais riche en substances nutritives et xénobiotiques récemment absorbés en provenance directe de l'intestin grêle et du gros intestin. Ces vaisseaux entrent dans le foie par sa face inférieure, puis se divisent le long des cloisons fibreuses pour devenir des vaisseaux segmentaires. Les petites veinules portes et les artérioles hépatiques terminales se déversent dans les sinusoides qui convergent vers le centre du lobule pour se jeter dans la veine centrolobulaire. A l'inverse, la bile, formée par les hépatocytes, est drainée par des sillons creusés sur leurs surfaces pariétales. Les sillons appartenant à deux hépatocytes, placés en vis-à-vis, forment des canalicules puis convergent pour former des ductules biliaires ayant une paroi. De là, la bile va se retrouver stockée par la vésicule biliaire et/ou progresser vers le tube digestif par le canal cholédoque. Au niveau histologique, on définit deux zones fonctionnelles : la zone périportale, centrée par l'espace porte, et la zone périveineuse, centrée par la veine centrolobulaire.

I. Métabolisme glucido-lipidique

Les fluctuations d'apport alimentaire vont orienter le foie vers un métabolisme de synthèse, de stockage, de réserve ou au contraire de dégradation des nutriments. La période post prandiale ou absorptive couvre les quatre premières heures après un repas. Un accroissement transitoire du glucose, des acides aminés et des lipides (sous forme de chylomicrons) dans la circulation sanguine est observé. Les nutriments affluent au niveau des tissus. Le pancréas intervient par une sécrétion importante de l'insuline alors que celle du glucagon est inhibée. Le métabolisme est orienté vers la synthèse des glucides et des lipides en vue de stockage. Le glucose intracellulaire peut entrer dans différentes voies métaboliques : la glycogénogenèse correspondant au stockage de glucose sous forme de glycogène ; la glycolyse permettant de produire de l'énergie à partir du glucose ; la lipogenèse *de novo* permettant de produire des acides gras (AG) à partir de glucose (Bechmann, Hannivoort et al. 2012).

En passant de la période post-prandiale à la période post-absorptive, soit 4 à 12 heures après un repas, puis de jeûne, soit 12 à 24 heures et au-delà après un repas, le rapport insuline/glucagon décroît et s'inverse. Le foie assure alors une production de glucose suffisante pour maintenir une glycémie de 5,5 mM. C'est une période catabolique où le foie synthétise le glucose par la mobilisation des réserves de glycogène et par la synthèse *de novo* de glucose ou néoglucogenèse. Le métabolisme lipidique est orienté essentiellement vers la dégradation des acides gras et la production de corps cétoniques (Finn and Dice 2006).

1. Homéostasie glucidique

En situation post-prandiale, le glucose, présent en quantité importante, est transporté à l'intérieur de la cellule par l'intermédiaire de transporteurs spécifiques. Les protéines de transport GLUT (glucose transporter) assurant la diffusion facilitée du glucose sont exprimées de manière ubiquitaire (Scheepers, Joost et al. 2004). Le foie met en réserve la majeure partie du glucose sous la forme d'un polysaccharide : le glycogène, c'est la glycogénogenèse. Le glycogène consiste en des chaînes de glucoses reliées linéairement par des liaisons α 1-4 et ramifiées par des liaisons en α 1-6. Les différentes étapes de la synthèse de ce polysaccharide sont récapitulées dans la **Figure 2**. La glycogène-synthase est la deuxième enzyme limitante de cette voie après la glucokinase (Bechmann, Hannivoort et al. 2012; Jitrapakdee 2012).

A l'état de jeûne, le foie est capable d'assurer un apport de glucose à l'organisme à partir de ses ressources en glycogène (glycogénolyse) et lorsque le jeûne se prolonge, à partir de la synthèse *de novo* de glucose (néoglucogenèse) (Jitrapakdee 2012). Ainsi, au bout de 10 heures de jeûne, la production hépatique de glucose proviendrait à 50% de la glycogénolyse et 50% de la néoglucogenèse alors qu'au bout de 40 heures, cette dernière assurerait 90% de cette production (Konig, Bulik et al. 2012).

La glycogénolyse permet à l'organisme de mobiliser le glycogène stocké. L'enzyme limitante de cette voie métabolique est la glucose 6-phosphatase. Elle transforme le glucose-6-phosphate en glucose (**Figure 2**). Le maintien de la glycémie par ce processus est transitoire puisque les réserves du foie sont limitées et s'épuisent au bout de 24 heures (Roach, Depaoli-Roach et al. 2012). Les voies de la glycogénogenèse et de la glycogénolyse partagent un ensemble d'enzymes étant sous le contrôle de facteurs nutritionnels, hormonaux et allostériques par des réactions de phosphorylation/déphosphorylation qui permettent des réponses rapides du foie selon le statut nutritionnel de l'individu (Ramnanan, Edgerton et al. 2011; Roach, Depaoli-Roach et al. 2012).

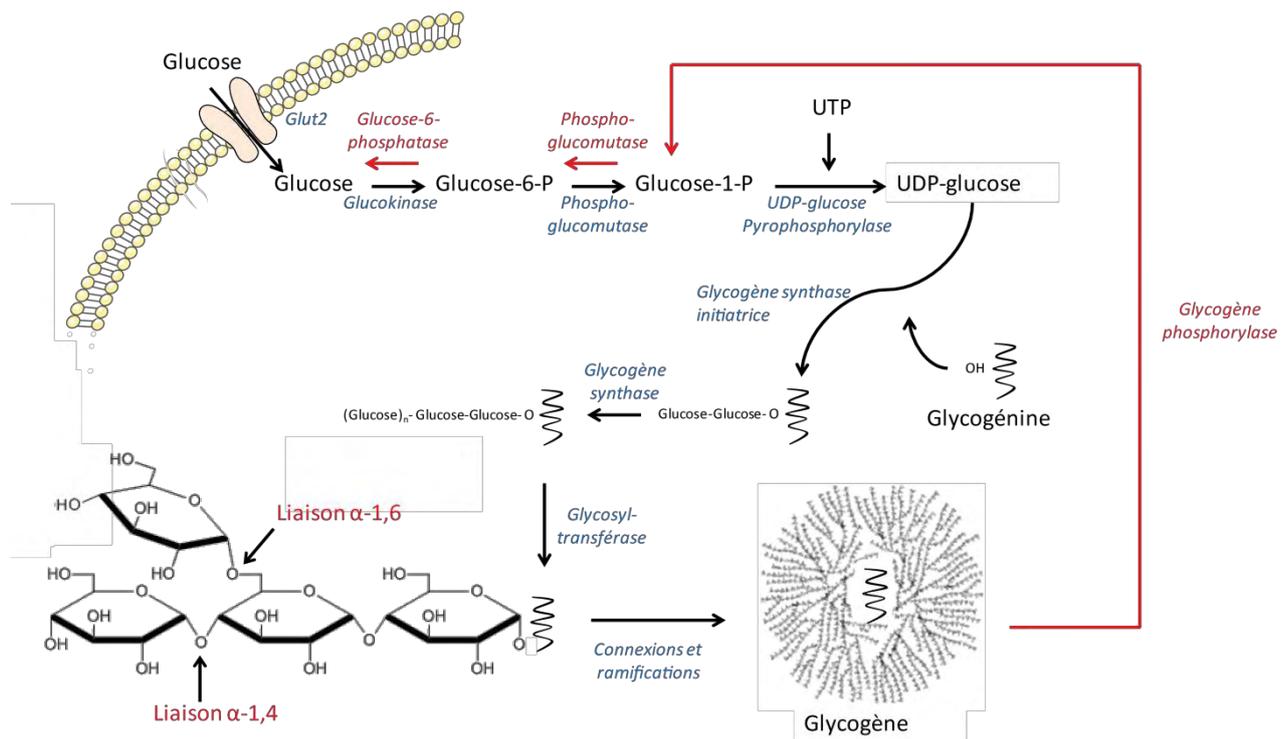


Figure 2. La glycogénogenèse et la glycogénolyse. Inspiré de (Agius 2010; Roach, Depaoli-Roach et al. 2012).

En situation post-prandiale, le foie met en réserve la majeure partie du glucose sous la forme d'un polysaccharide : le glycogène. Brièvement, le glucose intracellulaire est d'abord phosphorylé pour donner le glucose-6-phosphate qui sera isomérisé en glucose-1-phosphate, activé par de l'UTP (uridine triphosphate) entraînant la formation d'UDP-glucose. L'activation de la glycogène synthase permet aux UDP-glucoses de se lier les uns après les autres à la chaîne en voie d'élongation ayant pour extrémité une molécule de glycogénine. Après la fixation d'un certain nombre de résidus glycosyles, la glycosyl-4,6-transférase transfère un bloc de 5 à 8 unités en C6 d'un résidu d'au moins 11 unités entraînant la formation d'une ramification ; la synthèse reprend ensuite jusqu'à l'obtention du polysaccharide (Hers 1976).

En période post absorptive ou de jeûne, la glycogénolyse, qui permet la formation de glucose-6-phosphate sans consommation d'ATP, se réalise en trois étapes principales : dans le cytosol, sous l'action de la glycogène phosphorylase, le glycogène est phosphorolysé en glucose 1-phosphate. Ce dernier est ensuite isomérisé en glucose-6-phosphate, réaction catalysée par la phospho-glucomutase. Finalement le glucose-6-phosphate est transformé en glucose par la glucose-6-phosphatase, et ceci au niveau du réticulum endoplasmique des cellules hépatiques, les seules à posséder cette enzyme.

La néoglucogénèse permet au foie de produire du glucose à partir de précurseurs non glucidiques tels que le lactate, les acides-aminés ou le glycérol (Schutz 2011; Jitrapakdee 2012). La régulation de cette voie est sous le contrôle du rapport insuline/glucagon. En réponse à de faibles niveaux en glucose, le glucagon inhibe l'activité phosphatase des enzymes de la voie « inverse » de la néoglucogénèse : la glycolyse (Wang, Iwasaki et al. 2009), et stimule la dégradation des triglycérides au niveau du tissu adipeux à l'origine d'une libération de glycérol et au niveau du muscle permettant la libération acides aminés, substrats de cette voie. A l'inverse, l'insuline possède une activité anti-lipolytique (Jitrapakdee 2012). La néoglucogénèse se déroule essentiellement dans le foie mais également au niveau du rein et de l'intestin (Mithieux, Gautier-Stein et al. 2006; Mitrakou 2011). Douze réactions sont nécessaires, impliquant des enzymes communes à la voie de la glycolyse et quatre autres spécifiques de cette voie (pyruvate carboxylase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, fructose-1,6-bisphosphatase et glucose-6-phosphatase) (**Figure 3**) (Jitrapakdee 2012).

2. La lipogénèse *de novo*

La lipogénèse est un processus spécifique du foie même si certains tissus comme la glande mammaire peuvent y faire appel notamment en période de lactation (Han, Li et al. 2012). Elle consiste à synthétiser des acides gras à partir de molécules d'acétyl-CoA produites principalement par la glycolyse à partir du glucose.

La glycolyse consiste en la transformation progressive d'une molécule de glucose en pyruvate. Elle comporte 10 étapes se déroulant dans le cytoplasme (**Figure 3**). Les trois enzymes clés et irréversibles de cette voie sont la glucokinase, la phosphofructokinase et la pyruvate kinase (Bechmann, Hannivoort et al. 2012). L'insuline augmente la glycolyse en induisant ces enzymes (Wang, Iwasaki et al. 2009). En présence d'oxygène, le pyruvate, produit par la réaction de glycolyse, entre dans la mitochondrie où il est oxydé et décarboxylé en acétyl-Coenzyme A (acétyl-CoA), par un complexe enzymatique : la pyruvate déshydrogénase (PDH). La PDH est régulée par des réactions de phosphorylations/déphosphorylations, respectivement par le glucagon qui l'inhibe de manière indirecte *via* la pyruvate carboxylase (Agius and Alberti 1985) et par l'insuline qui l'active (Bechmann, Hannivoort et al. 2012). L'acétyl-CoA est un précurseur pour les réactions de synthèse des acides gras. Mais ne pouvant pas être transporté sous cette forme dans le cytosol, l'acétyl-CoA est transformé en citrate par une condensation avec l'oxaloacétate par la citrate synthase. C'est la première étape du cycle de Krebs. Le citrate est alors transporté vers le cytosol à travers la membrane mitochondriale interne puis retransformé en acétyl-CoA par l'ATP citrate lyase (ACLY) (Dentin, Girard et al. 2005; Postic and Girard 2008). Puis, l'acétyl-CoA est carboxylé en malonyl-CoA sous l'action de l'acétyl-CoA carboxylase (ACC). C'est l'étape limitante de cette voie nommée lipogénèse *de novo* (**Figure 4**). Elle a lieu dans le foie et le tissu adipeux, cependant, chez l'Homme, elle est principalement hépatique (Diraison, Yankah et al. 2003). Suite à cette réaction enzymatique, un seul

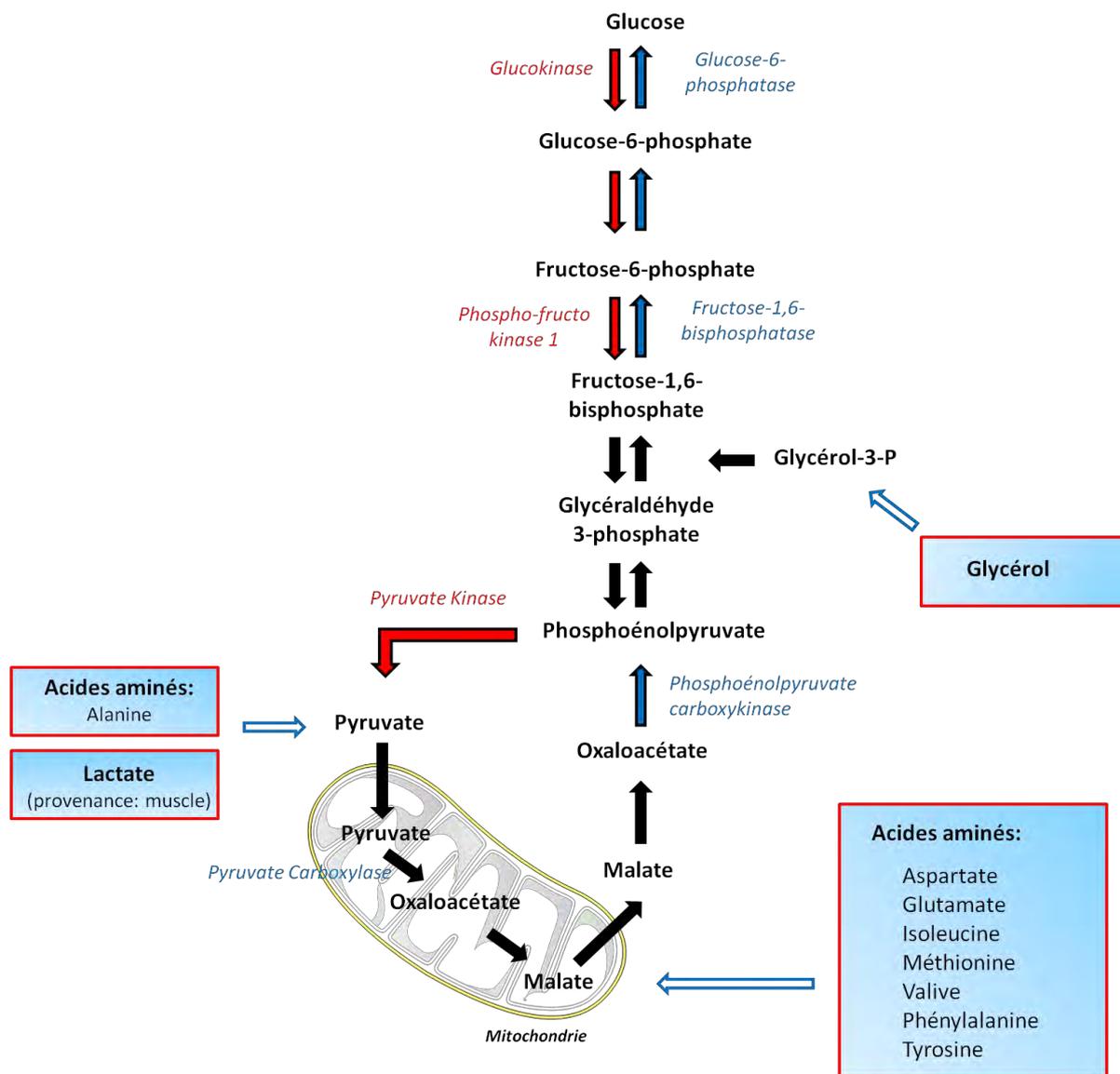


Figure 3. Les enzymes clés de la glycolyse (en rouge) et de la néoglucogenèse à partir de précurseurs non glucidiques (en bleu). D’après (Previs, Brunengraber et al. 2009; Jitrapakdee 2012; König, Bulik et al. 2012).

Dans le foie, la **glycolyse** est une voie métabolique d’assimilation du glucose. Le glucose intracellulaire est activé par phosphorylation par une glucokinase (GK), ce qui conduit à la formation du glucose-6-phosphate (G6P). Le G6P est ensuite isomérisé puis phosphorylé par la phosphofructokinase 1 (PFK1) pour donner du fructose 1,6-bisphosphate (F-1,6-bisP). Le clivage de la molécule de F-1,6-bisP aboutit à la formation de glycéraldéhyde-3-phosphate. Ce dernier subit une série de réactions enzymatiques (phosphorylation, isomérisation, déshydratation) pour former du phosphoenolpyruvate (PEP). Ensuite, la pyruvate kinase spécifique de type L (L-PK) phosphoryle le PEP, permettant la production de pyruvate. La **néoglucogenèse** permet la production de glucides à partir de précurseurs non glucidiques tels que le lactate, des acides-aminés glucoformateurs et du glycérol. Elle n’est pas exactement l’inverse de la glycolyse puisque certaines réactions enzymatiques irréversibles de la glycolyse sont court-circuitées par quatre enzymes caractéristiques. La phosphoenolpyruvate-carboxykinase (action indirecte) permet la formation du phosphoenolpyruvate à partir du pyruvate par l’intermédiaire de l’oxaloacétate. Ce dernier étant formé à partir de pyruvate par la pyruvate carboxylase. La fructose-1,6-bisphosphatase (action directe) catalyse la formation du fructose-6-phosphate à partir du fructose-1,6-bisphosphate, et la glucose-6-phosphatase (action directe) permet la formation du glucose à partir du glucose-6-phosphate.

complexe multifonctionnel cytosolique : l'acide gras synthase (FAS), catalyse toutes les réactions conduisant à l'obtention d'un acide gras saturé à 16 carbones : le palmitate. L'expression des enzymes de la lipogenèse (ACC, FAS) est régulée selon le statut nutritionnel (Clarke 1993; Fougère, Girard et al. 1996). Un régime hyperglucidique et plus particulièrement des taux élevés d'insuline et de glucose induiront leur expression génique (Kim, Sarraf et al. 1998; Koo, Dutcher et al. 2001).

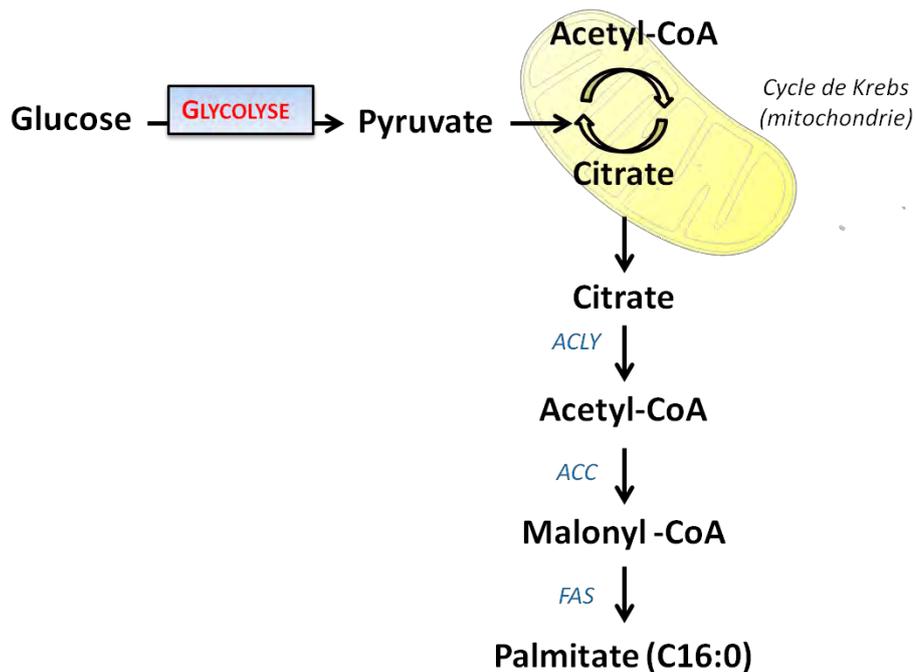


Figure 4. Enzymes clés de la lipogenèse *de novo*. D'après (Dentin, Girard et al. 2005; Postic and Girard 2008).

L'acétyl-CoA, le précurseur de la biosynthèse de l'acide palmitique est fourni par le cycle de Krebs qui utilise la glycolyse. L'acétyl-CoA mitochondrial est ensuite condensé pour former le citrate et est exporté vers le cytosol. L'ATP citrate lyase (ACLY) convertit le citrate en Acétyl-CoA, qui est à son tour carboxylé en Malonyl-CoA par l'acétyl-CoA carboxylase (ACC). L'acide gras synthase (FAS) effectue la synthèse d'un premier acide gras à 4 carbones, le butyryl, par un cycle de quatre réactions à partir d'acétyl-CoA et de malonyl-CoA. Ces 2 composés vont d'abord être condensés puis décarboxylés pour produire un composé à 4 carbones et libérer une molécule de CO₂. Cette étape est suivie de 3 réactions : une première réduction, une déshydratation puis une deuxième réduction. Ainsi, à la fin de ce cycle, un butyryl à 4 carbones est formé, et 2 NADPH,H⁺ ont été consommés. La synthèse du palmitate à 16 carbones est le produit de la répétition de ce cycle de quatre réactions qui, à 6 reprises, apportent 6 malonyl-CoA. Cette succession de cycles est appelée l'hélice de Wakil, chaque tour d'hélice correspondant à l'ajout successif de 2 carbones à l'acide gras en cours de synthèse. L'élongation s'arrête au palmitoyl-CoA, dit palmitate, qui est libéré par hydrolyse.

Les acides gras issus de la lipogénèse *de novo* ou de l'alimentation (famille n-3 et n-6, dits essentiels) vont pouvoir subir des transformations biochimiques permettant la biosynthèse d'une grande multiplicité d'acides gras à longues chaînes. Ils pourront être classés selon leur structure en fonction de la longueur de la chaîne carbonée qui varie de 4 à plus de 24 carbones et en fonction de leur degré d'insaturation, c'est-à-dire du nombre de doubles liaisons carbone-carbone dans la molécule. Les acides gras à chaîne moyenne ou courte ont un nombre de carbones compris entre 4 et 10, et les acides gras à longue chaîne à partir de 12. La longueur de chaîne a des conséquences sur l'insolubilité dans l'eau. Selon leur degré d'insaturation, on distingue les acides gras saturés, monoinsaturés (une double liaison) et polyinsaturés (plusieurs doubles liaisons) (**Figure 5**) (Guillou, Zadravec et al. 2010).

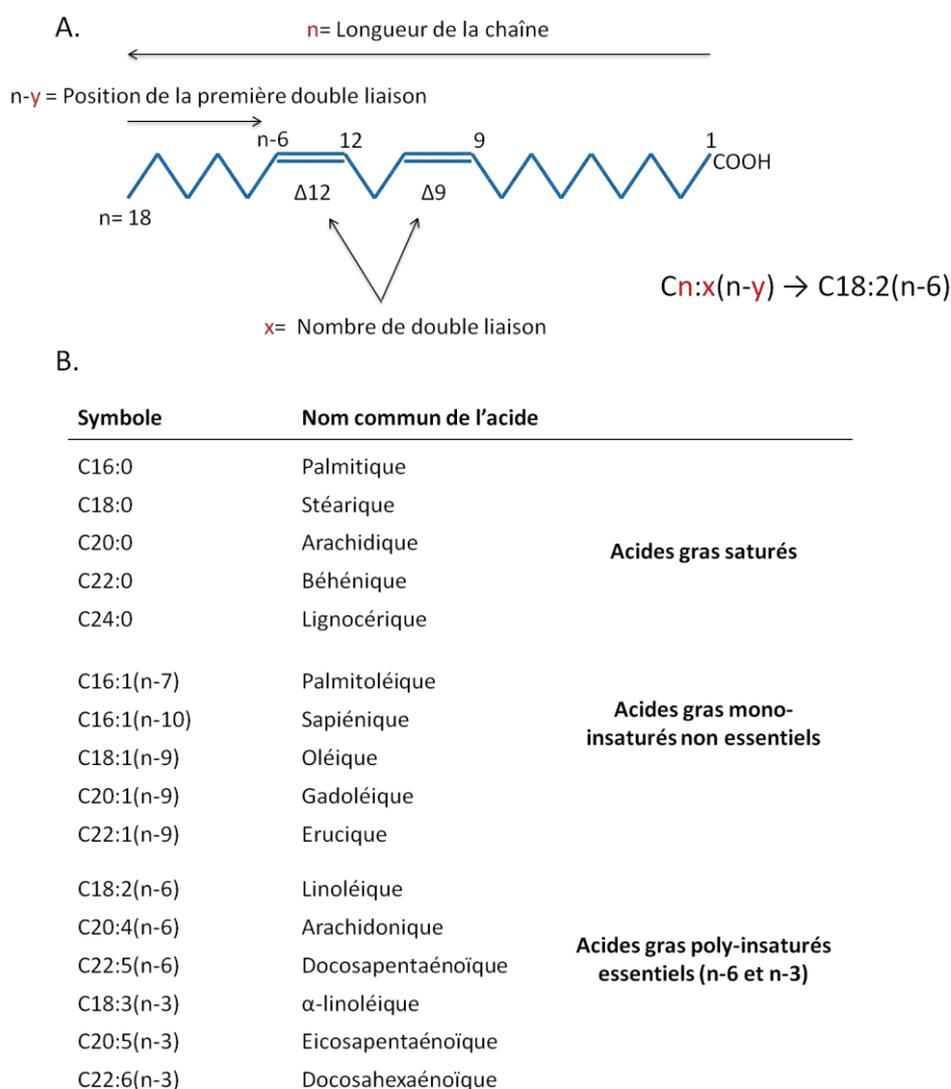


Figure 5. Structure et nomenclature des acides gras. D'après (Guillou, Zadravec et al. 2010).
A. Exemple de l'acide linoléique C18:2(n-6); B. Noms communs de différents acides gras.

Les réactions de désaturation permettent d'ajouter des doubles liaisons au niveau des acides gras provenant de la lipogenèse *de novo* ou de l'alimentation (**Figure 6**). Les stéaroyl-CoA désaturases (SCD) catalysent la synthèse d'acides gras mono-insaturés. L'isoforme SCD1, également nommée delta-9-désaturase, est une isoforme exprimée fortement dans le foie et le tissu adipeux (Guillou, Zadavec et al. 2010; Sampath and Ntambi 2011) et est limitante pour la lipogenèse (Miyazaki, Kim et al. 2001). Les *fatty acid* désaturases (FADS) sont des enzymes clés de la transformation des acides gras en acides gras fortement insaturés.

L'élongation des acides gras permet la formation des acides gras à longue chaîne ou à très longue chaîne (**Figure 6**). Les élongases ELOVL (*Elongation of very long chain fatty acid*), sont localisées au niveau mitochondrial et au niveau du réticulum endoplasmique. Chez les mammifères, 7 différentes élongases ont été caractérisées (ELOVL 1 à 7). ELOVL6 est exprimée au niveau du foie et du tissu adipeux (Moon, Shah et al. 2001; Matsuzaka, Shimano et al. 2002).

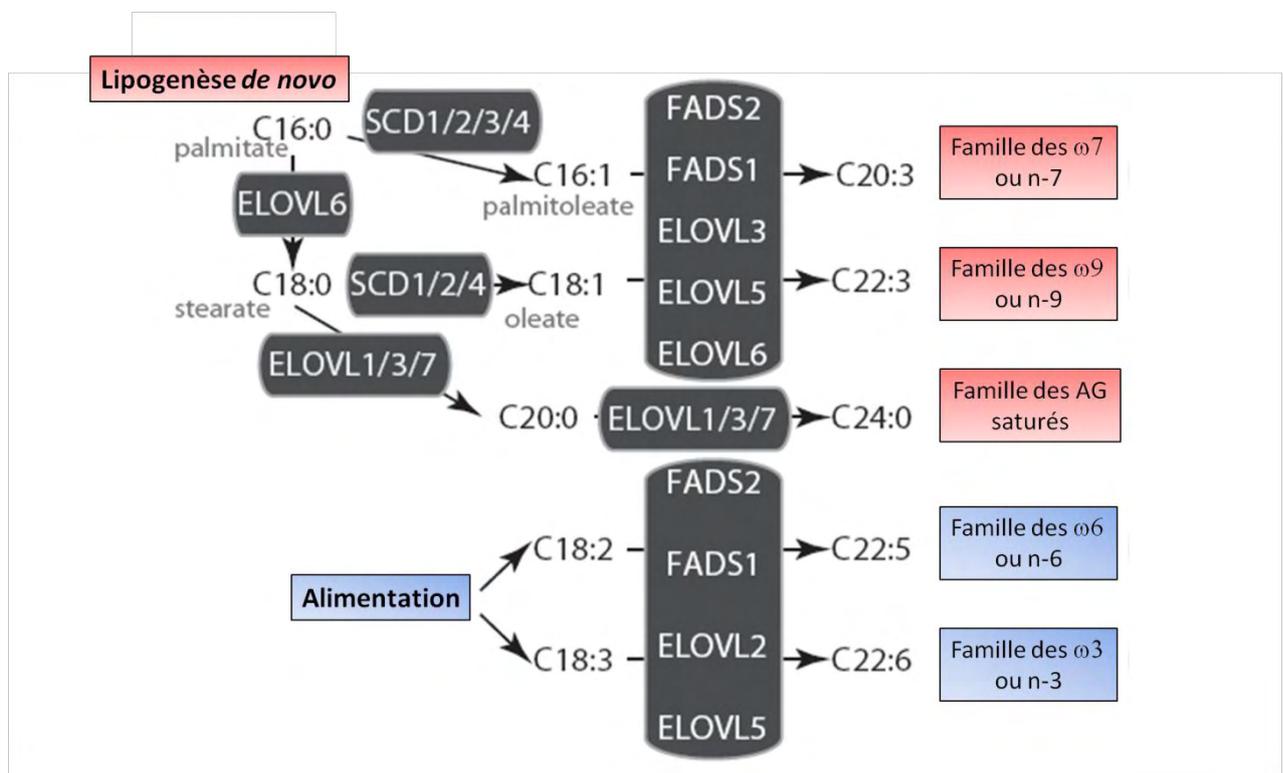


Figure 6. Transformation des acides gras en acides gras à plus longue chaîne. D'après (Ducheix, Lobaccaro et al. 2011)

L'acide palmitique (C16:0) peut être allongé par l'élongase ELOVL 6 pour former le stéarate (C18 :0) ou être désaturé par la stéaroyl-CoA désaturase 1 (SCD1) pour former le palmitoléate (C16:1 n-7). Le stéarate peut également être désaturé par SCD1 pour former l'oléate (C18: 1 n-9). Différentes SCD et *fatty Acid* désaturases (FADS) peuvent allonger et désaturer les acides gras, notamment les acides gras essentiels fournis par l'alimentation, afin de fournir à l'organisme une plus grande variété d'acides gras.

3. Synthèse des triglycérides et échanges inter-organes

Les acides gras à longues chaînes synthétisés par le foie peuvent entrer dans la composition de nombreuses classes de lipides telles que les triglycérides, les phospholipides et les esters de cholestérol (**Figure 7**). En situation physiologique, les triglycérides synthétisés sont soit stockés momentanément dans le cytosol au sein de gouttelettes lipidiques, soit transportés dans les peroxysomes et l'appareil de golgi pour former les VLDL qui seront ensuite excrétés dans la circulation (Ohsaki, Cheng et al. 2009). La synthèse des triglycérides implique l'estérification des acyl-CoA provenant de la lipogenèse avec le glycérol-3-phosphate (G3P), issu de la glycolyse ou de la synthèse de glycérol, pour former des mono-, di- ou tri-glycérides en fonction du nombre d'acyl-CoA ajoutés. Cette réaction implique les enzymes de la famille des GPAT (*sn-1*-glycérol-3-phosphate acyltransférase) pour produire de l'acide lysophosphatidique (LPA). Ensuite, le LPA est estérifié en position *sn-2* par les lysophospholipides acyltransférases (LPAAT, appelées également AGPAT), formant ainsi de l'acide phosphatidique (PA) (Coleman and Mashek 2011). Le PA est ensuite déphosphorylé par les lipines (PA phosphatase ou PAP ou LPIN) formant ainsi du diacylglycérol (DAG). Enfin, les diacylglycérol acyltransférases (DGAT) catalysent le transfert d'un troisième acyl-CoA sur un DAG en position *sn-3* pour former les triglycérides (TAG ou triglycérides ou TG). Elles sont exprimées au niveau du foie et du tissu adipeux et sont localisées au niveau du réticulum endoplasmique (Cases, Smith et al. 1998; Cases, Stone et al. 2001).

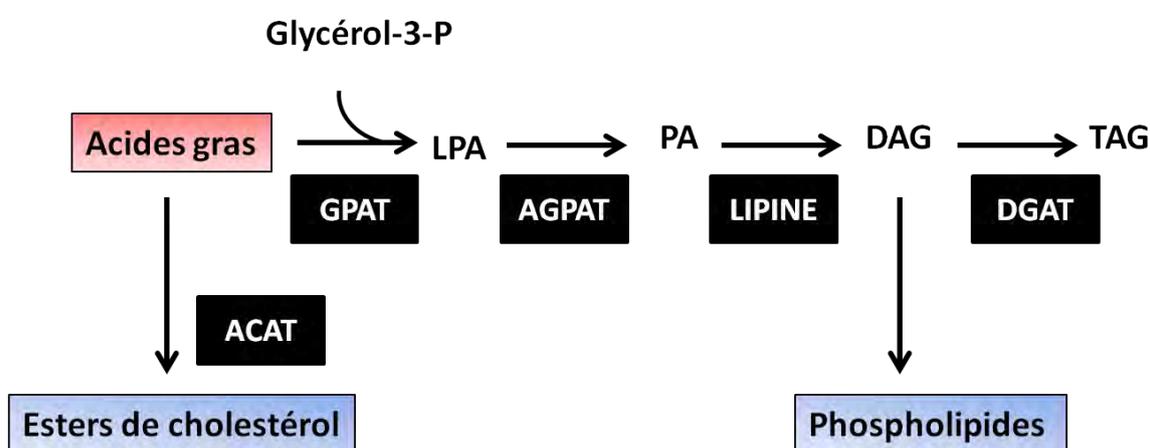


Figure 7. Le devenir des acides gras à longue chaîne. D'après (Ducheix, Lobaccaro et al. 2011).

Les acides gras sont estérifiés avec le glycérol-3-Phosphate par les GPAT (*sn-1*-glycérol-3-phosphate acyltransférase) pour produire de l'acide lysophosphatidique (LPA). Celui-ci est estérifié par les lysophospholipide acyltransférases (AGPAT) formant de l'acide phosphatidique (PA). Il est ensuite déphosphorylé par les lipines, formant ainsi du diacylglycérol (DAG). Enfin, la diacylglycérol acyltransférase (DGAT) catalyse le transfert d'un troisième acyl-CoA sur un DAG pour former les triacylglycérols (TAG). Les DAG sont également des précurseurs de la synthèse de phospholipides, et les esters de cholestérol sont issus du transfert du groupement acyl des acides gras sur le groupement hydroxyle du cholestérol par la cholestérol acyltransférase (ACAT).

Après leur synthèse au niveau du RE et en raison de leur nature hydrophobe, les triglycérides sont rapidement stockés dans le cytosol sous forme de gouttelettes lipidiques. Les gouttelettes lipidiques, assemblées au niveau du RE, sont composées d'une couche de phospholipides, à l'intérieur de laquelle on retrouve des TG et des esters de cholestérol. La structure des gouttelettes lipidiques est maintenue par association avec des protéines appelées Périlipine (Brasaemle 2007; Kimmel, Brasaemle et al. 2010) (**Figure 8**). Les triglycérides sont ensuite incorporés aux VLDL. Chaque VLDL est constitué d'une molécule d'ApoB 100 et d'autres apolipoprotéines (ApoC3, ApoE). L'ApoB 100 est traduite à la surface du RE et est conjointement transloquée dans la lumière du RE. Le chargement en lipides de l'ApoB s'effectue par la protéine chaperonne MTTP (*microsomal triacylglycerol transfer protein*), ce qui en même temps facilite sa translocation (Hussain, Shi et al. 2003). Ce processus aboutit à la formation de pré-VLDL, qui sont ensuite chargés en TG pour former des VLDL. Ces VLDL sont exportés à la lumière du RE où ils peuvent être chargés avec une masse supplémentaire de TG provenant des gouttelettes lipidiques. Ils sont sécrétés dans la circulation grâce à un transport vésiculaire du RE au golgi permettant de fournir des acides gras aux organes périphériques. Ils permettent également d'échanger activement des phospholipides, des triglycérides et des esters de cholestérol avec les HDL, qui sont impliqués principalement dans le transport réverse du cholestérol (Rothblat and Phillips 2010). L'insuline freine la sécrétion des VLDL par son effet inhibiteur sur l'expression de l'ApoB et de la MTTP (Gibbons, Brown et al. 2002) et elle va orienter les triglycérides des cellules hépatiques vers un compartiment de réserve au détriment de l'incorporation au sein des VLDL.

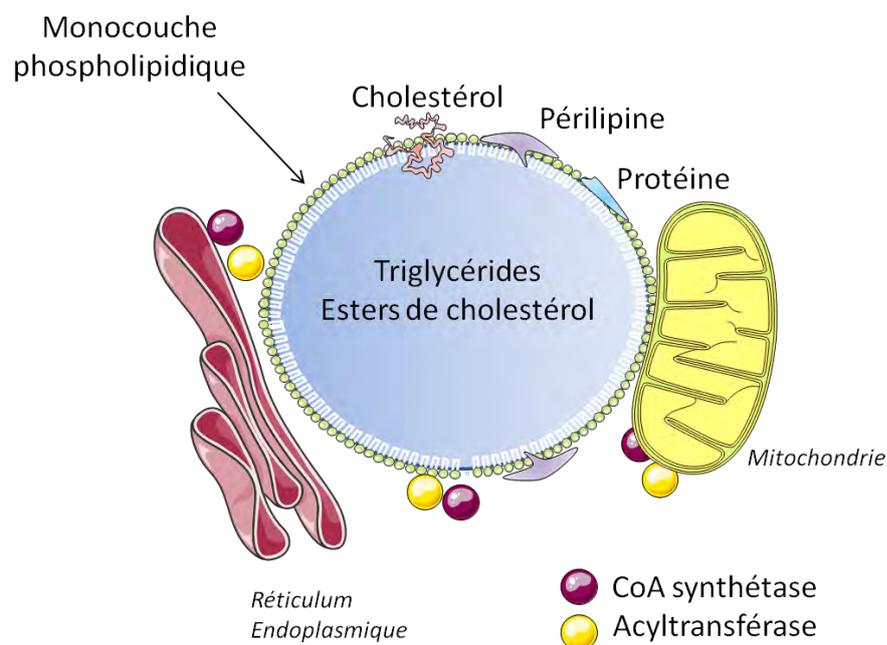


Figure 8. Structure d'une gouttelette lipidique. D'après (Ohsaki, Cheng et al. 2009).

Les gouttelettes lipidiques possèdent en commun une structure simple composée d'un noyau hydrophobe, formé essentiellement de triglycérides de stockage et d'esters de cholestérol, entouré d'une monocouche de phospholipides auxquelles se lient les protéines dont les périlipines et le cholestérol.

4. Catabolisme des acides gras

En l'absence de glucose, donc en période de jeûne, les triglycérides de réserve constituent une source d'énergie utilisable par toutes les cellules. Par le processus de lipolyse, ils sont mobilisés et dégradés en acides gras non estérifiés et en glycérol (Fukao, Lopaschuk et al. 2004). Le métabolisme lipidique est alors orienté vers la dégradation des acides gras et la production de corps cétoniques. Une forte oxydation des acides gras constitue la principale source énergétique du foie. Tout d'abord, les acides gras doivent être convertis en un intermédiaire actif avant d'être métabolisés. Cette première étape a lieu dans le cytoplasme, au niveau de la membrane externe mitochondriale où est située l'enzyme catalysant cette réaction : l'acylCoA synthétase. Ensuite, l'acide gras activé sera catabolisé par le biais de la bêta(β)-oxydation mitochondriale, la β -oxydation péroxysomale ou de l'omega(ω)-hydroxylation microsomale, selon la longueur de sa chaîne et ses saturations (**Figure 9**). La β -oxydation est la voie majoritaire d'oxydation des AG. C'est un processus aérobie. Elle correspond au raccourcissement progressif des acides gras pour générer des acétyl-CoA qui se condensent et génèrent des corps cétoniques (Moczulski, Majak et al. 2009).

Les acides gras saturés à chaîne courte et à longue chaîne (>12 carbones) utiliseront préférentiellement la voie de la β -oxydation mitochondriale. Les acides gras à chaîne courte peuvent facilement pénétrer au sein de la mitochondrie, tandis que les acides gras à longue chaîne sont incapables de traverser la membrane mitochondriale. L'isoforme hépatique de la carnitine palmitoyltransférase 1 (CPT1) catalyse le transfert de l'acyl-CoA sur la carnitine pour former l'acylcarnitine, dans l'espace inter-membranaire de la mitochondrie. La CPT1 est l'enzyme limitante de cette voie, son activité est inhibée par le malonyl-CoA, un intermédiaire de la lipogénèse. Son expression est corrélée au statut nutritionnel : induite au cours du jeûne, elle est inhibée à l'état nourri ou par un régime hyperglucidique (Schreurs, Kuipers et al. 2010). Puis la carnitine-acylcarnitine translocase (CACT), localisée au niveau de la membrane interne, transporte l'acylcarnitine dans la mitochondrie. L'acyl-CoA sera alors reformé à partir de l'acylcarnitine *via* la carnitine palmitoyltransférase 2 (CPT2) (**Figure 9**) (Rufer, Thoma et al. 2009).

Notons que des réactions enzymatiques supplémentaires sont nécessaires pour la β -oxydation des acides gras insaturés. Les acyl-CoA sont dégradés par les enzymes classiques de la β -oxydation jusqu'à l'approche de la double liaison. Si la double liaison est en position impaire, une isomérase déplace la double liaison et en transforme l'isomérisation *cis* en *trans*, ce qui permet à la β -oxydation de se poursuivre de façon habituelle. Si la double liaison est en position paire, une réductase est nécessaire pour poursuivre la β -oxydation (van Weeghel, Te Brinke et al. 2012).

L'oxydation des acides gras à très longue chaîne (> 20C) se déroule à l'intérieur des peroxysomes, on parle de β -oxydation péroxysomale (Hua, Wu et al. 2012). Les étapes sont similaires à celles de la β -oxydation mitochondriale, mais si l'oxydation mitochondriale des acides gras permet la formation de CO₂, d'H₂O et

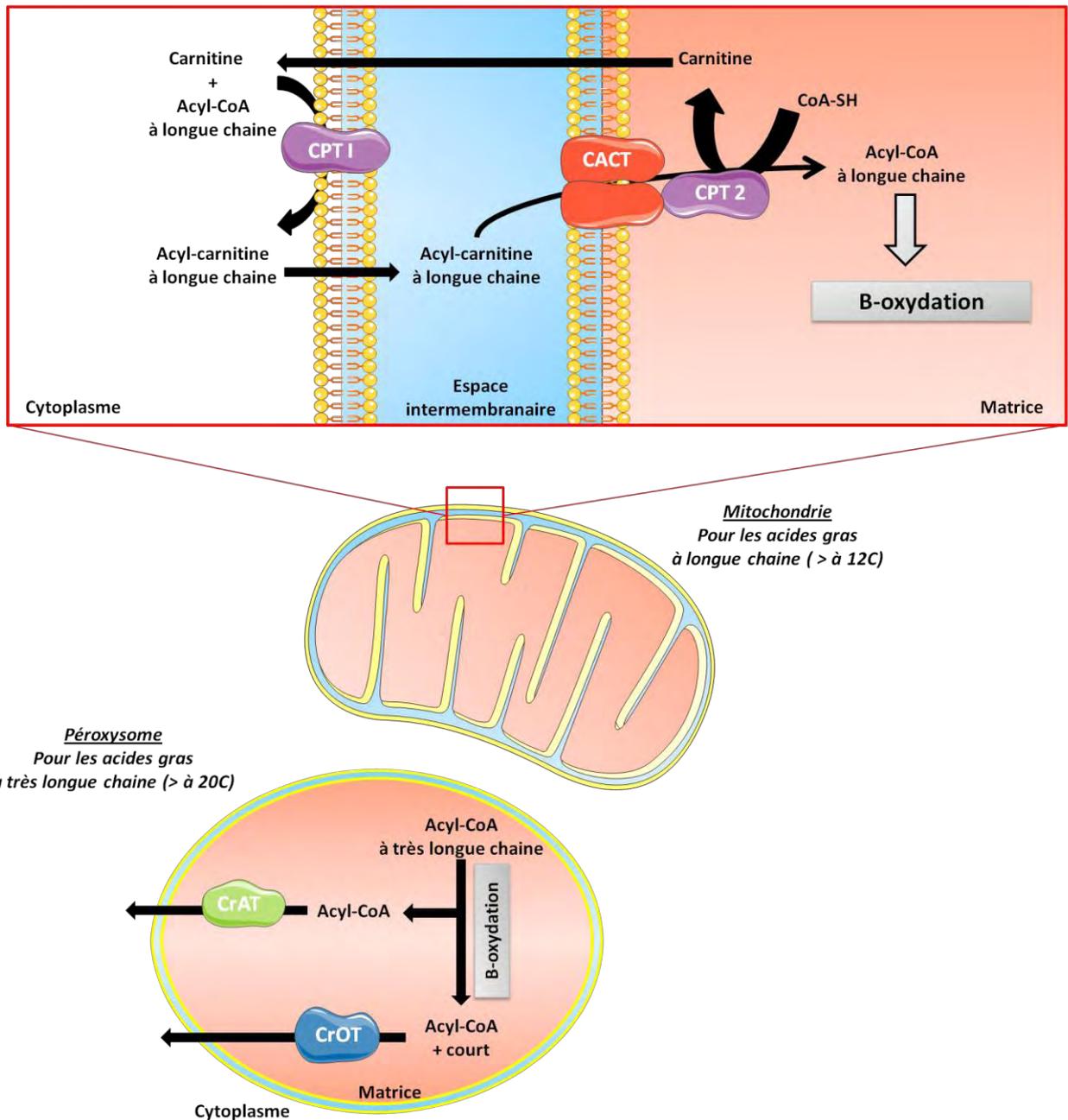


Figure 9. Le métabolisme mitochondrial et peroxysomal des acides gras. D'après (Le Borgne and Demarquoy 2003).

Les acides gras saturés à longue chaîne (>12 carbones) utiliseront préférentiellement la voie de la β -oxydation mitochondriale. L'isoforme hépatique de la carnitine palmitoyltransférase 1 (CPT1) doit catalyser le transfert de l'acyl-CoA sur la carnitine pour former l'acylcarnitine, dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie. Puis la carnitine acylcarnitine translocase (CACT), localisée au niveau de la membrane interne, transporte l'acylcarnitine dans la mitochondrie. L'acyl-CoA sera alors reformé à partir de l'acylcarnitine *via* la carnitine palmitoyltransférase 2 (CPT2). L'oxydation des acides gras à très longue chaîne (> 20C) se déroule à l'intérieur des peroxyosomes, on parle de β -oxydation peroxyosomale. Les étapes sont similaires à celles de la β -oxydation mitochondriale mais dans le peroxyosome, la β -oxydation n'est pas complète et aboutit à la formation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et d'acides gras à chaîne courte. Le devenir de ces derniers n'est pas clairement établi, mais il semble qu'ils soient trans-estérifiés en acyl-carnitine et quittent le peroxyosome pour être oxydés à l'intérieur de la mitochondrie. Deux enzymes dépendantes de la carnitine, la carnitine octanoyl transférase (CrOT) et la carnitine acétyl transférase (CrAT), semblent impliquées.

d'énergie, dans le peroxysome, la β -oxydation n'est pas complète et aboutit à la formation de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et d'acides gras à chaîne courte. Le devenir de ces derniers n'est pas clairement établi, mais il semble qu'ils soient trans-estérifiés en acyl-carnitine et quittent le peroxysome pour être oxydés à l'intérieur de la mitochondrie. Deux enzymes dépendantes de la carnitine, la carnitine octanoyl transférase (CrOT) et la carnitine acétyl transférase (CrAT), semblent impliquées (**Figure 9**) (Westin, Hunt et al. 2008).

L' ω -hydroxylation est une voie métabolique se déroulant au sein du réticulum endoplasmique. Elle oxyde les AG saturés et insaturés et aboutit à la formation de dicarboxyl-CoA qui sont utilisés dans la voie de la β -oxydation péroxydomale. Cette voie métabolique normalement mineure peut augmenter en cas de déficit enzymatique touchant la β -oxydation (Sanders, Ofman et al. 2008).

Pendant le jeûne, les corps cétoniques sont considérés comme des molécules énergétiques importantes. Seul le foie possède la capacité de synthétiser les corps cétoniques sous forme d'acétoacétate, de β -hydroxybutyrate et d'acétone à partir des acétyl-CoA, produits par l'oxydation des acides gras. Ils sont excrétés et utilisés à des fins énergétiques par d'autres tissus (cerveau, muscles striés et cardiaque par exemple) par l'intermédiaire de la circulation générale (Fukao, Lopaschuk et al. 2004).

II. Rôle du foie dans le métabolisme du cholestérol

Chez l'Homme, les besoins en cholestérol sont de l'ordre de 1 à 1,2 g/jour (Rezen, Rozman et al. 2011). Il est indispensable à la synthèse des acides biliaires, des hormones stéroïdiennes au sein des tissus stéroïdogéniques, des oxystérols et de la vitamine D (Rezen, Rozman et al. 2011). On le retrouve principalement au sein des membranes, auxquelles il confère des propriétés physiques particulières, régulant de ce fait de nombreuses voies métaboliques (Ikonen 2008).

Les voies décrites dans ce paragraphe sont représentées dans la **Figure 10**.

1. Synthèse hépatique de cholestérol

L'intestin représente le lieu d'absorption du cholestérol alimentaire ou biliaire tandis que le foie est le lieu important de sa synthèse. La synthèse endogène de cholestérol, réalisée à 80% par le foie, suffit à couvrir 70% des besoins, le cholestérol issu de l'alimentation apportant les 30% restants (Grundy 1983). L'intestin, la peau, les organes génitaux sont d'autres organes de la biosynthèse du cholestérol.

La synthèse du cholestérol est complexe, elle a lieu dans plusieurs organites cellulaires. Elle débute dans le cytosol à partir de molécules d'acétyl-CoA et se poursuit dans le réticulum endoplasmique et les peroxysomes (Soccio and Breslow 2004). Tous les carbones du cholestérol proviennent de l'acétate qui provient lui même de l'acétyl-CoA issu du métabolisme glucidique. Les réactions de synthèse et

d'estérification, nombreuses, peuvent être divisées en 4 étapes (Sakakura, Shimano et al. 2001) (**Figure 10**):

- La synthèse du mévalonate à 6 carbones à partir de 3 Acétyl-CoA. Trois enzymes sont impliquées dans cette première étape. L'acetyl-Coenzyme A acetyltransférase (ACAT) permet la condensation de 2 acétyl-CoA en acétoacétyl-CoA. Puis l'HMG-CoA synthase (HMGCS) permet la condensation d'un troisième acétyl-CoA pour former l'HMG-CoA. Enfin, l'HMG-CoA réductase (HMGCR) permet l'hydrolyse et la réduction de l'HMG-CoA en présence de 2 NADPH,H⁺ pour donner du mévalonate. L'HMGCR est l'enzyme limitante de la synthèse de cholestérol.
- La transformation du mévalonate en isoprène actif (isopentenylPyroPhosphate) à 5 carbones, qui implique la phospho-mévalonate kinase (MVK) et la mévalonate (diphospho) decarboxylase (MVD).
- La polymérisation de six isoprènes actifs par la farnesyl diphosphate synthase (FDPS) et la farnésyl diphosphate farnesyl transférase 1 (FDFT1) pour former le squalène à 30 carbones.
- La cyclisation du squalène et transformation en cholestérol. Le squalène est cyclisé en présence d'oxygène et de NADPH,H⁺ par une squalène époxidase (SQLE) et la lanosterol synthase (LSS) pour donner le lanostérol. Il s'en suivra une vingtaine de réactions pour supprimer les trois groupements méthyles, introduire un groupement hydroxyle et réarranger les doubles liaisons.

Le cholestérol sera incorporé aux VLDL sous forme de cholestérol estérifié en vue d'être transporté. D'autre part, le foie va intégrer les chylomicrons résiduels riches en cholestérol provenant de l'intestin ainsi que le cholestérol excédentaire synthétisé par les tissus périphériques extra-hépatiques *via* les HDL, afin de dégrader le cholestérol excédentaire en acides biliaires (**Figure 10**).

2. Gestion des besoins en cholestérol

La régulation de la biosynthèse du cholestérol est destinée à ne produire que le complément nécessaire au cholestérol d'origine exogène. Elle est principalement sous le contrôle de l'HMGCR, à court terme et à long terme. A court terme, l'HMGCR est activée par l'insuline par une déphosphorylation, et à l'inverse le glucagon l'inhibe (Ness, Zhao et al. 1994). Le mévalonate, le cholestérol issu de cette synthèse et les acides biliaires pourront effectuer un rétrocontrôle négatif sur l'HMGCR. A long terme, la biosynthèse du cholestérol est une régulation transcriptionnelle impliquant le facteur de transcription SREBP mature. Celui-ci active la transcription de nombreux gènes clés du métabolisme du cholestérol tels que le récepteur des LDL (LDLr) (Horton, Goldstein et al. 2002) (cf partie « Rôle de SREBP dans la régulation du cholestérol et de la lipogénèse »).

L'homéostasie du cholestérol est également régulée par son stockage au sein de gouttelettes lipidiques, rapidement utilisables pour la synthèse de membranes. Le stockage du cholestérol se fait sous forme d'esters. Dans les cellules, deux enzymes sont responsables de l'estérification, ACAT1 et ACAT2 (Acyl-CoA Cholestérol Acyl transférase 1 et 2), exprimées différemment selon le tissu considéré (Chang,

Sakashita et al. 2000). A l'inverse, l'hydrolyse des esters de cholestérol est effectuée par la cholestérol ester hydrolase (CEH) (Schmitz, Becker et al. 1996).

L'efflux du cholestérol nécessite les protéines de transport de la famille des *ATP-binding cassettes* (ABC) et plus particulièrement ABC-A1 et G1. Elles permettent le transport du cholestérol vers la membrane plasmique pour son appariement aux lipoprotéines. L'expression de ces protéines est sous le contrôle direct du récepteur nucléaire LXR (*Liver X receptor*) (Gelissen, Harris et al. 2006; Delvecchio, Bilan et al. 2007).

Le cholestérol est un stéroïde à 27 carbones qui ne peut être oxydé en acétyl-CoA comme les acides gras. Son élimination a lieu uniquement au niveau du foie, après avoir été transformé en acides biliaires. Ces derniers proviennent de plusieurs voies, la voie classique à partir du cholestérol, et la voie acide qui permet de dégrader certains oxystérols et les hormones stéroïdes, aboutissant respectivement à la formation de l'acide cholique et l'acide chénodésoxycholique, initiée respectivement par la cholestérol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) et la stérol 27-hydroxylase (CYP27A1). Ces deux acides biliaires dits primaires sont conjugués avec la glycine ou la taurine et excrétés par les voies biliaires dans le tube digestif. Sous l'action des bactéries intestinales, on peut obtenir des acides biliaires secondaires. Une petite partie des acides biliaires primaires et secondaires de l'intestin sont expulsés hors du corps dans les selles. La majeure partie est réabsorbée par les entérocytes, passe dans la circulation porte et retourne au foie.

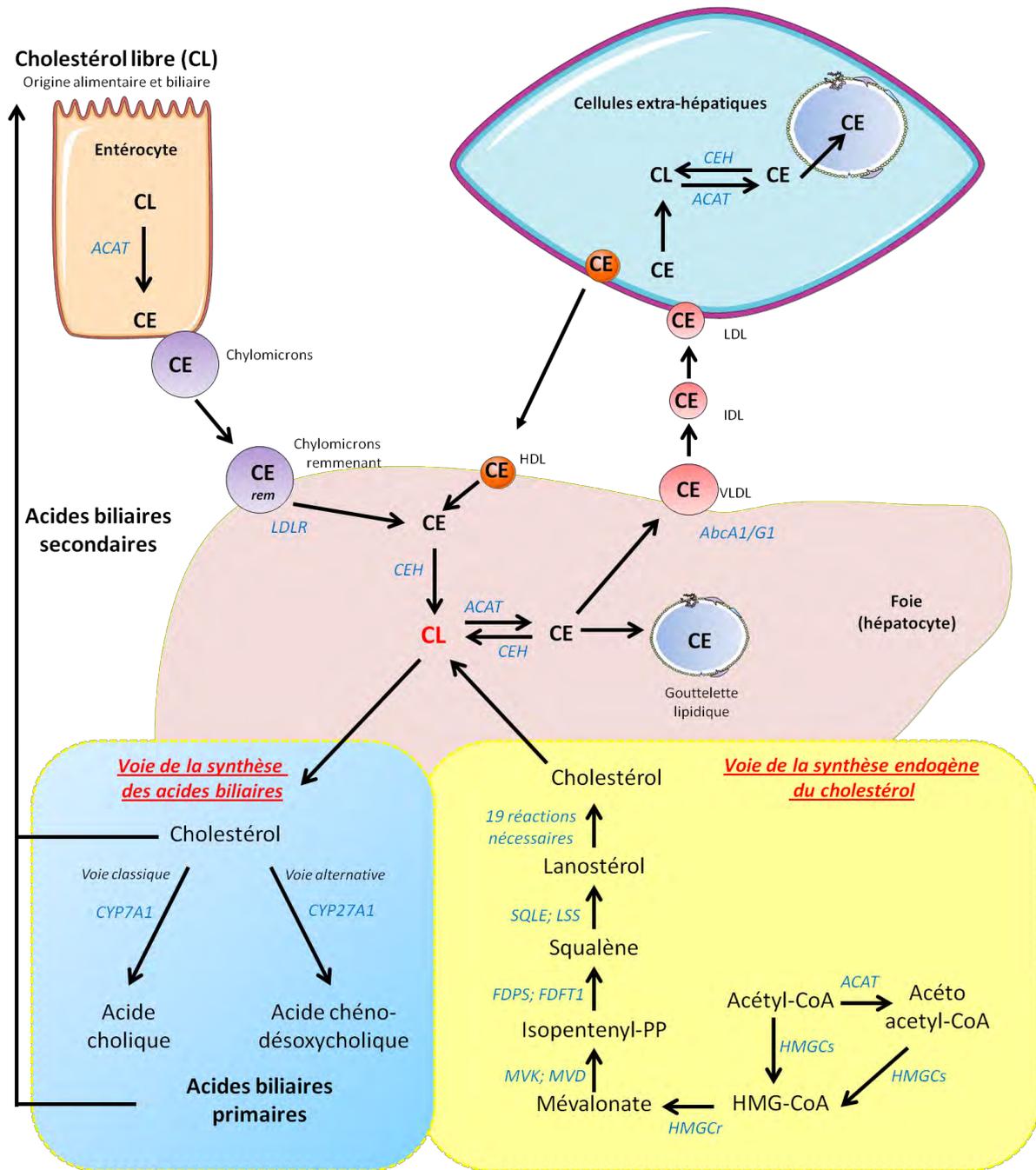


Figure 10. Métabolisme hépatique du cholestérol. Inspiré de (Sakakura, Shimano et al. 2001; Hu, Zhang et al. 2010)

La synthèse endogène en cholestérol couvre 70% des besoins, le reste provenant de l'alimentation. Le foie est l'organe principal de cette synthèse. La synthèse du cholestérol est représentée en jaune et sa dégradation par la voie des acides biliaires en bleu. Les voies de circulation du cholestérol entre les entérocytes, les hépatocytes et les autres cellules sont également représentées de manière simplifiée.

Abréviations: ABC *ATP-binding cassette*; ACAT acyl-CoA Cholestérol Acyl transférase; CEH cholestérol ester hydrolase; CE & CL cholestérol ester & libre; CYP cytochrome P450; FDPS farnesyl diphosphate synthase; FDFT1 farnesyl diphosphate farnésyl transférase 1; HDL lipoprotéine de haute densité; HMGCS l'HMG-CoA synthase; HMGCr HMG-CoA réductase; IDL lipoprotéine de densité intermédiaire; LDLR récepteur des lipoprotéines de faible densité (LDL); LSS lanostérol synthase; MVK phosphomévalonate kinase; MVD mévalonate(diphospho)décarboxylase; SQLE squalène époxydase; VLDL lipoprotéine de très basse densité.

III. Régulation transcriptionnelle du métabolisme énergétique hépatique.

Les facteurs de transcription SREBP (*Sterol Regulatory Element Binding protein*) et ChREBP (*Carbohydrate Response Element Binding Protein*), en association avec un nombre important de récepteurs nucléaires, contrôlent finement le métabolisme énergétique hépatique.

1. Rôle de SREBP dans la régulation du cholestérol et de la lipogenèse

Les facteurs de transcription SREBP appartiennent à la famille des bHLHLZ (*basic-helix-loop-helix-leucine zipper*). Trois membres de la famille SREBP ont été décrits : SREBP-1a et SREBP-1c codés par un même gène SREBF1, et SREBP-2 codé par un second gène SREBF2 (Hua, Wu et al. 1995). Le facteur SREBP-1c est exprimé dans les tissus ayant un métabolisme lipidique actif comme le foie, le tissu adipeux et le muscle, et stimule la lipogenèse (Shimomura, Hammer et al. 1998; Nadeau, Leitner et al. 2004; Ferre and Foulfelle 2010). SREBP-1a est plutôt exprimé dans les tissus en prolifération comme l'intestin. Le facteur SREBP-2 est exprimé de façon ubiquitaire et stimule, comme le facteur SREBP-1a, la synthèse du cholestérol (Brown and Goldstein 2009). La régulation de l'activité des SREBP se situe au niveau transcriptionnel mais également au niveau post-traductionnel.

En cohérence avec sa fonction de régulateur clé de la lipogenèse, l'expression de SREBP-1c est diminuée par le jeûne et induite par un régime lipogénique. Dans le foie et le tissu adipeux, la transcription de SREBP-1c est induite par l'insuline, et bloquée par le glucagon (Raghow, Yellaturu et al. 2008).

Avant d'être transcriptionnellement actives, les protéines SREBPs sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs et doivent subir un clivage protéolytique. Localisées à la membrane du RE, elles sont immédiatement prises en charge par la protéine cargo SCAP (*SREBP cleavage-activating protein*). SCAP agit comme une protéine de transport de SREBP du RE à l'appareil de Golgi où se produit leur clivage protéolytique afin de devenir actives (**Figure 11**). Ainsi, en situation de jeûne, l'interaction entre SCAP et INSIG-2A (*Insulin-Induced Gene-2A*) est facilitée et le complexe SCAP/SREBP-1c est retenu à la membrane du RE. En situation postprandiale, l'insuline stimule la kinase AKT qui phosphoryle la forme précurseur de SREBP-1c, permettant son clivage et sa migration vers le noyau (Fleischmann and Iynedjian 2000). Concernant SREBP-2 et -1a, la protéine SCAP fonctionne comme un senseur du niveau de cholestérol membranaire. Quand le niveau de cholestérol augmente, les stérols se fixent sur SCAP, provoquant un changement de conformation, favorisant la liaison de SCAP aux protéines INSIG1 et 2 chargées de séquestrer SREBP en se liant à SCAP (Raghow, Yellaturu et al. 2008). En cas de déplétion en cholestérol, SCAP subit un changement conformationnel induisant une affinité moindre avec les INSIG1/2, qui sont alors ubiquitinées puis dégradées par le protéasome (Raghow, Yellaturu et al. 2008) (**Figure 11**).

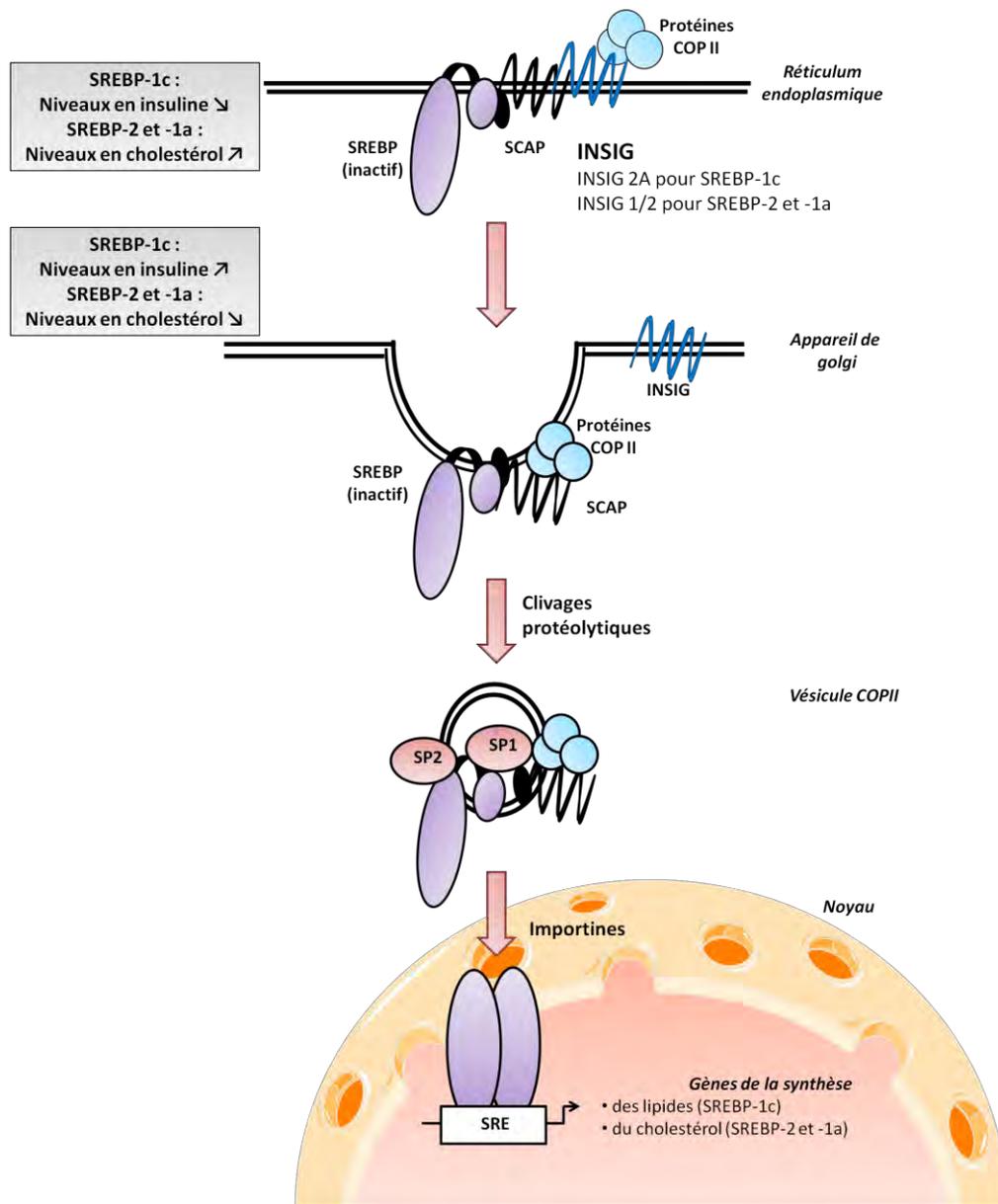


Figure 11. Activation protéolytique du facteur de transcription SREBP. Inspiré de (Raghow, Yellaturu et al. 2008).

Quand les niveaux de cholestérol sont élevés, les protéines SREBP-2 et -1a inactives sont prises en charge par la protéine cargo SCAP (*SREBP cleavage-activating protein*) au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (RE). Les INSIG1/2 (*Insulin-Induced Gene*) sont capables de séquestrer SREBP en se liant à SCAP, rendant SREBP inaccessible aux protéines COPII (*Coatomer Protein II*). Quant à SREBP-1c, des concentrations faibles en insuline (situation de jeûne) facilitent l'interaction entre SCAP et INSIG-2A. Le complexe SCAP/SREBP-1c est alors retenu à la membrane du RE. En cas de déplétion en cholestérol pour SREBP-2 et -1a ou en situation postprandiale pour SREBP-1c, SCAP subit un changement conformationnel induisant une affinité moindre avec les INSIG, qui sont alors dégradées par le protéasome. Le complexe SCAP/SREBP/protéines COPII se forme et transporte SREBP jusqu'au golgi (Yellaturu, Deng et al. 2009). Deux protéases, « site-1 protéase » (S1P) et « site-2 protéase » (S2P), pourront agir séquentiellement pour libérer la partie N-terminale des SREBPs, les rendant actives. Elles se rendront par la suite au noyau. La forte homologie entre les domaines HLH-LZ de SREBP-2, SREBP-1c et SREBP-1a, suggère un mécanisme d'import nucléaire identique pour les trois isoformes via les importines. Sous forme de dimère, les SREBPs pourront lier les séquences SREs situées au niveau des promoteurs des gènes cibles et induire, pour la plupart d'entre eux, leur propre transcription (Sato 2010).

2. CHREBP, un régulateur transcriptionnel du métabolisme des carbohydrates et des lipides

La protéine ChREBP (nom officiel *MLX interacting protein-like*, codée par le gène *Mlxipl*) a été identifiée comme étant un facteur de transcription activé en réponse au glucose (Yamashita, Takenoshita et al. 2001). ChREBP induit l'expression de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme lipidique hépatique en réponse au glucose extracellulaire (Yamashita, Takenoshita et al. 2001). Pour cela, il se fixe directement aux promoteurs des gènes codant pour les enzymes L-PK, ACC-1, FAS (Iizuka, Bruick et al. 2004). Ces gènes possèdent dans leur région promotrice un site de fixation nommé *Carbohydrate Response Element* (ChoRE), constitué de deux boîtes E (CANNTG) séparées par cinq nucléotides (Uyeda and Repa 2006). La protéine ChREBP s'y fixe sous forme d'hétérodimère, avec une autre protéine de la famille bHLH/ZIP des facteurs de transcription nommée Mlx (*Max-like protein X*), en interagissant par leur domaine bHLH/ZIP respectif (Stoeckman, Ma et al. 2004).

Dans le foie, le facteur de transcription ChREBP apparaît comme un régulateur central de la conversion du glucose alimentaire en lipides, favorisant leur stockage sous forme de triglycérides dans les tissus périphériques (Dentin, Girard et al. 2005). Les travaux du groupe de K. Uyeda ont permis de montrer qu'en réponse au glucose, la translocation nucléaire de ChREBP se fait par une cascade de réactions de phosphorylation/déphosphorylation (**Figure 12**). En situation de jeûne et dans des conditions de glycémie faible, ChREBP est phosphorylé par la protéine kinase A (PKA) au niveau des résidus sérines (S) S140, S196, S626 et du résidu thréonine (T) T666, et par la protéine kinase AMP-activée (AMPK) au niveau du résidu S568. La phosphorylation des résidus S140 et S196 de ChREBP permet son interaction avec une protéine de rétention cytosolique : 14-3-3, alors que la phosphorylation des résidus S568, S626 et T666 inhibe la liaison de ChREBP à l'ADN (Kawaguchi, Osatomi et al. 2002; Tsatsos and Towle 2006; Sakiyama, Wynn et al. 2008; Ge, Nakagawa et al. 2011). Lorsque les concentrations de glucose augmentent (**Figure 12**), le flux de glucose entraîne la formation de xylulose 5-phosphate (Xu-5-P), un intermédiaire de la voie des pentoses phosphate. Le Xu-5-P est capable d'activer la protéine phosphatase 2A (PP2A) qui déphosphoryle ChREBP sur la S196 et entraîne sa translocation dans le noyau, par dissociation de ChREBP à la protéine 14-3-3 et recrutement de l'importine α (Ge, Nakagawa et al. 2011; Dentin, Tomas-Cobos et al. 2012). La PP2A déphosphoryle ensuite ChREBP sur la T666 pour lui permettre d'agir sur les séquences ChoRE de ses cibles et d'induire leur transcription. Cependant, ce modèle d'action est actuellement remis en cause. Différents arguments sont en faveur d'une transduction du signal dépendante de la glucose 6-phosphatase (G6Pase) plutôt que du Xu-5-P (Dentin, Tomas-Cobos et al. 2012). Aussi, des mécanismes supplémentaires, indépendants de la régulation de ChREBP par la PKA, pourraient être impliqués, tels que la O-glycosylation ou l'acétylation (Bricambert, Miranda et al. 2010; Guinez, Filhoulaud et al. 2011; Dentin, Tomas-Cobos et al. 2012).

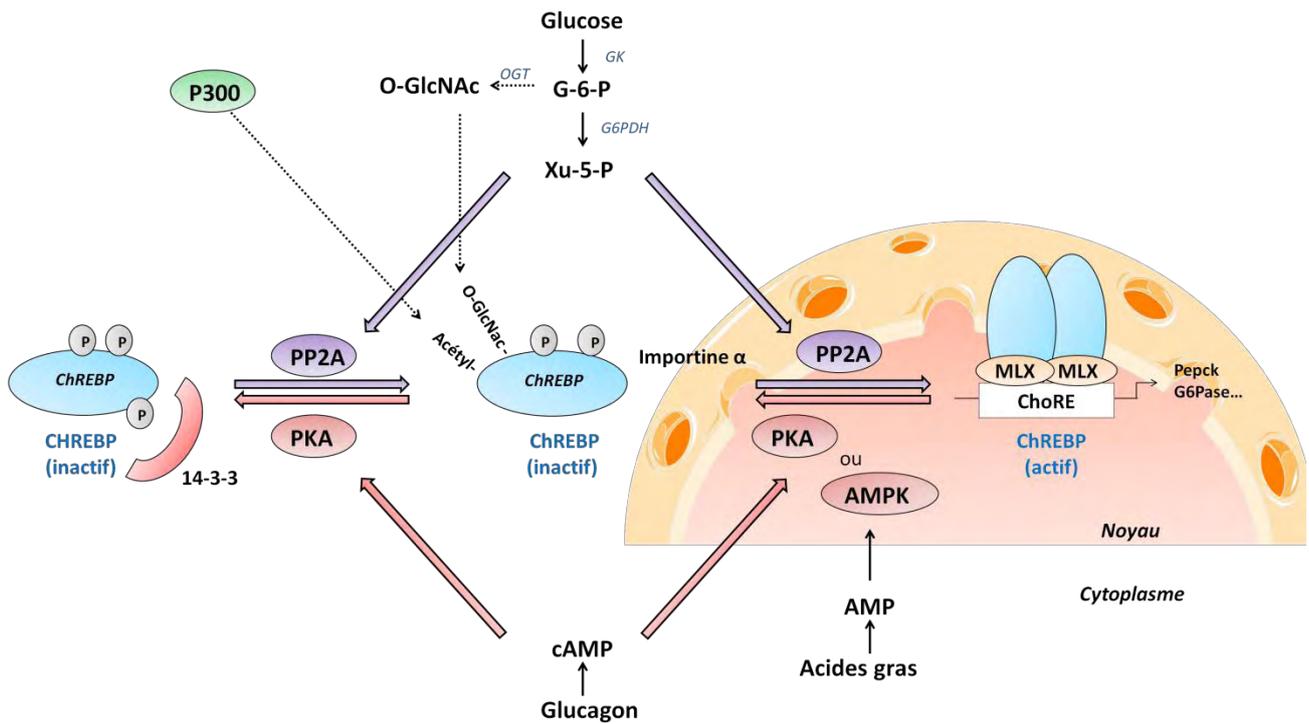


Figure 12. Régulation de ChREBP dans le foie. D'après (Uyeda and Repa 2006).

En situation de jeûne et dans des conditions de glycémie faible, ChREBP est phosphorylé par la protéine kinase A (PKA), et par la protéine kinase AMP-activée (AMPK). La phosphorylation de ChREBP permet son interaction avec une protéine de rétention cytosolique : 14-3-3 et une inhibition de sa liaison à l'ADN. Lorsque les concentrations de glucose augmentent, le flux de glucose entraîne la formation de xylulose 5-phosphate (Xu-5-P), un intermédiaire de la voie des pentoses phosphate. Le Xu-5-P est capable d'activer la protéine phosphatase 2A (PP2A) qui déphosphoryle ChREBP et entraîne sa translocation dans le noyau par dissociation de ChREBP à la protéine 14-3-3 et le recrutement de l'importine α . La PP2A déphosphoryle également ChREBP pour lui permettre d'agir sous forme d'hétérodimère avec les facteurs de transcription nommée Mlx (*Max-like protein X*) au niveau des séquences ChoRE de ses cibles et induire leur transcription (Dentin, Tomas-Cobos et al. 2012). ChREBP peut subir d'autres modifications post-traductionnelles : ChREBP est O-glycosylé par une interaction avec l'OGT (O-GlcNAc transférase) qui le glycosyle en ajoutant un résidu O-GlcNAc (*O-linked & N-acetylglucosamine*), un métabolite synthétisé à partir du glucose par la voie des hexosamines. Cela bloque sa dégradation protéosomale. ChREBP est également acétylé par l'acétylase p300 sur son domaine de liaison à l'ADN en réponse au glucose, ce qui augmente son activité transactivatrice. Ce mécanisme permet de limiter l'activité de ChREBP et ainsi une accumulation lipidique excessive dans le foie.

3. Régulation du métabolisme énergétique par les récepteurs nucléaires

Le métabolisme hépatique est également sous le contrôle d'autres facteurs de transcription appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires (Desvergne, Michalik et al. 2006; Lopez-Velazquez, Carrillo-Cordova et al. 2012). La description détaillée de cette superfamille sera réalisée dans la partie suivante. Une vue d'ensemble des récepteurs nucléaires dits « récepteurs nucléaires du métabolisme » est présentée **Figure 13**. Nous n'évoquerons dans cette partie que les récepteurs LXR et PPAR considérés comme des régulateurs majeurs du métabolisme énergétique (Vacca, Degirolamo et al. 2011).

Les récepteurs nucléaires des oxystérols LXR, existent sous deux isoformes : LXR α , essentiellement exprimé dans le foie, l'intestin, les reins et le tissu adipeux, et LXR β , exprimé ubiquitairement. Les principaux ligands naturels de LXR sont les oxystérols, des dérivés oxydés du cholestérol (Calkin and Tontonoz 2012). Ils jouent un rôle important dans le métabolisme du cholestérol et la synthèse des acides biliaires, en régulant l'expression des gènes codants pour les enzymes du catabolisme et du transport du cholestérol (Peet, Turley et al. 1998). Ils interviennent également dans la synthèse des acides gras en régulant directement l'expression des gènes SREBP-1c, Chrebp, Fas, Acc, (Repa, Liang et al. 2000; Schultz, Tu et al. 2000; Juvet, Andresen et al. 2003; Cha and Repa 2007). Le récepteur LXR β semble avoir des fonctions moins importantes que le récepteur LXR α dans la régulation du cholestérol dans le foie, mais semble être l'isoforme importante pour la régulation du stockage des lipides dans le muscle et le tissu adipeux (Alberti, Schuster et al. 2001; Korach-Andre, Archer et al. 2011).

Les récepteurs PPAR (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*) existent sous 3 types : α , β/δ et γ . PPAR γ , exprimé dans le tissu adipeux, est impliqué dans l'adipogenèse et la résistance à l'insuline (Gervois and Fruchart 2003). Ses ligands endogènes sont les acides gras et surtout les eïcosanoïdes (Willson and Wahli 1997). Ces ligands synthétiques appartiennent à la classe des thiazolidinediones et sont utilisés en clinique pour leur propriété de sensibilisation de la réponse à l'insuline en situation de diabète (Kletzien, Clarke et al. 1992). PPAR α , principalement exprimé dans le foie, le muscle squelettique et le cœur, joue un rôle dans la régulation du métabolisme des lipoprotéines et des lipides (catabolisme). Il a pour ligands naturels les acides gras saturés et insaturés, et pour ligands synthétiques, les fibrates, utilisés dans le traitement des hypertriglycémies (Vacca, Degirolamo et al. 2011). PPAR β/δ , moins étudié que les deux autres isoformes, présente une expression ubiquitaire. Des études ont montré qu'il est impliqué dans le métabolisme des lipides et des lipoprotéines, mais aussi dans la prolifération des préadipocytes et dans l'adipogenèse (Vacca, Degirolamo et al. 2011). De nombreux perturbateurs endocriniens sont connus pour activer ces récepteurs (Maloney and Waxman 1999; le Maire, Grimaldi et al. 2009; Riu, Grimaldi et al. 2011). Par exemple, le tributylétain, un composé organo-stannique retrouvé dans l'environnement et perturbant l'adipogenèse, est un activateur du récepteur PPAR γ (le Maire, Grimaldi et al. 2009; Janesick and Blumberg 2011).

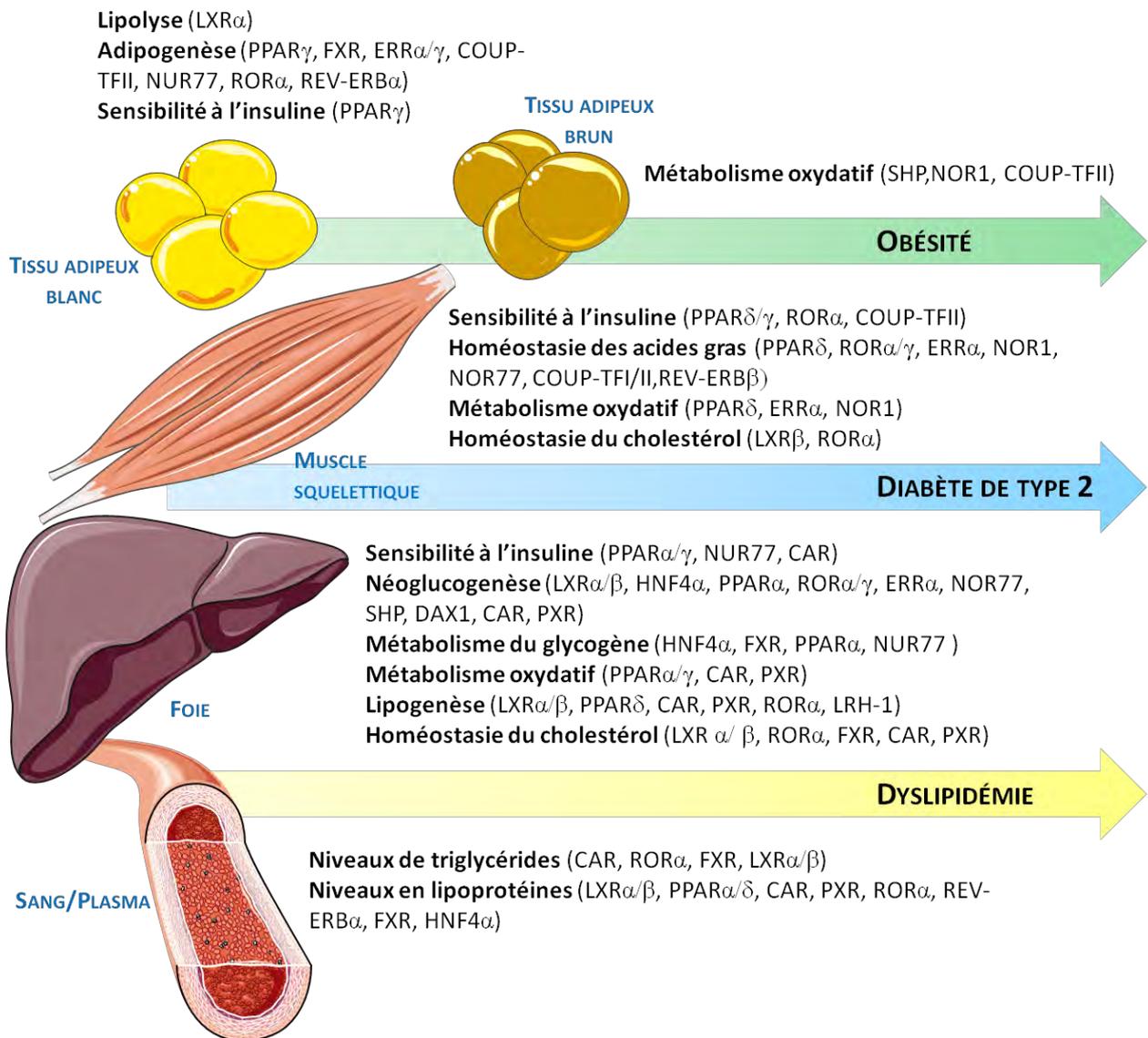


Figure 13. Régulation par les récepteurs nucléaires (orphelins ou adoptés) des fonctions métaboliques selon les tissus, et conditions physiopathologiques associées. D'après (Pearen and Muscat 2012).

Les « récepteurs nucléaires du métabolisme » (Francis, Fayard et al. 2003) agissent comme des senseurs et répondent à leur ligand en activant différentes voies de signalisation par la transcription de gènes cibles. Ils assurent ainsi l'homéostasie du métabolisme, des lipides, des glucides, du cholestérol au niveau de plusieurs tissus (Vacca, Degirolamo et al. 2011; Pearen and Muscat 2012).

Abréviations : Récepteur constitutif des androstanes (CAR); *Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor* (COUP-TF); *Dosage sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene 1* (DAX1); *Estrogen-related receptors* (ERR); Récepteur X des farnésoides (FXR); *Hepatocyte Nuclear Factor 4* (HNF4) ; *Liver receptor homolog-1*(LRH-1); Récepteur des oxystérols (LXR); *Neuron-derived orphan receptor* (NOR); *Neuron-derived clone* (NUR); Récepteur des oxystérols (LXR); *Neuron-derived orphan receptor* (NOR); *Neuron-derived clone* (NUR); Récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR); Récepteur Pregnane X (PXR); Récepteur apparenté au récepteur des rétinoïdes (ROR) ; *Small Heterodimer Partner* (SHP).

PARTIE 2 : LES RÉCEPTEURS NUCLÉAIRES CAR ET PXR À L'INTERFACE ENTRE DÉTOXIFICATION ET RÉGULATION DU MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE HÉPATIQUE

I. Principales caractéristiques structurales et fonctionnelles de CAR et PXR

Les récepteurs nucléaires forment une superfamille de facteurs de transcription. Au nombre de 48 chez l'homme et de 49 chez le rongeur (Mangelsdorf, Thummel et al. 1995), cet ensemble de récepteurs nucléaires participe à l'adaptation des organismes face aux changements environnementaux, aux régimes alimentaires, ainsi qu'à l'absorption de xénobiotiques. Ils régulent une variété de fonctions biologiques, dont la croissance, le développement, la reproduction et, comme nous avons pu le voir, ils régulent également le métabolisme énergétique (**Figure 13**).

Les récepteurs nucléaires CAR et PXR, appelés récepteurs aux xénobiotiques ou xénorécepteurs, appartiennent à cette superfamille. La classification phylogénétique de l'ensemble des récepteurs a permis de les classer dans le groupe des homologues du récepteur de la vitamine D dédiés aux hormones thyroïdiennes, ils sont donc identifiés par le code NR1I2 pour PXR et NR1I3 pour CAR (Germain, Staels et al. 2006). Ils sont essentiels à la protection de notre organisme contre l'accumulation de composés lipophiles toxiques exogènes ou endogènes. Ils sont donc principalement exprimés dans les organes clés du processus de détoxification : le foie, l'intestin grêle, le côlon (Xu, Li et al. 2005). Un nombre croissant d'études récentes a montré que ces récepteurs sont également impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique, le stress oxydant et l'inflammation (Moreau, Vilarem et al. 2008; Pascussi and Vilarem 2008).

1. Structure commune et spécificités des récepteurs CAR et PXR

Les récepteurs nucléaires peuvent être divisés en 3 sous-familles : les récepteurs endocriniens qui ont comme ligands des hormones stéroïdiennes (haute affinité de liaison), les récepteurs orphelins adoptés de dérivés des lipides alimentaires (faible affinité de liaison), dont la découverte a précédé celle de leur ligand, et les récepteurs orphelins qui n'ont pas de ligand identifié à ce jour (**Figure 14**) (Alaynick 2008).

De manière générale, les récepteurs nucléaires possèdent une structure typique constituée de différents domaines fonctionnels (**Figure 14**) (Buzon, Carbo et al. 2012).

- Un domaine « N-terminal régulateur » (ou domaine A/B) contenant le domaine d'activation de la transcription ligand-indépendant (*Activation Function-1*[AF1]). Cette région constitue un site d'interaction pour différents cofacteurs. La phosphorylation de résidus en N-terminale permet au récepteur d'avoir une activité constitutive, souvent faible. C'est la partie la moins conservée entre les différents récepteurs nucléaires.

- Un domaine de liaison à l'ADN (DBD) (ou domaine C) formé de deux motifs en doigts de zinc qui reconnaissent des éléments de réponse qui sont des séquences spécifiques au niveau de l'ADN des gènes cibles.
- Une région charnière (domaine D) qui peut contenir des signaux de localisation nucléaire et procure une flexibilité à la protéine.
- Un domaine de liaison au ligand (LBD) (domaine E) dans la portion C-terminale. Il possède les séquences essentielles à l'interaction du ligand (*Activation Function-2* [AF2]) et contient un site pour la dimérisation des récepteurs. Tout comme pour les séquences AF1, plusieurs cofacteurs montrent une affinité pour le domaine AF2 (Burris, Busby et al. 2012).

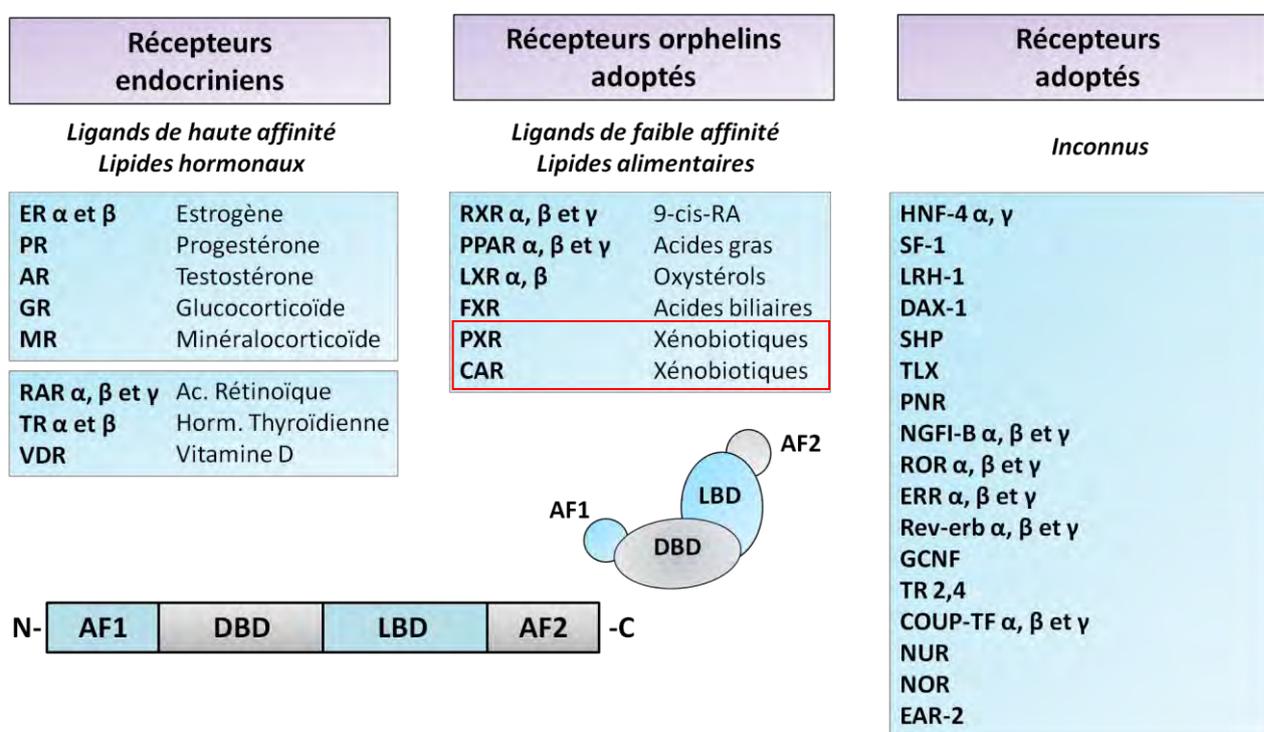


Figure 14. La superfamille des récepteurs nucléaires et leur structure commune. D'après (Chawla, Repa et al. 2001; Alaynick 2008; Pearen and Muscat 2012).

Classification en fonction de leur capacité à fixer leur ligand et structure commune des récepteurs nucléaires. Abréviations : Récepteurs : aux estrogènes (ER); à la progestérone (PR); des androgènes (AR); aux glucocorticoïdes (GR); des minéralocorticoïdes (MR); de l'acide rétinoïque (RAR); aux hormones thyroïdiennes (TR); à la vitamine D (VDR); X des rétinoïdes (RXR); activé par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR); des oxystérols (LXR); X des farnésoides (FXR); Pregnane X (PXR); constitutif des androstanes (CAR); *Hepatocyte Nuclear Factor 4* (HNF); *Steroidogenic Factor 1* (SF-1); *Liver Receptor Homolog-1* (LRH-1); *Dosage sensitive sex reversal-Adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene 1* (DAX-1); *Small Heterodimer Partner* (SHP); *Tailless homolog* (TLX); *Photoreceptor-specific Nuclear Receptor* (PNR); *Nerve Growth Factor IB-like receptor* (NGFI-B); récepteur apparenté au récepteur des rétinoïdes (ROR); *Estrogen-related receptors* (ERR); *Germ Cell Nuclear Factor* (GCNF); *Testicular orphan Receptor 2,4* (TR2,4); *Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor* (COUP-TF); *Neuron-derived orphan receptor* (NOR); *Neuron-derived clone* (NUR); *V-erbA-related* (EAR-2).

Les récepteurs CAR et PXR partagent cette structure commune à l'ensemble des récepteurs nucléaires. Néanmoins, leur analyse cristallographique a montré quelques spécificités structurales leur conférant des propriétés spécifiques.

Le récepteur PXR a la capacité de reconnaître un large spectre de ligands, en raison de feuillets supplémentaires au niveau du domaine entourant la poche de liaison des ligands (LBP ; *ligand binding pocket*) lui conférant une plus grande flexibilité, et une cavité importante dont la taille varie entre 200 et plus de 800 Daltons (Watkins, Wisely et al. 2001; Timsit and Negishi 2007). Aussi, chez l'homme, le LBP de PXR est majoritairement hydrophobe mais contient 8 résidus polaires répartis sur toute la surface. Ces résidus sont à l'origine de différences interspèces de reconnaissance de ligands (**Tableau 1**) car ils assurent des contraintes de spécificité de liaison.

Le récepteur CAR, en raison d'une hélice supplémentaire « l'hélice X » dans le LBD, possède une activité constitutive, c'est à dire une capacité à s'auto-activer en absence de ligand (Xu, Lambert et al. 2004).

2. Ligands de CAR et PXR

Les ligands des récepteurs nucléaires sont généralement de petites molécules lipophiles impliquées dans de nombreux mécanismes physiologiques et provenant de l'alimentation, de l'environnement, ou sont des intermédiaires de voies métaboliques. De nombreux ligands des récepteurs CAR et PXR ont été décrits depuis leur clonage, réalisés respectivement en 1994 (Baes, Gulick et al. 1994) et en 1998 (Bertilsson, Heidrich et al. 1998) (**Tableau 1**). Il s'agit de substances chimiques de structure et d'origine différentes (polluants, médicaments, molécules de l'alimentation) et de produits de dégradation de substances endogènes (acides biliaires, bilirubine, certains stéroïdes) (di Masi, De Marinis et al. 2009). Comme nous l'avons vu, la particularité de PXR est sa capacité à reconnaître un grand nombre de molécules de tailles et structures différentes. Au contraire, CAR reconnaît un panel plus restreint de ligands, pouvant être également des ligands de PXR (**Tableau 1**) (di Masi, De Marinis et al. 2009).

Tableau 1. Exemples de molécules agonistes ou antagonistes des formes humaine ou murine des récepteurs nucléaires PXR et CAR. D’après (Kretschmer and Baldwin 2005; Gueguen, Mouzat et al. 2006).

Molécule	Homme	Souris
PXR		
Acide lithocholique (métabolite biliaire)	x	x
Alachlor (herbicide)	x	x
Androstanol (stéroïde)	x	x
Benzophénone (contaminant photochimie)	?	x
BPA (contaminant plastique; activité estrog.)	x	-
Chlordane (pesticide)	x	x
Corticostérone (H corticostéroïde naturelle)	x	x
DBP (contaminant plastique)	x	x
DEHP (contaminant plastique)	x	x
Dexaméthasone (H glucocorticoïde synth.)	x	x
DES (œstrogène de synthèse)	x	?
Estradiol (H estrogénique naturelle)	x	x
Hyperforine (extrait de plante)	x	?
Lovastatine (statine)	x	?
MEHP (contaminant plastique)	x	x
Nonylphénol (contaminant activité estrog.)	x	x
PCB (118, 153) (POP)	x	x
PCN (anti-glucocorticoïde)	-	x
Pregnenolone (précur. nat. H stéroïd.)	x	x
Progestérone	x	x
Rifampicine (antibiotique)	x	-
RU486 (mifepristone)	x	x

Molécule	Homme	Souris
CAR		
Acétaminophène (analgésique)	x	x
BPA (contaminant plastique; activité estrog.)	x	?
CITCO	x	-
DDE (POP; pesticide)	?	x
Estradiol (H estrogénique naturelle)	x	x
Méthoxychlore (pesticide)	x	x
Nonylphénol (contaminant activité estrog.)	x	x
PCB (POP)	x	x
Phénobarbital (barbiturique)	x	x
TCPOBOP	-	x
Androstanol	x (antago)	x (antago)

Le tableau a été adapté de (Kretschmer and Baldwin 2005; Gueguen, Mouzat et al. 2006) mais des références supplémentaires ont été utilisées pour Acétaminophène (Zhang, Huang et al. 2002) ; Alachlor (Lemaire, Mnif et al. 2006) ; BPA (Barrett 2012) ; DBT et DDE (Wyde, Kirwan et al. 2005) ; Estradiol (Koh, Jurkovic et al. 2012); Hyperforine (Moya, Gomez-Lechon et al. 2010) ; Lovastatine (Plee-Gautier, Antoun et al. 2012) ; Nonylphénol (Hernandez, Huang et al. 2007) ; PCB (Schuetz, Brimer et al. 1998; Al-Salman and Plant 2012).

3. Caractéristiques des éléments de réponse

Les récepteurs nucléaires régulent l'expression de leurs gènes cibles en se liant à l'ADN au niveau des éléments de réponse spécifiques. Ces courtes séquences se situent généralement dans la région promotrice de gènes cibles mais peuvent également être présentes dans la séquence « *enhancer* » à plusieurs kilobases en amont du site d'initiation de la transcription. Deux motifs consensus de 6 paires de bases ont été identifiés : AGAACA, reconnu principalement par les récepteurs des hormones stéroïdiennes, et AG(G/T)TCA, reconnu par l'ensemble des autres récepteurs. Les récepteurs nucléaires se lient aux éléments de réponse sous forme de monomères, d'homodimères ou d'hétérodimères, avec le récepteur de l'acide rétinoïque-9-*cis*, RXR, comme principal partenaire d'hétérodimérisation (Perez, Bourguet et al. 2012). La disposition des séquences pour l'interaction d'un dimère peut se configurer sous forme de répétitions directes (DR), indirectes (IR) ou inversées (ER) qui sont deux demi-sites séparés par une courte séquence nucléotidique variable (**Figure 15**).

Le récepteur CAR, après son hétérodimérisation avec RXR, se lie à des éléments de réponse, de type DR-4, DR-5 (Baes, Gulick et al. 1994; Choi, Chung et al. 1997). Le motif DR-4 est crucial pour la régulation du gène prototypique de CAR : CYP2B6. Les éléments de réponse peuvent être également de type DR-1, ER-6, ER-8 (Sueyoshi, Kawamoto et al. 1999; Kast, Goodwin et al. 2002; Miao, Fang et al. 2006; di Masi, De Marinis et al. 2009). Le récepteur PXR reconnaît des éléments de réponse de type DR-3, DR-4, ER-6 et ER-8 (Kast, Goodwin et al. 2002; di Masi, De Marinis et al. 2009).

Même si l'analyse des éléments de réponse localisés dans le promoteur des gènes suggère que les voies de régulation de CAR et PXR sont distinctes, il existe pourtant de nombreuses similitudes entre ces deux voies : un grand nombre de ligands communs (phénobarbital, phénytoïne) et, de gènes cibles communs (CYP3A4, 2B6, 2C9, UGT1A1, 1A6) (Tojima, Kakizaki et al. 2012) (voir plus loin **Tableau 2**). Ces similitudes pourraient être à l'origine d'une potentialisation de leurs effets (Tolson and Wang 2010). Mais même si CAR et PXR reconnaissent les mêmes éléments de réponse (comme sur le promoteur des gènes CYP2B6 et CYP3A4 par exemple), leur efficacité dans la transactivation des gènes peut être différente. Par exemple, chez l'Homme, PXR régule les gènes CYP3A4 et CYP2B6 sans sélectivité, tandis que CAR présente une sélectivité prononcée pour CYP2B6 par rapport à CYP3A4 (Faucette, Sueyoshi et al. 2006; Pascussi, Gerbal-Chaloin et al. 2008).

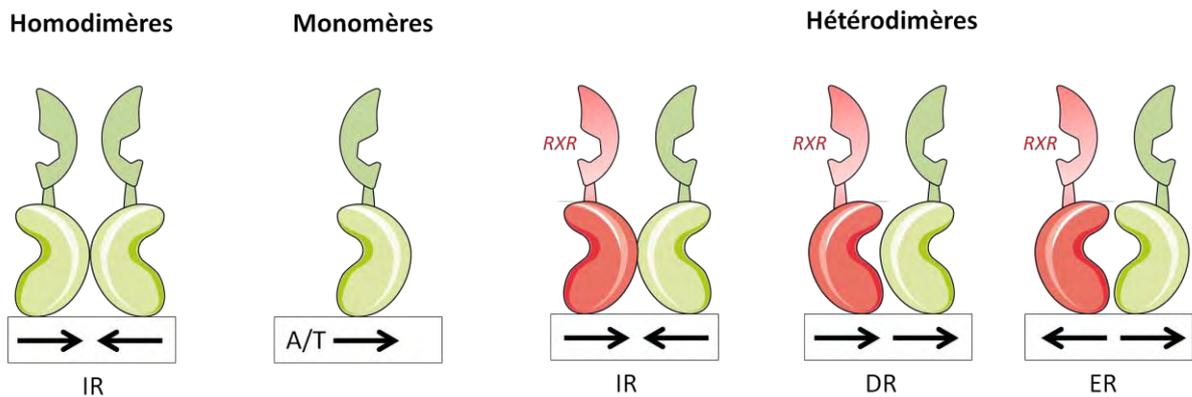


Figure 15. Les différents éléments de réponse des récepteurs nucléaires. D'après (Aranda and Pascual 2001).

Les éléments de réponse sont des éléments bipartites composés de deux séquences hexamériques appelées demi-sites. Ces séquences nucléotidiques forment des répétitions directes (DR), indirectes (IR) ou inversées (ER) qui sont deux demi-sites séparés par une courte séquence nucléotidique variable. La superfamille des récepteurs nucléaires peut être divisée en sous-groupes sur la base du profil de dimérisation :

- Les récepteurs des hormones stéroïdiennes se fixent généralement en homodimères sur des éléments de type IR3 (deux demi-sites organisés en palindromes et séparés par trois nucléotides). La séquence consensus du demi-site est AGAACA, à l'exception du récepteur aux œstrogènes (AGGTCA).
- Les récepteurs nucléaires qui forment des hétérodimères avec le récepteur X des rétinoïdes (RXR) contactent le plus souvent des éléments de type DR (DR1 à DR5), mais certains peuvent également se fixer sur des éléments de réponse de type ER, comme les récepteurs CAR et PXR, ou IR, en plus de leur DR canonique, notamment le récepteur aux hormones thyroïdiennes (TR), le récepteur de l'acide rétinoïque (RAR), le récepteur de la vitamine D (VDR). Cela implique que le DBD doit avoir une flexibilité de rotation par rapport au LBD. La séquence consensus des demi-sites est AG(G/T)TCA.
- Certains récepteurs nucléaires peuvent se fixer à l'ADN sous forme de monomère sur un unique demi-site dont la séquence consensus est AGGTCA précédé d'une séquence riche en A/T en 5'.

Exemples : DR-5 (AGTTCA_{n5}AGTTCA) ; ER-8 (TGAAGTCA_{n8}AGTTCA), chaque chiffre correspondant au nombre de nucléotides séparant les deux motifs.

4. Mécanismes d'activation

Il existe différents mécanismes d'activation de la transcription pour l'ensemble des récepteurs nucléaires: translocation au noyau du récepteur séquestré dans le cytoplasme à l'état inactif, activation du récepteur localisé au noyau favorisant le recrutement de coactivateurs (Chen and Evans 1995; Horlein, Naar et al. 1995).

Le récepteur CAR fut nommé « constitutif » en raison de sa capacité à se lier à son partenaire de dimérisation RXR et à activer la transcription de ses gènes cibles en l'absence de ligand (Tolson and Wang 2010). CAR interagit avec deux métabolites endogènes de la testostérone: l'androstanol et l'androsténol (Forman, Tzamelis et al. 1998). La fixation de ces molécules dans la poche de fixation du ligand se traduit par une inhibition des capacités transcriptionnelles de CAR. Ce récepteur est le premier exemple d'un facteur de transcription régulé négativement par des ligands endogènes (Gueguen, Mouzat et al. 2006). CAR peut être également activé de manière directe par des agonistes tels que le CITCO pour la forme humaine du récepteur et le TCPOBOP pour la forme murine (Wei, Zhang et al. 2000; Timsit and Negishi 2007; Tolson and Wang 2010), ou de manière indirecte par le phénobarbital (PB). Dans les deux cas, le complexe ligand-récepteur formé va pouvoir migrer vers le noyau, s'hétérodimériser avec RXR et se fixer au niveau des régions promotrices de ses gènes cibles, activant ainsi leur transcription (Gueguen, Mouzat et al. 2006) (**Figure 16**).

Le mécanisme d'activation du récepteur PXR est aujourd'hui encore discuté. Des études réalisées à partir de foies de souris et de lignée humaines de cancer de la prostate ont mis en évidence une localisation cytosolique de PXR. Comme pour CAR, il subirait une translocation nucléaire suite à son activation (Squires, Sueyoshi et al. 2004; Chen, Tang et al. 2007) (**Figure 17A**). Un second mécanisme a également été suggéré. Des études réalisées à partir de modèles cellulaires exprimant PXR ont montré qu'il serait présent en permanence dans le noyau au niveau de ses éléments de réponse dans les régions promotrices de ses gènes cibles, mais à l'état inactif, en l'absence de ligand, sa liaison aux corépresseurs (SMRT : *Silencing mediator of retinoid and throid receptor* ; NcoR : *nuclear receptor corepressor*) empêcherait l'activation de la transcription en maintenant la chromatine dans un état non-permissif. En présence de ligand la co-répression serait levée, les co-activateurs et autres acteurs de la machinerie transcriptionnelle pourraient être recrutés (Koyano, Kurose et al. 2004; Saradhi, Sengupta et al. 2005; di Masi, De Marinis et al. 2009) (**Figure 17B**).

Des modifications post-traductionnelles de type phosphorylation, acylation, ubiquitination et SUMOylation interviennent également dans le processus d'activation des récepteurs CAR et PXR (Hu, Xu et al. 2010; Wang, Ong et al. 2012).

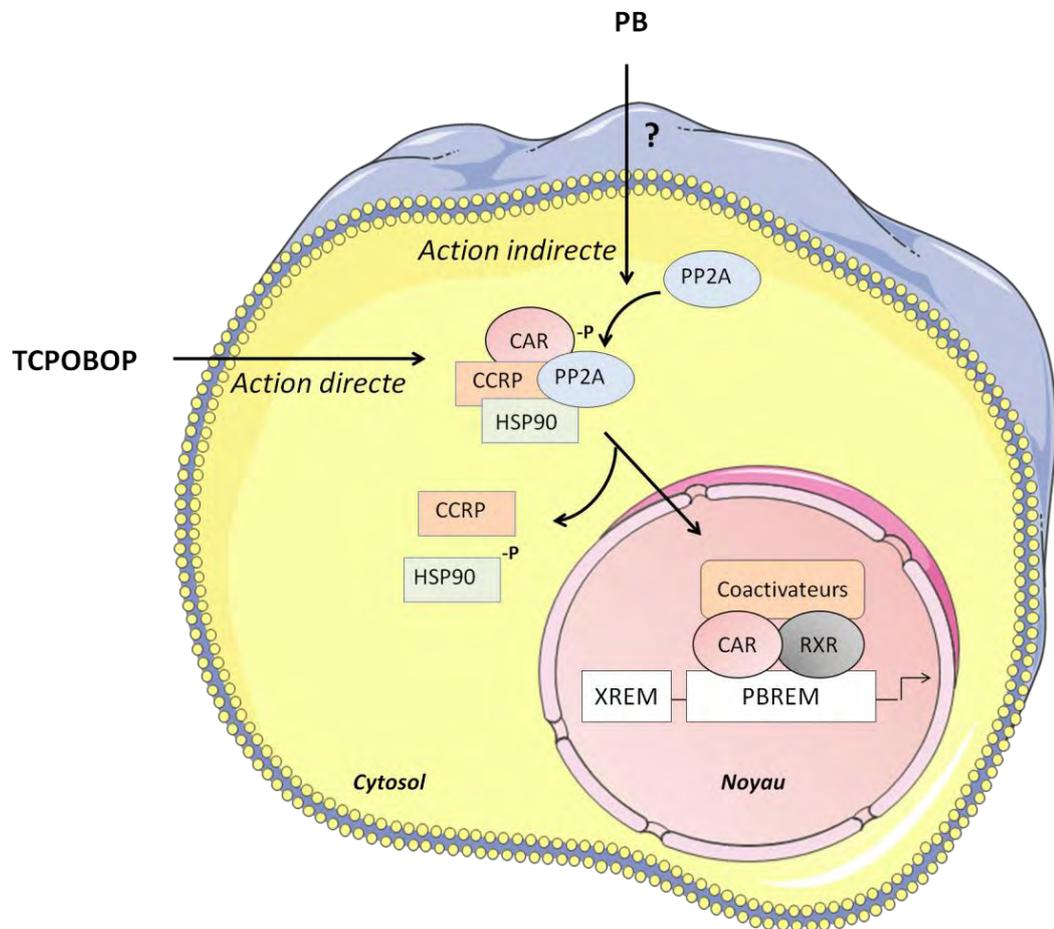


Figure 16. Illustration schématique de l'activation du récepteur nucléaire CAR. D'après (Swales and Negishi 2004; di Masi, De Marinis et al. 2009).

Le récepteur nucléaire CAR est activé de manière directe par le TCPOBOP alors que le phénobarbital (PB) l'active de manière indirecte. L'activation de CAR par ces molécules déclenche la déphosphorylation du récepteur par la *protein phosphatase 2A* (PP2A), détachant CAR du complexe cytoplasmique dans lequel il est retenu, formé par différentes protéines chaperonnes, dont CCRP (protéine de rétention cytoplasmique de CAR) et HSP90 (protéine de choc thermique). Le récepteur ainsi libéré va pouvoir migrer vers le noyau puis s'hétérodimériser avec RXR et recruter ses coactivateurs (ASC-2, GRIP1/TIF2, PGC-1 α) activant la transcription des gènes cibles de CAR. Pour l'activation de son gène cible prototypique, le gène CYP2B6, CAR agira au niveau d'éléments de réponse spécifiques, appelés PBREM (*phenobarbital (PB)-responsive enhancer module*).

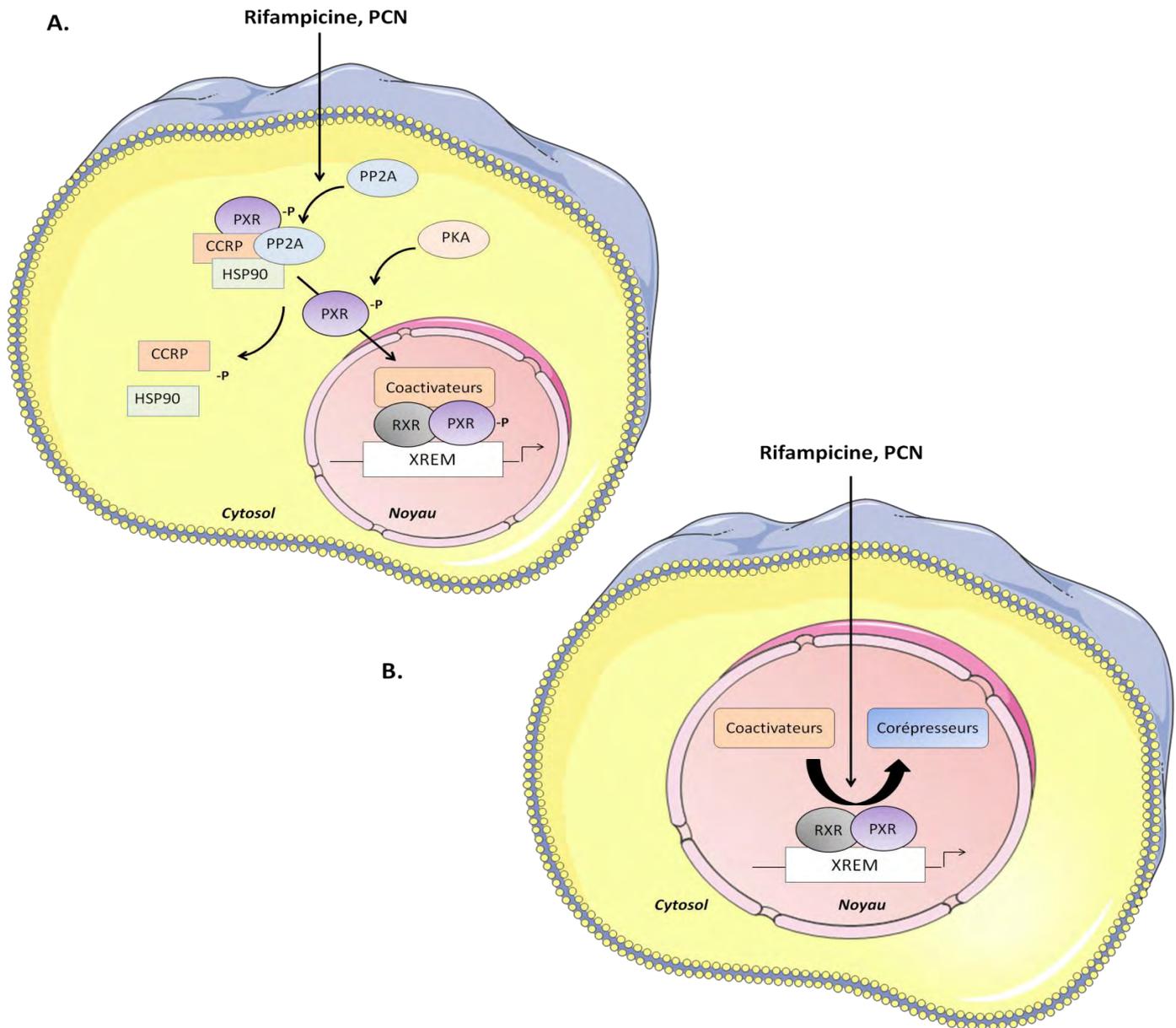


Figure 17. Illustration schématique de l'activation du récepteur nucléaire PXR. D'après (di Masi, De Marinis et al. 2009).

A. Le premier mécanisme d'activation proposé présente de fortes similitudes avec celui présenté pour le récepteur CAR. Le récepteur PXR est séquestré dans le cytosol dans un multi-complexe protéique constitué des protéines HSP90 (protéine de choc thermique) et CCRP (protéine de rétention cytoplasmique de CAR). La fixation d'un ligand sur PXR (Rifampicine, PCN) lui permet de se détacher du complexe par une déphosphorylation par la protéine phosphatase 2 A (PP2A). Il pourrait migrer vers le noyau puis s'hétérodimériser avec RXR afin de se fixer sur des séquences spécifiques au niveau du promoteur du gène, appelées XREM (*Xenobiotic Responsive Element Module*), et activer la transcription de ses gènes cibles. La protéine kinase A (PKA) pourrait phosphoryler le récepteur PXR, favorisant le recrutement de co-activateurs (GRIP, SRC-1) (Squires, Sueyoshi et al. 2004). B. Un mécanisme d'activation différent a également été proposé. Le récepteur PXR inactif pourrait se lier au niveau de son promoteur XREM et agirait comme un gène répresseur de la transcription de ses gènes cibles. Son activation par un ligand (Rifampicine, PCN) provoquerait la dissociation des corépresseurs (NcoR) et le recrutement de coactivateurs (GRIP, SRC-1) permettant la transcription de ses gènes cibles.

II. Régulation du métabolisme des xénobiotiques par les récepteurs nucléaires CAR et PXR

Les récepteurs CAR et PXR ont pour principale fonction la reconnaissance (et l'élimination) de substances lipophiles pouvant traverser la membrane et s'accumuler dans la cellule jusqu'à être cytotoxiques pour l'organisme. Ils interviennent dans la régulation transcriptionnelle des enzymes clés de ce processus de détoxification, appelé métabolisme des xénobiotiques. Celui-ci est divisé en quatre phases (**Figure 18**).

La première étape, dite « Phase 0 », correspond à l'entrée active des xénobiotiques au niveau sinusoïdal ou vasculaire. Les transporteurs membranaires d'influx impliqués sont les SLC (*solute carriers*) transporteurs, contenant par exemple les protéines OATP (Protéine de transport des anions organiques) et les OCT (Transporteurs cations organiques) (Muller and Jansen 1997).

L'étape de biotransformation, dite « Phase I » ou phase de fonctionnalisation, permet par des réactions d'oxydation, de réduction ou d'hydrolyse, d'introduire dans la molécule cible un groupement polaire hydroxyl (OH), amino (NH₂) ou carboxyl (COOH). Les enzymes impliquées sont essentiellement les cytochromes P450 (CYP) qui catalysent des réactions de monooxygénation. Chez l'homme, il a été évalué que 6 isoenzymes CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 et 3A4 seraient impliquées dans le métabolisme oxydant de 90% des médicaments (Lewis 2004).

Les enzymes de « phase II » ou phase de conjugaison permettent l'ajout d'un groupement hydrophyle ou polaire soit sur le xénobiotique inchangé, soit sur le(s) métabolite(s) produit(s) lors de la phase I. Cela fait intervenir principalement des réactions de glucurononoconjugaison par les UDP-Glucuronosyltransférases (UGT) (King, Rios et al. 2000), des réactions de conjugaison au glutathion par les glutathione-S-transférases (GST), de sulfoconjugaison par les sulfotransférases (SULT), d'acylation par les acétyltransférases et de méthylation par les méthyltransférases (Hinson and Forkert 1995).

A l'échelle cellulaire, ces enzymes de phase I et II sont principalement présentes dans le réticulum endoplasmique lisse (enzymes microsomales) et/ou dans le cytoplasme (enzymes cytosoliques) (Neve and Ingelman-Sundberg 2008). A l'échelle tissulaire, la biotransformation des substances endogènes et des xénobiotiques a lieu principalement dans le foie, l'intestin, les poumons et le rein (Chen, Tang et al. 2012).

Les métabolites qui résultent de la phase I et/ou de la phase II sont souvent plus polaires que le composé parent. Mais leur élimination nécessite l'intervention de pompes d'efflux permettant un passage dans la bile (foie) et l'urine (rein). Cette étape est assurée par les transporteurs constituant la « phase III », parmi lesquels les ABC (*ATP binding cassette*) transporteurs jouent un rôle prépondérant. Les transporteurs ABC comprennent plusieurs familles de transporteurs, dont la famille MDR (*MultiDrug Resistance*), la famille

des MRP (*Multidrug Resistance Protein*) ou encore les ABCG2 (*ATP Binding Cassette sub-family G member 2*).

Notons qu'il existe une importante variabilité interindividuelle quant à l'expression et l'activité enzymatique ou à la régulation transcriptionnelle de ces enzymes (Bosch, Meijerman et al. 2006; Gueguen, Mouzat et al. 2006). L'origine de telles variabilités est liée à des facteurs non génétiques incluant les facteurs environnementaux (les produits chimiques, les aliments, les médicaments), à des facteurs propres à l'individu (le sexe, l'âge, la physiologie, les pathologies) (Parkinson, Mudra et al. 2004; Cheng and Klaassen 2009; Court 2010) et à des facteurs génétiques (polymorphisme) (Ginsberg, Guyton et al. 2010; Johansson and Ingelman-Sundberg 2011). Cela peut avoir des conséquences sur la capacité de détoxification des individus et donc sur la biodisponibilité des molécules et notamment celle des médicaments (Ingelman-Sundberg 2001; Ginsberg, Guyton et al. 2010; Rodriguez-Antona, Gomez et al. 2010).

Les récepteurs CAR et PXR vont pouvoir co-induire l'expression de nombreuses enzymes du métabolisme de phase I (CYP3A4, 2B6, 2C8, 2C9...) mais également des aldo-keto réductases (AKRs), de phase II telles que les UGTs, les GSTs et les SULTs et les transporteurs membranaires constituant la phase III (MDR1, MRP1, MRP2, ...) (**Tableau 2**). Comme nous avons pu le voir, chez l'Homme, le récepteur CAR a pour gène cible prototypique le gène CYP2B6 pour la forme humaine et Cyp2b10 pour la forme murine tandis que le récepteur PXR en a deux. Il régule de manière prononcée les gènes CYP2B6 (Cyp2b10) et CYP3A4 (ou Cyp3A11 pour la forme murine) (Faucette, Sueyoshi et al. 2006).

D'autres récepteurs régulent également les enzymes du processus de détoxification. C'est le cas des récepteurs aux hydrocarbures aromatiques AhR, et dans une moindre mesure, des récepteurs nucléaires PPAR, GR, VDR et HNF4 α (Pascussi, Gerbal-Chaloin et al. 2003; Aleksunes and Klaassen 2012), souvent par l'intermédiaire d'un dialogue croisé entre les récepteurs CAR et PXR (Pascussi, Gerbal-Chaloin et al. 2008).

Ces régulations croisées entre récepteurs nucléaires pourraient être à l'origine d'inter-relations entre le métabolisme endobiotique et celui des xénobiotiques. Par exemple, les CYPs sont impliqués dans la détoxification de xénobiotiques mais également dans le métabolisme de molécules endogènes telles que la biosynthèse des hormones stéroïdiennes, des stérols, des prostaglandines, des acides gras et de la vitamine D3 (Nebert and Russell 2002). De même, les transporteurs ABC sont d'une manière générale impliqués dans le transport des stérols et des acides gras (Borst, Zelcer et al. 2000; Schmitz and Kaminski 2001).

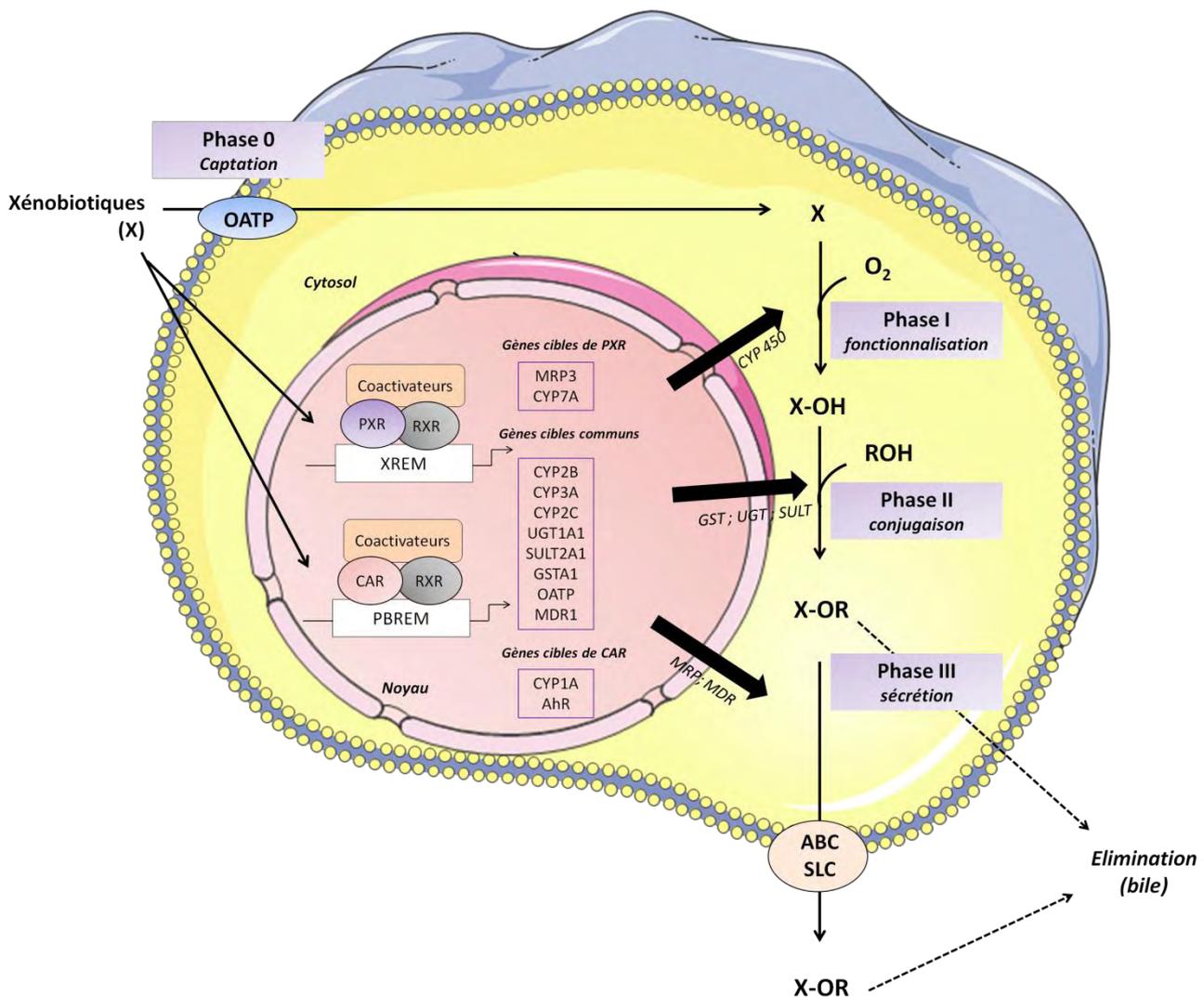


Figure 18. Représentation schématique de la régulation du métabolisme des xénobiotiques par les récepteurs nucléaires CAR et PXR au niveau hépatique. Inspiré de (Kretschmer and Baldwin 2005; Qatanani and Moore 2005; Gueguen, Mouzat et al. 2006; Tolson and Wang 2010).

CAR et PXR, activés par certains xénobiotiques, sont des acteurs clés du métabolisme des xénobiotiques *via* la transcription de leurs gènes cibles communs ou spécifiques. Le métabolisme des xénobiotiques se décompose en 4 phases qui aboutissent au final à l'élimination du composé, généralement moins toxique que le composé parent, dans la bile. La Phase 0, correspond à l'entrée active des xénobiotiques par des transporteurs membranaires d'influx tels que les OATP (protéine de transport des anions organiques). Les enzymes de la phase I dites de fonctionnalisation, catalysent essentiellement les réactions d'oxydo-réduction et d'hydrolyse, principalement par les cytochromes P450 (CYP) ; les enzymes de la phase II (glutathion-S-transférases : GST, UDP-glucuronosyltransférases : UGT, sulfotransférase : SULT), dites de conjugaison, catalysent les réactions de transfert; les transporteurs de la phase III tels que les transporteurs ABC (*ATP binding cassette*) permettent aux xénobiotiques et aux dérivés conjugués de traverser la membrane en vue de leur élimination.

Tableau 2. Principaux gènes cibles de CAR et PXR, impliqués dans le métabolisme et le transport des xénobiotiques dont les médicaments. D'après (Tolson and Wang 2010; Chen, Tang et al. 2012).

Classe	Gène	Récepteur(s)
<i>Enzymes de phase I</i>	CYP1A1	CAR
	CYP1A2	CAR
	CYP2A4	CAR
	CYP2A6	PXR
	CYP2B1/2	CAR/PXR
	CYP2B6	CAR/PXR
	CYP2C8	PXR/CAR
	CYP2C9	PXR/CAR
	CYP2C19	PXR/CAR
	CYP2C29	CAR
	CYP2C37	CAR
	CYP3A2	PXR
	CYP3A4	PXR/CAR
	CYP3A7	PXR
	CYP3A11	PXR/CAR
	CYP3A23	PXR
	CYP4F12	PXR
	CYP7A1	PXR
	AKR1C1/2	PXR
AKR1B7	PXR/CAR	
<i>Enzymes de phase II</i>	UGT1A1	CAR/PXR
	UGT1A3	PXR
	UGT1A6	PXR/CAR
	UGT1A9	PXR/CAR
	UGT2B1	CAR
	UGT2B5	PXR
	GSTA1	PXR
	SULT2A1	PXR/CAR
	SULT1E1	PXR/CAR
	SULT2A2	PXR/CAR
	SULT1A1	PXR
	SULT1B1	PXR
<i>Transporteurs</i>	MDR1	PXR/CAR
	MRP1	CAR
	MRP2	PXR/CAR
	MRP3	PXR/CAR
	MRP4	CAR

Abréviations : Aldo-keto réductases (AKR) ; Cytochrome P450 (CYP); Glutathione-S-transférase (GST); *MultiDrug Resistance* (MDR) ; *Multidrug Resistance Protein* (MRP) ; Sulfotransférase (SULT) ; UDP-Glucuronosyltransférase (UGT).

I. CAR et PXR, des régulateurs du métabolisme énergétique

De nombreux articles récents attribuent désormais à ces récepteurs nucléaires un rôle dans le métabolisme énergétique (Kakizaki, Yamazaki et al. 2008; Konno, Negishi et al. 2008; Fiorucci, Zampella et al. 2012; Gao and Xie 2012; Wang, Ong et al. 2012). Des données épidémiologiques plus anciennes faisaient déjà un lien entre certains médicaments et l'existence de troubles métaboliques chez les patients. Les études expérimentales réalisées chez le rongeur sont venues conforter ces observations et éclaircir, au moins en partie, les mécanismes sous-jacents.

A l'heure actuelle, le rôle du récepteur PXR dans la régulation du métabolisme énergétique est mieux caractérisé comparé à celui de CAR, dont certains effets restent controversés.

1. Modulation du métabolisme énergétique hépatique par le récepteur PXR

A l'origine, des observations cliniques ont montré dans les années 1970 que certains traitements médicamenteux étaient associés à la survenue de désordres métaboliques. Ces médicaments ont été identifiés plus tard comme des activateurs du récepteur PXR. Ainsi, des patients tuberculeux, traités à la rifampicine, présentaient une accumulation excessive de triglycérides dans le foie (Morere, Nouvet et al. 1975). Cela a également été observé chez le rongeur après l'activation du récepteur « humanisé » de PXR à la rifampicine (Zhou, Zhai et al. 2006) ou suite à l'activation de la forme murine de ce récepteur par le PCN (Nakamura, Moore et al. 2007). De même la nifedipine et la carbamazépine, identifiées plus tard comme des molécules activatrices de PXR (Drocourt, Pascussi et al. 2001; Oscarson, Zanger et al. 2006), sont connus pour induire des événements sporadiques de stéatose hépatiques (Morere, Nouvet et al. 1975; Babany, Uzzan et al. 1989; Drocourt, Pascussi et al. 2001; Luo, Cunningham et al. 2002). Plus récemment, des études ont montré une corrélation positive entre un traitement chronique à l'acide valproïque, un autre activateur de PXR (Cervený, Svecova et al. 2007), associé ou non à un traitement à la carbamazépine et la survenue de désordres hépatiques tels que les NAFLD (Verrotti, Agostinelli et al. 2011; Saleh, Ismail et al. 2012).

1.1. Induction de la lipogenèse et répression de la β -oxydation

Les données sur la régulation du métabolisme lipidique par PXR montrent un effet d'inhibition sur les gènes de la β -oxydation et d'activation de gènes lipogéniques et de ceux impliqués dans le captage des acides gras libres à partir de la circulation (**Figure 19**).

Une activation de PXR chez la souris provoque une diminution de l'oxydation des acides gras et de la cétogenèse. Nakamura et al. ont montré que PXR interagit directement avec le facteur de transcription

FoxA2 (*Forkhead box A2*) et empêche sa liaison au niveau des éléments de réponse du promoteur de ses gènes cibles (Nakamura, Moore et al. 2007). Ces gènes impliqués dans le catabolisme des acides gras (PPAR α , Cpt1a) (Louet, Le May et al. 2001; Nakamura, Moore et al. 2007) et de la cétogenèse (Hmgcs, Thiolase) sont alors réprimés (Hegardt 1999; Wolfrum, Asilmaz et al. 2004; Li and Chiang 2005; Zhou, Zhai et al. 2006).

L'activation de PXR induit *in vivo* et *in vitro* les gènes clés de la lipogénèse *de novo* hépatique (Scd-1, Fas) (Nakamura, Moore et al. 2007). Moreau et al. ont montré que PXR régule également l'expression du gène Spot14 (Moreau, Teruel et al. 2009). Ce gène est intéressant puisqu'il se situe en amont de la voie de régulation des gènes clés de la lipogéniques (Acly, Fas) et de la glycolyse (L-Pk) (Kinlaw, Church et al. 1995; Brown, Maloney et al. 1997). Le récepteur PXR se lie au niveau du promoteur de ce gène à des éléments de réponse de type « TRE » (Elément de réponse aux hormones thyroïdiennes), également reconnus par le récepteur aux hormones thyroïdiennes (TR) (Kinlaw, Church et al. 1995). Spot14 est également régulé par le récepteur LXR (Pawar, Botolin et al. 2003) et par les facteurs de transcription SREBP-1c (Dentin, Pegorier et al. 2004) et ChREBP (Koo and Towle 2000) suggérant un rôle pivot dans la régulation du métabolisme glucido-lipidique (Kinlaw, Church et al. 1995).

Des données rapportent également un effet de PXR sur l'expression du récepteur CD36 (Cluster de Différentiation 36), en interagissant directement au niveau de son promoteur (Zhou, Zhai et al. 2006; Zhou, Febbraio et al. 2008). Par ce biais, il induit indirectement l'expression du récepteur PPAR γ (Zhou, Zhai et al. 2006). L'activation de CD36 étant connue pour faciliter l'absorption des acides gras libres à partir de la circulation (Febbraio and Silverstein 2007), son expression est fortement associée à la stéatose hépatique (Koonen, Febbraio et al. 2007; Koonen, Jacobs et al. 2007).

De manière contradictoire, Roth et al. ont montré que le récepteur PXR peut induire le facteur INSIG1 par une liaison directe sur son promoteur provoquant une diminution des niveaux de la forme SREBP-1 active et une diminution de la synthèse de triglycérides (Roth, Looser et al. 2008). Mais Zhou et al. ont montré que la régulation des enzymes Scd1 et CD36 par PXR se déroule de manière indépendante du facteur de transcription SREBP-1c (Zhou, Zhai et al. 2006; Lee, Zhou et al. 2008).

1.2. Répression des enzymes de la néoglucogenèse

PXR est également impliqué dans la régulation de la néoglucogenèse hépatique. L'activation de PXR est responsable d'une répression des gènes PEPCCK et G6Pase chez le rongeur (Zhou, Zhai et al. 2006; Kodama, Moore et al. 2007).

L'étude des mécanismes impliqués montre que le récepteur PXR activé peut interagir directement avec le facteur CREB (*cAMP response element-binding protein*), l'empêchant de se lier et de réguler positivement la transcription des gènes PEPCCK et G6Pase (Herzig, Long et al. 2001; Kurukulasuriya, Link et al. 2003; Kodama, Moore et al. 2007). L'expression de ces gènes est également réprimée par une interaction directe de PXR avec le facteur de transcription *forkhead box protein O1* (FOXO1), inhibant sa liaison à une séquence de réponse à l'insuline (IRS) (Kodama, Koike et al. 2004; Konno, Negishi et al. 2008). Un autre mécanisme proposé consiste en une dissociation du complexe HNF4 α -PGC1 α via une compétition de HNF4 α avec PXR pour PGC1 α , un co-activateur commun (Bhalla, Ozalp et al. 2004) (**Figure 19**).

1.3. Régulation du métabolisme du cholestérol

Des études cliniques supportent un rôle pro-athérogénique de PXR. Son activation par les médicaments conduit à une hyperlipidémie chez certains patients (Khogali, Chazan et al. 1974; Eiris, Lojo et al. 1995; Carr, Samaras et al. 1998). Chez la souris, l'activation de PXR par le PCN conduit à l'augmentation des niveaux plasmatiques en cholestérol total et en lipoprotéines athérogéniques VLDL- et LDL-cholestérol (Bachmann, Patel et al. 2004; Zhou, King et al. 2009). Aussi, dans un modèle de souris transgéniques déficientes en apolipoprotéine E, De Haan et al. ont montré que les niveaux plasmatiques en HDL-cholestérol étaient réduits suite à l'activation de PXR (de Haan, de Vries-van der Weij et al. 2009). Le récepteur PXR agit au niveau de la biosynthèse des HDL (ABCA1 ; ApoA1(Apolipoprotéine A1)), de leur maturation (Lécithine cholestérol acyl transférase : Lcat, protéine de transfert des phospholipides: Pltp) et de leur clairance (Récepteur scavenger classe B1 : Sr-b1) (de Haan, de Vries-van der Weij et al. 2009).

Le récepteur PXR aurait aussi un rôle hépatoprotecteur face à l'accumulation de cholestérol intracellulaire et d'acides biliaires, produits de dégradation du cholestérol. Certains, comme l'acide lithocholique, très cytotoxique, apparaissent comme des ligands de PXR (Staudinger, Goodwin et al. 2001). Activé, PXR induit l'expression de CYPs (et notamment CYP27A1 au moins au niveau des entérocytes (Li, Chen et al. 2007)), de sulfotransférases (SULT2A1) et de transporteurs (MRP2/ABCC2 ; MRP3/ABCC3) impliqués dans la détoxification des acides biliaires (Staudinger, Liu et al. 2001; Staudinger, Goodwin et al. 2001; Xie, Radominska-Pandya et al. 2001; Rosenfeld, Vargas et al. 2003; Staudinger, Madan et al. 2003; He, Nishida et al. 2011). PXR a également été identifié comme un gène cible de FXR, le médiateur de l'élimination des acides biliaires (Jung, Mangelsdorf et al. 2006).

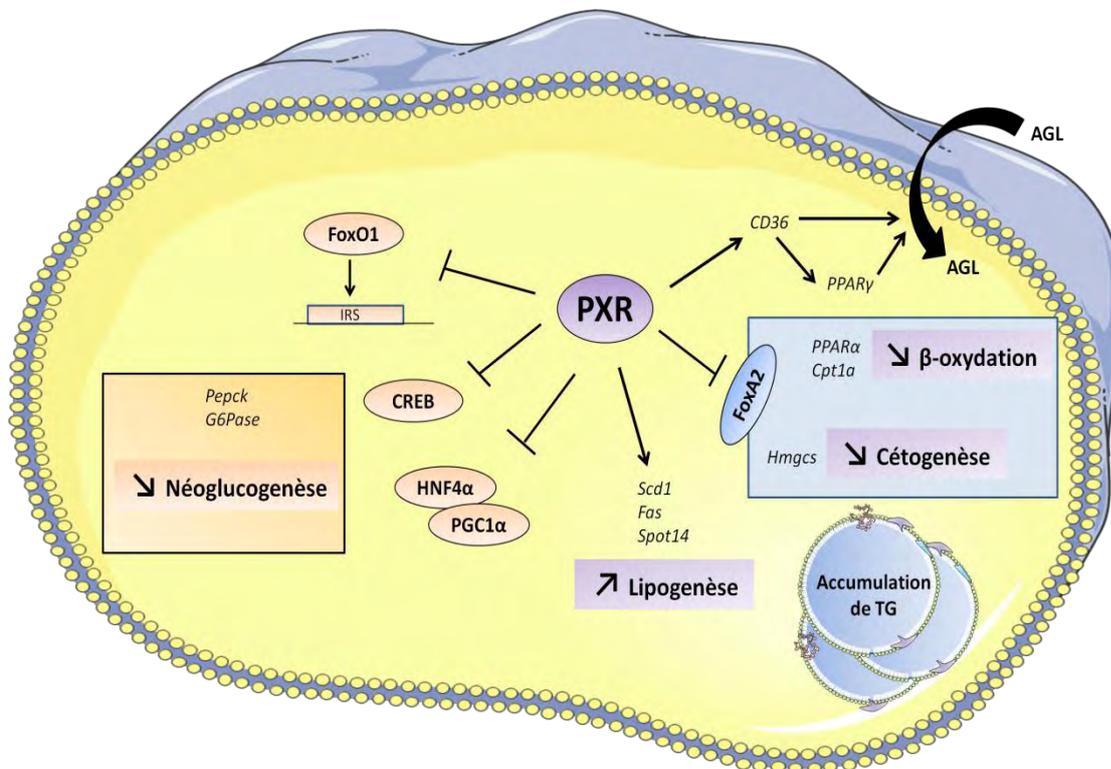


Figure 19. Implication du récepteur PXR dans la régulation du métabolisme lipidique et glucidique. D'après (Moreau, Vilarem et al. 2008; Wada, Gao et al. 2009; Lopez-Velazquez, Carrillo-Cordova et al. 2012).

L'activation du récepteur PXR induit le récepteur scavenger CD36 par une liaison directe sur son promoteur et active indirectement le récepteur PPAR γ , facilitant l'entrée dans la cellule des acides gras libres de la circulation. PXR activé peut réprimer l'activité du facteur de transcription FoxA2, une cible en aval de la signalisation de l'insuline, par une liaison directe. Ce dernier régule l'expression des gènes de la β -oxydation tel que le récepteur PPAR α et son gène cible *Cpt1a* et de la cétogenèse tel que le gène *Hmgcs*. Aussi, l'activation de PXR induit les gènes clés de la lipogenèse *de novo* hépatique tels que *Scd-1*, *Fas* ou encore du gène *Spot14*. Ces altérations ont pour conséquence une augmentation des niveaux de triglycérides hépatiques. D'autre part, PXR régule la néoglucogenèse hépatique. Son activation est responsable d'une répression des gènes *PEPCK* et *G6Pase*, en raison d'une interaction directement avec le facteur CREB ; par une inhibition de la liaison du facteur de transcription *forkhead 1* à une séquence de réponse à l'insuline (IRS) par une interaction directe avec PXR ; et par une dissociation du complexe HNF4 α -PGC1 α via une compétition avec PXR pour ce co-activateur commun.

2. Modulation du métabolisme énergétique hépatique par le récepteur CAR.

Comme pour PXR, des données épidémiologiques font état d'un lien entre l'utilisation de médicaments activateurs de CAR notamment de type antiépileptique et la présence de perturbations métaboliques chez les patients. Ainsi l'utilisation à long terme de phénobarbital (PB), activateur de CAR et PXR, comme un médicament antiépileptique, montrait un changement dans les profils plasmatiques des patients (Luoma, Myllyla et al. 1979; Yamamoto, Takahashi et al. 1989; Calandre, Rodriguez-Lopez et al. 1991). Des études plus récentes ont montré que des traitements chroniques de patients épileptiques à l'acide valproïque ou de patientes traitées pour des cancers mammaires par le tamoxifène, médicaments activant le récepteur CAR (Cervený, Svecová et al. 2007; Mo, Liu et al. 2009), étaient associés à la survenue de désordres hépatiques (Bilici, Ozguroglu et al. 2007; Lee, Kim et al. 2010; Verrotti, Agostinelli et al. 2011; Saleh, Ismail et al. 2012).

2.1 Répression de la β -oxydation des acides gras

Le récepteur CAR agit sur la voie de la β -oxydation des acides gras en interférant avec le récepteur de l'oxydation des acides gras : PPAR α . Il peut rentrer en compétition avec le récepteur PPAR α pour sa liaison au niveau d'éléments de réponse, sur le promoteur de l'énoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase, une enzyme clé de la β -oxydation peroxysomale (Kassam, Winrow et al. 2000). De plus, l'activation de CAR entraîne une répression de l'expression de PPAR α et de ses gènes cibles : Cyp4a14, ECI, Cpt1 α et CTE (*cytosolic Acyl-CoA thioesterase*) (Ueda, Hamadeh et al. 2002; Maglich, Lobe et al. 2009). En période de jeûne, l'activité de CAR est fortement augmentée (Maglich, Watson et al. 2004). Sa capacité à diminuer l'oxydation des acides gras pourrait constituer une protection des organismes dans des situations où l'organisme est déficitaire (Maglich, Lobe et al. 2009).

2.2 Un rôle controversé de CAR dans la régulation de la lipogenèse de novo

A ce jour, les données obtenues chez l'animal décrivent le récepteur CAR soit comme un facteur « pro-lipogénique » (Maglich, Watson et al. 2004; Maglich, Lobe et al. 2009; Breuker, Moreau et al. 2010), soit comme un facteur « anti-obésogène » (Dong, Saha et al. 2009; Masuyama and Hiramatsu 2012a; Masuyama and Hiramatsu 2012b). Il semble que ces effets soient dépendants du statut physiopathologique dans lesquelles les organismes se trouvent (Masuyama and Hiramatsu 2012a).

Etudes rapportant un effet de répression des gènes lipogéniques par l'activation de CAR. Chez la souris transgénique obèse (ob/ob) ou soumise à un régime gras, l'activation du récepteur CAR par une exposition prolongée au TCPOBOP permettrait de soulager le foie en triglycérides, en limitant la lipogenèse *de novo* par une répression des gènes Scd1, Acc et SREBP-1c (Dong, Saha et al. 2009; Gao, He et al. 2009;

Masuyama and Hiramatsu 2012a). Roth et al. ont montré que SREBP-1c interagit avec CAR et diminue le recrutement de co-activateurs communs (SRC1, GRIP1, PGC1 α , TRAP220) ayant pour conséquence une moindre activité transcriptionnelle de CAR (Roth, Looser et al. 2008), dans des conditions de régimes alimentaires enrichis en cholestérol. La même année, ils ont montré que le récepteur CAR active la transcription du facteur INSIG-1 par une liaison directe au niveau d'un élément DR-4 de son promoteur. Les INSIG ont la capacité de séquestrer le facteur lipogénique SREBP-1c, l'empêchant d'être transcriptionnellement actif (Roth, Looser et al. 2008).

Etudes rapportant un effet d'induction des gènes lipogéniques par l'activation de CAR. Chez l'Homme, l'activation de CAR par le PB entraîne une augmentation des concentrations de triglycérides plasmatiques (Franzoni, Govoni et al. 1992). C'est également le cas pour les souris de type sauvage ou mutées pour le récepteur à la leptine (db/db) suite à l'activation de CAR par le PB (Yoshinari, Takagi et al. 2006). Maglich et al. ont montré que cet effet était dépendant de CAR par l'utilisation de modèles transgéniques déficients pour ce récepteur (Maglich, Lobe et al. 2009). Comme pour PXR, l'activation du récepteur CAR, dans des cultures primaires d'hépatocytes humains, induit l'expression des gènes lipogéniques Fas et Scd1 (Breuker, Moreau et al. 2010). Les auteurs ont également montré que le récepteur CAR active la transcription du gène Spot14, un gène dont les fonctions ne sont pas encore complètement élucidées mais qui semble être un modulateur important du métabolisme énergétique (Breuker, Moreau et al. 2010) (voir partie « PXR induit la lipogenèse et réprime la β -oxydation»). Par ailleurs, dans un modèle murin présentant des atteintes hépatiques induites par une alimentation riche en méthionine et en choline, l'activation de CAR aggrave ces atteintes hépatiques des animaux en augmentant la peroxydation lipidique et en induisant l'expression génique de iNOS, un médiateur de la pathogenèse des atteintes hépatiques, et de la collagénase 1 α et TIMP-1, des marqueurs de la fibrose hépatique (Yamazaki, Kakizaki et al. 2007).

En conclusion. Les données sur la régulation de la lipogenèse par CAR restent encore très controversées et il est actuellement difficile de dire s'il joue un rôle identique ou inverse à celui de PXR. Ces effets semblent varier en fonction du statut physiologique des animaux (obésité, résistance à l'insuline) suggérant que ce récepteur pourrait avoir des fonctions différentes voire opposées selon ces différentes conditions. Des publications ont également mis en évidence une régulation nutritionnelle de CAR et de ses gènes cibles. De manière intéressante, ils sont induits dans deux situations critiques pour l'organisme : en situation de jeûne (Ding, Lichti et al. 2006) et en situation d'obésité (souris db/db) (Yoshinari, Takagi et al. 2006). Deux situations où le co-activateur transcriptionnel Pgc1 α , identifié comme un facteur essentiel à la transactivation de CAR (Shiraki, Sakai et al. 2003), est induit de manière importante (Haase, Ringholm et al. 2011) voir anormale (chez les souris db/db) même à l'état nourri (Aoyama, Daitoku et al. 2006; Tamura, Ogihara et al. 2007). Etant donné l'importance de ce co-activateur dans la régulation du métabolisme énergétique, les effets observés suite à l'activation de CAR pourraient être une conséquence d'effets sur ce co-activateur (Liu and Lin 2011). Il est également important de noter que l'expression de ce récepteur et de

ses gènes cibles est régulée par le rythme circadien. En l'intervalle de 4 heures, l'expression de CAR peut varier d'un facteur 2 modulant celle de ses gènes cibles (Zhang, Yeager et al. 2009).

2.3 Implication dans le catabolisme des hormones thyroïdiennes

Le récepteur CAR intervient également dans la régulation du métabolisme des hormones thyroïdiennes en augmentant leur catabolisme en induisant l'expression d'UGTs (1A1, 2B1) et de SULTs (2A1, 1C1, 1E1) impliquées dans ce processus. Il en résulte une diminution des concentrations sériques en T4 et une augmentation des niveaux sériques en TSH (Maglich, Watson et al. 2004; Qatanani, Zhang et al. 2005; Pakharukova, Smetanina et al. 2010). Les hormones thyroïdiennes affectent de nombreux processus métaboliques (consommation d'oxygène, thermogénèse, accélération du métabolisme glucidique, protidique et lipidique). Une diminution avérée en hormones thyroïdiennes peut conduire à un ralentissement du métabolisme basal. Ainsi, Maglich et al. ont montré qu'en induisant l'augmentation du catabolisme des hormones thyroïdiennes, CAR contribuerait à limiter la perte de poids dans des conditions de restriction calorique (Maglich, Watson et al. 2004).

2.4 Répression des enzymes de la néoglucogénèse

Des études cliniques réalisées chez les patients ont montré que l'activation chronique de CAR par le PB provoque une diminution des concentrations de glucose plasmatique et améliore la sensibilité à l'insuline chez l'Homme (Lahtela, Arranto et al. 1985) et la souris exposée à un régime gras (Gao, He et al. 2009). L'expression hépatique des enzymes de la néoglucogénèse telles que la G6Pase et la PEPCK est diminuée suite à l'activation pharmacologique de CAR chez l'animal (Manenti, Dragani et al. 1987; Argaud, Halimi et al. 1991; Ueda, Hamadeh et al. 2002; Kiyosawa, Tanaka et al. 2004; Dong, Saha et al. 2009). Les mécanismes moléculaires sous-jacents à ces effets résultent, comme pour le récepteur PXR, de l'interaction directe de CAR avec le facteur FoxO1, empêchant sa liaison à l'ADN au niveau du promoteur IRS-1 et la transcription de ses gènes cibles (G6Pase et Pepck) (Kodama, Koike et al. 2004; Konno, Negishi et al. 2008). Aussi, CAR peut dissocier le complexe PGC-1 α / HNF4 α . En effet, il peut interagir avec PGC-1 α , un co-activateur commun à CAR et HNF4 α . Cette compétition pour le recrutement de co-activateurs aboutit à une inhibition de l'activité de HNF4 α , connu pour interagir positivement sur le promoteur des gènes Cyp7a1 et Pepck. (Miao, Fang et al. 2006). Ces deux récepteurs entrent également en compétition pour leur liaison au niveau du motif DR-1 sur le promoteur de ces gènes (Miao, Fang et al. 2006).

2.5 Régulation de l'homéostasie du cholestérol et des acides biliaires

Un effet secondaire du traitement chronique aux médicaments activateurs de CAR, est l'augmentation des concentrations sériques en cholestérol total, en HDL-cholestérol, en apolipoprotéine A et B chez l'Homme (Luoma, Myllyla et al. 1979; Calandre, Rodriguez-Lopez et al. 1991; Franzoni, Govoni et al. 1992; Eiris,

Lojo et al. 1995; Aynaci, Orhan et al. 2001). Des études réalisées chez la souris, traitées au TCPOBOP, ont montré qu'une activation de CAR induit les gènes de la cholestérogénèse hépatique tels que Hmgcr, Sqle et Lss (Ueda, Hamadeh et al. 2002; Rezen, Rozman et al. 2011). En revanche, lorsque les animaux sont soumis à un régime riche en graisses, l'activation de CAR par le TCPOBOP diminue les concentrations hépatiques en cholestérol (Sberna, Assem et al. 2011). La même équipe montre également une diminution des concentrations plasmatiques en cholestérol total et en HDL- et LDL-cholestérol, après un traitement au TCPOBOP des souris (Masson, Qatanani et al. 2008). Suite à un régime riche en cholestérol, CAR activé par le TCPOBOP protège d'une élévation des taux plasmatiques et hépatiques de cholestérol (Rezen, Tamasi et al. 2009). Ces effets s'expliquent par une augmentation de l'import du cholestérol au niveau des hépatocytes par l'intermédiaire du LDLR et par une augmentation du catabolisme du cholestérol après l'activation de CAR par le TCPOBOP (Rezen, Tamasi et al. 2009). Aussi, CAR active le métabolisme des acides biliaires par l'induction des SULT (2A1 et 2A9) (Saini, Sonoda et al. 2004) et en augmentant l'expression des transporteurs des acides biliaires (MRP2/ABCC2 ; MRP3/ABCC3) au niveau du pôle canaliculaire des hépatocytes (Cherrington, Hartley et al. 2002; Kast, Goodwin et al. 2002; Staudinger, Madan et al. 2003). Cela conférerait à CAR un rôle hépatoprotecteur face aux acides biliaires tels que l'acide lithocholique (Saini, Sonoda et al. 2004). Aussi, chez l'homme et la souris, des agonistes de CAR sont utiles dans le traitement de la cholestase, correspondant à un défaut de sécrétion de bile par le foie (Stedman, Liddle et al. 2005; Wagner, Halilbasic et al. 2005).

En conclusion, l'impact du récepteur PXR dans la régulation du métabolisme énergétique est mieux caractérisé comparé à celui de CAR qui reste controversé. Ces deux récepteurs ont été clairement identifiés comme des répresseurs de la synthèse de glucose. D'un point de vue évolutif, la régulation de la gluconéogenèse par les xénorécepteurs pourrait représenter un mécanisme d'adaptation cellulaire pour faire face à un déficit énergétique dans différentes conditions physiopathologiques. La néoglucogénèse est un processus demandeur en énergie. Dans un même temps, le métabolisme des xénobiotiques nécessite également une grande quantité d'ATP pour générer du NADPH, nécessaire au bon fonctionnement des enzymes du cytochrome P450. En supprimant la gluconéogenèse, *via* CAR et PXR, les hépatocytes seraient en mesure de maintenir les niveaux de NADPH nécessaires pour assurer une fonction de protection du métabolisme des xénobiotiques (Gao and Xie 2012). Il a également été proposé que l'accumulation de lipides induite par ces xénosenseurs pourrait servir le système de détoxification en piégeant les xénobiotiques de nature lipophile dans les gouttelettes lipidiques permettant de réduire ou de retarder leurs effets toxiques en attendant que le système de détoxification puisse les éliminer (Breuker, Moreau et al. 2010). Il n'en demeure pas moins qu'une activation chronique de ces xénosenseurs par les nombreux polluants ou médicaments auxquels nous sommes soumis, est susceptible de conduire à terme à des dérégulations métaboliques importantes qu'il est important de ne pas négliger.

PARTIE 3 : LES MALADIES HÉPATIQUES NON ALCOOLIQUES, ORIGINE GÉNÉTIQUE ET ENVIRONNEMENTALE

Le maintien de la balance énergétique est un processus fondamental pour l'organisme. Un déséquilibre entre les apports et la dépense énergétique peut avoir de graves conséquences, comme en témoigne aujourd'hui l'augmentation de la prévalence de l'obésité et des pathologies associées telles que le diabète de type 2, la résistance à l'insuline, les maladies coronariennes, l'hypertension artérielle et les atteintes hépatiques de type stéatoses non alcooliques (Lakka et al. 2002). Ces pathologies regroupées dans une entité unique appelée syndrome métabolique (**Figure 20**) se caractérisent par la présence de plusieurs anomalies métaboliques associées (obésité abdominale, hypertriglycéridémie, HDL-cholestérol bas, intolérance au glucose, hypertension artérielle). Des prédispositions génétiques associées aux facteurs environnementaux peuvent également intervenir dans l'apparition ou dans l'évolution de ces désordres (Alisi, Cianfarani et al. 2012; Gonzalez-Bulnes and Ovilo 2012; Paquot, De Flines et al. 2012) (**Figure 20**).

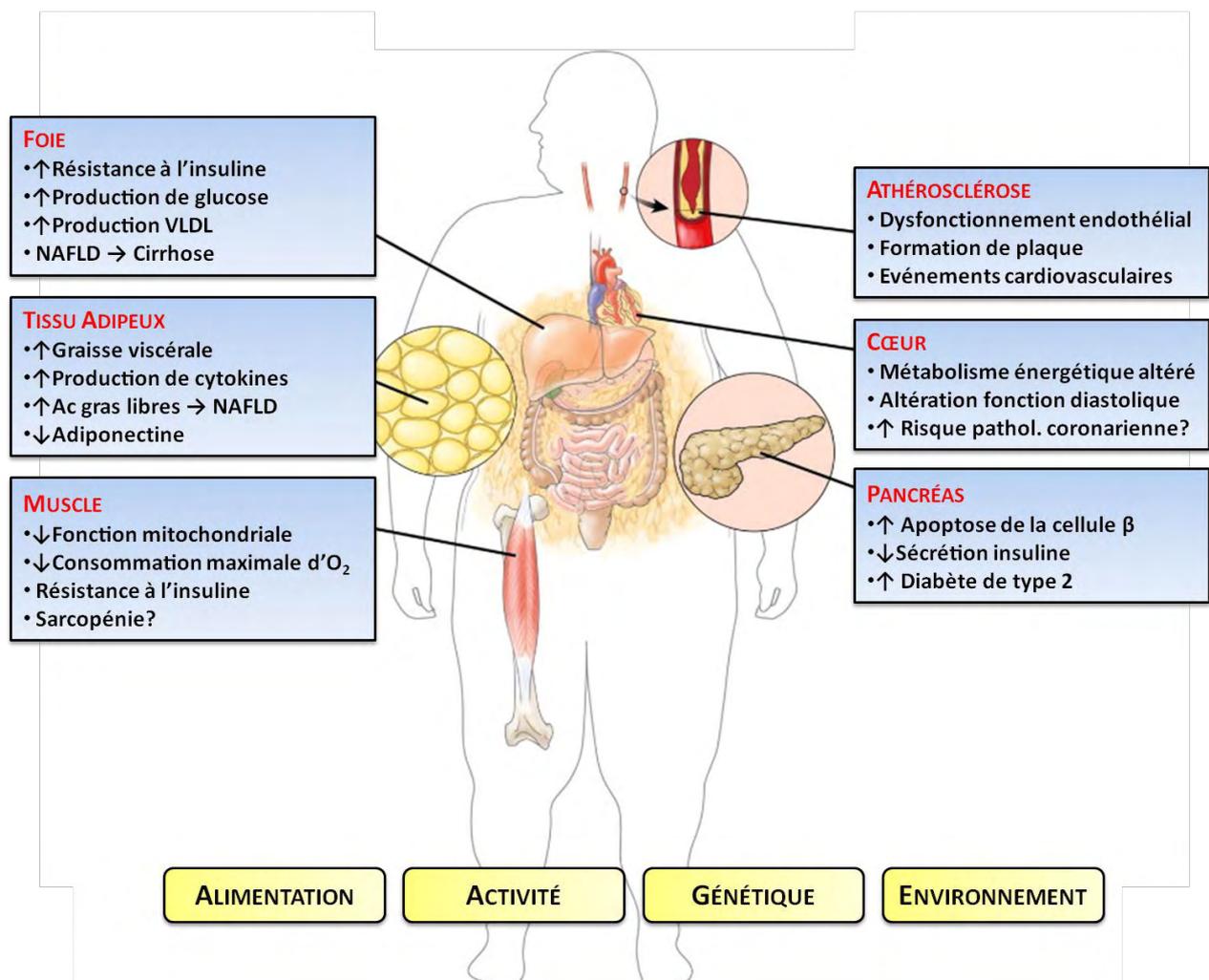


Figure 20. Origines multi-factorielles du syndrome métabolique et tissus cibles. D'après (Ben-Jonathan, Hugo et al. 2009; Cusi 2012).

I. Les maladies hépatiques non alcooliques

Les maladies hépatiques non alcooliques (nommées NAFLD pour *Non-alcoholic fatty liver disease*) représentent un ensemble de désordres hépatiques allant de la simple accumulation de graisse dans le foie, connue sous le nom de stéatose, à une inflammation en présence ou non de fibrose dite stéatohépatite non alcoolique (nommée NASH pour *Non Alcoholic Steato-Hepatitis*), pouvant évoluer en cirrhose et en carcinomes hépatocellulaires (**Figure 21**). Ces altérations se caractérisent par l'absence de consommation excessive d'alcool (inférieur à 10 g/j pour la femme et 20 g/j pour l'homme) (Yerian 2012).

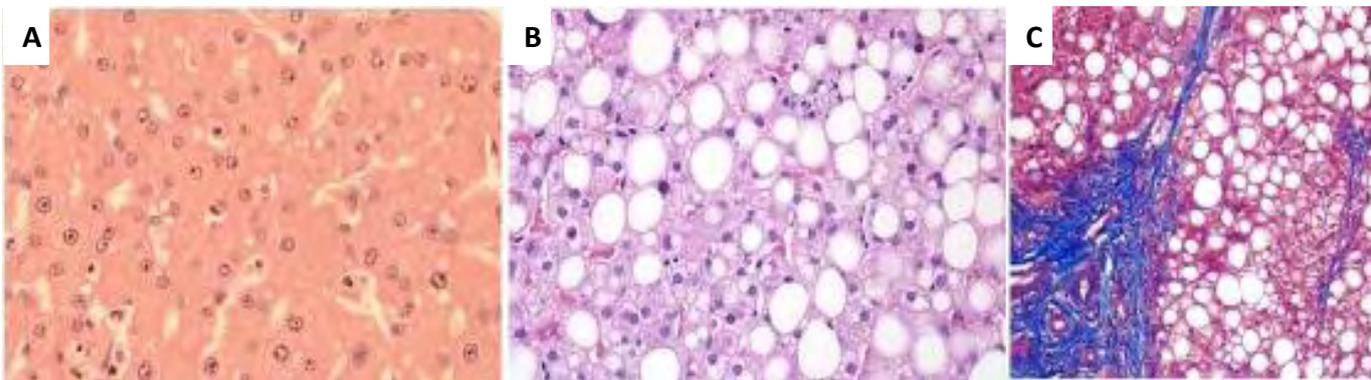
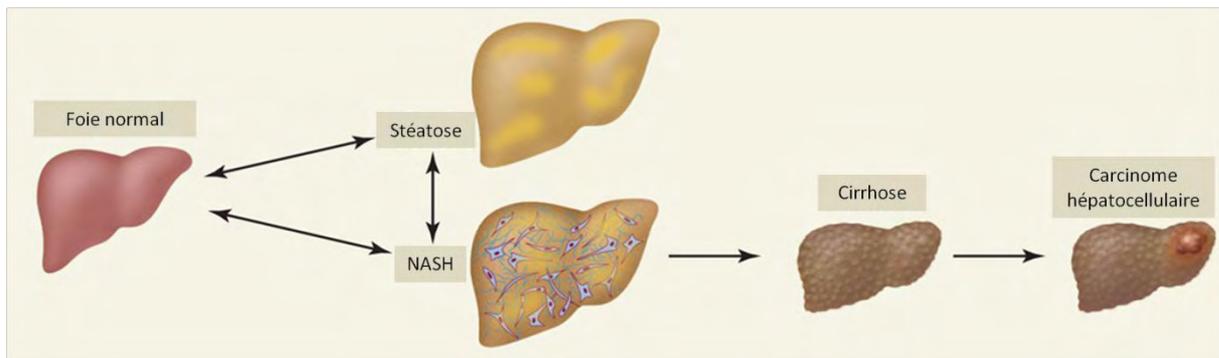


Figure 21. Schéma de la progression de la stéatose hépatique non alcoolique. D'après (Hooper, Adams et al. 2011).

L'accumulation de triglycérides dans les gouttelettes lipidiques des hépatocytes provoque une stéatose. La stéatose associée à l'inflammation, la mort cellulaire, et éventuellement à la fibrose, est appelée stéatohépatite non alcoolique (NASH), et peut évoluer en cirrhose. Les individus atteints de cirrhose ont un risque accru de développement d'un carcinome hépatocellulaire (Cohen, Horton et al. 2011). Coupes histologiques de foie observées en microscopie : A: Foie normal (H&E, 200×); B: Stéatose macrovésiculaire (H&E, 100×); C: Présence de nodules cirrhotiques sur un foie stéatosé (MT, 100×)

La première cause d'apparition des NAFLD est la suralimentation. Son incidence est estimée à 30% dans les pays industrialisés et à 10% dans les pays en développement, et ces chiffres ne cessent d'augmenter en raison de l'augmentation du syndrome métabolique au sein de la population générale (Smith and Adams 2011). Les facteurs de risques pour les NAFLD comportent l'obésité, le diabète, la résistance à l'insuline,

les altérations cardiovasculaires et l'hyper-triglycéridémie (Higuchi and Gores 2003; Smith and Adams 2011).

Il existe deux types de stéatoses hépatiques caractérisées par la morphologie des gouttelettes lipidiques. La stéatose microvésiculaire est caractérisée par la présence dans le cytoplasme des hépatocytes de nombreuses petites vésicules lipidiques (microvésicules). Ces gouttelettes sont de taille inférieure à celle du noyau, ce dernier restant en position centrale (Hautekeete, Degott et al. 1990). Quand les gouttelettes lipidiques à l'intérieur des hépatocytes sont gonflées, le noyau est déplacé en périphérie. On parle alors de stéatose macrovésiculaire (Yerian 2012). Des stéatoses macrovésiculaires ou mixtes sont le plus souvent observées dans un contexte de syndrome métabolique (Yerian 2012). En situation de stéatose microvésiculaire, les lésions sont potentiellement sévères provoquant l'apparition d'une insuffisance hépatique et d'une hypoglycémie majeure. Les stéatoses macrovésiculaires sont quand à elles plus bénignes, pouvant toutefois évoluer en maladies plus sévères (Burt, Mutton et al. 1998).

Les NAFLD peuvent avoir d'autres origines. On peut citer parmi celles-ci de nombreux médicaments (Tamoxifène, Amiodarone, Tétracycline) (Labbe, Pessayre et al. 2008). Ils pourront induire une stéatose micro- ou macrovésiculaire selon la(les) voie(s) métabolique(s) altérée(s) (voir plus loin « Les perturbateurs médicamenteux » pour plus de détails). Une stéatose peut également apparaître après une intervention chirurgicale (pose d'un « by-pass » jéjuno-iléal ou une gastroplastie par exemple), lors d'une nutrition parentérale ou lors d'une perte de poids rapide (Reid 2001). Chez certaines femmes enceintes, une stéatose de type microvésiculaire peut survenir au troisième trimestre de la grossesse (Smith and Adams 2011). Elle peut également être d'origine virale (hépatite C, virus de l'immunodéficience humaine) (Basaranoglu and Basaranoglu 2011; Lemoine, Serfaty et al. 2012).

1. Accumulation de triglycérides dans le foie ou stéatose hépatique

La stéatose hépatique correspond à l'accumulation hépatique de triglycérides dans les hépatocytes. Les processus responsables du déclenchement des NAFLD ne sont pas complètement élucidés. Cependant, Day et James en 1998 ont émis une théorie, bien admise par la communauté scientifique, selon laquelle ces désordres interviendraient en deux temps (nommée « *two hits hypothesis* »). Le premier mécanisme moléculaire impliqué serait l'accumulation de graisses dans le foie due à un excès d'acides gras, bien supérieur à leur utilisation. La(les) raison(s) peut(peuvent) être 1) un apport excédentaire de triglycérides alimentaires de l'intestin au foie par les chylomicrons, et/ou 2) une synthèse *de novo* renforcée dans le foie, et/ou 3) une libération accrue d'acides gras à partir des tissus adipeux, et/ou 4) un défaut d'oxydation ou d'export des acides gras. L'augmentation d'une de ces voies serait suffisante pour conduire au développement de la stéatose hépatique (Sanyal, Campbell-Sargent et al. 2001; Savage and Semple 2010).

1) Apport excessif et nature différente des lipides alimentaires. Chez les patients présentant une stéatose, dans un contexte d'obésité, une consommation plus élevée en graisses saturées est généralement observée. Cela a pour conséquence une augmentation du rapport en acides gras essentiels n-6/n-3 (Videla, Rodrigo et al. 2004). Au niveau hépatique, la teneur en acides gras polyinsaturés (AGPI) à longue chaîne de la série n-3 (DHA) est diminuée, provoquant une diminution du rapport dérivés/précurseurs des n-6 et n-3 et une augmentation de la concentration en acide oléique (18:1, n-9) (Araya, Rodrigo et al. 2004; Videla, Rodrigo et al. 2004). Ces modifications suggèrent une diminution des activités désaturases (delta 6 et delta5) et/ou une diminution des apports en précurseurs de la série n-3 (18 :3, n-3 ou acide linoléique) (Clarke 2001; Videla, Rodrigo et al. 2004).

2) Une synthèse *de novo* renforcée. Au niveau du foie, en situation de régime riche en carbohydrates, les capacités de stockage en glycogène peuvent être saturées, le glucose emprunte alors une voie métabolique alternative : la voie de la lipogénèse. Une augmentation de l'expression des enzymes de la glycolyse telles que la glucokinase (Santoro, Zhang et al. 2012), et de la lipogénèse telles que ACC, FAS et DGAT, ainsi que des facteurs de transcription LXR (Lima-Cabello, Garcia-Mediavilla et al. 2011), SREBP-1c et ChREBP peut être observée (Kohjima, Enjoji et al. 2007; Higuchi, Kato et al. 2008; Robichon, Girard et al. 2008). Certains médicaments conduisant à l'apparition de stéatoses, comme l'amiodarone et la tétracycline, sont également capables d'induire, dans un modèle *in vitro*, les gènes de la lipogénèse *de novo* (Antherieu, Rogue et al. 2011).

3) Libération accrue d'acides gras à partir des tissus adipeux en situation d'insulino-résistance. Chez le sujet obèse, lorsque le tissu adipeux ne peut plus s'étendre, les adipocytes deviennent hypertrophiés et résistants à l'insuline, augmentant ainsi la lipolyse. Le flux d'acides gras libérés dans la circulation et parvenant au foie est augmenté. L'incorporation des acides gras circulant au niveau hépatique est également augmentée *via* l'expression des transporteurs impliqués dans cet import (CD36 ou FATP5) (Greco, Kotronen et al. 2008). En parallèle, l'exportation des acides gras, par le foie, sous forme de VLDL est diminuée. L'apoB-100 est moins synthétisée en raison de l'action conjuguée de l'insulino-résistance et du facteur pro-inflammatoire TNF α (*Tumor necrosis factor alpha*), dont la sécrétion par le tissu adipeux est augmentée.

4) Catabolisme et export des acides gras. Afin d'éviter un « engorgement » des hépatocytes, les triglycérides peuvent être hydrolysés, et les acides gras qui en résultent servent de substrats pour la β -oxydation. Cette voie est altérée chez l'individu insulino-résistant et/ou obèse présentant une stéatose (Bechmann, Hannivoort et al. 2012). L'expression du récepteur nucléaire PPAR α , un médiateur clé de cette voie, et de ses gènes cibles est diminuée. De plus, le taux élevé de la synthèse *de novo* de lipides chez ces individus entraîne une surproduction de malonyl-coA, inhibant la L-CPT1, l'enzyme limitante de la β -oxydation (Utzschneider and Kahn 2006; Akkaoui, Cohen et al. 2009). L'altération de la β -oxydation par

certaines médicaments peut également être à l'origine d'une stéatose médicamenteuse (Pessayre, Fromenty et al. 2012). Nous y reviendrons par la suite, dans un paragraphe dédié à ces effets. Par ailleurs, la stéatose peut également être la conséquence d'un défaut de synthèse et d'excrétion des VLDL (Fujita, Nozaki et al. 2009).

2. Contexte physiopathologique de la stéatose

Les triglycérides ne sont pas toxiques pour les hépatocytes et leur accumulation est un processus physiologique normal permettant le stockage de l'énergie. La stéatose peut donc être une pathologie réversible. Néanmoins, l'excès permanent en acides gras saturés n'est pas inoffensif pour le foie et c'est cet effet prolongé qui va conduire vers un état plus sévère caractérisé par la présence d'hépatocytes en apoptose et d'infiltrats inflammatoires (**Figure 21**). Les mécanismes impliqués dans la progression de la stéatose vers l'inflammation et la fibrose restent encore mal compris. Une série de mécanismes, agissant en synergie ou par étapes successives, a été proposé. Les facteurs qui semblent déterminants sont une vulnérabilité accrue des hépatocytes stéatosiques, le stress oxydant, une altération du métabolisme des lipides, un dysfonctionnement mitochondrial, et la résistance à l'insuline. Le stress oxydant constitue une condition de déséquilibre de la balance entre les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERA) et les défenses antioxydantes de la cellule, en faveur des espèces oxydantes. Cette condition est considérée comme centrale dans la pathogenèse de la NASH et dans sa progression vers la fibrose/cirrhose (Cohen, Horton et al. 2011). Les sources potentielles d'ERO sont multiples. La mitochondrie est un site important de la production d'ERO (Murphy 2009). Une activité élevée de la β -oxydation peut être observée, en condition d'obésité, lorsque le ratio entre acides gras saturés et insaturés est augmenté (Jump 2008). Cela provoque un apport important d'électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale (MRC). Celle-ci sera altérée, conduisant à la formation d'ERO tels que les anions superoxydes ($O^{\cdot-}$, $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot}) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Browning and Horton 2004; Murphy 2009). Un dysfonctionnement mitochondrial peut être également induit par des médicaments (Begrache, Massart et al. 2011). L'augmentation d'expression et d'activité des cytochromes, principalement le CYP2E1, représente également une source importante de production d'ERO, au niveau du réticulum endoplasmique et de la mitochondrie (Aubert, Begrache et al. 2011; Knockaert, Fromenty et al. 2011; Leung and Nieto 2012). Au niveau du peroxysome, du H_2O_2 est également formé par l'oxydation des acides gras à très longue chaîne, catalysée par l'acyl-CoA oxydase (AOX) (Schrader and Fahimi 2004). L'augmentation de la production d'ERO peut conduire à une peroxydation lipidique accrue des lipides hépatiques ayant pour conséquence une augmentation de la formation d'aldéhydes réactifs, tels que le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal (HNE). Les ERO, les ERA et les produits réactifs de la peroxydation lipidique (aldéhydes) peuvent directement endommager l'ADN mitochondrial (ADNmt) (Browning and Horton 2004; Begrache, Massart et al. 2011). Les altérations de l'ADNmt peuvent résulter en une diminution de la synthèse de protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale, l'endommageant de façon supplémentaire. Ceci a pour conséquence une

production encore plus élevée d'ERO et enclenche ainsi un cercle vicieux pour la cellule. Par ailleurs l'oxydation des lipides contenus dans les membranes provoque une destruction progressive des membranes cellulaires conduisant à un dysfonctionnement des organelles et, à terme, à une nécrose cellulaire.

Les principales cytokines pro-inflammatoires produites en réponse au stress oxydant sont le *Transforming growth factor beta* (TGF β) et l'interleukine 6 (IL-6) (Das and Balakrishnan 2011). Etant des chémo-attractants des neutrophiles, ils pourraient être à l'origine des infiltrats de neutrophiles observés en cas de NASH. Les ERO peuvent aussi conduire à une fibrose en activant les cellules stellaires du foie, qui synthétisent le collagène et perpétuent la réponse inflammatoire (Browning and Horton 2004; Lanthier, Horsmans et al. 2009). Aussi, la surexpression du TNF α par le tissu adipeux (Hensley, Kotake et al. 2000; Das and Balakrishnan 2011) provoque une inflammation au niveau du foie mais également une augmentation du stress oxydant *via* un effet inhibiteur sur la chaîne respiratoire mitochondriale, ainsi que l'induction d'une apoptose caspase-dépendante (Crespo, Cayon et al. 2001).

Ainsi, la stéatohépatite progressera vers la fibrose pouvant ensuite aboutir à la cirrhose dans les 10 ans (Argo, Northup et al. 2009). Les hépatocytes sont remplacés par du tissu cicatriciel composé de collagène de type I produit par les cellules stellaires. Finalement, 4 à 27 % des individus ayant une cirrhose développeront un hépatocarcinome. Les altérations hépatiques peuvent être classifiées suite à des observations histologiques permettant de juger de la sévérité des NAFLD (Brunt 2001; Kleiner and Brunt 2012).

Des facteurs génétiques et environnementaux pourraient expliquer pourquoi certains patients développent une stéatohépatite alors que d'autres ne dépasseront pas le stade de la stéatose simple, ou encore pourquoi les NAFLD sont plus fréquentes dans certaines populations ethniques que d'autres (Anderson and Borlak 2008; Hooper, Adams et al. 2011).

II. Rôle des facteurs génétiques dans le développement de NAFLD, l'adiponutrine comme exemple

De nombreuses mutations génétiques existent chez l'homme et sont connues pour être associées aux NAFLD. Ces gènes sont impliqués dans le métabolisme lipidique (DGAT, AGPAT2), dans la signalisation insulinique (IRS1, AKT2), dans l'hydrolyse des lipides (ATGL), ou encore dans l'inflammation (TNF) (Hooper, Adams et al. 2011). L'un des plus décrits est le gène PNPLA3 (*Patatin-like phospholipase domain containing*), qui présente un variant génétique nommé rs738409 ou I148M associé dans de nombreuses études à la sévérité des NAFLD. Cette partie bibliographique est consacrée plus particulièrement à ce gène auquel nous nous sommes intéressés.

1. PNPLA3 et la famille des PNPLA

PNPLA3, encore appelée Adiponutrine, est une protéine de 413 acides aminés identifiée en 2001 à partir d'échantillons de tissu adipeux (Baulande, Lasnier et al. 2001), mais également dans le foie (Wilson, Gardner et al. 2006). Cette protéine membranaire d'environ 45 kDa, appartient à la famille des PNPLA (**Tableau 3**). Ces protéines font partie de la super-famille des phospholipases A2 (PLA2) et plus particulièrement de la famille des iPLA2 qui hydrolysent les acides gras en position sn-2 (Baulande and Langlois 2010). La spécificité de ces enzymes réside dans le fait que leur activité n'est pas dépendante de la présence de calcium, à la différence des autres PLA2. Outre leur activité phospholipase A2, elles présentent des activités de type phospholipases A1, lysophospholipases et phospholipide/transacylases (Lio and Dennis 1998; Kienesberger, Oberer et al. 2009). Ces protéines présentent un domaine fonctionnel commun « *patatin-like phospholipase domain* » en N-terminal qui leur confère une activité de type lipase/transacylase (Jenkins, Mancuso et al. 2004). Il existe 9 PNPLA chez l'homme et 8 chez la souris (PNPLA4 est absent). L'analyse phylogénétique des protéines à domaine PNPLA a permis de répertorier trois sous-familles dont les fonctions sont plus ou moins bien caractérisées.

- Le groupe des « *neuropathy target esterase* » (PNPLA 6 et 7). Ces PNPLA ont pour substrats des phospholipides ciblant préférentiellement les lysophospholipides, et ne présentent qu'une très faible activité phospholipase A2.
- Le groupe des iPLA2 β et γ (PNPLA 8 et 9). Elles exercent des activités de type transacylase, lysophospholipase, et phospholipases A1 et A2.
- Un groupe majoritaire contenant cinq membres (PNPLA 1 à 5). De nombreuses études démontrent une implication de ces protéines dans le métabolisme des glycérolipides et non des phospholipides, contrairement aux fonctions des deux groupes précédents. En effet, ces protéines ne semblent pas hydrolyser les phospholipides (Lake, Sun et al. 2005; Wilson, Gardner et al. 2006; Baulande and Langlois 2010).

Tableau 3. Description des neuf PNPLA humaines et activités enzymatiques associées.

Nom	Activité enzymatique	Sites d'expression et régulation	Utilisation de modèles transgéniques invalidés	Polymorphisme chez l'homme	Références bibliographiques
Groupe des acylglycérol lipases/transacylases					
PNPLA1	-	Système digestif	-	SNPs associés l'obésité chez l'enfant	Wilson, Gardner et al. 2006; Johansson, Johansson et al. 2009
PNPLA2 (Desnutrine; ATGL)	Triglycéride lipase	Tissu adipeux, foie, cœur, testicule Régulation nutritionnelle: ↓ en situation nourri (insuline) ↑ en situation de jeûne (glucagon)	↓ des concentrations plasmatiques de TG Accumulation de TG dans les tissus Obésité ↑ de la tolérance au glucose et à l'insuline Mort prématurée (attaque cardiaque)	Association avec: ↓ AG et TG plasma ↑ risque diabète de type 2 Mutation associée à myopathie à surcharge lipidique (NLSDM)	Zimmermann, Strauss et al. 2004; Lake, Sun et al. 2005; Schoenborn, Heid et al. 2006; Kiensberger, Oberer et al. 2009; Ash, Papadimitriou et al. 2012
PNPLA3 (Adiponutrine; ADPN)	Triglycéride lipase et transacylase	Tissu adipeux, foie, muscle Régulation nutritionnelle: ↑ en situation nourri (insuline) ↓ en situation de jeûne (glucagon)	Pas d'effet sur le développement du syndrome métabolique; Hypothèse: compensation par PNPLA5 (au niveau du tissu adipeux)	Association avec l'obésité, l'insulinorésistance et les NAFLD	Romeo, Kozlitina et al. 2008; Chen, Chang et al. 2010; Qiao, Liang et al. 2011
PNPLA4 (GS2) (absente chez la souris)	Rétinol lipase et transacylase Triglycéride lipase et transacylase	Tissu adipeux, muscle, cœur, foie, peau (kératinocyte)			Gao and Simon 2006; Baulande and Langlois 2010
PNPLA5	Triglycéride lipase	Poumon, tissu adipeux, cerveau, hypophyse, foie (faible niveau d'expression) Régulation nutritionnelle: ↑ en situation nourri (insuline) ↓ en situation de jeûne (glucagon)			Lake, Sun et al. 2005; Chen, Chang et al. 2010; Basantani, Sitnick et al. 2011
Groupe des « neuropathy target esterase »					
PNPLA6 (NTE)	Lysophospholipase Monoacylglycérol lipase Très faible activité A2	Neurones, intestin, rein, foie, testicules	Neurodégénérescence Défaut des motoneurones (zébrafish)	Mutation associée aux MND	Akassoglou, Malester et al. 2004; Baulande and Langlois 2010; Hein, Stuckey et al. 2010; Song, Wang et al. 2012
PNPLA7 (NRE; NTE-like)	Lysophospholipase Très faible activité A2	Prostate, pancréas, WAT Muscle, cœur (chez la souris uniquement) Régulation nutritionnelle: ↑ en situation de jeûne ↓ par l'insuline			Wilson, Gardner et al. 2006; Kiensberger, Oberer et al. 2009
Groupe des phospholipases A2 calcium-indépendantes					
PNPLA8 (iPLA2γ)	Phospholipase A1 & A2 Lysophospholipase	Cœur, muscle, foie	Altérations des mitochondries Altérations cardiaques Résistance au développement d'une insulinorésistance		Mancuso, Jenkins et al. 2004; Wilson, Gardner et al. 2006; Mancuso, Han et al. 2007; Song, Wohltmann et al. 2010
PNPLA9 (iPLA2β)	Phospholipase A1 & A2 Lysophospholipase Acyltransférase	Ubiquitaire	Réduction fertilité des mâles Diminution de la tolérance au glucose Sécrétion d'insuline altérée Neurodégénérescence ↑ production de PAF par les cellules endothéliales cardiaques	Mutation associée à 2 pathologies neurodégénératives infantile : INAD et NBIA	Gregory, Westaway et al. 2008; Baulande and Langlois 2010; Song, Wohltmann et al. 2010; Sharma, Turk et al. 2011; Song, Wohltmann et al. 2012; Zhang, Gao et al. 2012

Abréviations: INAD : Dystrophie neuroaxonale infantile ; MND : Maladie du motoneurone ; NBIA : Neurodégénérescence idiopathique avec une accumulation de fer dans le cerveau; PAF : facteur d'activation des plaquettes ; PNPLA : *Patatin-like phospholipase domain containing* ; SNP : Polymorphisme nucléotidique.

2. Les fonctions de Pnpla3 et du variant I148M

Les fonctions de PNPLA2 et 3 sont à l'heure actuelle, les plus abordées dans la littérature. Bien qu'ayant une forte homologie de séquence (40%), PNPLA2 et PNPLA3 ont des caractéristiques très souvent opposables (Baulande and Langlois 2010). PNPLA2 est une enzyme majeure du métabolisme lipidique impliquée dans la lipolyse cellulaire. Elle intervient dans la première étape d'hydrolyse des triglycérides stockés dans les gouttelettes lipidiques pour produire les diglycérides, substrat de l'hormone sensitive lipase (HSL) (Zimmermann, Strauss et al. 2004). À l'inverse, la régulation de PNPLA3 indique plutôt un rôle de type anabolique et donc en faveur de la lipogénèse (activité de type transacylase, et moins en faveur d'une activité de type lipase) (Jenkins, Mancuso et al. 2004), mais cela reste encore controversé (Sookoian and Pirola 2012). Certains auteurs proposent que PNPLA3 pourrait catalyser l'hydrolyse des 3 glycérolipides majeurs (TAG, DAG et MAG), avec une affinité plus élevée pour les chaînes d'acide oléique (C18:1) composant les triglycérides et les chaînes en position sn-1 et sn-3 des triglycérides (Huang, Cohen et al. 2011). D'autres études lui attribuent un rôle dans la ré-estérification des MAG et DAG en TAG (Jenkins, Mancuso et al. 2004) en ayant une activité LPAAT (AGPAT) (voir **Figure 7**) (Kumari, Schoiswohl et al. 2012). Le variant I148M de PNPLA3 aurait une activité LPAAT plus importante que le variant non muté (Kumari, Schoiswohl et al. 2012). La surexpression de ce variant *in vitro* et *in vivo* augmente fortement le contenu en triglycérides hépatiques (He, McPhaul et al. 2010; Huang, Cohen et al. 2011). Ceci pourrait s'expliquer par une restriction de l'activité hydrolase suite au remplacement de l'isoleucine par la méthionine au niveau du résidu 148 de la triade catalytique Sérine47-Isoleucine148-Aspartate166 (**Figure 22**) (Hirschberg, Simons et al. 2001; Rydel, Williams et al. 2003; He, McPhaul et al. 2010). Ainsi, la fonction hydrolase de PNPLA3 serait moins active mais la fonction transacylase serait maintenue, favorisant l'accumulation de triglycérides hépatiques (He, McPhaul et al. 2010; Huang, Cohen et al. 2011).

Les travaux de Basantani et al. et de Chen et al. contestent l'implication de PNPLA3 en tant qu'enzyme limitante de l'hydrolyse des triglycérides (Chen, Chang et al. 2010; Basantani, Sitnick et al. 2011). Ces auteurs montrent que la délétion du gène Pnpla3 chez la souris n'a pas de conséquence sur le métabolisme général et hépatique. Ces résultats pourraient néanmoins s'expliquer par une compensation par PNPLA5 qui apparaît comme une duplication ancestrale de PNPLA3 (Wilson, Gardner et al. 2006; Chen, Chang et al. 2010).

Le rôle précis de cette protéine reste pour le moment non établi, elle pourrait disposer à la fois d'une activité hydrolase et d'une activité transacylase qui s'exprimeraient différemment selon le contexte.

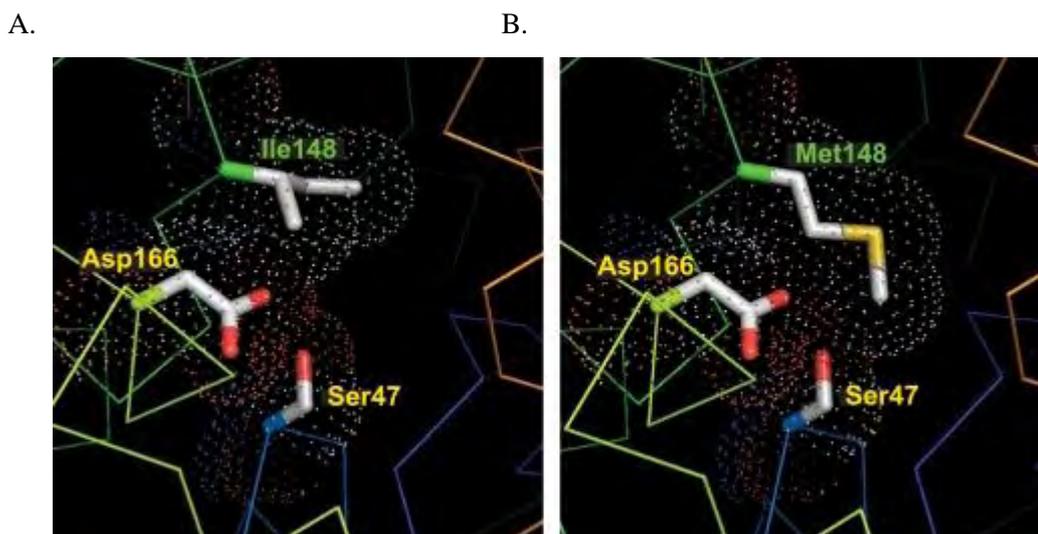


Figure 22. Modèle structural de PNPLA3, forme sauvage et mutée. D'après (He, McPhaul et al. 2010).

En A. La protéine PNPLA3 sauvage (Ile148) et en B. La forme PNPLA3 mutant (Met148). La mutation I148M sur le gène *Pnpla3* pourrait favoriser l'accumulation de triglycérides en limitant l'activité d'hydrolyse des triglycérides par un accès plus restreint au site d'activité hydrolase de PNPLA3 formée par une triade catalytique (une sérine (Ser) en position 47, une isoleucine (Ile) en position 148, un aspartate (Asp) en position 166) (Rydel, Williams et al. 2003), lorsque l'Ile est substituée par la méthionine (Met) au niveau du résidu 148 (Hirschberg, Simons et al. 2001; He, McPhaul et al. 2010).

3. Une régulation nutritionnelle de PNPLA3

L'expression du gène *Pnpla3* est finement régulée par le statut nutritionnel au niveau du tissu adipeux (Polson and Thompson 2004) et du foie (Huang, He et al. 2010; Qiao, Liang et al. 2011). En effet son expression, indétectable en situation de jeûne, est très fortement induite en réponse à une prise alimentaire (Moldes, Beauregard et al. 2006). Elle est fortement régulée par le glucose et l'insuline (Rae-Whitcombe, Kennedy et al. 2010; Qiao, Liang et al. 2011). Les médiateurs clés de cette régulation sont les facteurs de transcription ChREBP (Perttila, Huaman-Samanez et al. 2012), LXR et SREBP-1c (Huang, He et al. 2010; Qiao, Liang et al. 2011). La surexpression de ChREBP par des adénovirus, *in vivo* et à partir de cultures primaires d'hépatocytes de souris, augmente les niveaux d'expression en ARNm de *Pnpla3* (Dubuquoy, Robichon et al. 2011). En revanche, ces résultats ne sont plus retrouvés pour les hépatocytes humains transformés (IHH) et les hépatocarcinomes humains (HepG2) suggérant une différence interspèce dans la régulation transcriptionnel de ce gène (Dubuquoy, Robichon et al. 2011; Perttila, Huaman-Samanez et al. 2012). Des analyses *in silico* ont révélé la présence d'éléments de réponse à ChREBP (ChoRE) sur la forme murine du gène *Pnpla3* mais pas sur la forme humaine, pouvant expliquer cette régulation distincte entre les hépatocytes humains et murins (Dubuquoy, Robichon et al. 2011). En revanche, dans les hépatocytes

murins et humains, SREBP-1c peut interagir directement au niveau des éléments de réponse SRE (*Sterol regulatory elements*) situés sur le promoteur du gène *Pnpla3* (Dubuquoy, Robichon et al. 2011). Le récepteur nucléaire LXR est également impliqué dans la régulation transcriptionnelle de *Pnpla3* mais semble intervenir de manière indirecte *via* SREBP-1c (Qiao, Liang et al. 2011). SREBP-1c semble également intervenir par un mécanisme non-transcriptionnel en inhibant la dégradation PNPLA3 (Huang, He et al. 2010) (**Figure 23**). Les acides gras intra-hépatiques amplifieraient l'effet du variant I148M de *Pnpla3* sur l'accumulation de triglycérides en le stabilisant (Huang, He et al. 2010; Perttila, Huaman-Samanez et al. 2012).

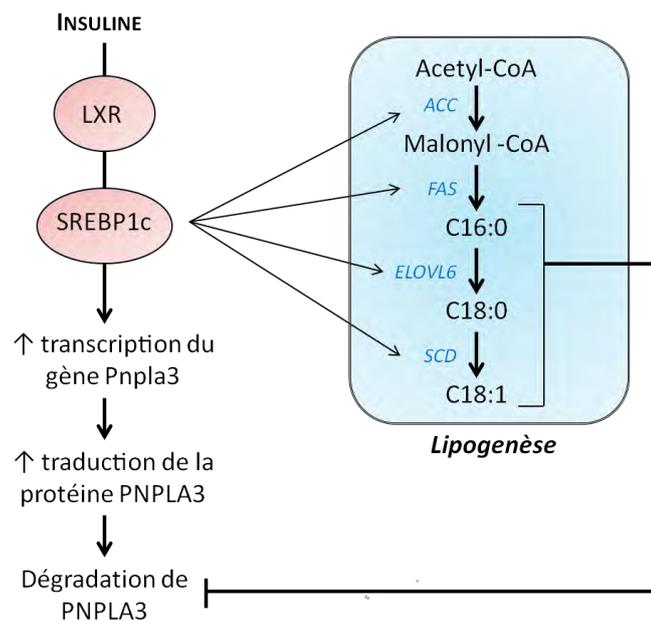


Figure 23. Régulation transcriptionnelle et stabilisation de la protéine PNPLA3 par l'intermédiaire du facteur de transcription SREBP-1c. D'après (Huang, He et al. 2010).

Les glucides provenant de l'alimentation activent SREBP-1c par l'intermédiaire du récepteur nucléaire LXR. SREBP-1c active transcriptionnellement *Pnpla3* ainsi que plusieurs gènes codant pour les enzymes dans la voie de biosynthèse des acides gras. Les acides gras synthétisés (C16: 0, C18: 0 et C18: 1) pourraient inhiber la dégradation de la protéine PNPLA3.

4. Variant I148M de PNPLA3 et désordres métaboliques associés

Chez l'homme, le gène *Pnpla3* présente un polymorphisme. L'étude de Romeo et al. visant à déterminer les différences de polymorphisme (*Genome Wide Association*) sur une cohorte de 2000 individus américains, a montré l'existence d'un SNP (polymorphisme nucléotidique) situé dans le gène *Pnpla3* (Romeo, Kozlitina et al. 2008). Ce variant génétique nommé rs738409 (**Figure 22**) est caractérisé par la substitution d'un seul nucléotide C à G (C-->G) codant pour une méthionine à la place d'une isoleucine au niveau du résidu 148 (I148M). Ce variant est associé à la sévérité des NAFLD (Zain, Mohamed et al. 2012). Les individus

peuvent être porteurs homozygotes « CC » (forme sauvage) ou « GG », ou porteurs hétérozygotes « CG ». Chez les individus obèses présentant un NAFLD, la substitution d'un seul nucléotide C par G sur ce SNP est corrélée à une augmentation du contenu en triglycérides hépatiques. Cette augmentation est d'autant plus importante chez les individus homozygotes « GG » (Romeo, Kozlitina et al. 2008). Ce variant génétique a fait l'objet de nombreuses études épidémiologiques qui l'associent à la sévérité de la stéatose (Rotman, Koh et al. 2010; Hyysalo, Stojkovic et al. 2012; Li, Xing et al. 2012) et au développement de fibrose, de cirrhose et de carcinomes hépatocellulaires chez l'adulte (Valenti, Al-Serri et al. 2010; Guyot, Sutton et al. 2012). Les données épidémiologiques chez l'enfant font également le lien entre ce variant et l'émergence de NAFLD (Goran, Walker et al. 2010; Santoro, Kursawe et al. 2010; Valenti, Alisi et al. 2010). Ces études ont été réalisées sur des cohortes d'individus ayant différentes origines (hispanique, africaine, européenne, asiatique). De manière intéressante, le variant génétique I148M est plus répandu dans les populations d'origine hispanique, ces dernières étant également les plus touchées par les NAFLD, soit 45% des cas contre 33% pour les américains d'origine européenne et 24% pour ceux d'origine africaine (les chiffres pour les individus d'origine asiatique sont moins documentés) (Browning, Szczepaniak et al. 2004; Romeo, Kozlitina et al. 2008). Il existe une association positive entre la quantité de triglycérides hépatiques et ce variant génétique chez l'homme (Romeo, Kozlitina et al. 2008) et la souris (**Figure 24**) (He, McPhaul et al. 2010). Les individus présentant ce polymorphisme ont des niveaux sériques d'ALAT et ALAT plus élevés (Wang, Lin et al. 2011). Ils sont également plus susceptibles de développer une obésité, une insulino-résistance (Johansson, Lindblad et al. 2008; Wang, Lin et al. 2011) et/ou un diabète de type 2 (Palmer, Maglio et al. 2012). Prises ensemble, ces observations illustrent bien l'impact du polymorphisme de séquence de PNPLA3 sur la survenue de NAFLD et d'autres pathologies associées au syndrome métabolique. Son génotypage pourrait être pris en compte comme élément prédictif de la survenue des NAFLD et d'estimation du risque pour chaque individu de développer une atteinte hépatique plus sévère.

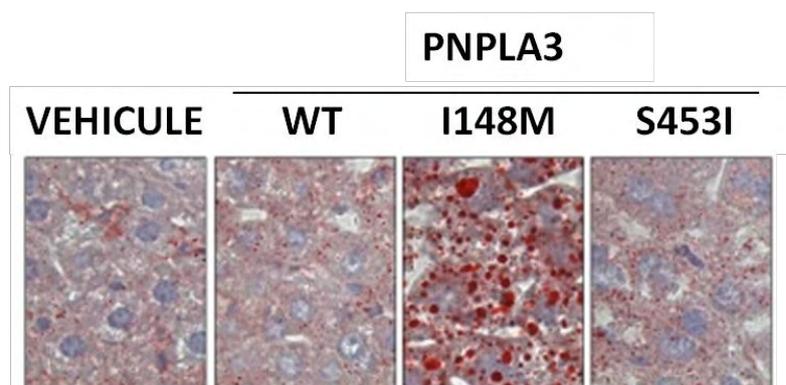


Figure 24. Association entre les variants SNP du gène Pnpla3 et le contenu en triglycérides hépatiques chez la souris. D'après (He, McPhaul et al. 2010).

Observation au microscope des gouttelettes lipidiques à partir de coupes histologiques de foie de souris sur-exprimant les mutants de Pnpla3 (vecteur vide, PNPLA3 type sauvage, PNPLA3-I148M, PNPLA3-S453I) (coloration à l'huile rouge; grossissement x40).

D'autres polymorphismes du gène Pnpla3 ont également été identifiés : rs2072907, rs1010022, rs6006460 ou S453I (Johansson, Lindblad et al. 2008; Romeo, Kozlitina et al. 2008; Johansson, Johansson et al. 2009). Ces variants sont peu décrits dans la littérature et semblent présents plutôt chez les individus obèses comparés aux individus sains. Le variant rs6006460, à l'inverse du I148M, est associé à un taux bas de triglycérides hépatiques (Romeo, Kozlitina et al. 2008). Il est caractérisé par la substitution d'un seul nucléotide G à T (G-->T) codant pour une isoleucine à la place d'une sérine en position 453 de la séquence de PNPLA3 (Romeo, Kozlitina et al. 2008).

III. Implication des xénobiotiques dans la survenue des stéatoses hépatiques non alcooliques.

L'augmentation des apports caloriques et la diminution de l'activité physique au cours des dernières années ne suffisent pas à expliquer l'épidémie actuelle d'obésité et des pathologies métaboliques associées. La coïncidence entre l'augmentation de l'utilisation de produits chimiques ces 40 dernières années et la prévalence de ces désordres métaboliques (Baillie-Hamilton 2002; Heindel 2003; Newbold, Padilla-Banks et al. 2009) a fait émerger le concept d' « obésogènes environnementaux » (Grun 2010). Les produits chimiques de notre environnement pourraient contribuer au développement de l'obésité en perturbant la balance énergétique des organismes (**Figure 25**). Sont suspectés comme obésogènes ou diabétogènes, certains Polluants Organiques Persistants ou POP, le bisphénol A (BPA), les phtalates ou encore les pesticides organochlorés (Grun 2010; Thayer, Heindel et al. 2012). Mais les polluants environnementaux ne sont pas les seuls incriminés puisque plusieurs centaines de médicaments de la pharmacopée moderne sont soupçonnés d'induire une atteinte hépatique (Larrey 2000; Biour, Ben Salem et al. 2004). Les atteintes hépatiques ont été bien décrites pour certains de ces xénobiotiques mais pas pour tous. Cependant, il est évident qu'un produit induisant des troubles métaboliques tels que la prise de poids ou diabète, est susceptible à plus ou moins long terme d'avoir un impact au niveau hépatique.

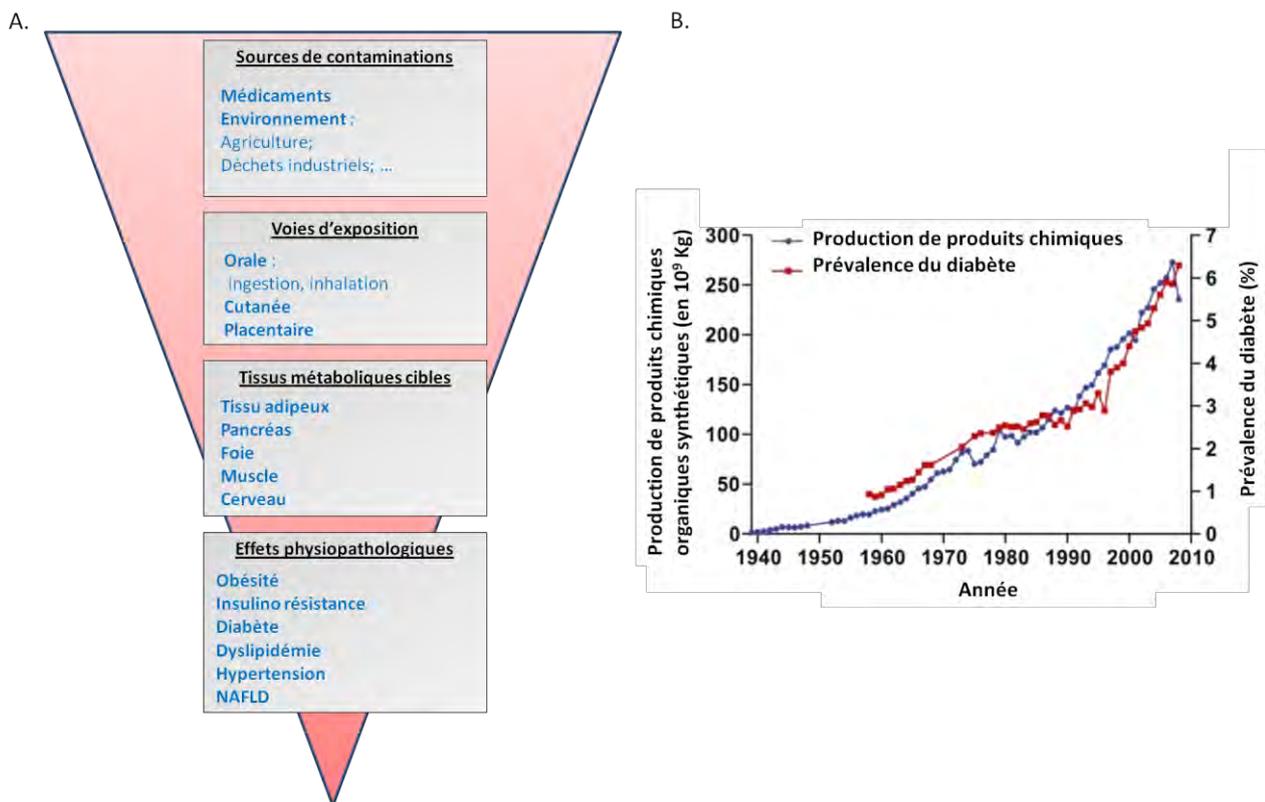


Figure 25. Implication des perturbateurs endocriniens environnementaux dans la survenue de désordres métaboliques. D'après (Neel and Sargis 2011).

A. Sources et cibles des perturbateurs endocriniens et métaboliques. B. Evolution de la production de produits chimiques et de la prévalence du diabète depuis 1940 aux Etats Unis.

1. Les perturbateurs médicamenteux.

Plus de 1000 médicaments de la pharmacopée moderne sont soupçonnés d'induire une atteinte hépatique (Larrey 2000; Biour, Ben Salem et al. 2004). Dans les cas les plus sévères, ces atteintes peuvent conduire à une transplantation du foie, voire même au décès des patients (Bjornsson 2009). Ces effets apparaissent le plus souvent pour un traitement dont la dose quotidienne serait supérieure à 50 mg ou lorsque le médicament affecte le métabolisme hépatique (Lammert, Bjornsson et al. 2010).

La mitochondrie joue un rôle essentiel dans l'homéostasie énergétique hépatique (Labbe, Pessayre et al. 2008). Lors d'altérations hépatiques induites par les médicaments, la mitochondrie est une cible privilégiée (Begriche, Massart et al. 2011). Les médicaments peuvent affecter (**Tableau 4**) :

- l'oxydation des acides gras (Amineptine, Panadiplone)
- la perméabilité de la membrane interne mitochondriale (via la MPTP pour *Mitochondrial Permeability Transition Pore*) (Acide valproïque, Amiodarone)
- le processus de phosphorylation oxydatif (formation d'ATP lorsque les électrons sont transférés du NADH ou du FADH₂ au dioxygène) (Perhéxiline, Amiodarone)

- la chaîne respiratoire mitochondriale (Tétracycline, Tamoxifène)
- le génome mitochondrial (Fialuridine).

Cela a pour conséquence un dysfonctionnement mitochondrial (stress oxydant, manque d'énergie, accumulation de triglycérides et apoptose) (Begrliche, Massart et al. 2011). Selon les voies altérées par le médicament, la stéatose observée sera micro- ou macrovésiculaire.

La stéatose microvésiculaire est la conséquence d'une inhibition importante de la β -oxydation mitochondriale (Hautekeete, Degott et al. 1990; Fromenty and Pessayre 1995). Elle provoque des lésions hépatiques potentiellement sévères associées généralement à une défaillance hépatique et une hypoglycémie importante. La stéatose macrovésiculaire peut être induite par une inhibition modérée de la β -oxydation mitochondriale, mais également par une augmentation de la synthèse *de novo* de lipides et une diminution de l'export des triglycérides par une altération de la sécrétion de VLDL. Les médicaments peuvent également agir directement sur les médiateurs clés des voies du métabolisme énergétique hépatique (SREBP-1c, PPAR γ , PXR et CAR). La stéatose macrovésiculaire peut être la conséquence de dérégulations hormonales (hyperinsulinémie, hypoleptinémie) et l'obésité ou la lipoatrophie sont des facteurs de risque importants (**Tableau 5**) (Fabbrini, Sullivan et al. 2010; Begrliche, Massart et al. 2011). Ces stéatoses, bénignes à court terme, peuvent progresser en stéatohépatite après quelques mois (parfois années) de traitement. Le foie subit alors des dysfonctionnements mitochondriaux, une peroxydation lipidique, et une surproduction d'ERO (voir partie « Les stéatoses hépatiques non alcooliques ») (Browning and Horton 2004; Comar and Sterling 2006).

Tableau 4. Exemple de médicaments provoquant des stéatoses micro- ou macrovésiculaires et leur mode d'action. D'après (Labbe, Pessayre et al. 2008; Begrliche, Massart et al. 2011).

Médicaments	Classe thérapeutique	Modes d'action				
		Ouverture MPTP (perméabilité)	Inhibition directe β -oxydation	Phosphorylation oxydative altérée	Inhibition Chaîne Mito Respiratoire	Domage ADN Mito
STÉATOSE MICROVÉSICULAIRE						
Amineptine	Antidépresseur		+			
Fialuridine	Antiviral					+
Panadiplone	Anxiolytique		+			
Tétracycline	Antibiotiques				+	
Acide valproïque	Antiépileptique	+	+			
STÉATOSE MACROVÉSICULAIRE						
Amiodarone	Antiangoreux		+	+	+	
Perhéxiline	Antiangoreux		+	+	+	
Tamoxifène	Antinéoplasique		+	+		

Tableau 5. Exemple de médicaments provoquant une obésité ou une lipoatrophie favorisant la survenue d'une résistance à l'insuline et de NAFLD. D'après (Begrliche, Massart et al. 2011).

Médicaments	Classe thérapeutique	Obésité	Lipoatrophie
Glucocorticoïdes	Anti-inflammatoire	+	
Olanzapine	Antipsychotique	+	
Inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse	Antirétroviral		+
Inhibiteurs de protéase	Antirétroviral		+
Risperidone	Antipsychotique	+	
Acide valproïque	Antiépileptique	+	

Parmi les médicaments considérés comme obésogènes, sans que les effets sur le foie aient été appréhendés, on peut citer le Diethylstilbestrol (DES). C'est un composé estrogénique synthétique qui fut prescrit aux femmes en prévention des fausses-couches et d'autres complications de la grossesse. Le DES a été retiré du marché dans les pays occidentaux suite à la mise en évidence de ses multiples effets sur l'appareil reproducteur de la descendance exposée au DES au stade fœtal, tels que des malformations du col utérin, un cloisonnement du vagin et/ou de l'utérus, des anomalies des trompes chez la femme (Mittendorf 1995; Schrager and Potter 2004; Newbold 2008; Hoover, Hyer et al. 2011), et des désordres urogénitaux chez l'homme (Palmer, Herbst et al. 2009). Chez la souris, une exposition *in utero* à ce composé conduit à une obésité de la progéniture devenue adulte (**Figure 26**), mais à l'heure actuelle ces données n'ont pas été confirmées chez l'homme.

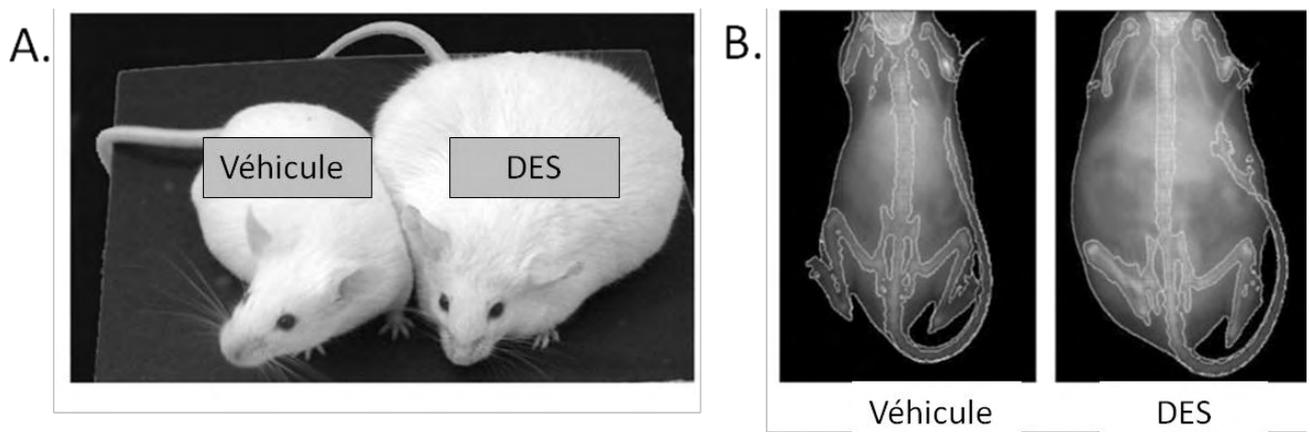


Figure 26. Le Diethylstilbestrol (DES) peut contribuer à l'émergence du syndrome métabolique. D'après (Newbold, Padilla-Banks et al. 2005).

A. Différence de la masse corporelle de souris adultes, exposées *in utero* au DES. B. Observation de leur masse grasse par densitométrie.

2. Impact des polluants environnementaux

L'exposition des organismes aux obésogènes peut également se faire par le biais d'une contamination chronique par de nombreux polluants environnementaux. A l'heure actuelle, les composés chimiques perturbateurs endocriniens incriminés sont les composés organo-étains (ou organo-stanniques) tels que le tributylétain (TBT), le bisphénol A (BPA) (Newbold, Padilla-Banks et al. 2009; Newbold 2011), l'acide perfluorooctanoïque, les phyto-estrogènes (Ruhlen, Howdeshell et al. 2008) et les phtalates (Bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)) (Grun and Blumberg 2006; Grun 2010). Pour certains composés, on parle maintenant de composés « obésogènes » mais également « diabétogènes » (Neel and Sargis 2011). Les effets hépatiques de ces molécules ne sont pas toujours décrits dans la littérature.

2.1. Les composés organo-métalliques

Les composés organo-stanniques (composés à base d'étain) sont utilisés dans les peintures anti-salissures pour bateaux, les catalyseurs de bois, des plastifiants, des myxobactéricides, dans les conduites d'eau, et en tant que fongicides sur les denrées alimentaires. L'exposition humaine à ces sources majeures de l'environnement survient le plus souvent par l'ingestion de fruits de mer contaminés, de produits agricoles, et de l'eau potable, ainsi que suite à une exposition à la lixiviation des matières plastiques (Zuo, Chen et al. 2009). A ce jour, le tributylétain (TBT) a clairement été identifié comme composé « obésogène ». Les études expérimentales chez la souris ont montré qu'une exposition à ce composé chimique au stade fœtale favorise la différenciation des cellules souches en cellules adipocytaires, et cela au détriment des cellules osseuses. Au niveau épigénétique, Kirchner et al. ont constaté une hypométhylation des gènes de l'adipogenèse (Grun and Blumberg 2006; Grun 2010; Kirchner, Kieu et al. 2010). Chez l'adulte, une exposition à de faibles doses de TBT (jusqu'à 0,5 µg/kg/j) provoque une prise de poids, une insulino-résistance et le développement d'une stéatose hépatique (**Figure 27**) (Zuo, Chen et al. 2011). Le TBT agit comme un agoniste très puissant des récepteurs nucléaires RXR (α , β , γ et) et PPAR γ (le Maire, Grimaldi et al. 2009), faisant de lui un perturbateur important de l'homéostasie lipidique et de l'adipogenèse (Li, Ycaza et al. 2011; Zuo, Chen et al. 2011).

Ces composés organo-étains, considérés comme « substance dangereuse prioritaire » par la communauté Européenne (EEC no. 2455/2001/EC, 2001), sont maintenant partiellement voire complètement interdits d'utilisation.

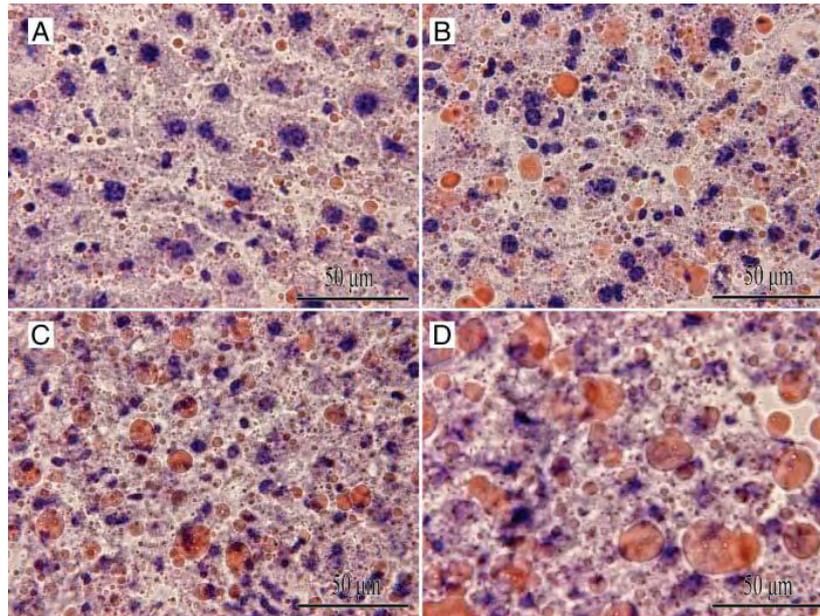


Figure 27. Modifications histologiques de foie de souris adultes exposées 45 jours au TBT. D'après (Zuo, Chen et al. 2011).

Marquage à l'huile rouge, révélatrice de gouttelettes lipidiques, de coupes de foies de souris (A) contrôles ou exposées à (B) 0.5 µg/kg; (C) 5 µg/kg ou (D) 50 µg/kg de TBT, pendant 45 jours.

2.2. Les polluants organiques persistants (POPs)

Les POPs sont des composés lipophiles, définis par leur résistance aux dégradations biologiques naturelles et leur bioaccumulation dans les tissus vivants. Ces polluants sont issus de la production de produits chimiques, tels que les pesticides organochlorés ou encore les polychlorobiphényles (PCB) et les polybromobiphényles (PBB), mais également de la production non-intentionnelle (combustion du bois et issue des ordures ménagères). Cette deuxième origine concerne principalement les dioxines, les furanes et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Des données épidémiologiques récentes suggèrent une association entre la charge de POPs, le diabète et le syndrome métabolique (Fierens, Mairesse et al. 2003; Rylander, Rignell-Hydbom et al. 2005; Lee, Lee et al. 2007; Lee, Steffes et al. 2010; Hong, Kim et al. 2012). Notons que les taux sériques de POPs sont le reflet d'une exposition principalement orale à ces contaminants mais également de leur libération des compartiments de stockage des graisses (Mullerova and Kopecky 2007). Des études ont rapporté une importante libération de POPs bioaccumulés dans le tissu adipeux à la suite d'une perte de poids chez l'individu obèse (Hong, Kim et al. 2012).

Par exemple, les PCB sont des composants aromatiques halogénés synthétiques destinés à la fabrication d'isolants électriques et de lubrifiants. Après une utilisation intensive, leur production a été interdite dans les années 1970 mais leurs propriétés physico-chimiques leur confèrent une stabilité dans le temps, expliquant leur persistance dans l'environnement (temps de demi vie supérieurs à 10 ans pour certains PCB ; estimation de 209 types de PCB différents dans la nature) (Lai, Pan et al. 2011; Ritter, Scheringer et al. 2011). Ils peuvent mimer l'action des hormones naturelles telles que les hormones thyroïdiennes et les

œstrogènes (McKinney and Waller 1994). De faibles concentrations de PCB augmentent la différenciation adipocytaire, induisent l'expression des cytokines pro-inflammatoires (Arsenescu, Arsenescu et al. 2008), et activeraient le récepteur PPAR γ (Cimafranca, Hanlon et al. 2004; Staels 2007; Casals-Casas and Desvergne 2011). Une étude épidémiologique a montré une association entre la présence de PCB et la survenue d'atteintes hépatiques (Cave, Appana et al. 2010). *In vivo*, l'exposition de souris au PBC153, l'un des PCB les plus présents dans l'environnement, provoque une aggravation de la stéatose hépatique induite par un régime gras (Shi, Wahlang et al. 2012). Chez le rat, l'administration PCB126 provoque une stéatose hépatique (Lai, Dhakal et al. 2012).

La dioxine et notamment le TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine) sont aussi des précurseurs de stéatose hépatique. *In vivo*, le TCDD pourrait augmenter l'import (Angrish, Mets et al. 2012) et diminuer l'efflux hépatique des triglycérides (Angrish, Dominici et al. 2012), entraînant une accumulation de lipides hépatiques, une inflammation du foie, et l'augmentation des marqueurs sériques d'atteintes hépatiques ALAT et ASAT (Boverhof, Burgoon et al. 2006; Kopec, Burgoon et al. 2010).

2.3. Les plastifiants

Les phtalates sont utilisés depuis 50 ans et sont produits de nos jours à raison de 3 millions de tonnes par an. Le diethylhexyl phtalate (DEHP) est parmi les esters de phtalate les plus abondamment utilisés comme plastifiants industriels, et se retrouve également dans les produits cosmétiques ainsi que dans les peintures et les solvants industriels. Lorsqu'il est ingéré par des aliments contaminés, le DEHP est converti par les lipases intestinales en un métabolite actif : le monoethylhexyl monoester phtalate (MEHP), qui est alors préférentiellement absorbé. Il est maintenant établi que ces composés interfèrent sur le maintien de l'homéostasie énergétique des organismes. Dans des modèles cellulaires, le MEHP induit l'adipogenèse en modulant l'activité du récepteur PPAR γ ainsi que de ses gènes cibles, et en recrutant les co-activateurs de PPAR γ (Feige, Gelman et al. 2007; Hao, Cheng et al. 2012). L'exposition de la souris à l'âge adulte provoque une induction des marqueurs de l'adipogenèse (PPAR γ , aP2 et LPL) au niveau du tissu adipeux, et une induction de la lipogenèse hépatique. Une exposition *in utero* conduit au développement d'une prise de poids de l'animal devenu adulte (Hao, Cheng et al. 2012). Cependant, le MEHP et le DEHP activent également le récepteur PPAR α , qui, en induisant l'oxydation des acides gras, jouerait un rôle plutôt anti-stéatosique (Lapinskas, Brown et al. 2005; Eveillard, Mselli-Lakhel et al. 2009).

Un autre plastifiant concerné par ces effets obésogènes est le bisphénol A, sur lequel a porté une grande partie de mon travail de thèse, et qui est traité plus en détail dans la dernière partie de cette introduction bibliographique. A l'heure actuelle, les dérivés de ce composé inquiètent également. Le bisphénol A diglycidyl éther (BADGE) qui est fabriqué à partir du BPA, et entre comme ce dernier dans la composition de certaines résines époxy et plastiques de type polycarbonate, stimule la formation de cellules adipeuses et favorise la différenciation des cellules souches en cellules graisseuses (Chamorro-Garcia, Kirchner et al. 2012).

PARTIE 4 : LE BISPHÉNOL A, UN PERTURBATEUR MÉTABOLIQUE

I. Origine et production du Bisphénol A

La première synthèse chimique du bisphénol A (BPA) fut réalisée par le professeur Dianin en 1891. Issue de la réaction entre deux équivalents de phénol et un équivalent d'acétone, la molécule de BPA contient deux groupements fonctionnels phénols et fait partie des composés organiques aromatiques (**Figure 28**). Ses autres noms sont également le 4,4'-(propan-2-ylidène)diphénol ou le p, p'-isopropylidènebisphénol (Vogel 2009).

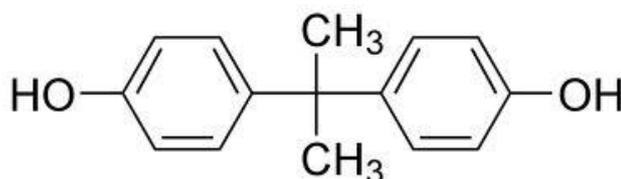


Figure 28. La molécule de Bisphénol A

Le BPA fut très étudié dans les années 1930 au cours de la recherche d'œstrogènes de synthèse. Malgré ses effets sur la fonction endocrinienne féminine il ne fut jamais utilisé comme tel, du fait de la découverte à la même époque d'un autre composé, le diéthylstilbestrol (DES), dont les propriétés semblaient être plus intéressantes (Dodds 1936). En 1960, son utilisation massive débute dans l'industrie du plastique.

Le BPA est distribué de manière ubiquitaire dans l'environnement (Calafat, Kuklennyik et al. 2005; Rubin 2011). En 2006, la production mondiale de bisphénol A s'élevait à environ 3,8 millions de tonnes, utilisées aux deux tiers pour la fabrication du polycarbonate, et pour un tiers pour celle de résines.

II. Les usages du Bisphénol A

Le BPA entre dans la fabrication industrielle de plastiques de type polycarbonate et de résines époxy. De ce fait on le retrouve dans le revêtement intérieur de boîtes de conserves, les canettes de boissons et plusieurs emballages alimentaires en plastique, avec parfois un logo de recyclage entourant le chiffre 3, 7 ou PC (Polycarbonate). De plus, il entre dans la composition des CD, DVD, de certains produits électroniques et de l'industrie automobile, des téléphones portables, des lunettes et lentilles de contact, ainsi que les tickets de caisse à encre thermique. Les résines époxy contenant du BPA sont également utilisées dans des systèmes de stockage et de transport de l'eau, et dans certains ciments dentaires (Vandenberg, Hauser et al.

2007). Les dérivés halogénés du BPA présents dans les retardateurs de flamme peuvent également contaminer l'atmosphère des logements (Rudel, Gray et al. 2011).

III. Les voies d'exposition pour l'Homme

Exposition alimentaire. Les populations sont majoritairement exposées au BPA par la voie orale, principalement par le biais de l'alimentation. Le BPA peut migrer dans les denrées alimentaires et les boissons conditionnées dans des emballages fabriqués à partir de BPA polymérisé, contaminant ainsi le consommateur (Carwile, Luu et al. 2009; Geens, Goeyens et al. 2011). Les taux de migration dépendent directement des conditions de stockage et d'utilisation, du temps et de la température de chauffage, de la durée de conservation et du pH des aliments (Welshons, Nagel et al. 2006). Par exemple, un chauffage à des températures élevées lors de la stérilisation ou de l'appertisation (procédé d'autoclavage après la mise en conserve) accroît considérablement la migration du monomère vers l'aliment. Cette migration est également importante dans le cas de produits alimentaires acides, aboutissant à augmenter les concentrations de BPA libre dans le produit consommé (Kang, Kondo et al. 2006; Vandenberg, Hauser et al. 2007).

L'eau comme source de contamination. Par ses propriétés physico-chimiques et sa production importante, le BPA est un composé persistant dans l'environnement (milieux aquatiques, air et sols) (Kang, Kondo et al. 2006). Les taux de contamination par le BPA des sources d'eaux destinées à la consommation restent faibles (Bono-Blay, Guart et al. 2012). Néanmoins, ce contaminant est détecté dans certaines eaux de surface et eaux souterraines à un taux maximal de 2,5 µg/L en Europe (Loos, Locoro et al. 2010) et aux Etats-Unis (Barnes, Kolpin et al. 2008). Dans les eaux salées, le BPA peut persister plus longtemps sans aucune dégradation (environ 30 jours contre 3-5 jours dans les rivières) (Staples, Dorn et al. 1998; Kang and Kondo 2005; Kang, Kondo et al. 2006).

Exposition cutanée au BPA. De récentes études ont également mis en évidence une exposition cutanée au BPA (Biedermann, Tschudin et al. 2010; Zalko, Jacques et al. 2011). Cette voie d'exposition pourrait concerner des milieux professionnels particuliers autres que le secteur de la fabrication du Bisphénol. La quantité moyenne du BPA présente dans les tickets de caisse est estimée à environ 13,3 g/kg de papier (Liao and Kannan 2011). La manipulation fréquente de ces tickets provoquerait une absorption quotidienne de 71µg de BPA par le seul passage transcutané (Biedermann, Tschudin et al. 2010), favorisé par des mains humides, et même après lavage des quantités résiduelles de BPA peuvent être détectées sur l'épiderme (Biedermann, Tschudin et al. 2010).

Autres sources d'exposition orales et environnementales minoritaires. Une exposition orale au BPA a été observée lors de soins dentaires par l'utilisation de résines, de ciments et de scellements dentaires contenant en partie ce composé. Le BPA peut migrer dans la salive provoquant une augmentation significative mais

temporaire de la concentration salivaire de bisphénol A chez l'enfant et l'adulte. Par exemple, il est détectable dans la salive jusqu'à 3 heures après la pose de résine (Zimmerman-Downs, Shuman et al. 2012). Toutefois, l'exposition au BPA dans le cadre d'un traitement dentaire reste marginale par rapport aux autres sources d'exposition orale.

En tant que substance soluble dans l'eau (120 to 300 mg/L à pH 7) et modérément hydrophobe (Staples, Dorn et al. 1998), le BPA se concentre dans les phases organiques comme les sédiments et les particules du sol (Santé Canada, 2008 ; Rapport Anses 2011). La demi-vie du BPA dans les sols est inférieure à 3 jours (Fent, Hein et al. 2003). Néanmoins, dans les zones à forte densité de population humaine, la contamination des sols par le BPA est entretenue par les déchets domestiques et industriels (Kawahata, Ohta et al. 2004).

Le potentiel de transport de BPA dans l'air est beaucoup plus faible que dans l'eau (environ 30%) ou dans le sol (environ 68%) (Staples, Dorn et al. 1998). En règle générale, la possibilité d'inhaler des niveaux élevés de BPA dans l'air est très faible. Des études montrent la présence du BPA dans l'air à des concentrations allant de 2 à 208 ng/m³ (Rudel, Brody et al. 2001). Toutefois, les travailleurs dans les entreprises qui produisent des produits à base de BPA représentent une exception (Poole, van Herwijnen et al. 2004).

IV. Métabolisme du Bisphénol A

Afin d'évaluer la toxicité du BPA, il est indispensable de connaître les capacités de biotransformation de ce contaminant par les organismes. Chez l'homme, le temps de demi-vie plasmatique du BPA total est court (environ 4-6 heures) (Volkel, Colnot et al. 2002; Volkel, Bittner et al. 2005). Il est donc rapidement pris en charge par les enzymes de détoxification de l'organisme. Des études réalisées chez différentes espèces incluant l'Homme ont montré que suite à une absorption orale, le BPA est métabolisé rapidement principalement au niveau hépatique et au niveau des entérocytes. Les données obtenues indiquent une métabolisation du BPA plus lente chez le rongeur et plus rapide chez l'humain, en raison de l'absence de circulation entéro-hépatique chez ce dernier (Volkel, Colnot et al. 2002; Inoue, Yuki et al. 2003). Mais une étude récente, réalisée sur le singe et la souris, apporte des nombreux détails sur le métabolisme du BPA et ajoute une controverse à la détoxification rapide du BPA dans l'espèce humaine (Taylor, Vom Saal et al. 2011). Sur la base des données pharmacocinétiques prenant en compte la biotransformation du BPA administré oralement, le métabolisme du rongeur serait comparable à celui du primate et de l'homme.

Chez toutes les espèces étudiées, la voie métabolique majoritaire est la conjugaison du BPA par l'acide glucuronique pour former le BPA-glucuronide qui est ensuite éliminé sous cette forme par voie urinaire. Les enzymes impliquées dans cette biotransformation sont des enzymes de phase II : les UDP-Glucuronosyltransferase (UGT). Chez le rat, l'isoforme qui va majoritairement transformer le BPA est

l'UGT2B1, alors que chez l'Homme ce sont les isoformes UGT2B15 et UGT2B7 (Mazur, Kenneke et al. 2010). Le polymorphisme génétique de l'UGT2B15 pourrait entraîner des différences interindividuelles dans la capacité de détoxifier le BPA (Hanioka, Oka et al. 2011).

Chez le rongeur, le métabolisme du BPA est différent. Après la glucuronidation du BPA au niveau hépatique, le conjugué est excrété dans la bile et retourne à l'intestin où il est dissocié par la flore bactérienne (cycle entéro-hépatique), se retrouvant ainsi sous sa forme libre, capable à nouveau de se fixer sur les ERs (Sakamoto, Yokota et al. 2002; Volkel, Colnot et al. 2002; Inoue, Yuki et al. 2003). Des données similaires ne sont pas connues chez l'homme, mais la possibilité d'une déconjugaison du BPA-glucuronidé au niveau de plusieurs tissus périphériques ne peut être exclue, car du BPA libre est retrouvé dans les urines. En effet, l'enzyme β -glucuronidase, responsable de la déconjugaison du BPA-glucuronidé est présente dans la plupart des tissus humains, en particulier dans le placenta et le foie fœtal (Ginsberg and Rice 2009). On considère jusqu'à présent que la forme BPA-glucuronide ne possède pas d'activité oestrogénique (Doerge, Twaddle et al.; Pottenger, Domoradzki et al. 2000; Volkel, Colnot et al. 2002), ce qui permet de limiter l'exposition interne à la molécule libre de BPA. Aussi, la glucuronidation limite la fraction de BPA pouvant être métabolisée par les cytochromes P450. Les cytochromes majoritairement impliqués sont les CYP 2C18, 2C19, 2C9 et dans une moindre mesure les CYP 1A1, 2C8, 2B6 (Niwa, Fujimoto et al. 2001). Cette métabolisation par les CYP450 mène à la formation de métabolites comme le 4-méthyl-2,4-bis(p-hydroxyphenyl)pent-1-ène (MBP) qui a un potentiel estrogénique plus grand que le BPA (Yoshihara, Mizutare et al. 2004), et le bisphenol-o-quinone qui peut former des adduits à l'ADN (Niwa, Fujimoto et al. 2001). La sulfatation est une voie secondaire dans le métabolisme du BPA, tant chez les rongeurs que chez l'Homme, avec la génération du métabolite BPA-sulfate qui ne possède pas d'activité oestrogénique (Shimizu, Ohta et al. 2002). Toutefois cette voie métabolique reste peu étudiée.

V. Imprégnation des populations

1. Les techniques de dosage du Bisphénol A

De multiples techniques s'appliquent pour mesurer les taux de BPA total, libre ou conjugué dans les fluides (urines, sang, liquide amniotique) et les tissus. La chromatographie en phase gazeuse (GC) et la chromatographie en phase liquide (LC) sont généralement utilisées en association avec des méthodes de détection telles que la spectrométrie de masse (MS), la spectrométrie de masse tandem (MS/MS), et la dérivation chimique (fluorescence, électrochimie) (Vandenberg, Chahoud et al. 2012). Un test ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) est également utilisé dans plusieurs études. Cependant, cette méthode est considérée comme moins sensible vis-à-vis des méthodes utilisant la chimie analytique (Fukata, Miyagawa et al. 2006; Dekant and Volkel 2008). Notons que d'importantes précautions doivent être prises afin de garantir un dosage fiable (durée et température de conservation des échantillons, seuils

limites de détection, contamination des échantillons par le consommable utilisé pour l'analyse) (Ye, Bishop et al. 2007; Vandenberg, Chahoud et al. 2012).

2. Estimations de l'exposition humaine au Bisphénol A

Les valeurs d'exposition moyennes au BPA sont estimées à environ 30 ng/kg de poids corporel/j chez l'adulte et environ 25 fois plus élevées pour le nourrisson nourri au biberon en polycarbonate soit 800 ng/kg/j (von Goetz, Wormuth et al. 2010). Ces doses sont largement inférieures à la dose journalière admissible (DJA) de 50 µg/kg/j. Cependant, elles sont du même ordre de grandeur que les concentrations récemment rapportées comme délétères sur différentes fonctions de l'organisme (voir partie « Bisphénol A et risques sanitaires »).

3. Taux plasmatiques de Bisphénol A

En 2012, environ 17 études ayant mesuré les taux de BPA total dans le sang et le sérum d'hommes et de femmes ont été répertoriées (Vandenberg, Chahoud et al. 2012). Vandenberg et coll. (2012), dans leur revue bibliographique, ont estimé que les niveaux sériques moyens en BPA dans la population adulte sont de 1 ng/ml de sang. Les prélèvements sanguins pratiqués chez 40 femmes de nationalité américaine au moment de l'accouchement montrent des niveaux plasmatiques en BPA variant de 0,5 (limite de détection) à 22,3 ng/ml (moyenne=5,9 ng/ml) (Padmanabhan, Siefert et al. 2008). Dans une étude analogue réalisée sur 300 femmes coréennes au moment de l'accouchement, les concentrations plasmatiques étaient comprises entre 2,73 et 66,48 ng/ml. Dans le sang du cordon, les concentrations plasmatiques ne dépassaient pas 8,86 ng/ml (Lee, Ryu et al. 2008). Ces valeurs sont plus élevées que celles relevées par Chapin et coll. dans leur revue bibliographique, dans laquelle les concentrations plasmatiques moyennes chez les femmes enceintes ne dépassent pas 4,4 ng/ml (Chapin, Adams et al. 2008).

Malgré les nombreuses mesures du BPA sérique chez l'adulte, il n'existe pas de relevés équivalents pour les nourrissons. En utilisant un modèle toxicocinétique tenant compte des différences enzymatiques entre les nouveau-nés et les adultes, la quantité de BPA circulant chez le nourrisson est estimée de 3 à 11 fois plus élevée que chez l'adulte (Edginton and Ritter 2009; Mielke and Gundert-Remy 2009). Cette différence est probablement due à une faible capacité de métabolisation du BPA et à une corpulence moindre (Edginton and Ritter 2009). Mais les modèles toxicocinétiques appliqués par Mielke et Gundert-Remy font apparaître que les scénarios d'exposition mettant en jeu les doses les plus élevées devraient conduire à des niveaux plasmatiques circulants en BPA cent fois plus faibles que ceux qui sont rapportés dans la littérature. Cette incohérence a conduit beaucoup d'équipes à préférer l'utilisation des quantités totales de bisphénol A éliminées dans l'urine comme marqueurs d'exposition à ce contaminant (Mielke and Gundert-Remy 2009).

4. Taux urinaires de Bisphénol A

La détermination des concentrations urinaires de BPA est un paramètre clé pour l'estimation des valeurs d'exposition. Une étude réalisée sur la cohorte NHANES (2003-2004), conçue pour être représentative de la population des États-Unis, a montré que plus de 90% des échantillons d'urine testés contenaient des niveaux quantifiables de BPA libre et conjugué, soit en moyenne 2,7 ng/mL chez les individus de 12 ans et plus (Calafat, Ye et al. 2008). Ces concentrations s'élèvent à environ 4 ng/mL chez les enfants âgés de 3 à 11 ans (Calafat, Ye et al. 2008; Perera, Vishnevetsky et al. 2012). D'autres études se sont également intéressées à la détermination de ce paramètre, mais souvent avec une cohorte d'individus moins importante (**Tableau 6**). En se basant sur les niveaux urinaires du BPA (Calafat, Ye et al. 2008) et à l'aide de modèles pharmacocinétiques, les estimations d'absorption journalière du BPA donnent pour un adulte une valeur d'exposition d'environ 50,5 ng/kg/jour, contre 67,4 ng/kg pour un enfant âgé de 6 à 11 ans (Lakind and Naiman 2008).

5. Taux de Bisphénol A dans les autres fluides

Le BPA peut être retrouvé dans le lait maternel, surexposant ainsi le nourrisson allaité. Les taux de BPA ont été estimés entre 0,61 à 1,9 ng/ml dans le lait maternel (Otaka, Yasuhara et al. 2003; Sun, Irie et al. 2004; Ye, Kuklennyik et al. 2006; Ye, Tao et al. 2008). Des quantités plus importantes (3,41 ng/ml) ont été retrouvées dans le colostrum, dans les trois premiers jours après l'accouchement (Kuruto-Niwa, Tateoka et al. 2007), confirmant l'exposition de l'enfant par sa mère dès le plus jeune âge.

Le BPA a également été mesuré dans le liquide amniotique au cours d'amniocentèses. Les concentrations détectées ont varié de 0,5 à 1,96 ng/ml (Ikezuki, Tsutsumi et al. 2002; Yamada, Furuta et al. 2002; Engel, Levy et al. 2006). Yamada et coll. et Ikezuki et coll. ont détecté des niveaux plus élevés en BPA allant respectivement jusqu'à 5,62 et 8,3 ng/ml dans le liquide amniotique, mais ces valeurs peuvent être discutables compte tenu de la technique utilisée (ELISA) jugée moins spécifique (Ikezuki, Tsutsumi et al. 2002; Yamada, Furuta et al. 2002). Une étude a montré récemment que le BPA est plus souvent retrouvé dans le liquide amniotique au second trimestre (16 femmes sur 20 ; moyenne de 0,40 ng/ml de BPA total) de la grossesse comparé au troisième trimestre (1 femmes sur 20 ; 0,40 ng/ml de BPA total) (Edlow, Chen et al. 2012). Aussi, le BPA est une molécule lipophile qui peut être retrouvée dans les graisses. L'analyse du tissu adipeux de 20 femmes d'origine espagnole par Fernandez et coll. montre que 55% ont des taux détectables de BPA, soit 3,16 µg/kg de tissu adipeux (Fernandez, Arrebola et al. 2007). Chez l'enfant, Olea et coll. (2008) ont montré que les teneurs dans le tissu adipeux étaient en moyenne de $17,46 \pm 14,82$ µg/kg de tissu adipeux (Olea 2008). Geens et al. ont montré sur une petite cohorte d'individus (9-62 ans), des teneurs moyennes en BPA de 3,78 µg/kg (Geens, Neels et al. 2012).

Tableau 6 : Concentrations urinaires de Bisphénol A dans différentes études épidémiologiques. D'après (Vandenberg, Chahoud et al. 2012).

Références	Populations examinées	Techniques	Taux de détection	[BPA] total urinaire (ng/mL)
(Kim, Kim et al. 2003; Matsumoto, Kunugita et al. 2003)	Hommes de nationalité coréenne ; n=15/étude	HPLC	100%	2,8 (Conjugué : 0,6)
(Ye, Kuklennyk et al. 2005; Ye, Kuklennyk et al. 2005)	Nationalité américaine; adultes ; n=30/étude	SPE-HPLC-MS/MS	87% ; 97%	3,5 ; 3,2
(Yang, Kim et al. 2006)	Hommes de nationalité coréenne ; n=172	HPLC-FD	97,5%	7,86
(Wolff, Teitelbaum et al. 2007)	Jeunes filles de nationalité américaine ; 6-9 ans ; n=90	HPLC-MS/MS	94%	2,0
(Calafat, Ye et al. 2008)	Nationalité américaine ; Enfants, 6-11 ans ; N=314 Adolescents, 12-19 ans ; n=713 Adultes, 20-59 ans ; n=950 Adultes, + de 60 ans ; n=537	HPLC-MS/MS	92,6%	4,3 2,8 2,4 2,3
(Teitelbaum, Britton et al. 2008)	Enfants de nationalité américaine; 6-10 ans; n=159	HPLC-MS/MS	95%	3,4
(Wolff, Engel et al. 2008)	Femmes enceintes; nationalité américaine; n= 404	SPE-HPLC-MS/MS	90,8%	Non détectable à 35,2
(Ye, Pierik et al. 2008)	Femmes enceintes; nationalité allemande ; n=100	GC-MS/MS	82%	1,2
(Becker, Goen et al. 2009)	Enfants de nationalité allemande; 3-5 ans ; n=137 6-8 ans ; n=145; 9-11 ans ; n=149; 12-14 ans ; n=168	LC/LC-MS/MS	99%	3,55 2,22 à 2,72
(He, Miao et al. 2009)	Adultes de nationalité chinoise ; Hommes ; n=419 Femmes ; n=503	HPLC	58% 44%	1,41 0,58
(Hong, Park et al. 2009)	Hommes de nationalité coréenne ; n=516	HPLC-MS/MS	76%	2,74
(Kim, Park et al. 2011)	Hommes (n=1000) et femmes (n=800); nationalité coréenne	GC/MS	99%	1,90
(Zhang, Alomirah et al. 2011)	Hommes et femmes de nationalité : Koweitienne ; n=32 Coréen ; n=32 Indienne ; n=21 Vietnamienne ; n=30 Chinoise ; n=116 Malaysienne ; n=32 Japonaise ; n=36	HPLC-MS/MS	94,3%	3,05 2,17 1,70 1,18 1,10 1,06 0,95
(Perera, Vishnevetsky et al. 2012)	Enfants de nationalité américaine; 3-4 ans; n=357	HPLC-MS/MS	>90%	4

Abréviations : GC, chromatographie en phase gazeuse ; HPLC, chromatographie en phase liquide à haute performance ; LC/LC, chromatographie en phase liquide en tandem ; SPE, extraction en phase solide ; MS/MS, spectrométrie de masse en tandem

VI. Le Bisphénol A, un perturbateur endocrinien dont l'usage est soumis à réglementation

Depuis plusieurs années, le bisphénol A est suspecté d'être préjudiciable à la santé et en particulier d'être responsable de perturbations endocriniennes et de troubles de la reproduction.

1. Notion de perturbateur endocrinien

Un perturbateur endocrinien est défini selon US-EPA *Environmental Protection Agency* comme un agent exogène qui interfère avec la production, la libération, le transport, le métabolisme, la liaison, l'action ou l'élimination des ligands naturels responsables du maintien de l'homéostasie et de la régulation du développement de l'organisme. Ils peuvent être nocifs ou bénéfiques. *L'International Program for Chemical Safety* définit les perturbateurs endocriniens comme des substances ou mélanges exogènes modifiant la (les) fonction(s) du système endocrinien et provoquant ainsi des effets sanitaires nocifs dans un organisme intact, sa descendance, ou sur des populations.

Le BPA est qualifié de perturbateur endocrinien car de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont montré qu'il possède des propriétés œstrogène-mimétiques. Il est capable de se lier et d'activer le récepteur des hormones aux œstrogènes mais, avec une capacité 1 000 à 5 000 fois moindre que le 17 β -œstradiol (AFSCA, 2009). Il est classé en tant que substance reprotoxique pour la fertilité de l'espèce humaine (Rapport INSERM, 2010).

2. Législation française, européenne et mondiale

En France, la loi n°2010-729 du 30 juin 2010, relative à la suspension de la commercialisation de biberons produits à base de bisphénol A, a suspendu la fabrication, l'importation, l'exportation et la mise sur le marché à titre gratuit ou onéreux de biberons produits à base de bisphénol A jusqu'à l'adoption par l'Anses d'un avis motivé autorisant à nouveau ces opérations. Le 12 octobre 2011, l'Assemblée Nationale a voté une loi visant à la suspension de la fabrication, l'importation, l'exportation et la mise sur le marché de tout conditionnement à vocation alimentaire contenant du BPA à compter du 1er janvier 2014 et à compter du 1er janvier 2013 pour les conditionnements destinés aux nourrissons et à l'enfant en bas âge (Rapport du Sénat 2010; Texte Assemblée Nationale 2011). Mais le 3 octobre 2012, la Commission des affaires sociales du Sénat a repoussé d'un an la suspension totale du BPA (Texte de loi suspension totale BPA 2015 2012) afin de laisser un délai supplémentaire aux industriels pour le remplacement du BPA par un composé plus sûr. Le recul de l'échéance d'interdiction du BPA est néanmoins compensé par l'élargissement inattendu de la loi à l'interdiction de tous les CMR (substances

Cancérogènes, Mutagènes et toxiques pour la Reproduction) de catégorie 2 (substances et préparations pour lesquelles il existe une forte présomption que l'exposition de l'homme à de telles substances et préparations puisse provoquer ou augmenter la fréquence d'apparition des effets CMR) dont trois phtalates (DEHP, DBP, BBP), et de tout perturbateur endocrinien dans les dispositifs médicaux.

Concernant l'Europe, en janvier 2011, la Commission européenne a adopté la directive UE n° 8/2011, interdisant l'utilisation du BPA pour la fabrication de biberons pour nourrissons en polycarbonate. Mais l'emploi du BPA est autorisé dans les matériaux en contact avec les aliments au sein de l'Union européenne conformément au règlement UE n° 10/2011 relatif aux matériaux et articles en matière plastique destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires (Règlement_(UE)_8/2011 2011; Règlement_(UE)_10/2011 2011).

La nouvelle politique européenne des produits chimiques, appelée REACH (enregistrement, évaluation et autorisation des substances chimiques) est entrée en vigueur le 1er Juin 2007. REACH rationalise et améliore l'ancien cadre réglementaire de l'Union européenne (UE) sur les produits chimiques. L'un des principaux objectifs de REACH est de s'assurer qu'il y ait suffisamment d'informations disponibles afin d'évaluer les risques potentiels des substances chimiques. Les polymères, tels que le polycarbonate et les résines époxy, sont exemptés d'enregistrement, mais les monomères à partir desquels ils sont fabriqués, comme le bisphénol A (BPA), doivent être enregistrés. La date limite pour l'enregistrement dépend du tonnage fabriqué ou importé. Pour le BPA il s'agissait du 1er Décembre 2010. Dans le cadre de REACH, les « substances extrêmement préoccupantes » peuvent faire l'objet d'une procédure d' « autorisation » dans le but de s'assurer que les risques liés à ces substances sont suffisamment maîtrisés. Le BPA ne remplit pas les critères d'une « substance extrêmement préoccupante ».

Concernant le reste du monde, depuis le 18 avril 2008, l'office public de santé du Canada a classé le bisphénol A au rang de substance dangereuse. Le Canada a été ainsi le premier pays à classer cette substance comme toxique, ce qui a amené les États-Unis et l'Union européenne à se prononcer. Le 15 août 2008, un rapport de la Food and Drug Administration (FDA) aux États-Unis concluait que ce produit ne posait pas de problème de santé humaine aux niveaux d'exposition habituels pour l'homme. Mais en raison des différents signaux d'alerte émis par la communauté scientifique, dix États (Californie, Connecticut, Delaware, Maine, Maryland, Minnesota, New York, Vermont, Washington, Wisconsin) et le District de Columbia ont adopté des restrictions depuis 2009 (NCSL_Policy_Update:_State_Restrictions_on_BPA).

3. Estimation des doses de référence par les autorités

Le BPA a fait l'objet de plusieurs évaluations de risque à la demande de différentes agences sanitaires aussi bien en Europe qu'aux Etats-Unis (**Tableau 7**). Ces évaluations se sont appuyées principalement sur deux études réalisées par la même équipe (Tyl et coll., 2002, 2008) selon les lignes directrices de l'OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques). A partir de ces études conduites sur plusieurs générations de rats et de souris, une dose de référence en toxicologie réglementaire : la NOAEL a été établie à 5 000 µg/kg de poids corporel/ jour, en se basant sur des effets de toxicité systémique. Sur la base de ces travaux, les autorités sanitaires (EFSA) ont défini une dose journalière admissible (DJA) pour l'Homme de 50 µg/kg/jour en Europe, elle correspond à la valeur de la NOAEL divisée par un facteur de sécurité prenant en compte les différences inter-individuelles et les différences inter-espèces. La DJA est l'estimation de la quantité maximale d'une substance qui peut être ingérée quotidiennement pendant toute la durée d'une vie sans risque notable pour la santé. Actuellement, l'innocuité du BPA aux quantités permises et utilisées, est contestée partout dans les pays industrialisés. Un nombre croissant de recherches confirme des effets néfastes sur la santé à de très faibles doses d'exposition (Welshons, Nagel et al. 2006). Dans certains cas, ces effets ne sont plus retrouvés au plus fortes doses (Vandenberg, Colborn et al. 2012). Les faibles doses font généralement référence à des doses proches d'une exposition humaine et donc inférieures à celles utilisées dans les études de toxicologie classique, qui ne suffisent pas à évaluer les effets potentiellement néfastes de ces contaminants (Vandenberg, Colborn et al. 2012).

Tableau 7. Doses de référence en toxicologie réglementaire tirées de l'évaluation des risques par dates et pays. D'après (BPA_Effets_sur_la_reproduction_Rapport_INSERTM 2010).

Agence d'évaluation des risques Date/Pays	Etude(s) de référence	NOAEL (mg/kg/j)	DJA (µg/kg/j)
SCF 2002/Europe	(Tyl et coll., 2002)	5	10
EBP 2003/Europe		50	
AIST 2005/Japon		5 ou 50	
EFSSA 2006 et 2008/ Europe	(Tyl et coll., 2002, 2008)	5	50
ECB 2008/Europe		50	
NTP-CERHR 2008/USA		4,75	
US FDA 2008/USA		5	
Health Canada 2008/Canada		5	

Liste des abréviations : SCF : *Scientific Committee on Food*; ECB : *European Chemicals Bureau*; AIST : *Advanced Industrial Science and Technology*; AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments; NTP-CERHR : *National Toxicology Program- Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction*; US FDA : *US Food and Drug Administration*; NOAEL : *No observable adverse effect level*; DJA : Dose journalière admissible.

VII. Bisphénol A et risques sanitaires

1. Etudes épidémiologiques

Les études épidémiologiques ont permis d'explorer, au cours des dix dernières années, l'impact suspecté du BPA sur diverses fonctions de l'organisme. Ces études ont l'avantage de s'affranchir des transpositions de l'animal à l'Homme. Cependant, certaines d'entre elles sont pénalisées par des biais méthodologiques classiques (taille trop limitée des cohortes, choix de la population exposée et des témoins, mode de recueil des données, ...).

Plusieurs études épidémiologiques ont corrélé l'exposition des populations au BPA à des dommages sur la capacité de reproduction. Chez l'homme, les niveaux de BPA ont été associés à une diminution de la fertilité (diminution de la concentration du sperme, du nombre, de la viabilité et de la mobilité des spermatozoïdes) (Li, Zhou et al. 2011). Chez la femme, les données disponibles actuellement ne permettent pas de conclure avec certitude à un quelconque impact (conclusions du rapport de l'ANSES 2011). L'exposition au BPA semble interférer avec la maturation des ovocytes dans la procréation médicalement assistée (FIV) (Fujimoto, Kim et al. 2011; Mok-Lin, Ehrlich et al. 2011; Ehrlich, Williams et al. 2012), et pourrait être associée à des avortements spontanés (Liu, Shen et al. 2011). En revanche, aucune association entre la concentration urinaire de BPA et l'endométriose n'a été trouvée (Itoh, Iwasaki et al. 2007).

Concernant les effets néfastes sur la santé suite à une exposition professionnelle au BPA, le groupe de Li et al. (2010) a montré que les travailleurs exposés au BPA présentaient un risque plus élevé de dysfonctionnement sexuel que les travailleurs non exposés (difficultés érectiles, difficultés d'éjaculation et la satisfaction réduite) (Li, Zhou et al. 2010). Toutefois, les données ont été obtenues par auto-déclaration, sans l'appui des données cliniques et peuvent par conséquent être remises en question. Une autre étude, réalisée chez 28 individus travaillant dans l'industrie de fabrication des résines époxy, démontre une association positive entre les concentrations urinaires de BPA, des taux cliniquement anormaux des hormones stimulant la thyroïde (FT3, FT4, AT3, AT4), et une augmentation des marqueurs de la toxicité hépatique (ASAT et gamma-glutamyl-transférase) (Wang, Hua et al. 2012).

Aussi, les niveaux urinaires de BPA sont corrélés, chez les jeunes enfants, à une hyperactivité et une augmentation de l'agressivité. L'étude de Braun, en 2009, a été largement contestée (Braun, Yolton et al. 2009). Mais une étude récente de cette même équipe (Braun and Hauser 2011) et une étude du groupe de F. Perera (Perera, Vishnevetsky et al. 2012) viennent conforter ces observations.

Une étude épidémiologique réalisée sur une cohorte NHANES (*National Health and Nutrition Examination Survey*), conçue pour être représentative de la population générale américaine, a montré que le BPA semble affecter négativement la fonction immunitaire humaine, mesurée dans cette étude par les niveaux d'anticorps de Cytomégalovirus. Des études supplémentaires devraient être effectuées pour enquêter sur ces conclusions (Clayton, Todd et al. 2011).

Plusieurs études épidémiologiques traitent de l'association entre le BPA et les marqueurs de l'obésité, les pathologies cardiovasculaires, le diabète et les paramètres biochimiques sanguins. L'étude de ces paramètres sur une cohorte de 1455 individus d'une population NHANES a montré une corrélation positive entre les niveaux urinaires de BPA et le risque de diabète et de maladies cardiovasculaires (Calafat, Kuklennyik et al. 2005; Calafat, Ye et al. 2008). Plus particulièrement, ces niveaux de BPA ont été corrélés positivement aux cardiopathies coronariennes (CAD pour *coronary artery disease*) (Melzer, Rice et al. 2010; Melzer, Osborne et al. 2012), ainsi qu'aux artériopathies oblitérantes des membres inférieurs (PAD), un marqueur de la défaillance cardiaque (population NHANES 2003-04) (Shankar, Teppala et al. 2012). Les taux élevés de BPA dans les urines de cette même population sont corrélés à l'hypertension artérielle (Shankar and Teppala 2012). Une étude réalisée sur une cohorte de 2840 enfants et adolescents a montré une association entre les concentrations urinaires de BPA et l'obésité (Trasande, Attina et al. 2012). Il existe également une association entre l'exposition au bisphénol A et la résistance accrue à l'insuline, l'obésité générale, l'obésité abdominale et la prévalence du diabète (Lang, Galloway et al. 2008; Wang, Li et al. 2012). De nombreuses études épidémiologiques récentes viennent renforcer ces observations (Lang, Galloway et al. 2008; Melzer, Rice et al. 2010; Carwile and Michels 2011; Shankar and Teppala 2011; Wang, Li et al. 2012).

2. Effets d'expositions au Bisphénol A chez l'animal

L'utilisation de modèles animaux, exposés à différentes doses de BPA et à différentes périodes de la vie, permet de mieux comprendre l'impact de cette molécule sur les organismes. Bien que chaque espèce possède des caractéristiques physiologiques particulières, ces études peuvent prédire ce qui se passe chez l'Homme.

La période périnatale est une fenêtre d'exposition critique au BPA. La présence de celui-ci dans le liquide amniotique et les tissus fœtaux confirme la capacité du BPA à traverser la barrière placentaire (Zalko, Soto et al. 2003). Le fœtus, exposé très précocement au BPA, ne possède pas l'équipement enzymatique nécessaire pour neutraliser le contaminant, les enzymes responsables de la conjugaison du BPA n'étant pas suffisamment exprimées dans les microsomes hépatiques humains avant la naissance (Coughtrie, Burchell et al. 1988; Ring, Ghabrial et al. 1999). Beaucoup d'études expérimentales se sont focalisées sur cette fenêtre d'exposition, révélant des effets avérés du BPA chez l'animal devenu adulte. Les expérimentations chez l'adulte, moins nombreuses, révèlent également des effets néfastes de ce contaminant sur un large spectre de fonctions de l'organisme.

2.1 Fonction de reproduction et de développement des organes génitaux

De nombreuses études réalisées sur des modèles animaux ont montré qu'une exposition *in utero* au BPA s'accompagne, dès la naissance et jusqu'à l'âge adulte, de troubles de la fonction de reproduction et de

développement des organes génitaux. L'exposition des mères au BPA entraîne chez la descendance femelle une puberté précoce (Howdeshell, Hotchkiss et al. 1999; Honma, Suzuki et al. 2002), une altération des cycles œstraux, une diminution des niveaux plasmatiques de l'hormone lutéinisante (LH) (Rubin, Murray et al. 2001; Monje, Varayoud et al. 2010; Cabaton, Wadia et al. 2011; Zhang, Zhang et al. 2011), des lésions au niveau de l'utérus et des ovaires (kystes ovariens, une hyperplasie atypique de l'utérus et des polypes utérins) (Markey, Wadia et al. 2005; Newbold, Jefferson et al. 2007; Newbold, Jefferson et al. 2009), et une altération du développement des glandes mammaires avec des preuves d'hyperplasies intracanales et préneoplasiques (Markey, Wadia et al. 2005; Munoz-de-Toro, Markey et al. 2005; Murray, Maffini et al. 2007; Vandenberg, Maffini et al. 2008; Ayyanan, Laribi et al. 2011). Concernant la descendance mâle, une augmentation du volume de la prostate (Gupta 2000; Timms, Howdeshell et al. 2005), un développement de lésions néoplasiques (Ho, Tang et al. 2006; Prins, Birch et al. 2007) et un déséquilibre dans l'homéostasie de la testostérone ont été rapportés. Ces animaux présentent également une diminution de la masse des épидидymes et de la production spermatique journalière (vom Saal, Cooke et al. 1998).

Une exposition des femelles à l'âge adulte peut conduire à une tumorigenèse mammaire accélérée et métastasée (Jenkins, Wang et al. 2011). Chez le mâle, la production et la viabilité du sperme sont diminuées (Zhang, Zhang et al. 2012) ainsi que le poids des testicules et des vésicules séminales (Al-Hiyasat, Darmani et al. 2002).

2.2 Fonctions cérébrales et comportementales

Les fonctions cérébrales et comportementales sont également perturbées chez les animaux exposés *in utero* au BPA. En effet, plusieurs études ont mis en évidence une perte du dimorphisme sexuel au niveau des structures cérébrales pour la progéniture exposée à ce contaminant (Kubo, Arai et al. 2003; Patisaul, Fortino et al. 2006; Rubin, Lenkowski et al. 2006; Cao, Mickens et al. 2012). Les animaux présentent également des comportements cognitifs et anxiolytiques perturbés (Tian, Baek et al. 2012). Kawai et al. ont également mis en évidence une augmentation de l'agressivité (Kawai, Nozaki et al. 2003), de nombreuses publications mettent en évidence une hyperactivité (Ishido, Masuo et al. 2004; Viberg, Fredriksson et al. 2011; Wolstenholme, Taylor et al. 2011) et une altération du comportement socio-sexuel de ces animaux (Farabollini, Porrini et al. 2002; Porrini, Belloni et al. 2005).

Une exposition à l'âge adulte peut conduire à une altération de la mémoire (Eilam-Stock et al., 2011) et du comportement exploratoire (Razzoli, Valsecchi et al. 2005). Une masculinisation du comportement social et émotionnel (Yu et al., 2011) et une altération du comportement maternel (Della Seta, Minder et al. 2005) sont également observées chez la femelle. Dans l'hypothalamus et le cortex préfrontal, le BPA antagonise l'action de l'E2 sur la synaptogenèse (MacLusky, Hajszan et al. 2005; Leranthy, Szigeti-Buck et al. 2008)

2.3 Fonction immunitaire

Une exposition périnatale au BPA chez le rat affecte la barrière intestinale, se traduisant par une fragilité du système immunitaire chez la progéniture femelle (Braniste, Jouault et al. 2010). L'exposition prénatale au BPA semble augmenter la réponse immunitaire à l'antigène soluble, avec une augmentation de l'immunoglobuline Ig de type G (IgG). Les réponses de type Th (*T helper*) 1 (y compris les IgG2a et la production d'IFN-gamma) et les réponses de type Th2 (y compris la production d'IgG1 et d'IL-4) sont augmentées (Yoshino, Yamaki et al. 2004). Chez la souris adulte, le BPA peut moduler la fonction immunitaire par une altération de la production de cytokines et d'anticorps, de la réponse à l'infection, et par la progression des maladies auto-immunes (Sawai, Anderson et al. 2003; Yoshino, Yamaki et al. 2003). Le BPA renforce la sensibilisation allergique chez les animaux exposés *in utero* et favorise le développement des maladies atopiques comme l'asthme (Midoro-Horiuti, Tiwari et al. 2010; Bonds and Midoro-Horiuti 2012).

2.4 Fonctions métaboliques

2.4.1 Poids des animaux

Il existe une littérature fournie décrivant les effets d'exposition *in utero* au BPA sur le poids corporel des animaux, les observations ne vont pas toujours dans le même sens.

Lorsqu'un gain de poids est observé chez les animaux exposés, ces effets sont souvent spécifiques aux faibles doses, suivant un effet dose réponse non monotone en U inversé où la masse corporelle mais également la masse des tissus gras sont augmentées à de faibles doses, mais ne le sont pas forcément à des doses plus élevées (Rubin, Murray et al. 2001; Miyawaki, Sakayama et al. 2007; Alonso-Magdalena, Vieira et al. 2010). Ces effets en « cloche », ne sont pas retrouvés forcément pour les deux sexes. Par exemple, les souris adultes exposées *in utero* au BPA et soumises à un régime alimentaire riche en graisses, présentent une augmentation de leur masse corporelle et de la masse de tissus adipeux. Chez les femelles, le poids des tissus adipeux a augmenté lors d'exposition *in utero* à une faible dose de BPA (1 µg/mL soit 0,26 mg/kg/j), mais cet effet est aboli à une dose plus élevée (10 µg/mL soit 2,72 mg/kg/j). Chez les mâles, la masse de tissu adipeux est augmentée proportionnellement à la dose de BPA administrée (Miyawaki, Sakayama et al. 2007). L'augmentation du poids corporel est souvent plus prononcée et persistante chez la progéniture femelle, comparée à la progéniture mâle. Mais une exposition à un régime gras fait souvent apparaître une prédisposition à l'obésité chez les mâles (Somm, Schwitzgebel et al. 2009). Ce dimorphisme sexuel n'est pas toujours retrouvé. Dans l'étude de Wei et al. l'augmentation du poids corporel des rats soumis *in utero* au BPA est observée en conditions d'alimentation standard et lorsqu'ils sont soumis à un régime riche en graisses et en carbohydrates quelque soit le sexe (Wei, Lin et al. 2011). Chez l'adulte, peu d'études ont été

réalisées. Nadal et al. montrent que l'exposition au BPA (100 µg/kg) de souris adultes gestantes provoque une augmentation modérée de leur masse corporelle (Alonso-Magdalena, Vieira et al. 2010).

Certaines études ont montré une diminution du poids en réponse à une exposition périnatale au BPA (Nagel, vom Saal et al. 1997; Honma, Suzuki et al. 2002; Evans, North et al. 2004) et d'autres n'ont trouvé aucun effet sur le poids corporel (Ishido, Masuo et al. 2004; Kabuto, Amakawa et al. 2004; Ryan and Vandenberg 2006).

Les différences obtenues peuvent s'expliquer par les souches utilisées qui diffèrent d'une étude à l'autre et nous savons désormais que certaines souches sont plus sensibles que d'autres aux xéno-estrogènes (Richter, Birnbaum et al. 2007). Aussi, la fenêtre d'exposition, le temps et le mode d'administration du BPA (Richter, Birnbaum et al. 2007), le type d'alimentation (vom Saal, Richter et al. 2005), le conditionnement des animaux sont des facteurs déterminants, à prendre en considération. Ainsi, l'impact du BPA sur la prise de poids des animaux peut varier selon les expériences. Cependant, les observations réalisées au niveau des organes clés du métabolisme énergétique (pancréas, tissu adipeux, foie et muscle) viennent conforter l'idée que le BPA est non seulement un perturbateur endocrinien mais également un perturbateur métabolique.

2.4.2 Pancréas

Les cellules endocrines du pancréas sont regroupées dans les îlots de Langerhans. Chaque îlot contient 1000 à 3000 cellules de cinq types, les plus importantes étant les cellules β , qui synthétisent et sécrètent l'insuline (Brissova, Fowler et al. 2005; Cabrera, Berman et al. 2006). La biosynthèse de l'insuline est contrôlée par de nombreuses molécules de signalisation, comprenant les neurotransmetteurs, des hormones et des nutriments, parmi lesquels le glucose est le plus important. En situation physiologique, en réponse à une courte stimulation par le glucose, la biosynthèse de l'insuline est régulée par une augmentation de la conversion de la préproinsuline en insuline via des modifications post-traductionnelles. Par contre, après une exposition prolongée au glucose, c'est la transcription du gène d'insuline qui est augmentée (Orland, Chyn et al. 1985; Poitout, Hagman et al. 2006). Les récepteurs aux estrogènes α et β (ER α et β) nucléaires et membranaires existent dans la cellule β pancréatique. Les formes membranaires des récepteurs sont capables d'activer rapidement des cascades de signalisation, on parle d'effets non-génomiques (Alonso-Magdalena, Ropero et al. 2012). Le récepteur ER α membranaire joue un rôle important dans la biosynthèse de l'insuline alors que le récepteur ER β membranaire a récemment été identifié comme un médiateur de la sécrétion d'insuline. Son action inhibitrice des canaux potassiques (K_{ATP}) provoque la dépolarisation de la membrane conduisant à l'augmentation de la sécrétion d'insuline par l'augmentation des concentrations de Ca^{2+} intracellulaires (Ropero, Pang et al. 2012). Le BPA utilisé dans ces études comme modèle de xénoestrogène s'est très vite révélé avoir les mêmes effets que l'oestradiol sur ces voies métaboliques.

Chez la souris mâle adulte, une exposition de quelques jours (1 et 4 jours) à de faibles doses de BPA (10 et 100 µg/kg/j) provoque une altération de la tolérance au glucose, une hyper insulinémie et une augmentation de la teneur en insuline dans les cellules β (Alonso-Magdalena, Morimoto et al. 2006; Alonso-Magdalena, Ropero et al. 2008). Cela a également été observé *in vitro* en présence de doses proches de celles retrouvées dans le sérum humain (Alonso-Magdalena, Ropero et al. 2008). Les îlots de Langerhans de souris adultes exposées à 100 µg/kg/j de BPA présentent une augmentation de la sécrétion d'insuline stimulée en réponse au glucose (Batista, Alonso-Magdalena et al. 2012).

Les souris, exposées au BPA(10µg/kg/j) pendant la période de gestation, développent également une hyper insulinémie qui persiste dans le temps. Leur progéniture présente des prédispositions au développement d'un syndrome métabolique à l'âge adulte (résistance à l'insuline, et altération de la sécrétion d'insuline et de la signalisation calcique dans la cellule β) (Alonso-Magdalena, Vieira et al. 2010). Des résultats similaires ont été observés chez les rats. Lorsque qu'ils sont soumis à un régime gras ces effets préjudiciables sont plus précoces et exacerbés, surtout à de faibles doses de BPA (50 µg/kg/j) (Wei, Lin et al. 2011). Les cellules β des animaux exposés présentent des anomalies de structure. Les mitochondries et le réticulum endoplasmique rugueux sont hypertrophiés. La proportion de granules sécrétoires matures est diminuée chez les animaux soumis à un régime standard, voire absente chez les mâles soumis à un régime gras. Chez ces derniers, les îlots sont désorganisés et les cellules subissent la pycnose (processus de condensation irréversible de la chromatine aboutissant à la nécrose des cellules) (Wei, Lin et al. 2011). Aussi, l'exposition chronique de cellules β (TC-6) au BPA modifie l'expression des protéines clés impliquées dans la réponse au stress du réticulum endoplasmique (Makaji, Raha et al. 2011).

Contrairement à beaucoup d'observations montrant que le BPA est un agoniste faible des récepteurs aux estrogènes (Dahlman-Wright, Cavailles et al. 2006), Nadal et al. ont montré que, sur les cellules β pancréatiques, le BPA (1 nM) peut imiter les effets de l'estradiol (E2) avec la même puissance (Alonso-Magdalena, Morimoto et al. 2006; Alonso-Magdalena, Ropero et al. 2008; Ropero, Alonso-Magdalena et al. 2008). Le récepteur ERα non génomique est impliqué dans les effets à long terme du BPA en augmentant la transcription du gène du précurseur de l'insuline via la phosphorylation de ERK1/2 (Alonso-Magdalena, Ropero et al. 2008; Nadal, Alonso-Magdalena et al. 2009), tandis que le récepteur ERβ membranaire est impliqué dans l'activité pulsatile de l'insuline. De faibles concentrations de BPA (1 nM) vont diminuer rapidement l'activité de canaux K_{ATP} via ERβ, ceci génère une dépolarisation de la membrane et l'augmentation du taux de calcium intracellulaire, ce qui déclenche la sécrétion d'insuline (Soriano, Alonso-Magdalena et al. 2012). D'autres récepteurs pourraient également être mis en jeu, par exemple le récepteur à 7 domaines transmembranaires (RCPG). Le récepteur GPR30/GPER, une cible du BPA (Thomas and Dong 2006), a récemment été identifié comme un médiateur des effets insulino tropes de l'insuline en réponse à l'E2 (Sharma and Prossnitz 2011).

Le BPA agit également au niveau des cellules α pancréatiques. Leur exposition au BPA (1 nM) imite l'effet de l'E2 en bloquant le signal Ca²⁺ impliqué dans la libération de glucagon. Ces effets pourraient se faire *via*

les récepteurs membranaires aux estrogènes et mettre en jeu des protéines G activant la *nitric oxide synthase* (NOS) et la protéine kinase dépendante du cGMP (Alonso-Magdalena, Laribi et al. 2005).

Ces données suggèrent qu'à long terme, l'exposition au BPA peut être préjudiciable à la fonction des cellules β (et éventuellement des cellules α) et en fin de compte être un facteur important dans l'étiologie de diabète de type 2 et le développement d'une insulino-résistance.

2.4.3 Tissu adipeux

L'obésité est le résultat d'une augmentation de la masse de tissu adipeux en raison d'une augmentation de la taille et du nombre d'adipocytes. Plusieurs lignées cellulaires ont mis en évidence un effet de certains perturbateurs endocriniens environnementaux (4-nonylphénol, tributylétain...) sur ce tissu. Chez l'Homme, les concentrations sériques en BPA sont plus élevées chez les patientes obèses comparées aux patientes dont l'indice de masse corporel est plus faible (Takeuchi, Tsutsumi et al. 2004). Ce contaminant est détecté dans les tissus adipeux humains analysés, à hauteur de $3,16 \pm 4,11$ ng/g de tissu (Fernandez, Arrebola et al. 2007).

Des études *in vitro* ont montré que le BPA (2 à 20 $\mu\text{g/mL}$) induit la différenciation adipocytaire en augmentant la teneur en triglycérides et l'activité LPL (lipoprotéine lipase), et cela en présence d'insuline (Masuno, Kidani et al. 2002; Wada, Sakamoto et al. 2007). Il augmente l'expression génique des facteurs de transcription adipogéniques (C/EBP β : *alpha CAAT enhancer binding protein*, PPAR γ et FAS) dans les cellules 3T3-L1 préadipocytes (Sargis, Johnson et al. 2010). Il augmente l'absorption de glucose en conditions basales et en réponse à une stimulation par l'insuline. Cela pourrait s'expliquer en partie par une augmentation de la synthèse du transporteur de glucose GLUT4 (Sakurai, Kawazuma et al. 2004). A l'inverse, une étude récente a montré une diminution de l'activité LPL et de l'accumulation de triglycérides suite à une exposition de cellules souches humaines au BPA (Linehan, Gupta et al. 2012).

Le tissu adipeux n'est pas seulement un organe de stockage d'énergie mais également une glande endocrine qui sécrète divers peptides métaboliquement actifs dotés de propriétés régulatrices et appelés adipocytokines. Certaines agissent à distance, par voie endocrine, sur leurs tissus cibles (leptine, adiponectine...) (Yamauchi, Kamon et al. 2001), d'autres agissent localement par voie autocrine ou paracrine (TNF α , facteurs angiogéniques et mitogéniques...). L'adiponectine est une hormone adipocytaire spécifique qui augmente la sensibilité de l'insuline et réduit l'inflammation des tissus. Ainsi, tout facteur qui supprime la libération d'adiponectine pourrait conduire à l'insulino-résistance et augmenter la susceptibilité de développer des pathologies associées à l'obésité. Le BPA affecte sa production et sa sécrétion par les adipocytes 3T3-L1 en culture (Kidani, Kamei et al. 2010) et à partir d'explants de tissus adipeux humains (Hugo, Brandebourg et al. 2008), le plus souvent, en suivant un effet dose réponse non monotone en U inversé (Hugo, Brandebourg et al. 2008; Ben-Jonathan, Hugo et al. 2009). Le BPA pourrait agir par la voie PI3-kinase conduisant à une répression de l'expression et de la phosphorylation d'Akt, qui est normalement

activée lorsque l'insuline se lie à son récepteur de surface cellulaire (Masuno, Iwanami et al. 2005; Pereira and Draznin 2005; Kidani, Kamei et al. 2010). Pour aller plus loin dans la compréhension des mécanismes impliqués, les auteurs ont montré que ces effets ne sont pas réalisés par la voie de signalisation du récepteur ER ou du récepteur PPAR γ (Kidani, Kamei et al. 2010; Sargis, Johnson et al. 2010). Les tissus adipeux humains exposés au BPA (10 nM) sécrètent également plus de facteurs pro-inflammatoires, IL-6 et TNF α (Ben-Jonathan, Hugo et al. 2009). Une élévation des niveaux d'IL-6 est associée à une augmentation des risques cardiovasculaires chez le sujet obèse et diabétique, et contribue au processus inflammatoire qui est caractéristique du syndrome métabolique (Spranger, Kroke et al. 2003). L'augmentation du facteur TNF α est fortement corrélée au développement d'une insulino-résistance (Ryden and Arner 2007). L'étude récente de Wang et al. réalisée à partir de tissus adipeux viscéral d'enfants (3 à 13 ans) montre qu'une exposition au BPA, de l'ordre du nanomolaire, induit une adipogenèse en augmentant l'activité de la 11 β hydroxystéroïde déhydrogénase 1, qui catalyse la conversion de la cortisone en cortisol (Wang, Sun et al. 2012).

Des études, réalisées chez la souris, ont montré que la progéniture femelle exposée *in utero* au BPA et soumise à un régime alimentaire riche en lipides et en carbohydrates, présente un taux anormalement élevé en leptine, spécifiquement à la faible dose (1 $\mu\text{g/mL}$ de BPA soit environ 0,3 mg/kg/j). Chez les mâles, cet effet n'est pas retrouvé (Miyawaki, Sakayama et al. 2007). Aussi, les rates exposées *in utero* au BPA (environ 70 $\mu\text{g/kg/j}$) présentent une masse excessive de tissu adipeux blanc associée à une hypertrophie des adipocytes et une surexpression de gènes lipogéniques tels que C/EBP-alpha, PPAR γ , SREBP-1c, LPL, FAS et SCD-1. Les mâles semblent moins affectés. Mais une fois exposés à un régime gras, les effets néfastes chez ces derniers sont révélés (Somm, Schwitzgebel et al. 2009). De la même manière, l'exposition périnatale de rats à 50 $\mu\text{g/kg/j}$ de BPA conduit à une hypertrophie des adipocytes dans des conditions de régime standard et riche en graisses, pour les deux sexes (Wei, Lin et al. 2011).

2.4.4 Foie

De multiples modèles animaux montrent l'existence d'un lien entre la résistance à l'insuline, l'hyperinsulinémie et la stéatose hépatique (Cohen, Horton et al. 2011). En effet, le foie joue un rôle pivot dans la régulation du métabolisme énergétique. La dérégulation de ces voies métaboliques peut aboutir à une accumulation excessive de triglycérides hépatiques, un processus considéré comme bénin et réversible mais qui peut converger vers des formes plus sévères de NAFLD. Les NAFLD sont fortement liées à la suralimentation, l'hypoactivité et la résistance à l'insuline (Larter, Chitturi et al. 2010) (voir paragraphe « Les maladies hépatiques non alcooliques »), mais de nombreux autres facteurs peuvent initier leur développement (Cave, Deaciuc et al. 2007). Il s'agit notamment d'hépatotoxines biologiques ou synthétiques, d'endotoxines bactériennes et de composés toxiques présents de manière ubiquitaire dans notre environnement. Parce que la stéatose hépatique peut conduire à des pathologies plus graves, les effets des polluants environnementaux sur les fonctions hépatiques nécessitent d'être examinés avec soin. Les

informations concernant les effets hépatiques du BPA étaient relativement limitées au commencement de ce travail, des travaux très récents ainsi que nos résultats (voir partie Résultats) ont révélé un impact du BPA sur le foie.

Somm et al. ont montré, chez le rat, que l'expression hépatique des facteurs lipogéniques SREBP-1c, FAS et ACC est augmentée chez les femelles exposées *in utero* à environ 70 µg/kg/j de BPA (Somm, Schwitzgebel et al. 2009). En parallèle, une étude, réalisée sur la lignée d'hépatocytes humains HepG2, montre une accumulation de lipides intracellulaires en réponse à de faibles doses de BPA (10^{-12} à 10^{-6} M) (Huc, Lemarie et al. 2012).

De fortes doses de BPA (50mg/kg/j) génèrent, chez le rat, une production d'ERO et une répression des gènes anti oxydants (catalase glutathion réductase, glutathion transférase, glutathion peroxydase), provoquant une hépatotoxicité (Hassan, Elobeid et al. 2012). Moon et al. ont montré qu'une exposition aiguë au BPA chez la souris, à une dose inférieure à la NOAEL (1,2 mg/kg/j), peut induire des lésions hépatiques et des dysfonctionnements mitochondriaux par une augmentation du stress oxydant, de l'inflammation et de la peroxydation lipidique. Les transaminases ASAT et ALAT, marqueurs d'une atteinte hépatique, et les niveaux sériques en cytokines inflammatoires IL-6 et TNF α sont fortement élevés, surtout 6 heures après l'injection de BPA (Moon, Kim et al. 2012). Des études, réalisées sur une lignée d'hépatocytes humains (HepG2), confirment ces observations. Une courte exposition à 10 ou 100 nM de BPA provoque une altération de la structure des mitochondries, mais également de leurs fonctions (diminution du taux de consommation d'oxygène, de la production d'ATP, et de la perméabilité membranaire). Ceci est associé à une augmentation du stress oxydant et de l'inflammation (Huc, Lemarie et al. 2012; Moon, Kim et al. 2012).

Asahi et al. ont montré que le BPA induit un stress du RE par la production de ERO dans les cellules hépatiques de type macrophages (Asahi, Kamo et al. 2010). L'activation chronique du stress du RE a un rôle important dans le développement de la résistance à l'insuline et du diabète dans l'obésité (Fu, Yang et al. 2011).

L'étude des voies de signalisation dans le foie de souris gestantes montre que la voie de phosphorylation d'Akt (résidu Thr³⁰⁸) est diminuée suite à une exposition au BPA (10 µg/kg/j), reflet d'une insulino-résistance (Alonso-Magdalena, Vieira et al. 2010). Chez le mâle, un traitement au BPA conduit à une surexpression de la protéine IRS-1 et la voie AKT ne semble pas altérée (Batista, Alonso-Magdalena et al. 2012).

2.4.5 Muscle

Le muscle squelettique est un organe clé de la lipogenèse et de l'oxydation des acides gras. En situation de syndrome métabolique, le muscle squelettique ne parvient pas à répondre de manière appropriée à l'insuline, provoquant une élimination insuffisante du glucose après un repas. L'apparition d'une résistance

à l'insuline est associée à des augmentations généralisées de l'adiposité, ainsi que des dépôts de lipides ectopiques dans le muscle squelettique. Les lipides intracellulaires de muscle squelettique chez l'individu obèse comprennent 3 à 4% de la superficie totale de fibres, alors que les lipides dans le muscle d'une personne mince ne comprennent que 1 à 2% de la superficie totale (Muio 2010). L'étude des voies de signalisation dans le muscle squelettique de souris gestantes a montré que l'insuline provoque, en situation physiologique, une phosphorylation d'Akt. Cette réponse est complètement abrogée chez les animaux exposés au BPA (10 µg/kg/j), reflétant une insulino-résistance (Alonso-Magdalena, Vieira et al. 2010). Chez le mâle adulte, cette voie est également altérée. Le traitement au BPA peut affecter la voie de signalisation des MAPK. En effet, un pulse d'insuline n'est plus capable de provoquer une augmentation de la phosphorylation de ERK (Batista, Alonso-Magdalena et al. 2012).

VIII. Les cibles du BPA

Le BPA est un agoniste faible des récepteurs aux œstrogènes ER α et ER β et sa propriété oestrogénomimétique a longtemps été considérée comme responsable des effets qu'il induit. Cependant, il présente une affinité pour les récepteurs ER α et ER β plusieurs milliers de fois moins importante que celle de l'œstradiol (Welshons, Nagel et al. 2006). De nombreuses études récentes montrent que le BPA interagit avec d'autres récepteurs suggérant que sa propriété oestrogénomimétique est loin d'expliquer tous les effets indésirables qu'il provoque (Welshons, Nagel et al. 2006).

1. La signalisation par les récepteurs nucléaires

Récepteur aux œstrogènes. Le BPA, avec ses deux groupements hydroxyles (noyaux phénoliques), se lie aux récepteurs des œstrogènes (ER) α et β (Paris, Balaguer et al. 2002; Delfosse, Grimaldi et al. 2012) et peut activer une cascade de réactions à l'origine d'une perturbation de l'équilibre hormonal. De plus, le BPA possède deux groupements méthyles qui renforcent son activité oestrogénique (Delfosse, Grimaldi et al. 2012). En revanche, il interagit différemment avec le domaine fixateur du ligand des ERs, puis dans le recrutement de co-activateurs, aboutissant à des différences dans la réponse transcriptionnelle (Routledge, White et al. 2000; Welshons, Nagel et al. 2006; Delfosse, Grimaldi et al. 2012).

Le BPA est considéré comme un *Selective Estrogen Receptor Modulator* (SERM) (Delfosse, Grimaldi et al. 2012). Les SERM sont des molécules à activité agoniste partielle. Le BPA peut manifester selon les tissus des effets agonistes, antagonistes ou des effets mixtes agonistes - antagonistes sur les ERs. De plus, une même dose de BPA ne présentera pas la même amplitude d'action biologique au niveau des tissus cibles (Welshons, Nagel et al. 2006), soulignant l'importance d'établir des courbes dose-réponse pour chaque organe.

Récepteur aux androgènes. Plusieurs études ont également montré que le BPA se liait au récepteur nucléaire des androgènes (AR) (Sohoni and Sumpter 1998; Paris, Balaguer et al. 2002). L'AR est principalement exprimé dans le testicule, il est présent dans la prostate, les glandes surrénales, les reins, le cerveau et l'hypophyse. Le rôle du récepteur AR dans les organes mâles est très similaire à celui des récepteurs ER dans les organes femelles. Contrairement aux ERs, le BPA est un antagoniste pour AR et son affinité est de l'ordre du micromolaire (Paris, Balaguer et al. 2002). Les effets observés à faible dose pourraient en partie s'expliquer par des actions synergiques à travers les récepteurs ERs (action agoniste et féminisante) et le récepteur AR (action antagoniste, donc antagoniste de l'effet masculinisant).

Récepteur ERR γ . Le BPA est un ligand puissant du récepteur nucléaire ERR γ (*Estrogen Related Receptor gamma*) (Takayanagi, Tokunaga et al. 2006; Okada, Tokunaga et al. 2008; Brieno-Enriquez, Reig-Viader et al. 2012; Liu, Matsushima et al. 2012). Il agit comme un antagoniste inverse de ERR γ , en maintenant une activité basale élevée même en présence de son agoniste inverse le 4-hydroxytamoxifène (Liu, Matsushima et al. 2010). Le fait que ce récepteur se lie sur les promoteurs des gènes cibles des récepteurs des œstrogènes suggère son implication dans les effets de perturbation endocrine induits par le BPA (Vanacker, Pettersson et al. 1999). ERR γ est connu pour réguler positivement la différenciation adipocytaire (Kubo, Ijichi et al. 2009). Au niveau hépatique, il a été identifié comme un médiateur des effets du glucagon et sa surexpression induit l'expression des gènes de la néoglucogenèse : *Pepck* and *G6Pase*, et augmente la production de glucose (Kim, Ryu et al. 2012). Il a également été identifié comme un perturbateur de la signalisation hépatique de l'insuline (Kim, Kim et al. 2011). Ainsi il a été suggéré que ERR γ , en combinaison avec les isoformes α et β , jouerait un rôle important dans le contrôle transcriptionnel de l'homéostasie énergétique. Il pourrait donc contribuer à expliquer les effets du BPA sur le métabolisme glucidique.

Récepteurs CAR et PXR. Les xénosenseurs CAR et PXR sont également des cibles du BPA. Le BPA est décrit comme un agoniste de la forme humaine de PXR (Tabb, Kholodovych et al. 2004; DeKeyser, Laurenzana et al. 2011; Sui, Ai et al. 2012) mais pas de la forme murine. Ce sont des résidus clés propres à la poche de liaison au ligand de PXR humain qui permettraient au BPA de s'intercaler (Sui, Ai et al. 2012). Le BPA (et certains de ses analogues comme le bisphenol B (BPB), le 2-(4'-hydroxyphenyl)-2-phenylpropane (HPP), et le tetrachlorobisphenol A (TCBPA)) conduit à l'induction de l'expression des gènes cibles de PXR dans une lignée d'hépatocytes humains et à partir de cellules de carcinomes coliques humains (Takeshita, Koibuchi et al. 2001; Sui, Ai et al. 2012). Cet effet est amplifié par le recrutement du co-activateur SRC-1 (Takeshita, Koibuchi et al. 2001). La forme de référence du récepteur CAR humain (CAR variant 1) est issue d'un gène composé de 9 exons. Cependant d'autres transcripts, générés par des épissages alternatifs, peuvent être exprimés chez l'Homme et la souris. Le variant CAR1 est constitutivement actif alors que ses deux autres variants CAR2 et CAR3 ne le sont pas. Les variants 1 et 3 du récepteur CAR ont été décrits comme étant des cibles du BPA. L'effet de ce composé sur l'activation de

ces variants de CAR est presque aussi important que l'effet du CICTO, un agoniste puissant de la forme humaine de CAR (DeKeyser, Laurenzana et al. 2011).

Récepteur aux hormones thyroïdiennes. Le BPA possède également la capacité de se lier au récepteur aux hormones thyroïdiennes (TR). Il empêche la fixation de l'hormone thyroïdienne T3 (triiodothyronine) au TR et favorise le recrutement de corépresseurs, entraînant l'inhibition de l'activité transcriptionnelle des gènes cibles du TR (Moriyama, Tagami et al. 2002; Kitamura, Suzuki et al. 2005; Zoeller 2005), même à faibles doses (Iwamuro, Yamada et al. 2006). Mais une étude récente vient de montrer que l'effet du BPA résulterait d'effets non génomiques (Sheng, Tang et al. 2012). Les effets des hormones thyroïdiennes sont très complexes et sont surtout connus par les conséquences de leur déficience. Les hormones thyroïdiennes augmentent le métabolisme basal et la consommation d'oxygène au niveau du cœur, des muscles squelettiques, du foie, des reins et influent sur la thermogénèse.

Récepteur aux glucocorticoïdes ? Les glucocorticoïdes sont de puissantes molécules anti-inflammatoires, immunomodulatrices, antiprolifératives et cytotoxiques, qui se lient à un récepteur intracellulaire : le récepteur aux glucocorticoïdes (GR). Des études *in silico* ont identifié le BPA comme un agoniste du GR (Prasanth, Divya et al. 2010). La capacité du BPA à stimuler, *in vitro*, l'adipogénèse pourrait se faire par une activation de ce récepteur (Sargis, Johnson et al. 2010).

Récepteur PPAR γ ? Bien que certains des dérivés du BPA tels que le dérivé bromé tetrabromobisphenol A (TBBPA) et le dérivé chloré TCBPA aient été clairement identifiés comme des ligands du récepteur PPAR γ , le BPA n'apparaît pas comme tel (Riu, Grimaldi et al. 2011; Riu, Grimaldi et al. 2012). Toutefois de nombreuses études *in vivo* et *in vitro* montrent un effet du BPA sur l'expression de PPAR γ et de ses gènes cibles (voir partie « Fonctions métaboliques du BPA », ci-dessus). Ces effets pourraient être la conséquence de mécanismes d'actions indirects plutôt que d'une liaison directe du BPA sur ce récepteur.

2. La signalisation par d'autres récepteurs

D'autres types de récepteurs peuvent être modulés par le BPA. Par exemple, il agit comme un antagoniste du récepteur AhR (Récepteur aux hydrocarbures aromatiques) (Bonfeld-Jorgensen, Long et al. 2007) qui a pour principale fonction l'adaptation de l'organisme à l'afflux de xénobiotiques, en association avec les récepteurs CAR et PXR. Il a également été identifié comme un régulateur du métabolisme énergétique. Par exemple, son activation réprime l'expression des gènes clés de la synthèse de lipides dans le foie (Tanos, Murray et al. 2012).

Aussi, des études récentes ont montré que le BPA pouvait d'une part avoir des effets à des concentrations plus faibles que celles auxquelles il se lie à ER α et β , et d'autre part qu'il pouvait agir très rapidement (quelques minutes), ce qui exclut une action *via* les récepteurs nucléaires. Des effets dits « non génomiques» pourraient faire intervenir des récepteurs localisés dans le cytoplasme, dans la mitochondrie ou dans la membrane cytoplasmique.

Il existe deux hypothèses pour expliquer ces effets non génomiques, l'une impliquant des récepteurs membranaires de structure similaire aux récepteurs nucléaires, mais localisés à la membrane, l'autre utilisant un récepteur transmembranaire couplé aux protéines G (GPR30).

Récepteurs membranaires. Le groupe de Watson a proposé que le BPA puisse exercer une partie de ses effets par l'intermédiaire de formes membranaires de ER α et β (mER α et β) (Watson, Jeng et al. 2010; Watson, Jeng et al. 2011). La localisation à la membrane de ces récepteurs pourrait être due à des modifications post-traductionnelles comme la palmitoylation (Marino, Ascenzi et al. 2006), ce qui permettrait d'expliquer certains des effets rapides du BPA. En revanche, ce mécanisme d'action ne permet pas d'expliquer les effets à faible concentration. En effet, il est supposé que ces formes membranaires ont la même affinité pour le BPA que les formes nucléaires.

Récepteur couplé aux protéines G. Un deuxième médiateur des effets non génomiques du BPA pourrait être un récepteur transmembranaire couplé aux protéines G : GPR30. Ces récepteurs sont très sensibles à leur environnement. A l'état actif, ils activent une protéine G, déclenchant une cascade de signalisation. Lors d'une exposition prolongée et répétée à leurs ligands, les récepteurs sont désensibilisés et internalisés, provoquant l'arrêt de la transduction du signal. Le récepteur GPR30 est localisé dans le réticulum endoplasmique et il pourrait lier le BPA à faible concentration (Wang, Liu et al. 2009; Chevalier, Vega et al. 2012). Nadal et al. ont montré que GPR30 est impliqué dans l'effet insulinothrompe de l'E₂ au niveau de la cellule β -pancréatique, suggérant un mode d'action similaire du BPA (Roper, Pang et al. 2012).

3. Signatures épigénétiques

Un mode d'action du BPA via l'épigénome a été suspecté à la suite d'observations de perturbations précoces en vie fœtale induisant un phénotype adulte après une exposition à ce contaminant (Somm, Schwitzgebel et al. 2009; Alonso-Magdalena, Vieira et al. 2010; Wei, Lin et al. 2011; Ehrlich, Williams et al. 2012; Trasande, Attina et al. 2012).

A l'aide d'un modèle de souris porteuse d'un allèle métastable du gène *agouti* contrôlant la couleur du pelage, Dolinoy et al. ont montré pour la première fois qu'une exposition prénatale et continue au BPA, au moins à forte dose, pouvait modifier les phénotypes adultes par altération de l'épigénome (Dolinoy, Huang

et al. 2007). Les effets du BPA en exposition fœtale et/ou néonatale sur la méthylation de l'ADN de tissus somatiques adultes ont été proposés par d'autres études, en utilisant des doses faibles : Tang et al. rapportent des défauts de méthylation pour divers locus dans la prostate de rats exposés à 10 µg/kg de BPA à la naissance, en association avec une prédisposition au développement d'hyperplasies prostatiques (Ho, Tang et al. 2006; Tang, Morey et al. 2012). Des hyperméthylations de la région promotrice du récepteur aux estrogènes dans le testicule ont également été rapportées chez les rats exposés *in utero* à ce contaminant (Doshi, Mehta et al. 2011). Yaoi et al. documentent des hypo- et des hyperméthylations à divers loci dans le cerveau antérieur d'embryons à jours 12,5 et 14,5 de gestation, après que leurs mères aient été exposées pendant la gestation à 20 µg/kg/jour de BPA (Yaoi, Itoh et al. 2008). Aussi, des souris femelles exposées *in utero* à 5 µg/kg de BPA, ont montré un défaut important de méthylation du gène *Hoxa10* dans l'utérus à l'âge adulte (Bromer, Zhou et al. 2010).

Bien que les profils de méthylation n'aient pas été analysés, nombre d'études rapportent des changements d'expression de gènes clés dans des tissus adultes conséquents à une exposition fœtale ou néonatale au BPA, qui pourraient signer une programmation épigénétique précoce de phénotypes adultes (Monje, Varayoud et al. 2007; Yaoi, Itoh et al. 2008; Salian, Doshi et al. 2009; Somm, Schwitzgebel et al. 2009; Alonso-Magdalena, Vieira et al. 2010; Wei, Lin et al. 2011).

OBJECTIFS

Nous avons vu dans la partie bibliographique de ce manuscrit que des xénobiotiques de type perturbateurs endocriniens environnementaux ou médicaments peuvent perturber l'équilibre hormonal des organismes et/ou interférer avec les fonctions métaboliques des organes. Les récepteurs nucléaires peuvent agir comme des médiateurs de ces effets.

Dans ce contexte, les objectifs de ce travail ont été d'aborder cette problématique sous 2 approches différentes.

- 1) Le premier a consisté à évaluer les effets du BPA sur le métabolisme énergétique hépatique, le foie étant peu étudié dans la littérature comme organe cible de ce contaminant.
- 2) Le second a consisté à évaluer l'activation des récepteurs CAR et PXR, deux récepteurs nucléaires à l'interface entre la détoxification et le métabolisme énergétique, comme médiateurs de désordres métaboliques hépatiques.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

ARTICLE PUBLIÉ

Marmugi A, Ducheix S, Lasserre F, Polizzi A, Paris A, Priymenko N, Bertrand-Michel J, Pineau T, Guillou H, Martin PG, Mselli-Lakhal L: **Low doses of bisphenol A induce gene expression related to lipid synthesis and trigger triglyceride accumulation in adult mouse liver.** *Hepatology* 2012, **55**(2):395-407.

ARTICLES EN PREPARATION

Article en préparation n°1: Marmugi A, et al. **Impact of long term BPA exposure on cholesterolemia.**

Article en préparation n°2: Marmugi A, et al. **Adiponutrin/PNPLA3, a maker of hepatic steatosis is regulated by the Constitutive Androstane Receptor.**

ARTICLE 1: LOW DOSES OF BISPHENOL A INDUCE GENE EXPRESSION RELATED TO LIPID SYNTHESIS AND TRIGGER TRIGLYCERIDE ACCUMULATION IN ADULT MOUSE LIVER.

Comme décrit précédemment, le BPA est un perturbateur endocrinien omniprésent dans notre environnement (Markey, Rubin et al. 2002). C'est probablement l'un des mieux étudiés. Il affecte plusieurs fonctions de l'organisme dont le métabolisme énergétique (Richter 2007). Les études sur le métabolisme ont porté sur le tissu adipeux et le pancréas mais peu sur le foie. De nombreuses études rapportent des effets spécifiques aux faibles doses sans que des mécanismes soient proposés pour l'expliquer. La période périnatale est considérée comme une phase critique d'exposition à ce contaminant parce que les hormones y jouent un rôle important et que le fœtus ne possède pas de système de détoxification mature lui permettant de se protéger contre les contaminants. Une exposition chronique de l'adulte à un perturbateur endocrinien n'est néanmoins pas dépourvue de risque. L'ensemble de ces observations nous a conduit à évaluer les effets de différentes doses de BPA au niveau du métabolisme hépatique chez la souris adulte. Pour mimer le mode d'exposition de la population humaine, ce contaminant a été administré par voie orale par l'alimentation. Pour cela des souris mâles âgées de 6 semaines ont été exposées à 5 doses différentes de BPA incluant la dose sans effet nocif observable chez l'animal (NOAEL) de 5 mg/kg/j utilisée dans les études classiques de toxicologie réglementaire et la dose journalière admissible pour l'Homme (DJA) de 0,05 mg/kg/j. Les données obtenues à partir d'analyses transcriptomiques (puces à ADN et PCR quantitatives) effectuées sur les échantillons de foie ont révélé une altération de l'homéostasie énergétique hépatique. En effet, les gènes impliqués dans le métabolisme lipidique, glucidique et dans la synthèse du cholestérol, sont fortement induits suite à une exposition au BPA, et plus particulièrement aux faibles doses. Le dosage des lipides neutres hépatiques a permis de mettre en évidence une accumulation plus importante de triglycérides et d'esters de cholestérol, toujours aux plus faibles doses de BPA. Nous avons par ailleurs mis en évidence des niveaux d'insuline plasmatique plus importants chez les animaux exposés aux mêmes doses. Cette insuline plasmatique pourrait expliquer au moins en partie les effets observés sur l'accumulation de lipides dans le foie. Cette hypothèse est renforcée par l'induction d'expression de facteurs de transcription comme SREBP-1c et LXR, régulateurs importants de la lipogenèse au niveau hépatique et connus pour être induits par l'insuline. Des effets directs du BPA sur le foie ne sont néanmoins pas à exclure. Les données générées dans le cadre de cette étude ont permis de mettre en évidence pour la première fois un effet du BPA à faibles doses sur l'accumulation de lipides dans le foie. Elles renforcent les observations sur les effets métaboliques et hépatiques du BPA chez l'animal adulte.

Low Doses of Bisphenol A Induce Gene Expression Related to Lipid Synthesis and Trigger Triglyceride Accumulation in Adult Mouse Liver

Alice Marmugi,^{1,2} Simon Ducheix,^{1,2} Frédéric Lasserre,^{1,2} Arnaud Polizzi,^{1,2} Alain Paris,³
 Nathalie Priymenko,^{1,2} Justine Bertrand-Michel,⁴ Thierry Pineau,^{1,2} Hervé Guillou,^{1,2}
 Pascal G.P. Martin,^{1,2} and Laïla Mselli-Lakhal^{1,2}

Changes in lifestyle are suspected to have strongly influenced the current obesity epidemic. Based on recent experimental, clinical, and epidemiological work, it has been proposed that some food contaminants may exert damaging effects on endocrine and metabolic functions, thereby promoting obesity and associated metabolic diseases such as nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). In this work, we investigated the effect of one suspicious food contaminant, bisphenol A (BPA), *in vivo*. We used a transcriptomic approach in male CD1 mice exposed for 28 days to different doses of BPA (0, 5, 50, 500, and 5,000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) through food contamination. Data analysis revealed a specific impact of low doses of BPA on the hepatic transcriptome, more particularly on genes involved in lipid synthesis. Strikingly, the effect of BPA on the expression of *de novo* lipogenesis followed a nonmonotonic dose-response curve, with more important effects at lower doses than at the higher dose. In addition to lipogenic enzymes (Acc, Fasn, Scd1), the expression of transcription factors such as liver X Receptor, the sterol regulatory element binding protein-1c, and the carbohydrate responsive element binding protein that govern the expression of lipogenic genes also followed a nonmonotonic dose-response curve in response to BPA. Consistent with an increased fatty acid biosynthesis, determination of fat in the liver showed an accumulation of cholesteryl esters and of triglycerides. **Conclusion:** Our work suggests that exposure to low BPA doses may influence *de novo* fatty acid synthesis through increased expression of lipogenic genes, thereby contributing to hepatic steatosis. Exposure to such contaminants should be carefully examined in the etiology of metabolic diseases such as NAFLD and nonalcoholic steatohepatitis. (HEPATOLOGY 2012;55:395-407)

Changes in diet and lifestyle are leading causes for the emergence of the metabolic diseases associated with obesity. Recently, the hypothesis that a number of food contaminants acting as endocrine-disrupting chemicals may influence metabolic diseases has been proposed.¹

Bisphenol A (BPA) is an endocrine disruptor highly prevalent in our environment. It is used as the monomer of polycarbonate plastics and epoxy resins.² The human population is widely exposed to low levels of BPA, primarily by way of the diet by migration from food and beverage containers.² 93% of urine samples

Abbreviations: Acc, acetyl-CoA carboxylase; BPA, bisphenol A; ER, estrogen receptor; FA, fatty acid; Fasn, fatty acid synthase; NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease; NASH, nonalcoholic steatohepatitis; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; Scd1, stearyl-CoA desaturase-1.

From the ¹INRA, TOXALIM (Research Centre in Food Toxicology), Toulouse, France; ²Université de Toulouse, INP, UPS, TOXALIM, Toulouse, France; ³INRA, Métarisk, Paris, France; and ⁴MetaToul, Plateau de lipidomique, INSERM, Toulouse, France.

Received April 20, 2011; accepted August 31, 2011.

Supported by grants from the ANR (PNRA-PlastImpact program and CES PerinaTox program) and by the INRA-FORMAS France-Sweden cooperative program. A.M. is funded by a grant from INRA Animal Health Department and the Région Midi-Pyrénées. S.D. is funded by a grant from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Address reprint requests to: Pascal G.P. Martin, ToxAlim UMR1331 INRA/INPT/UPS, Integrative Toxicology & Metabolism group, 180 chemin de Tournefeuille, BP 93173, 31027 Toulouse Cedex 3, France. E-mail: Pascal.Martin@toulouse.inra.fr; fax: +33 561285310.

Copyright © 2011 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

View this article online at wileyonlinelibrary.com.

DOI 10.1002/hep.24685

Potential conflict of interest: Nothing to report.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

collected from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III) cohort revealed detectable levels of BPA.³ As a protective measure the U.S. Environmental Protection Agency and the European Food Safety Agency have established a tolerable daily intake (TDI) of 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ derived by applying an uncertainty factor of 100 to the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) of 5,000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ mainly based on liver and reproductive toxicity. However, recent animal studies revealed that exposure to environmentally relevant BPA doses below the TDI alters biological functions such as reproductive functions, brain functions, and metabolic processes by interfering with endocrine signaling pathways.⁴

Recent epidemiological studies showed an association between urinary levels of BPA and the prevalence of diabetes, cardiovascular diseases, and elevated markers of liver toxicity.^{5,6} These studies pointed to metabolic disorders as a potential impact of exposure to low doses of BPA. In agreement with this hypothesis, experimental evidence has accumulated that BPA can alter several aspects of metabolic functions in rodents. Animal studies showed an increased body weight in offspring of mothers exposed to BPA during gestation and/or lactation period.⁷ The increase in body weight was more pronounced and persistent in females than males and the effects were stronger at low compared with high doses of exposure. Such nonmonotonic dose-response relationship have been reported for many actions of BPA.⁸⁻¹¹ How perinatal BPA exposure may exert these effects remains to be determined, but potential target tissues of BPA action including adipose tissue and pancreas have been studied. Gestational exposure to BPA was shown to increase adipose tissue mass at weaning associated with adipocyte hypertrophy and overexpression of lipogenic genes.^{9,10,12} Low BPA doses were also shown to increase leptin and to decrease adiponectin secretion.^{9,13} *In vitro* studies documented an increased lipid accumulation and adipocyte differentiation after exposure of 3T3L1 preadipocytes to BPA and other endocrine-disrupting chemicals.¹⁴⁻¹⁶

Nadal and colleagues showed that BPA increases insulin synthesis and secretion with concurrent impacts on glucose homeostasis.^{17,18} *In vivo* injection of 1, 10, or 100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ of BPA to adult male mice resulted in a significant dose-dependent decrease in glycemia in parallel to an increase in insulin from 30 minutes after injection.¹⁹ Isolated islets of pancreatic β -cells exposed to a range of BPA doses showed increased insulin content following an inverted U-shape dose-response curve.²⁰ The same group recently reported on similar

effects in pregnant mice and their offspring exposed to 10 or 100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ of BPA.²¹

Thus, both the adipose tissue and the pancreas have emerged as important targets of low BPA doses. Despite the important roles of the liver in whole body energy homeostasis, little is known about the hepatic impacts of exposure to environmentally relevant doses of BPA. Here we evaluated the effects of oral exposure to 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ (TDI) or 5,000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ (NOAEL) of BPA on mouse liver transcriptome. Initial genome-wide microarray screenings evidenced a predominant impact of low BPA doses on lipid biosynthesis pathways. Using a wide range of doses, we showed that these effects are specific to low, environmentally relevant doses of BPA and correlate with an increased hepatic accumulation of neutral lipids.

Materials and Methods

Animals and Treatments. Six-week-old male CD1 mice (Charles River, Les Oncins, France) divided into five groups ($n = 6/\text{group}$) were administered BPA by way of the diet for 28 days (housing at $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 12-hour light/dark). A standard diet (ingredients from SAFE Diet, Augy, France) was formulated from maize starch (49%), saccharose (24.4%), casein (14%), minerals mix (5%), peanut oil (2.5%), rapeseed oil (2.5%), cellulose (2%), vitamins mix (0.5%), and methionine (0.1%). BPA (4,4'-dihydroxy-2,2-diphenylpropane, CAS# 80-05-7, Sigma-Aldrich, France) was incorporated in the diet at 0 (controls), 0.05, 0.5, 5, or 50 ppm. Considering a diet consumption of 10% of the body weight per day, this corresponds to an oral exposure of 0 (controls), 5, 50 (TDI), 500, or 5,000 μg of BPA/kg BW/day (NOAEL), respectively. *In vivo* studies were conducted under E.U. guidelines for the use and care of laboratory animals and were approved by an independent ethics committee.

Blood and Organ Sampling. Blood was collected at the submandibular vein in heparin-coated capillaries. Plasma was prepared by centrifugation (2,000g, 10 minutes) and kept at -80°C until use. Following euthanasia, the liver and the perigonadic white adipose tissue (pWAT) were removed, weighed, dissected, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until use. Sampling was performed on two consecutive days ($n = 3$ mice/group per day) but no block effect was statistically evidenced.

Gene Expression Studies. Total RNA was extracted with TRIzol reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Transcriptomic profiles were obtained using

Agilent Whole Mouse Genome microarrays ($4 \times 44k$) following the manufacturer's instructions. Microarray data and all experimental details are available in the Gene Expression Omnibus (GEO) database (accession GSE26728). For real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR), total RNA samples ($2 \mu\text{g}$) were reverse-transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Primers for SYBR Green assays are presented in Supporting Table 1. Amplifications were performed on an ABI Prism 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems). qPCR data were normalized by TATA-box binding protein (TBP) messenger RNA (mRNA) levels and analyzed with LinRegPCR.²²

Immunoblot Analysis. Protein extracts were prepared using the Proteo-Jet cytoplasmic and nuclear extraction kit (Fermentas, Saint-Rémy-lès-Chevreuses, France). Following separation by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), liver proteins were probed with primary antibodies from Cell Signaling (β -actin: 4970; lamin A/C: 2032; ACLY: 4332; ACLY-P: 4331; ACC: 3662; FAS: 3189), Abcam (estrogen receptor [ER]: ab16460; GK: ab37796), Santa Cruz Biotechnology (LXR: sc-13068; SCD1: sc-14719), Lab Vision (SREBP-1c: MS-1207-P1ABX), Novus Biological (CHREBP: nb400-135), and secondary antibodies from Biotium (CF680 or CF770-labeled). G6PASE antibody was a gift from Dr. Gilles Mithieux.²³ The images were analyzed on the Odyssey Infrared Imaging system (Li-Cor, Lincoln, NE). Band intensities were normalized to those of β -actin or lamin A/C.

Biochemical Assays. Hepatic lipid content and FA composition were determined as described.²⁴ Plasma levels of triglycerides, glucose, total cholesterol, low- or high-density lipoprotein (LDL, HDL) cholesterol were determined on a biochemical analyzer, COBAS-MIRA+. Plasma insulin was assayed with the ultrasensitive mouse insulin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Crystal Chem, Downers Grove, IL).

Histology. Frozen liver samples were embedded in Neg 50 (Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). Sections ($5 \mu\text{m}$, Leica RM2145 microtome, Nanterre, France) were stained with Oil-Red-O and hematoxylin/eosin and visualized with a Leica DFC300 camera (Leica).

Statistical Analysis. All data were analyzed using R (www.r-project.org). Microarray data were processed with Bioconductor packages (www.bioconductor.org) as described in GEO entry GSE26728. Genes with $q\text{-value} \leq 0.1$ were considered differentially expressed

between BPA-treated and control animals. The enrichment of Gene Ontology (GO) Biological Processes was evaluated using a conditional hypergeometric test (GOstats package). For data other than microarray data, differential effects were analyzed by analysis of variance (ANOVA) followed by Student's t tests with a pooled variance estimate. $P \leq 0.05$ was considered significant.

Results

Low BPA Doses Increase Plasma Insulin. Male CD1 mice were exposed for 4 weeks to 0, 5, 50, 500, or 5,000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ of BPA by way of the diet. BPA exposure had no effect on body weight gain and relative liver weight (Fig. 1A). However, a significant increase in pWAT weight was observed in the animals exposed to 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ (Fig. 1A). Plasma insulin levels were significantly increased following exposure to 5, 50, and 500 μg BPA/kg/day (Fig. 1B) with a maximal effect at the lowest dose. BPA had no significant effect on plasma glucose and total, LDL- or HDL-cholesterol levels. The animals exposed to 500 μg BPA/kg/day displayed a significant increase in plasma triglyceride levels (Fig. 1B). To evaluate whether these observations were specific to a mouse strain and of a mode of BPA exposure, we performed an experiment in C57BL/6J mice exposed to the same BPA doses by way of the water. Although the modulations were generally of lower amplitude than in CD1 mice, the results obtained in this independent experiment were consistent with those presented here (Supporting Fig. 1).

Effects of BPA Reference Doses on Liver Transcriptome. Using microarrays, we compared the transcriptome of liver samples from mice exposed to BPA reference doses (TDI: 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ and NOAEL: 5,000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) to those from control animals. The global impact of BPA-TDI or BPA-NOAEL is illustrated by the distribution of raw P -values for gene expression changes between BPA-treated groups and the control group (Fig. 2A). The overabundance of low P -values reflects the amplitude of the impact on the transcriptome. Exposure to BPA-TDI (174 unique genes differentially expressed compared with controls: 108 upregulated and 66 down-regulated; Supporting Table 2) had a stronger impact on liver transcriptome compared with BPA-NOAEL (0 genes with $q\text{-value} \leq 10\%$). A heatmap of the average intensities for the corresponding 196 unique oligonucleotide probes illustrates the specific impact of BPA-TDI on the expression of these genes compared with BPA-NOAEL. Among the up-regulated genes the nine GO categories

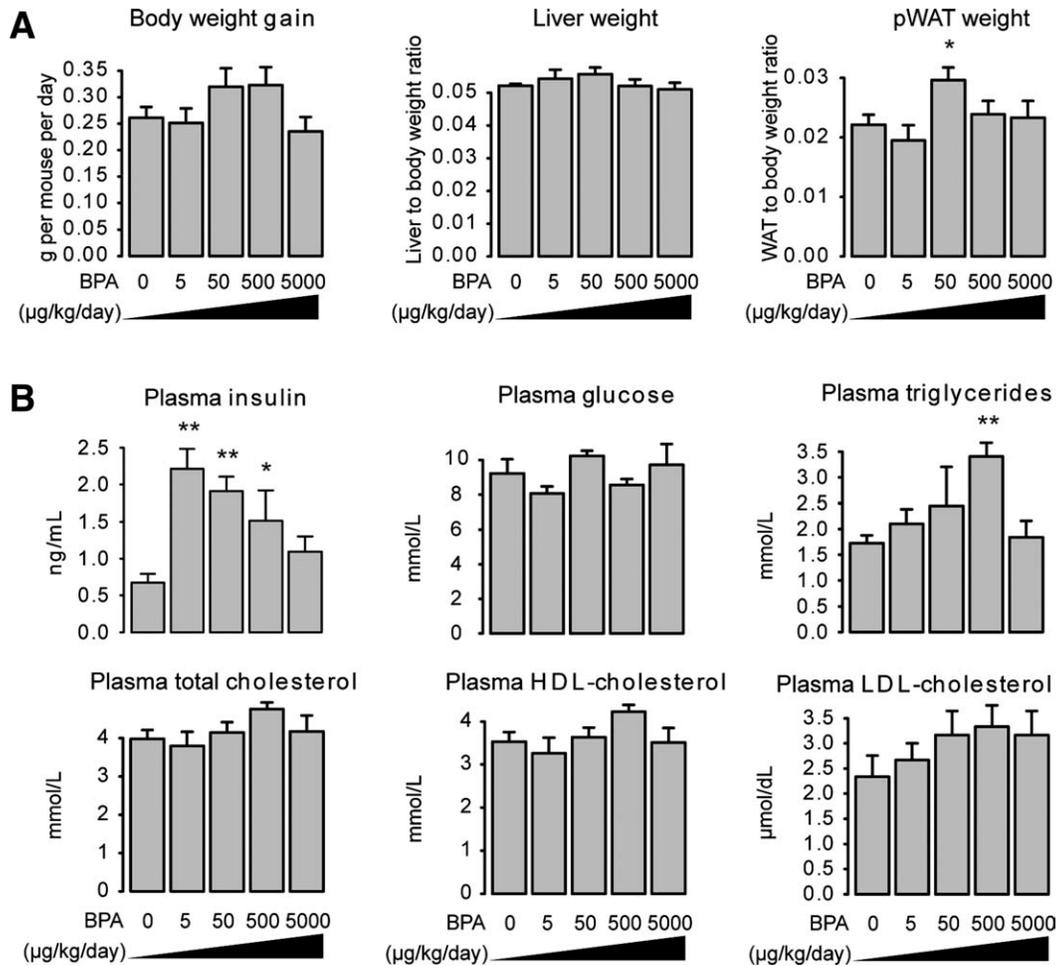


Fig. 1. Effects of different doses of BPA on body weight gain, on liver and adipose tissue weight, and on plasma parameters. (A) Body weight gain, liver weight (relative to body weight), and perigonadic white adipose tissue (pWAT) weight (relative to body weight) of male CD1 mice exposed orally for 28 days to different BPA doses (0, 5, 50, 500, and 5,000 $\mu\text{g/kg/day}$, $n = 6$ animals/group). (B) Quantification of plasma insulin, glucose, triglycerides, cholesterol (total, HDL, LDL) from the same animals.

significantly overrepresented ($q\text{-value} \leq 10\%$) were all related to lipid biosynthesis (Fig. 2B). Consistently, genes with increased expression at BPA-TDI included genes involved in *de novo* fatty acid (FA) synthesis (Acy: ATP citrate lyase, Acaca: Acetyl-CoA carboxylase alpha, Acacb: Acetyl-CoA carboxylase beta, Fasn) and elongation (Elovl6: long-chain FA elongase 6), in triglyceride synthesis (Gpat: glycerol-3-phosphate acyltransferase) and cholesterol synthesis (Mvd: mevalonate (diphospho) decarboxylase, Lss: lanosterol synthase). The most strongly induced gene at BPA-TDI was Pnpla3 (patatin-like phospholipase domain containing 3), a gene whose function is still poorly understood but whose genetic variability has been associated with the severity of nonalcoholic steatohepatitis (NASH).²⁵ Another member of this family, Pnpla5 (patatin-like phospholipase domain containing 5) was also induced at the TDI. The Thrsp-Spot14 (thyroid hormone responsive Spot14 homolog) is the second most

strongly induced gene at BPA-TDI versus control. Its overexpression was previously shown to increase lipogenesis in human hepatocytes.²⁶ To identify enriched functional categories among the regulated genes independently of the $q\text{-value}/\text{FDR}$ threshold, we used gene set enrichment analysis (GSEA, data not shown). Results of GSEA for the up-regulated genes also pointed to increased lipogenesis as the main and specific impact of BPA-TDI. Interestingly, GSEA identified an enrichment of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) target genes involved in FA oxidation among the down-regulated genes for both BPA reference doses.

Low BPA Doses Induce Hepatic Gene Expression Related to Lipid Biosynthesis. Based on microarray results, we evaluated by qPCR the effects of a wide range of BPA doses (0, 5, 50, 500, and 5,000 $\mu\text{g/kg/day}$) on the expression of genes related to hepatic lipid metabolism. Figure 3 illustrates that the effects of BPA

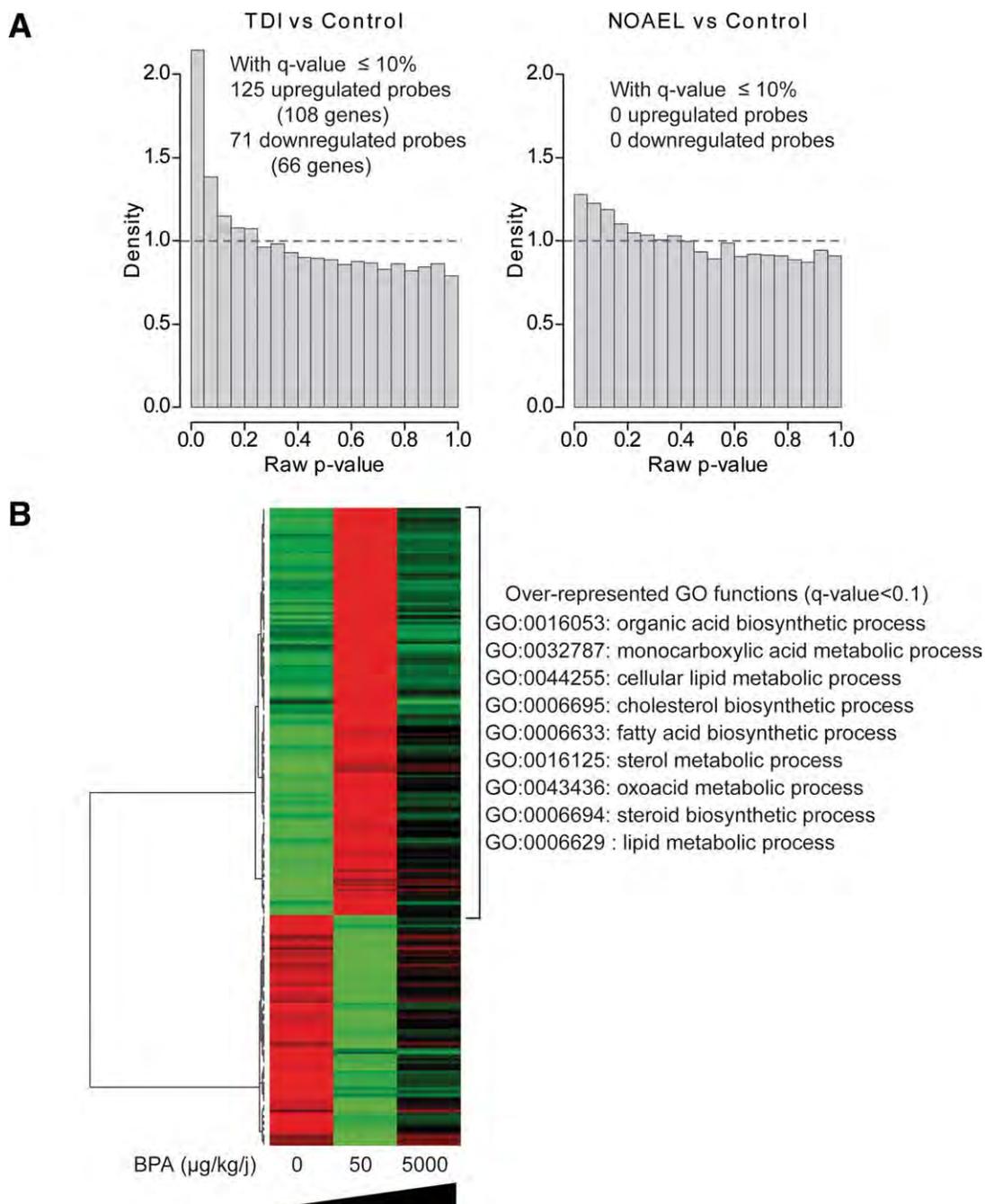


Fig. 2. Effects of BPA reference doses on liver transcriptome. mRNAs were extracted from the livers of male CD1 mice ($n = 6/\text{group}$) exposed or not to a low (TDI: $50 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) or high dose (NOAEL: $5,000 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) of BPA. Hepatic transcriptomes were analyzed using Agilent Whole Mouse Genome microarrays ($4 \times 44\text{K}$). (A) Distribution of raw P -values corresponding to the comparison between BPA-treated and control group. The dashed lines illustrate the flat histogram that is expected in the absence of BPA effect. The overabundance of low P -values (peak on the left of the histogram) illustrates graphically the global impact of the treatments on the transcriptome. The number of significant ($q\text{-value} \leq 10\%$) up- and down-regulated probes and of the corresponding number of genes are indicated. (B) The heatmap for the 196 probes significantly regulated at BPA-TDI versus control illustrates the specific impact of the low dose ($50 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) compared with the high dose ($5,000 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$). Red and green colors indicate values above and below the mean, respectively. Black color indicates values close to the mean. Only the mean values for each group are represented in the heatmap but the hierarchical clustering was obtained from individual values using 1-Pearson correlation coefficient as distance and the Ward's criterion for agglomeration. Analysis of GO biological functions significantly enriched ($q\text{-value} \leq 10\%$) among the up-regulated genes clearly pointed to processes linked to lipid metabolism as the most robustly enriched.

on key enzymes involved in lipogenesis (Fig. 3A), cholesterol biosynthesis (Fig. 3B), and to a lesser extent in glucose metabolism (Fig. 3C) follow a nonmonotonic

dose-response relationship. Key microarray findings were confirmed for *Acly*, *Acaca*, *Acacb*, *Elovl6*, *Fasn*, *Thrsp-Spot14* (Fig. 3A), *Mvd*, *Lss* (Fig. 3B), *Gpat*,

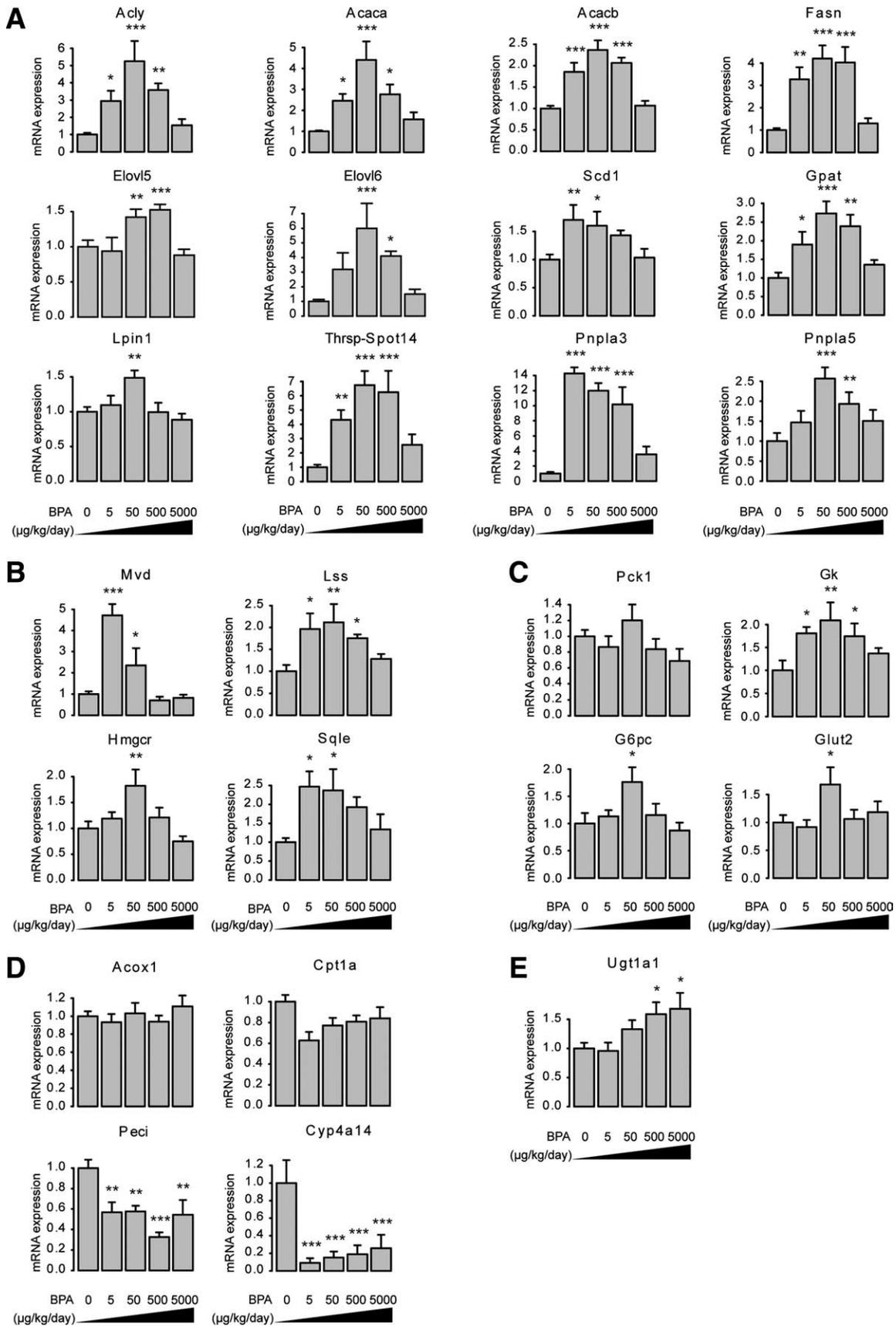


Fig. 3.

Pnpla3, and Pnpla5 genes (Fig. 3A). Similar patterns of expression were also observed for Elov15 (FA elongation), Scd1 (synthesis of monounsaturated FA), Lpin1 (triglyceride synthesis, Fig. 3A), Hmgcr, and Sqle (cholesterol biosynthesis, Fig. 3B). Because hepatic glucose and lipid metabolism are tightly linked, we analyzed the expression of genes involved in glucose homeostasis. A similar effect of BPA was observed for both the phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (Pck1) and the glucose-6-phosphatase (G6pc), which are involved in gluconeogenesis (Fig. 3C). The mRNA expression of glucokinase (Gk) which regulates glycolysis was also increased (Fig. 3C). An induction of the main hepatic glucose transporter (Glut2) was also observed (Fig. 3C). These effects on glucose metabolism-related genes were almost exclusively significant at BPA-TDI and were of more modest amplitude compared with those affecting genes involved in lipid metabolism.

Based on GSEA results, we evaluated the effects of BPA exposure on the expression of genes involved in FA oxidation. BPA had no effect on the expression of Acox1 or Cpt1a involved in peroxisomal and mitochondrial β -oxidation, respectively (Fig. 3D). However, all BPA doses reduced the expression of Peci involved in the metabolism of unsaturated FA and of Cyp4a14, two target genes of PPAR α (Fig. 3D).

We also studied the impact of BPA on the mRNA expression of genes involved in FA uptake and very low-density lipoprotein (VLDL) secretion. The results obtained did not suggest an upregulation of these pathways at low BPA doses (Supporting Fig. 2).

Finally, we searched for a more classical monotonic dose-response relationship between BPA exposure and gene expression. This led us to show that the expression of UDP glucuronyltransferase 1a1 (Ugt1a1), an enzyme involved in the phase II metabolism of xenobiotics and hormones, including estradiol is dose-dependently increased by BPA (Fig. 3E).

Western blot analysis for key lipogenic proteins (ACLY and its more active form phosphorylated on Ser454: ACLY-P, ACC, FAS, and SCD1), for GK, and for G6PASE showed protein levels consistent with the mRNA changes (Fig. 4).

Effects of BPA on Hepatic Transcription Factors.

In order to gain insight into the transcriptional mechanisms which could contribute to the effects of BPA on liver gene expression, we measured the expression of different transcription factors involved in the regulation of hepatic energy metabolism. These included several nuclear receptors: PPAR α ; the adipogenic regulator PPAR γ ; PPAR β/δ ; liver X receptor alpha (LXR α); ER α ; constitutive androstane receptor (CAR); pregnane X receptor (PXR), and the hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α). BPA had no significant effect on the expression of Pxr and Hnf4 α (Fig. 5A). The expression of Car was highest in control mice and was significantly reduced in mice exposed to 5 and 50 μ g BPA/kg/day (Fig. 5A). On the opposite, ER α expression was lowest in control mice and was significantly increased in mice exposed to 5 and 50 μ g/kg/day (Fig. 5A). We did not detect the expression of ER β in liver samples. Ppar α expression was decreased almost 3-fold in mice exposed to 5 or 500 μ g BPA/kg/day only (Fig. 5A). Ppar β/δ expression was significantly increased by about 50% in mice exposed to 500 μ g BPA/kg/day but a trend toward increased expression was also observed at 5 and 50 μ g/kg/day (Fig. 5A). Ppar γ and Lxr α expression were clearly increased by 4- and 2-fold, respectively, in the liver of mice exposed to BPA-TDI only (Fig. 5A). We also measured the expression of sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP-1c), a major regulator of *de novo* lipogenesis,²⁷ of sterol regulatory element binding protein 2 (SREBP-2), which regulates cholesterol metabolism,²⁸ and of carbohydrate response element binding protein (ChREBP), a transcriptional regulator of glucose and lipid metabolism.²⁹ The expression of Sreb-1c,

Fig. 3. Effects of BPA exposure on hepatic gene expression related to lipogenesis, cholesterol biosynthesis, glucose metabolism, and fatty acid oxidation. Hepatic mRNAs from male CD1 mice exposed to different doses of BPA (0, 5, 50, 500, and 5,000 μ g/kg/day) were used to assay by qPCR the relative expression of genes involved in (A) lipogenesis (Acly: ATP citrate lyase, Acaca: acetyl-CoAcarboxylase alpha, Acacb: acetyl-CoAcarboxylase beta, Fasn: fatty acid synthase, Elov15 and Elov16: elongation of long chain fatty acids family members 5 and 6, Scd1: stearoyl-CoA desaturase-1, Gpat: glycerol-3-phosphate acyltransferase, Lpin1: Lipin 1, Thrsp-Spot14: thyroid hormone responsive Spot14 homolog, Pnpla3 and Pnpla5: patatin-like phospholipase domain containing 3 and 5) (B) cholesterol biosynthesis (Mvd: mevalonate (diphospho) decarboxylase, Lss: lanosterolsynthase, Hmgcr: Hmg-coenzyme A reductase and Sqle: squalene epoxidase) (C) glucose metabolism (Pck1: phosphoenolpyruvate carboxykinase 1, Gk: glucokinase, G6pc: glucose-6-phosphatase, and Glut2: glucose transporter 2) (D) fatty acid oxidation (Acox1: acyl-coenzyme A oxidase 1, Cpt1a: carnitine palmitoyltransferase 1A, Peci: peroxisomal 3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, Cyp4a14: cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 14) (E) Ugt1a1: UDP-glucuronosyltransferase 1 polypeptide A1. All data were normalized to TBP (TATA-box binding protein) mRNA expression levels. Values shown are the mean \pm standard error of the mean (SEM) (n = 6 per group). Data were analyzed by ANOVA followed by post-hoc Student's test with a pooled variance estimate. Asterisk denotes a significant difference compared with control condition (0 μ g/kg/day of BPA): * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001.

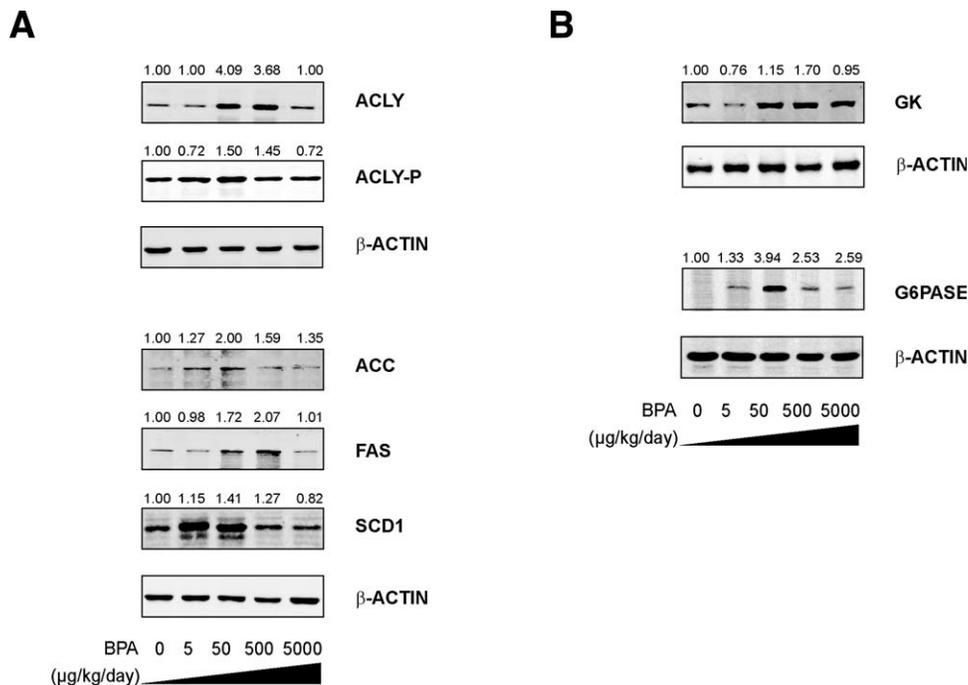


Fig. 4. Western blot analysis of the effect of BPA exposure on hepatic protein expression. Cytoplasmic protein extracts were prepared from the livers of control and BPA-exposed animals (0, 5, 50, 500, and 5,000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$; $n = 3$ to 6 animals/group). The protein extracts were subjected to SDS-PAGE and transferred on nitrocellulose membranes. Hepatic proteins were probed using antibodies specific to (A) key enzymes involved in fatty acid biosynthesis: ATP citrate lyase (ACLY), the more active form of ACLY phosphorylated on Ser454 (ACLY-P), acetyl-CoA carboxylase (ACC), fatty acid synthase (FAS), and stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1) and (B) key enzymes involved in glucose metabolism: glucokinase (GK) and glucose 6-phosphatase (G6PASE). β -Actin was used as loading control. A representative image is shown for each protein. The values indicated above each image are the mean values obtained for 3 to 6 animals per group.

Srebp-2, and Chrebp exhibited an inverted U-shaped dose-response profile under the effect of BPA (Fig. 5B). This was also the case for insulin induced gene 1 (Insig1), but not for insulin induced gene 2 (Insig2), two negative regulators of SREBP-2 and SREBP-1c processing, respectively (Fig. 5B). The analysis by western blot of nuclear protein levels for ER and for the key regulators of lipogenesis SREBP-1C, CHREBP and LXR confirmed a specific effect of low BPA doses on the active protein levels of these transcription factors (Fig. 5C).

Effects of BPA on Hepatic Lipids and FA Composition. To evaluate the consequences of increased expression of lipogenic genes, we stained hepatic neutral lipids with Oil-Red-O. The representative pictures in Fig. 6A illustrate a greater accumulation of lipids in the liver of mice exposed to BPA compared with control livers. Lipid droplets were larger and more numerous in the livers of mice exposed to BPA-TDI compared with those exposed to BPA-NOAEL. The quantification of liver lipid content confirmed these observations. BPA had no effect on hepatic total free cholesterol content (not shown). Liver triglycerides were significantly increased by approximately 60% and 65% in mice exposed to 50 and 500 μg BPA/kg/day,

respectively, compared with control mice (Fig. 6B). Additionally, mice exposed to BPA-TDI also showed a significant increase in hepatic cholesteryl esters (Fig. 6B). The analysis of hepatic FA composition (Fig. 6C; Supporting Table 3) showed that exposure to 50 or 500 μg BPA/kg/day resulted in accumulation of palmitic (C16:0) and oleic acids (C18:1n-9), the major constituents of triglycerides and cholesteryl esters. Conversely, the proportions of polyunsaturated FA and of C18:0, which are found at higher levels in phospholipids, were reduced at these doses. Despite increased *Elovl6* mRNA expression, the C18:0/C16:0 ratio was decreased at these doses. This may result from a combined increased synthesis of C16:0 by FAS and the efficient desaturation/elongation of C18:0 (as illustrated by the increased C18:1n-9/C18:0 ratio, Fig. 6D), both producing substrates for triglyceride synthesis.

Discussion

Our results show that the oral exposure of adult male mice to low BPA doses increases plasma insulin and hepatic mRNA and protein expression related to lipid biosynthesis. This correlates with increased liver lipids after 4 weeks of exposure. Most significant

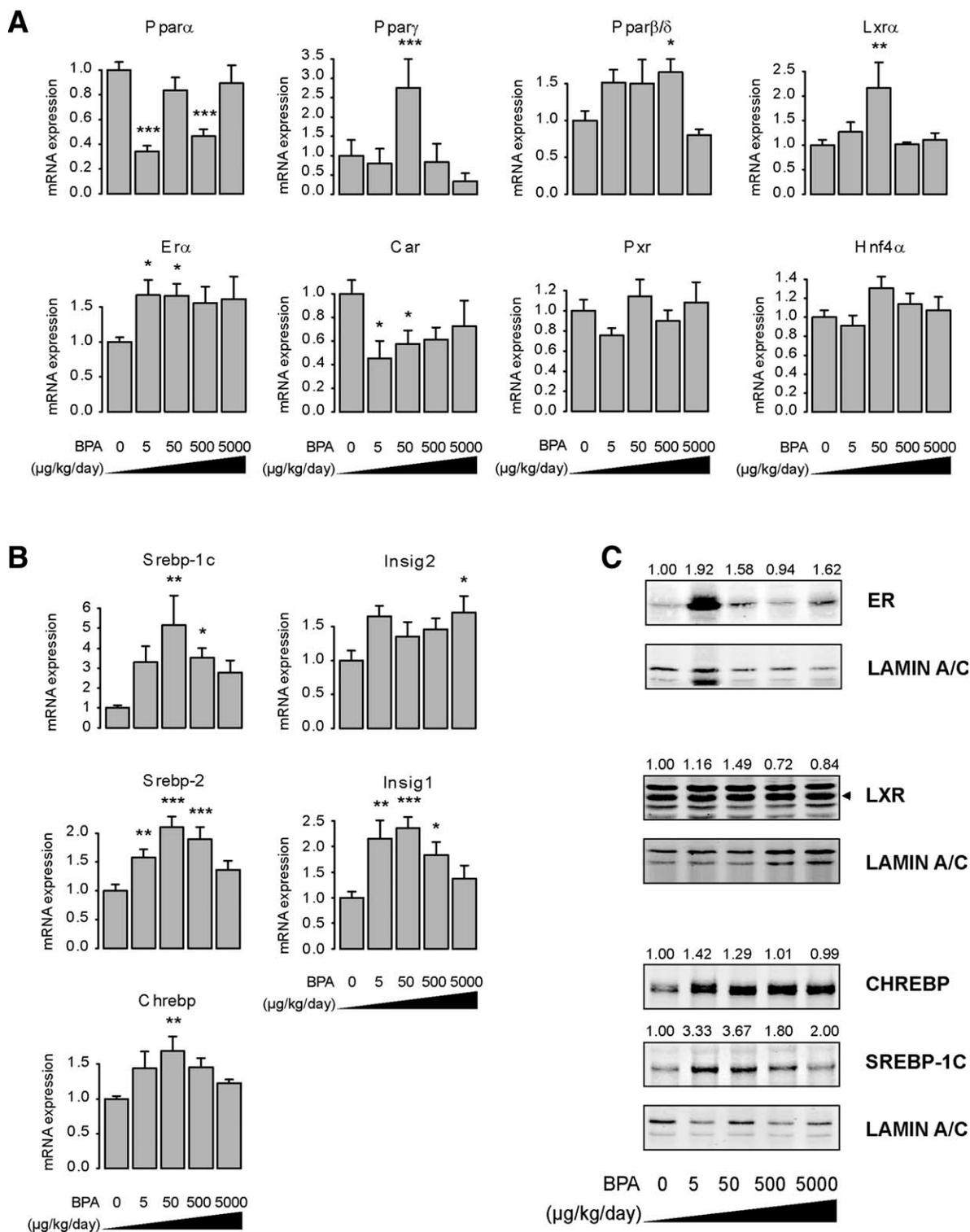


Fig. 5. Effects of low BPA doses on the expression of master transcriptional regulators of hepatic lipid and glucose homeostasis. Hepatic mRNAs from male CD1 mice exposed to different doses of BPA (0, 5, 50, 500, and 5,000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) were used to assay by qPCR the relative mRNA expression of (A) nuclear receptors: the peroxisome proliferator-activated receptors alpha (*Ppar α*), gamma (*Ppar γ*), beta/delta (*Ppar β/δ*), the liver X receptor alpha (*Lxr α*), the estrogen receptor alpha (*Er α*), the constitutive androstane receptor (*Car*), the pregnane X receptor (*Pxr*), and the hepatocyte nuclear factor 4 α (*Hnf4 α*) (B) and of other transcriptional regulators of hepatic lipid and glucose metabolism: the sterol regulatory element binding transcription factor 1c (*Srebp-1c*) and its associated factor encoded by the Insulin induced gene (*Insig2*), the sterol regulatory element binding transcription factor 2 (*Srebp-2*) and its associated factor encoded by the insulin induced gene 1 (*Insig1*), and the carbohydrate response element binding protein (*Chrebp*). All data were normalized to TBP (TATA-box binding protein) mRNA expression levels. Values shown are the mean \pm SEM ($n = 6$ per group). Data were analyzed by ANOVA followed by post-hoc Student's test with a pooled variance estimate. Asterisk denotes a significant difference compared with control condition (0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ of BPA): * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. (C) Immunoblots for ER, LXR, CHREBP, and SREBP-1c were performed as described in the legend of Fig. 4 except that nuclear proteins were extracted and analyzed and that LAMIN A/C was used as a loading control. The values indicated are the mean of the values obtained for 3 animals per group.

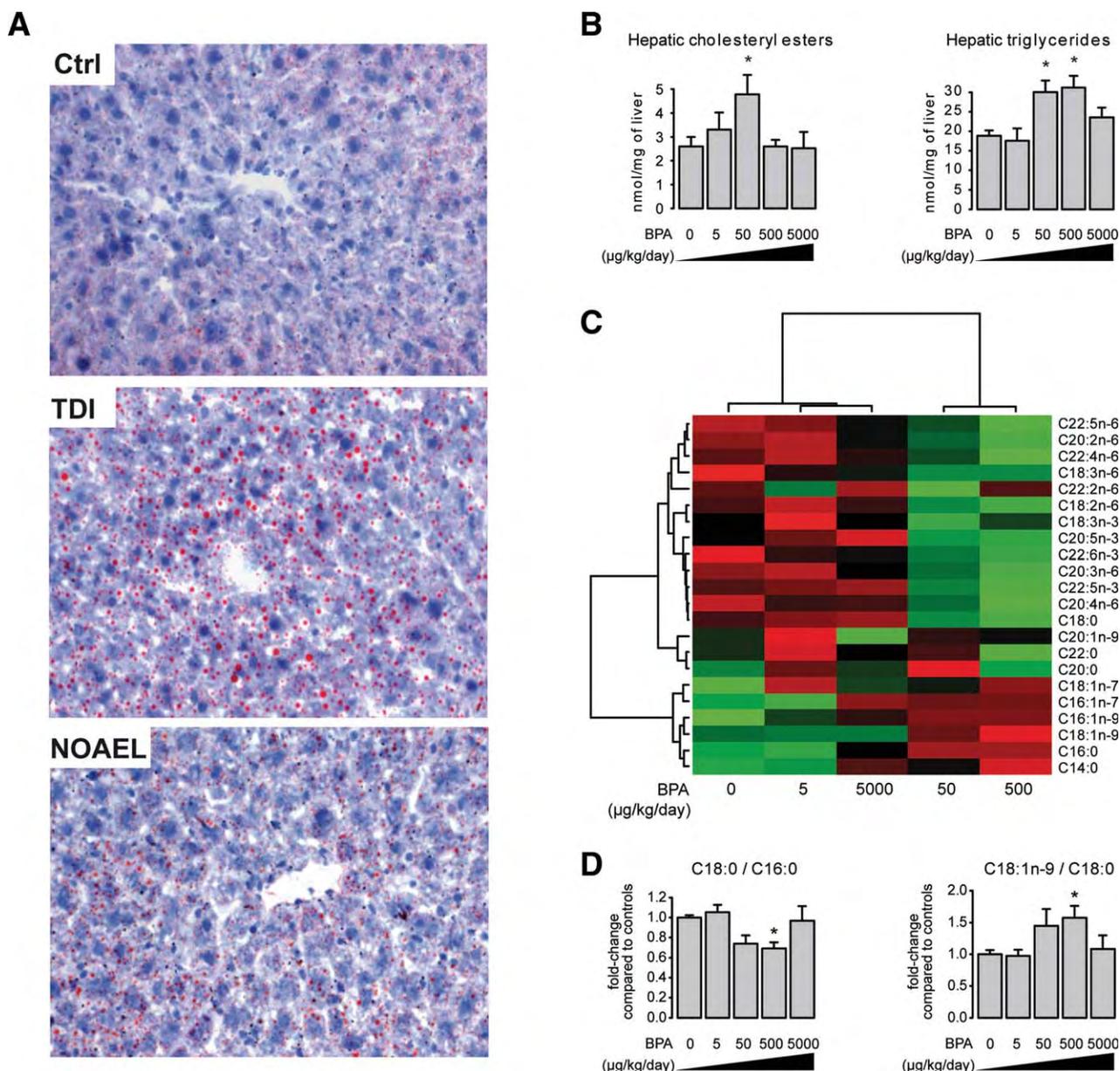


Fig. 6. Accumulation of triglycerides and cholesteryl esters and changes in the fatty acid profile in the livers of mice exposed to BPA low doses. (A) Oil-Red-O-staining of neutral lipids realized on histological sections of livers from mice exposed or not to a BPA low dose (TDI: 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) or high dose (NOAEL: 5,000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$). Neutral lipids appear in red (original magnification $\times 200$). (B) Neutral lipids were extracted from the liver of mice exposed to different doses of BPA (0, 5, 50, 500, and 5,000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) by way of their diet. After extraction, lipids were analyzed by gas chromatography. The presence of internal standards enabled to quantify neutral lipids. Values shown are the mean \pm SEM ($n = 6$ per group). Data were analyzed by ANOVA followed by post-hoc Student's test with a pooled variance estimate. * $P < 0.05$: significant difference compared with control condition (0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ of BPA). (C) The hepatic fatty acid composition of mice exposed to the five BPA doses ($n = 5$ or 6 per group) were determined by gas chromatography of fatty acid methyl esters. The heatmap and the dendrograms were obtained as described in the legend of Fig. 2. The clustering of the groups clearly identifies a specific impact of exposure to 50 and 500 μg BPA/kg/day on the fatty acid profile. It is characterized by increased proportions of saturated and monounsaturated fatty acids and reduced proportions of polyunsaturated fatty acids and C18:0. (D) A significant decrease in the C18:0/C16:0 ratio and a concomitant increase in the C18:1n-9/C18:0 ratio are observed in the livers of animals exposed to 500 μg BPA/kg/day.

effects were observed for BPA doses within one order of magnitude around the current TDI of 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$. Conversely, virtually no effects were observed at the NOAEL (5,000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$). Agencies for risk assessment have established a "safe" TDI for BPA at 50 $\mu\text{g}/$

kg/day, but several studies have revealed that exposure to environmentally relevant BPA doses below the TDI alters various biological functions, including reproductive, behavioral, metabolic, and immune systems.⁴ However, the molecular mechanisms underlying these

low-level responses are still unknown. It was proposed that down-regulation of receptors at higher hormone or xenoestrogen levels may contribute to shape these nonmonotonic curves. Some of BPA's actions, including insulin production by the pancreas, were attributed to its ability to bind to nonclassical membrane estrogen receptor as well as the G-protein coupled-receptor 30 (GPR30) and to act through nongenomic pathways.^{20,30} Interestingly, we observed that, contrary to lipid metabolism genes, *Ugt1a1* expression displayed a dose-dependent increase in response to BPA (Fig. 3E). Human *UGT1a1* mRNA expression has been previously reported to be increased by low BPA doses in HepG2 cells.³¹ This phase II enzyme is involved in the metabolism of endogenous estrogens³² and has also been shown to catalyze BPA glucuronidation at high substrate concentration.³³ Whether the modest increase in *Ugt1a1* expression can interfere with the action of BPA and/or endogenous estrogens may be doubtful, but it suggests that different pathways with different sensitivities to BPA are targeted depending on the dose of exposure.

The effects of BPA on insulin expression and secretion have been described.¹⁷ Our results strongly suggest that the effects of BPA on insulin production by the pancreas translate to transcriptional and functional consequences in the liver. Indeed, insulin is known to increase glycolysis and lipogenesis by way of both post-translational protein modifications and transcriptional mechanisms.³⁴ SREBP-1c plays a major role in the regulation of these genes in response to insulin.³⁵ LXR is thought to contribute to the effect of insulin on *Srebp-1c* gene expression.³⁶ LXR also directly regulates the expression of lipogenic genes.³⁷ Additionally, insulin also stimulates the proteolytic processing of SREBP-1c,³⁸ leading to increased mature nuclear form and subsequent induction of lipogenic gene expression. In addition to insulin, glucose stimulates glycolytic and lipogenic gene expression by activating the ChREBP,²⁹ which is itself under the transcriptional control of LXR.³⁹ Insulin also induces the expression of *Spot14*, which is required for induction of hepatic lipogenesis by thyroid hormone and insulin^{40,41} and of *Pnpla3* by way of SREBP1-c.⁴² SREBP-2 expression and activity are primarily regulated by low sterol levels but were also reported to respond to increased insulin levels.^{43,44} SREBP-2 is a major transcriptional regulator of genes involved in cholesterol biosynthesis, including *Hmgcr* and *Sqle*.⁴⁵ Thus, insulin is likely to contribute to a large number of the regulations observed following BPA exposure. However, although the expression of some genes (e.g., *Pnpla3*) parallels

plasma insulin levels, many other gene expression patterns do not strictly follow the insulin profile. Moreover, the up-regulation of genes involved in neoglucogenesis (*G6pc* and *Pck1*, Fig. 3C) is unexpected in the context of high insulin levels. We cannot rule out that other mechanisms, independent of insulin and possibly involving direct effects of BPA on the liver, may contribute to the transcriptional impacts of low BPA doses reported here.

We have shown an accumulation of liver triglycerides and cholesteryl esters together with associated changes in hepatic FA composition in the animals exposed to low BPA doses. Among the mechanisms potentially involved in these effects (increased FA uptake, impaired secretion, increased lipogenesis, or reduced oxidation), our results point to an activation of lipogenesis and cholesterol biosynthesis as the major mechanism involved, potentially associated with an inhibition of FA oxidation. Simple hepatic lipid accumulation is generally considered a benign and reversible process that does not invariably progress to a more serious condition. However, inappropriate regulation of hepatic *de novo* lipogenesis is now believed to facilitate the generation of lipotoxic lipid intermediates that could contribute to the pathogenesis of NASH.⁴⁶ NAFLD is strongly linked to overnutrition, underactivity, and insulin resistance,⁴⁷ but many other factors initiating hepatic steatosis or supporting the progression of NAFLD to NASH have been proposed.⁴⁸ These include biologic or synthetic hepatotoxins, bacterial endotoxins, and exposure to industrial petrochemicals. Because hepatic steatosis may lead to more severe pathologies such as NASH and fibrosis, the effects of environmental pollutants on liver functions should be carefully examined.

Acknowledgment: We thank Colette Bétoulières, Raymond Gazel and Florence Blas Y Estrada for animal care and technical assistance for animal experiments and Joëlle Laffitte for help in setting up protein analyses. We thank Dr. Gilles Mithieux (INSERM U855) for the generous gift of the G6PASE antibody. We thank the staff members of the following Geno-Toul core facilities for technical assistance: MetaToul/Lipidomic, Genome & Transcriptome, Anexplo/Histopathology and Phenotyping.

References

1. Grun F, Blumberg B. Endocrine disrupters as obesogens. *Mol Cell Endocrinol* 2009;304:19-29.
2. Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol* 2007;24:139-177.

3. Calafat AM, Kuklenyik Z, Reidy JA, Caudill SP, Ekong J, Needham LL. Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Perspect* 2005;113:391-395.
4. Richter CA, Birnbaum LS, Farabollini F, Newbold RR, Rubin BS, Talsness CE, et al. In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod Toxicol* 2007;24:199-224.
5. Lang IA, Galloway TS, Scarlett A, Henley WE, Depledge M, Wallace RB, et al. Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *JAMA* 2008;300:1303-1310.
6. Melzer D, Rice NE, Lewis C, Henley WE, Galloway TS. Association of urinary bisphenol a concentration with heart disease: evidence from NHANES 2003/06. *PLoS One* 2010;5:e8673.
7. Rubin BS, Soto AM. Bisphenol A: perinatal exposure and body weight. *Mol Cell Endocrinol* 2009;304:55-62.
8. Rubin BS, Murray MK, Damassa DA, King JC, Soto AM. Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environ Health Perspect* 2001;109:675-680.
9. Miyawaki J, Sakayama K, Kato H, Yamamoto H, Masuno H. Perinatal and postnatal exposure to bisphenol a increases adipose tissue mass and serum cholesterol level in mice. *J Atheroscler Thromb* 2007;14:245-252.
10. Somm E, Schwitzgebel VM, Toulotte A, Cederroth CR, Combescure C, Nef S, et al. Perinatal exposure to bisphenol a alters early adipogenesis in the rat. *Environ Health Perspect* 2009;117:1549-1555.
11. Vandenberg LN, Maffini MV, Wadia PR, Sonnenschein C, Rubin BS, Soto AM. Exposure to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol-A alters development of the fetal mouse mammary gland. *Endocrinology* 2007;148:116-127.
12. Phrakonkham P, Viengchareun S, Belloir C, Lombes M, Artur Y, Canivenc-Lavier MC. Dietary xenoestrogens differentially impair 3T3-L1 preadipocyte differentiation and persistently affect leptin synthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008;110:95-103.
13. Hugo ER, Brandebourg TD, Woo JG, Loftus J, Alexander JW, Ben-Jonathan N. Bisphenol A at environmentally relevant doses inhibits adiponectin release from human adipose tissue explants and adipocytes. *Environ Health Perspect* 2008;116:1642-1647.
14. Masuno H, Iwanami J, Kidani T, Sakayama K, Honda K. Bisphenol a accelerates terminal differentiation of 3T3-L1 cells into adipocytes through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Toxicol Sci* 2005;84:319-327.
15. Masuno H, Kidani T, Sekiya K, Sakayama K, Shiosaka T, Yamamoto H, Honda K. Bisphenol A in combination with insulin can accelerate the conversion of 3T3-L1 fibroblasts to adipocytes. *J Lipid Res* 2002;43:676-684.
16. Sargis RM, Johnson DN, Choudhury RA, Brady MJ. Environmental endocrine disruptors promote adipogenesis in the 3T3-L1 cell line through glucocorticoid receptor activation. *Obesity (Silver Spring)* 2010;18:1283-1288.
17. Nadal A, Alonso-Magdalena P, Soriano S, Quesada I, Ropero AB. The pancreatic beta-cell as a target of estrogens and xenoestrogens: implications for blood glucose homeostasis and diabetes. *Mol Cell Endocrinol* 2009;304:63-68.
18. Ropero AB, Alonso-Magdalena P, Garcia-Garcia E, Ripoll C, Fuentes E, Nadal A. Bisphenol-A disruption of the endocrine pancreas and blood glucose homeostasis. *Int J Androl* 2008;31:194-200.
19. Alonso-Magdalena P, Morimoto S, Ripoll C, Fuentes E, Nadal A. The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic beta-cell function in vivo and induces insulin resistance. *Environ Health Perspect* 2006;114:106-112.
20. Alonso-Magdalena P, Ropero AB, Carrera MP, Cederroth CR, Baquie M, Gauthier BR, et al. Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER alpha. *PLoS One* 2008;3:e2069.
21. Alonso-Magdalena P, Vieira E, Soriano S, Menes L, Burks D, Quesada I, et al. Bisphenol A exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring. *Environ Health Perspect* 2010;118:1243-1250.
22. Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WM, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJ, et al. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res* 2009;37:e45.
23. Rajas F, Jourdan-Pineau H, Stefanutti A, Mrad EA, Iyenedjian PB, Mithieux G. Immunocytochemical localization of glucose 6-phosphatase and cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase in gluconeogenic tissues reveals unsuspected metabolic zonation. *Histochem Cell Biol* 2007;127:555-565.
24. Zdravec D, Brolinson A, Fisher RM, Carneheim C, Csikasz RI, Bertrand-Michel J, et al. Ablation of the very-long-chain fatty acid elongase ELOVL3 in mice leads to constrained lipid storage and resistance to diet-induced obesity. *FASEB J* 2010;24:4366-4377.
25. Rotman Y, Koh C, Zmuda JM, Kleiner DE, Liang TJ. The association of genetic variability in patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3) with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *HEPATOLOGY* 2010;52:894-903.
26. Moreau A, Teruel C, Beylot M, Albalea V, Tamasi V, Umbdenstock T, et al. A novel pregnane X receptor and S14-mediated lipogenic pathway in human hepatocyte. *HEPATOLOGY* 2009;49:2068-2079.
27. Guillou H, Martin PG, Pineau T. Transcriptional regulation of hepatic fatty acid metabolism. *Subcell Biochem* 2008;49:3-47.
28. Sato R. Sterol metabolism and SREBP activation. *Arch Biochem Biophys* 2010;501:177-181.
29. Postic C, Dentin R, Denechaud PD, Girard J. ChREBP, a transcriptional regulator of glucose and lipid metabolism. *Annu Rev Nutr* 2007;27:179-192.
30. Alonso-Magdalena P, Laribi O, Ropero AB, Fuentes E, Ripoll C, Soria B, et al. Low doses of bisphenol A and diethylstilbestrol impair Ca²⁺ signals in pancreatic alpha-cells through a nonclassical membrane estrogen receptor within intact islets of Langerhans. *Environ Health Perspect* 2005;113:969-977.
31. Hanet N, Lancon A, Delmas D, Jannin B, Chagnon MC, Cherkaoui-Malki M, et al. Effects of endocrine disruptors on genes associated with 17beta-estradiol metabolism and excretion. *Steroids* 2008;73:1242-1251.
32. Senafi SB, Clarke DJ, Burchell B. Investigation of the substrate specificity of a cloned expressed human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase: UDP-sugar specificity and involvement in steroid and xenobiotic glucuronidation. *Biochem J* 1994;303(Pt 1):233-240.
33. Hanioka N, Naito T, Narimatsu S. Human UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in bisphenol A glucuronidation. *Chemosphere* 2008;74:33-36.
34. Kersten S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep* 2001;2:282-286.
35. Foufelle F, Ferre P. New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem J* 2002;366:377-391.
36. Chen G, Liang G, Ou J, Goldstein JL, Brown MS. Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:11245-11250.
37. Schultz JR, Tu H, Luk A, Repa JJ, Medina JC, Li L, et al. Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev* 2000;14:2831-2838.
38. Hegarty BD, Bobard A, Hainault I, Ferre P, Bossard P, Foufelle F. Distinct roles of insulin and liver X receptor in the induction and cleavage of sterol regulatory element-binding protein-1c. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:791-796.
39. Cha JY, Repa JJ. The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *J Biol Chem* 2007;282:743-751.
40. Brown SB, Maloney M, Kinlaw WB. "Spot 14" protein functions at the pretranslational level in the regulation of hepatic metabolism by thyroid hormone and glucose. *J Biol Chem* 1997;272:2163-2166.

41. Kinlaw WB, Church JL, Harmon J, Mariash CN. Direct evidence for a role of the "spot 14" protein in the regulation of lipid synthesis. *J Biol Chem* 1995;270:16615-16618.
42. Huang Y, He S, Li JZ, Seo YK, Osborne TF, Cohen JC, Hobbs HH. A feed-forward loop amplifies nutritional regulation of PNPLA3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:7892-7897.
43. Xie X, Liao H, Dang H, Pang W, Guan Y, Wang X, et al. Down-regulation of hepatic HNF4alpha gene expression during hyperinsulinemia via SREBPs. *Mol Endocrinol* 2009;23:434-443.
44. Kotzka J, Lehr S, Roth G, Avci H, Knebel B, Muller-Wieland D. Insulin-activated Erk-mitogen-activated protein kinases phosphorylate sterol regulatory element-binding protein-2 at serine residues 432 and 455 in vivo. *J Biol Chem* 2004;279:22404-22411.
45. Nagai M, Sakakibara J, Nakamura Y, Gejyo F, Ono T. SREBP-2 and NF-Y are involved in the transcriptional regulation of squalene epoxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;295:74-80.
46. Neuschwander-Tetri BA. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *HEPATOLOGY* 2010;52:774-788.
47. Larter CZ, Chitturi S, Heydet D, Farrell GC. A fresh look at NASH pathogenesis. Part 1. The metabolic movers. *J Gastroenterol Hepatol* 2010;25:672-690.
48. Cave M, Deaciuc I, Mendez C, Song Z, Joshi-Barve S, Barve S, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: predisposing factors and the role of nutrition. *J Nutr Biochem* 2007;18:184-195.

ARTICLE EN PRÉPARATION N°1: IMPACT OF LONG TERM BISPHENOL A EXPOSURE ON CHOLESTEROLEMIA.

Au terme de la première étude nous avons souhaité déterminer:

- 1) Quelles seraient les conséquences hépatiques d'expositions plus longues à ce contaminant : conduisent-elles, par exemple, à une stéatose plus grave que celle que nous avons observée au bout de 28 jours de traitement ?
- 2) Si le BPA est capable d'exercer un effet sur le métabolisme énergétique en influant directement les cellules hépatocytaires ou si les effets observés résulteraient d'effets de ce contaminant sur d'autres organes comme le pancréas.

Pour répondre à la première question nous avons choisi d'exposer des souris de la même souche CD1 aux mêmes doses de BPA (0 ; 0,005 ; 0,05 ; 0,5 et 5 mg/kg/j de BPA) pendant 7 mois. Dans cette étude, nous avons opté pour une administration *via* l'eau de boisson utilisée dans de nombreuses études dans la littérature (Miyawaki, Sakayama et al. 2007; Somm, Schwitzgebel et al. 2009; Liu, Ma et al. 2012) et plus compatible avec des expositions à long terme. Cette exposition a mis en évidence un effet du BPA sur l'expression des gènes hépatiques impliqués dans la biosynthèse du cholestérol. Contrairement à l'étude précédente, les effets ont été décalés vers les plus fortes doses de BPA (0,5 et 5 mg/kg/j). Ce décalage pourrait s'expliquer par un temps d'exposition plus long conduisant à une adaptation des animaux, ou par des taux d'expositions au BPA différents, liés au mode d'administration. Les modifications transcriptionnelles observées ne se sont pas traduites par des altérations de la physiologie du foie puisque le contenu en lipides neutres et les marqueurs de l'inflammation hépatique sont inchangés. Mais, les niveaux plasmatiques en cholestérol total sont significativement augmentés. Ces altérations du métabolisme du cholestérol peuvent être mises en corrélation avec les nombreuses publications épidémiologiques, faisant le lien entre des taux plasmatiques de BPA chez l'Homme et la survenue de maladies cardiovasculaires (Lind and Lind 2011; Melzer, Osborne et al. 2012; Shankar, Teppala et al. 2012).

Pour répondre à la deuxième question nous avons entrepris d'exposer des cellules de la lignée Hepa1 à différentes doses de BPA (10^{-9} à 10^{-6} M) pendant 24 heures. Cette exposition montre une induction des gènes clés de la synthèse du cholestérol (Mvd, Lss, Hmgcr) ainsi qu'une accumulation de lipides intracellulaires. Ces résultats et ceux de Huc et al. mettent en évidence un effet direct du BPA au niveau des hépatocytes (Huc, Lemarie et al. 2012). Les voies de signalisation par lesquelles ce xéno-œstrogène pourrait exercer ces effets restent encore à déterminer, mais une action *via* le récepteur aux œstrogènes ER α peut être envisagée, puisqu'il est décrit comme un récepteur important du métabolisme du cholestérol hépatique (Wang, Afdhal et al. 2006).

IMPACT OF LONG TERM BPA EXPOSURE ON CHOLESTEROLEMIA

Alice Marmugi^{a, b}, et al.

^a INRA; TOXALIM (Research Centre in Food Toxicology); 180 chemin de Tournefeuille, F-31027 Toulouse, France.

^b Université de Toulouse; INP; UPS; TOXALIM; F-31027 Toulouse, France

Correspondence to: Dr Laila Lakhali, ToxAlim UMR1331 INRA/INPT/UPS, Integrative Toxicology & Metabolism group, 180 chemin de Tournefeuille, BP 93173, 31027 Toulouse Cedex 3, FRANCE. Tel: +33 561285153. Fax: +33 561285310. Laila-lakhali@toulouse.inra.fr

Short title: Bisphenol A and cholesterol biosynthesis

Keywords: bisphenol A; liver; metabolism; lipid, cholesterol

Acknowledgments: This work was supported by grants from the ANR (CES PerinaTox program). Alice Marmugi is funded by a grant from INRA Animal Health Department and the Région Midi-Pyrénées.

List of Abbreviations

BPA: Bisphenol A; ER: Estrogen receptor; HMGCR: Hmg-coenzyme A reductase; LSS: Lanosterol synthase; MVD: Mevalonate diphospho decarboxylase; SQLE: Squalene epoxidase; SREBP: Sterol Regulatory Element Binding Protein-2.

Abstract

Background: Bisphenol A (BPA) is an endocrine disruptor which is highly prevalent in our environment. It is used as the monomer of polycarbonate plastics and epoxy resins. Recent epidemiological and animal studies have suggested that BPA exposure may have a role in the development of obesity and related pathologies like diabetes and cardiovascular diseases.

Objectives: In this study, we investigated the effect of long term BPA exposure on hepatic markers of metabolism in adult mice.

Methods: Male CD1 mice were exposed for 7 months to different doses of BPA (0; 5; 50; 500 and 5000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) through drinking water. Transcriptomic analyses were performed in the liver of control and BPA exposed mice. The *in vivo* analysis was completed by *in vitro* experiments on the Hepa-1 murin hepatocyte cell line.

Results: We report a specific impact of BPA on the hepatic genes involved in lipid synthesis and more particularly on cholesterol biosynthesis (Mvd, Lss, Hmgcr, Sqle). BPA effect was also observed on the expression of the Sterol Regulatory Element Binding Protein-2 (SREBP-2) that governs cholesterol biosynthesis. The highest effect was observed at the 5000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ BPA dose. Consistent with this transcriptomic effect, a hypercholesterolemia was evidenced in the BPA exposed animals. *In vitro* analysis showed a lipid accumulation in BPA-exposed Hepa-1 cell line suggesting that the liver may be a direct target for BPA.

Conclusion: Our results suggest that BPA may promote hypercholesterolemia by inducing cholesterol biosynthesis in the liver. These results are consistent with many epidemiological studies reporting on a link between BPA exposure and the onset of cardiovascular diseases.

Keywords: metabolic disruptor, bisphenol A, cholesterol biosynthesis, liver.

Introduction

Bisphenol A (BPA) is a man-made compound that is highly prevalent in our environment and suspected to act as an endocrine disruptor. It is intensively produced and used as a monomer of polycarbonate plastics and epoxy resins. Human exposure to BPA is ubiquitous at low levels, and it occurs primarily through the diet by migration from food and beverage containers (Vandenberg, Hauser et al. 2007). Biomonitoring surveys have demonstrated that detectable levels of BPA are present in the urine of nearly all sampled adults in the USA (Calafat, Kuklennyik et al. 2005; Calafat, Ye et al. 2008).

The ability of BPA to cause adverse human health effect is highly documented. Many experimental and epidemiological studies evidenced potential links between BPA exposure and the development of cancer and disorders of the reproductive, the neuroendocrine and the immune systems (Richter, Birnbaum et al. 2007). An area of an increasing interest is the potential for BPA exposure to contribute to obesity and its associated metabolic complications (Heindel 2003; Newbold 2008). High circulating BPA levels have been found to be associated with prevalent coronary heart diseases and a number of cardiovascular risk factors such as hypertension, obesity, diabetes, and metabolic syndrome (Lang, Galloway et al. 2008; Melzer, Rice et al. 2010). A recent study also reported the link between BPA and phthalates exposure, and the atherosclerosis (Lind and Lind 2011).

Consistent with these data, several animal studies reported an effect of BPA on metabolic homeostasis. Many *in vivo* studies reported an increase in body weight of rats and mice exposed to BPA during gestation and/or lactation period (Rubin and Soto 2009). Low BPA doses were shown to impact metabolic organs like the pancreas, the adipose tissue and the liver (Ben-Jonathan, Hugo et al. 2009; Nadal, Alonso-Magdalena et al. 2009; Marmugi, Ducheix et al. 2012).

The pancreas responded to low BPA doses with an increase of the production and secretion of insulin, which resulted in insulin resistance in adult animals (Alonso-Magdalena, Morimoto et al. 2006). When examined at 6 months of age, the male-offspring of the BPA-exposed dams had reduced glucose tolerance, increased insulin resistance and altered blood, revealing the ability of BPA to alter the pancreatic function (Alonso-Magdalena, Vieira et al. 2010; Wei, Lin et al. 2011). Using the anti-estrogen ICI182,780 or mice invalidated for estrogen receptor (ER) α or β (ER α KO and ER β KO), the authors demonstrated that BPA action on insulin biosynthesis is mediated by ER α receptor, the action on secretion is ER α -dependent (Alonso-Magdalena, Roperio et al. 2008; Soriano, Alonso-Magdalena et al. 2012).

BPA perinatal exposure was shown to increase adipose tissue mass at weaning, to induce overexpression of lipogenic genes, adipocyte hypertrophy, and to disturb adipokin release from adipose tissue by increasing leptin and decreasing adiponectin (Miyazaki, Flowers et al. 2007; Somm, Schwitzgebel et al. 2009; Wei, Lin et al. 2011). *In vitro* studies indicated that micromolar concentrations of BPA enhanced 3T3L1 cell line differentiation, also increased the expression of adipocyte differentiation factors and lipid accumulation, suggesting a direct effect of BPA on the adipose tissue (Masuno, Kidani et al. 2002; Masuno, Iwanami et al. 2005; Miyazaki, Flowers et al. 2007; Phrakonkham, Viengchareun et al. 2008; Somm, Schwitzgebel et al. 2009; Wei, Lin et al. 2011).

We recently reported a BPA effect in the liver of adult mice (Marmugi, Ducheix et al. 2012). Our data revealed a specific impact of low doses of BPA on the hepatic transcriptome, more particularly on genes involved in *de novo* lipogenesis. These effects followed a non-monotonic dose-response curve, with more important effects at lower doses than at the higher doses. Consistent with this increased fatty acid biosynthesis, we showed an accumulation of triglycerides and cholesterol esters in the liver of BPA exposed mice (Marmugi, Ducheix et al. 2012).

To date, few studies have evaluated the effects of BPA through adulthood and to later ages. In the present study we exposed CD1 mice to different BPA doses (0; 5; 50; 500; 5000 µg/kg/day) for 7 months through drinking water as reported in many studies (Miyawaki, Sakayama et al. 2007; Somm, Schwitzgebel et al. 2009). We evaluated this long-term exposure on the liver transcriptome and on hepatic and plasmatic lipid accumulation.

Materials and Methods

Animals and treatments. Six-week-old male CD1 mice (Charles River, Les Oncins, France) divided into five groups (n=6/group) were administered different BPA (4,4'-dihydroxy-2,2-diphenylpropane, CAS# 80-05-7, Sigma-Aldrich, France) doses via the water (ethanol 0,36%) for 7 months. Animals were fed with a standard diet (ingredients from SAFE Diet, Augy, France) (housing at 22±2°C, 12h light/dark). Considering a given water consumption and body weight per week, quantity of BPA were re-evaluated to an oral exposure of 0 (controls), 5, 50 (Tolerable Daily Intake), 500 or 5000 µg/kg of BPA/day (No-Observed-Adverse-Effect Level) respectively. *In vivo* studies were conducted under E.U. guidelines for the use and care of laboratory animals and were approved by an independent ethics committee.

Blood and organs sampling. Blood was collected at the submandibular vein in EDTA-coated capillaries. Plasma was prepared by centrifugation (2000×g, 10 min) and kept at -80°C until use. Following euthanasia the liver was removed, weighed, dissected, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use.

Gene expression studies. Total RNA was extracted with TRIzol® reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). For real-time quantitative PCR (qPCR), total RNA samples (2 µg) were reverse-transcribed using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Primers for SYBR Green assays are presented in Table 1. Amplifications were performed on an ABI Prism 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems). QPCR data were normalized by TATA-box binding protein (TBP) mRNA levels and analyzed with LinRegPCR (Ruijter, Ramakers et al. 2009).

Biochemical assays. Hepatic lipid content and fatty acid (FA) composition were determined as described elsewhere (Zadravec, Brolinson et al.). Plasma levels of triglycerides, glucose, total cholesterol, LDL- and HDL-cholesterol were determined on a COBAS-MIRA+ biochemical analyzer. Plasma insulin was assayed with the ultra sensitive mouse insulin ELISA kit (Crystal Chem, Downers Grove, IL).

Cell culture. Hepa1 cells were cultivated in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, 4.5 g/L glucose) with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine and penicillin (100 U/mL)-streptomycin (0.1 mg/mL), in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37 °C. Medium and reagents were purchased from Sigma–Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Bisphenol A was resuspended in ethanol at 100 mM and used at concentrations between 10⁻⁹ and 10⁻⁶ M,. The medium was composed of DMEM without phenol red and serum, to avoid estrogen contamination.

Cell lipid content analysis by BODIPY staining. After a 24h-treatment with BPA or oleate (30 µM), Hepa1 cells were collected and stained with BODIPY 493/503 solution (Life Technology, Saint Aubin, France) at 1 µg/L final concentration for 10 min at 37°C. BODIPY cellular fluorescence (λ_{exc}: 485 nm, λ_{em}: 515 nm) was analyzed by flow cytometry in the B1 channel 525/50 nm BPMACSQuant Analyser 10, Miltenyi). Each measurement was conducted on 10,000 events and analyzed with MACSQuantifysoftware. Three independent experiments were carried out. For confocal microscopy, cells (seeded in glass eight chamber LabTeks) were rinsed in PBS and stained with BODIPY 493/503 solution at 1 µg/L final concentration for 10 min. DAPI was

used to stain nuclei. Slides were analyzed using a confocal laser-scanning microscope (LSM 710, Carl Zeiss) with 488 nm laser and green channel for BODIPY, and 405 nm laser and DAPI channel for DAPI, and a 63× oil immersion objective. The images were analyzed using ImageJ software.

Statistical analysis. All the data were analyzed using R (www.r-project.org). Differential effects were analyzed by anova followed by Student t-tests with a pooled variance estimate. A p-value \leq 0.05 was considered significant.

Results

Long-term BPA exposure induces hepatic gene expression related to cholesterol biosynthesis. Male CD1 mice were exposed for 6 months to 0, 5, 50, 500 or 5000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ of BPA via drinking water. BPA exposure had no effect on body weight gain and relative liver weight (Data not shown). We evaluated by qPCR the effects of the different BPA doses (0, 5, 50, 500 and 5000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) on the expression of genes involved in cholesterol biosynthesis. Figure 1A illustrates the effect of BPA on key enzymes involved in cholesterol biosynthesis like Mevalonate diphospho decarboxylase (Mvd), Lanosterol synthase (Lss), Hmg-coenzyme A reductase (Hmgcr) and Squalene epoxidase (Sqle). Significant inductions were observed for the higher BPA doses (500 and 5000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$). The same pattern of expression was observed for the Sterol Regulatory Element Binding Protein 2 (SREBP-2), a major transcriptional regulator of cholesterol biosynthesis (Figure 1B). A similar effect of BPA was observed for cytochrome P450, family 7, subfamily A, polypeptide 1 (Cyp7a1), an enzyme catalyzing the rate limiting step of bile acid synthesis which is the primary mechanism of cholesterol elimination (Figure 1C). BPA exposure did not affect the expression of another CYP involved in bile acid synthesis, the cytochrome P450, family 27, subfamily A, polypeptide 1 (Cyp27a1), and an enzyme involved in intracellular cholesterol esterification, the Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) (Figure 1C). No effect either was obtained on nuclear receptor like the Liver X receptor (LXR), involved in the conversion of cholesterol into bile acids, and the Farnesoid X receptor (FXR) controlling bile acid homeostasis (Figure 1B). We also studied the impact of BPA on the mRNA expression of genes involved in cholesterol uptake and excretion. BPA did not affect the low density lipoprotein receptor (Ldlr) which transports cholesterol-carrying lipoprotein particles into hepatocytes (Figure 1D). Obtained results did not suggest a BPA impact on cholesterol influx. BPA exposure at 5, 500 and 5000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ decreases the expression of ATP-binding cassette sub-family G member 1

(AbcG1) gene, but not the expression ATP-binding cassettes sub-family A member 1 (AbcA1), both known to be involved in cholesterol efflux (Figure 1D).

BPA long-term exposure activates carbohydrate and lipid pathways. Expression of genes involved in neoglucogenesis like the Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) was induced at 50 and 5000 µg/kg/day but no effect was observed for the Glucose 6-phosphatase (G6Pase) (Figure 2A). Concerning the genes involved in glycolysis, no effect was observed for the Glucokinase (Gck) and exposure to 500 µg/kg/day of BPA led to Liver-pyruvate kinase (L-pk) gene induction (Figure 2A). BPA was also shown to induce the expression of the fatty acid synthase (Fasn) gene, a key regulator of lipogenesis (Figure 2B). It also induced the expression of the Patatin-like phospholipase domain containing 3 (Pnpla3), a gene associated to lipogenesis and recently identified as a marker of the severity of non-alcoholic steatohepatitis (Sookoian and Pirola 2011), and of the Thyroid hormone responsive Spot14 homolog (Thrsp-Spot14), a protein known to transduce hormone-related and nutriment-related signals into genes involved in lipogenesis through a molecular mechanism which is not elucidated yet (Tsatsos, Augustin et al. 2008). The effects on the ATP citrate lyase (Acl), on the stearyl-Coenzyme A desaturase 1 (Scd1) and on Sterol Regulatory Element Binding Protein 1C (SREBP-1c), a major transcriptional regulator of lipogenesis, were not significantly different in the BPA treated animals compared to the controls (Figure 2B).

BPA exposure did not lead to any deleterious effect in the liver but to a disruption of plasma parameters. In order to determine whether there are inflammatory processes taking place in the liver due to long-term exposure to BPA, we measured the expression of pro-inflammatory genes like the tumor necrosis factor alpha (TNF α) or the Interleukin 6 (IL-6). Their expression was not affected in the long-term BPA-exposed animals (Figure 3A). Despite an induction of all the genes involved in cholesterol synthesis that we tested, we observed no cholesterol or cholesterol ester accumulation in the liver, probably due to a process of cholesterol degradation greater than its synthesis (Figure 3B). We did not observe either any accumulation of triglycerides in the liver of BPA-exposed animals (Figure 3B). In contrast, an increase of plasma cholesterol levels was observed in animals exposed to 5, 50, 500 and 5000 µg BPA/kg/day (Figure 3C). Plasma HDL-cholesterol and LDL-cholesterol were also significantly increased for some BPA doses (Figure 3C). BPA had no significant effect on plasma free fatty acid and exposure to 5, 50, 500 and 5000 µg BPA/kg/day decreased plasma triglycerides (Figure 3D). Glucose levels were also significantly

increased in the animals exposed to 5, 500 and 5000 μg BPA/kg/day, with a maximal effect at the highest dose, while the insulin levels were not affected (Figure 3D).

BPA exposure induced liver accumulation in a mouse hepatic cell line. Hepa1 cells were exposed for 24 hours to different BPA doses (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} M). Confocal microscopy on BPA-treated Hepa1 cells stained with BODIPY revealed an increase of lipid accumulation in the BPA treated cells compared to the control cells and the oleate treatment was used as a positive control (Figure 4A). This increase in lipid content was confirmed by flow cytometry on BODIPY stained cells (Table 2). Q-PCR analysis in the control and BPA-treated cells revealed an increase of the *Mvd*, *Lss* and *Hmgr* genes involved in cholesterol synthesis, and of *Fasn* involved in lipogenesis (Figure 4B).

Discussion

In the present study we have evidenced an increase in plasmatic total, HDL and LDL-cholesterol in adult mice exposed to BPA through drinking water for 7 months (Figure 3C). Our results are consistent with those published by Miyawaki et al. showing an increase of total cholesterol in mice exposed to BPA during prenatal and until postnatal day 31 (Miyawaki, Sakayama et al. 2007). But the increase was significant only in females, not in males (Miyawaki, Sakayama et al. 2007). These authors evidenced an effect of BPA on adipose tissue mass and adipokin secretion, but did not explore the liver. The liver transcriptome analysis performed in our study revealed an increase in most of the key enzymes involved in hepatic cholesterol biosynthesis, like *Hmgcr*, *Mvd*, *Lss*, *Sqle* (Figure 1A), correlated with an increase of the master transcriptional regulator of cholesterol biosynthesis SREBP-2 (Figure 1B). These effects could be explained by an action of BPA on $\text{ER}\alpha$ receptor, which was reported to up-regulate SREBP-2, with the activation of SREBP-2-responsive genes in the cholesterol biosynthetic pathway as a result (Wang, Afdhal et al. 2006). Since BPA is suspected to have an *oestrogeno-mimetic* activity, it may use the same “estrogen- $\text{ER}\alpha$ -SREBP-2” pathway to regulate hepatic cholesterol biosynthesis. BPA-mediated cholesterol biosynthesis can also involve the G protein-coupled receptor (GPR30), a receptor expressed in the liver (Feng and Gregor 1997), that has been identified as a mediator of some effects of estradiol in the liver (Hsieh, Yu et al. 2007; Ikeda, Tajima et al. 2012). Wang et al. suspected GPR30 to act as $\text{ER}\alpha$ on cholesterol metabolism (Wang, Liu et al. 2009). In parallel to cholesterol biosynthesis enzymes induction we also observed an increase in gene expression of the rate-limiting enzyme in the synthesis of bile acid from cholesterol, the *Cyp7A1* (Figure 1C). The

fact that we observed both a synthesis and catabolism of cholesterol, suggests that BPA may have several targets in the liver. Induction of Cyp7A1 expression may result from an effect of BPA on LXR, which is known to be the dominant regulator of this gene (Gupta, Pandak et al. 2002). We did not evidence any increase of the expression of LXR in the BPA exposed animals (Figure 1B), but it does not exclude its activation since one of its other target genes like Fasn is also induced (Figure 2B).

In a previous study we reported cholesterol and lipogenic related gene expression in the liver of mice exposed to BPA for 28 days (Marmugi, Ducheix et al. 2012). These genes were induced at the lower BPA doses (5 and 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$) while in the present study the higher effects were observed at the higher BPA doses both for lipogenic and for the genes involved in cholesterol homeostasis. These results can be explained either by the time of exposure which is longer in the present study, or possibly by the mode of administration of BPA. The administration by drinking water may result in different quantities of BPA reaching the liver than with food administration. It may also result from an adaptation of the animals to the BPA during the 7 months of exposure, which may change their ability to metabolize and eliminate it.

Moreover in contrast to our previous study, these deregulations occurred without any plasmatic insulinemia, suggesting a direct effect of BPA in the liver rather than a consequence of its effect on the pancreas as suggested in our previous study (Marmugi et al., 2012). To check that, we exposed *in vitro* the Hepa1 mouse hepatocyte cell line to different BPA doses. Confocal microscopy analysis after bodipy staining of neutral lipids allowed us to highlight an accumulation of lipids in BPA-exposed cells (Figure 4A). Gene expression analysis allowed us to highlight an induction of the expression of genes regulating the lipogenesis, like Fasn, but especially those involved in the biosynthesis of cholesterol (Hmgcr, Mvd, Lss) (Figure 4B). There are only few studies reporting effects of BPA *in vitro* in hepatic cells. Our results are consistent with previous studies showing lipid accumulation in human hepatocytes cell lines exposed to low BPA doses (Wada, Sakamoto et al. 2007; Huc, Lemarie et al. 2012). In the study published by Huc et al., disturbances in mitochondrial function and release of pro-inflammatory cytokines were reported in parallel to lipid accumulation (Huc, Lemarie et al. 2012). But none of these studies measured the expression of genes involved in lipid metabolism.

In addition to elevated cholesterol levels, the BPA-exposed animals showed a decrease of TG and an increase of plasma glucose, evidencing more general disorders of the metabolism due to the impact of BPA on other organs such as the adipose tissue and the pancreas.

The most original result of the present study is the identification of hypercholesterolemia in animals subjected to BPA. This hypercholesterolemia correlates with the increased expression of

key genes regulating this cholesterol biosynthesis. These results are to be linked with the numerous epidemiological studies showing an association between BPA exposure and the onset of cardiovascular diseases (Melzer, Osborne et al. 2012; Olsen, Lind et al. 2012). Cardiovascular diseases result from a complex interaction between genetic, lifestyle and environmental factors. While several personal risk factors for developing heart diseases including smoking, diabetes, and dyslipidemia have been identified, the contribution of environmental contaminants has received comparatively less attention and should be more carefully examined.

References

- Alonso-Magdalena, P., S. Morimoto, et al. (2006). "The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic beta-cell function in vivo and induces insulin resistance." Environ Health Perspect **114**(1): 106-12.
- Alonso-Magdalena, P., A. B. Roper, et al. (2008). "Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER alpha." PLoS One **3**(4): e2069.
- Alonso-Magdalena, P., E. Vieira, et al. (2010). "Bisphenol A exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring." Environ Health Perspect **118**(9): 1243-50.
- Ben-Jonathan, N., E. R. Hugo, et al. (2009). "Effects of bisphenol A on adipokine release from human adipose tissue: Implications for the metabolic syndrome." Mol Cell Endocrinol **304**(1-2): 49-54.
- Calafat, A. M., Z. Kuklennyik, et al. (2005). "Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population." Environ Health Perspect **113**(4): 391-5.
- Calafat, A. M., X. Ye, et al. (2008). "Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004." Environ Health Perspect **116**(1): 39-44.
- Feng, Y. and P. Gregor (1997). "Cloning of a novel member of the G protein-coupled receptor family related to peptide receptors." Biochem Biophys Res Commun **231**(3): 651-4.
- Gupta, S., W. M. Pandak, et al. (2002). "LXR alpha is the dominant regulator of CYP7A1 transcription." Biochem Biophys Res Commun **293**(1): 338-43.
- Heindel, J. J. (2003). "Endocrine disruptors and the obesity epidemic." Toxicol Sci **76**(2): 247-9.
- Hsieh, Y. C., H. P. Yu, et al. (2007). "G protein-coupled receptor 30-dependent protein kinase A pathway is critical in nongenomic effects of estrogen in attenuating liver injury after trauma-hemorrhage." Am J Pathol **170**(4): 1210-8.

- Huc, L., A. Lemarie, et al. (2012). "Low concentrations of bisphenol A induce lipid accumulation mediated by the production of reactive oxygen species in the mitochondria of HepG2 cells." Toxicol In Vitro **26**(5): 709-17.
- Ikeda, Y., S. Tajima, et al. (2012). "Estrogen regulates hepcidin expression via GPR30-BMP6-dependent signaling in hepatocytes." PLoS One **7**(7): e40465.
- Lang, I. A., T. S. Galloway, et al. (2008). "Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults." JAMA **300**(11): 1303-10.
- Lind, P. M. and L. Lind (2011). "Circulating levels of bisphenol A and phthalates are related to carotid atherosclerosis in the elderly." Atherosclerosis **218**(1): 207-13.
- Marmugi, A., S. Ducheix, et al. (2012). "Low doses of bisphenol A induce gene expression related to lipid synthesis and trigger triglyceride accumulation in adult mouse liver." Hepatology **55**(2): 395-407.
- Masuno, H., J. Iwanami, et al. (2005). "Bisphenol a accelerates terminal differentiation of 3T3-L1 cells into adipocytes through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway." Toxicol Sci **84**(2): 319-27.
- Masuno, H., T. Kidani, et al. (2002). "Bisphenol A in combination with insulin can accelerate the conversion of 3T3-L1 fibroblasts to adipocytes." J Lipid Res **43**(5): 676-84.
- Melzer, D., N. J. Osborne, et al. (2012). "Urinary bisphenol A concentration and risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women." Circulation **125**(12): 1482-90.
- Melzer, D., N. E. Rice, et al. (2010). "Association of urinary bisphenol a concentration with heart disease: evidence from NHANES 2003/06." PLoS One **5**(1): e8673.
- Miyawaki, J., K. Sakayama, et al. (2007). "Perinatal and postnatal exposure to bisphenol a increases adipose tissue mass and serum cholesterol level in mice." J Atheroscler Thromb **14**(5): 245-52.
- Miyazaki, M., M. T. Flowers, et al. (2007). "Hepatic stearyl-CoA desaturase-1 deficiency protects mice from carbohydrate-induced adiposity and hepatic steatosis." Cell Metab **6**(6): 484-96.
- Nadal, A., P. Alonso-Magdalena, et al. (2009). "The pancreatic beta-cell as a target of estrogens and xenoestrogens: Implications for blood glucose homeostasis and diabetes." Mol Cell Endocrinol **304**(1-2): 63-8.
- Newbold, R. R. (2008). "Prenatal exposure to diethylstilbestrol (DES)." Fertil Steril **89**(2 Suppl): e55-6.
- Olsen, L., L. Lind, et al. (2012). "Associations between circulating levels of bisphenol A and phthalate metabolites and coronary risk in the elderly." Ecotoxicol Environ Saf **80**: 179-83.

- Phrakonkham, P., S. Viengchareun, et al. (2008). "Dietary xenoestrogens differentially impair 3T3-L1 preadipocyte differentiation and persistently affect leptin synthesis." J Steroid Biochem Mol Biol **110**(1-2): 95-103.
- Richter, C. A., L. S. Birnbaum, et al. (2007). "In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies." Reprod Toxicol **24**(2): 199-224.
- Rubin, B. S. and A. M. Soto (2009). "Bisphenol A: Perinatal exposure and body weight." Mol Cell Endocrinol **304**(1-2): 55-62.
- Ruijter, J. M., C. Ramakers, et al. (2009). "Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data." Nucleic Acids Res **37**(6): e45.
- Somm, E., V. M. Schwitzgebel, et al. (2009). "Perinatal exposure to bisphenol a alters early adipogenesis in the rat." Environ Health Perspect **117**(10): 1549-55.
- Sookoian, S. and C. J. Pirola (2011). "Meta-analysis of the influence of I148M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease." Hepatology **53**(6): 1883-94.
- Soriano, S., P. Alonso-Magdalena, et al. (2012). "Rapid insulinotropic action of low doses of bisphenol-A on mouse and human islets of Langerhans: role of estrogen receptor beta." PLoS One **7**(2): e31109.
- Tsatsos, N. G., L. B. Augustin, et al. (2008). "Hepatic expression of the SPOT 14 (S14) paralog S14-related (Mid1 interacting protein) is regulated by dietary carbohydrate." Endocrinology **149**(10): 5155-61.
- Vandenberg, L. N., R. Hauser, et al. (2007). "Human exposure to bisphenol A (BPA)." Reprod Toxicol **24**(2): 139-77.
- Wada, K., H. Sakamoto, et al. (2007). "Life style-related diseases of the digestive system: endocrine disruptors stimulate lipid accumulation in target cells related to metabolic syndrome." J Pharmacol Sci **105**(2): 133-7.
- Wang, H. H., N. H. Afdhal, et al. (2006). "Overexpression of estrogen receptor alpha increases hepatic cholesterogenesis, leading to biliary hypersecretion in mice." J Lipid Res **47**(4): 778-86.
- Wang, H. H., M. Liu, et al. (2009). "New insights into the molecular mechanisms underlying effects of estrogen on cholesterol gallstone formation." Biochim Biophys Acta **1791**(11): 1037-47.
- Wei, J., Y. Lin, et al. (2011). "Perinatal exposure to bisphenol A at reference dose predisposes offspring to metabolic syndrome in adult rats on a high-fat diet." Endocrinology **152**(8): 3049-61.

Zdravec, D., A. Brolinson, et al. (2010). "Ablation of the very-long-chain fatty acid elongase ELOVL3 in mice leads to constrained lipid storage and resistance to diet-induced obesity." *Faseb J* **24**(11): 4366-77.

Figure Legends

Figure 1. Effects of BPA exposure on hepatic gene expression related to cholesterol metabolism. Hepatic mRNAs from male CD-1 mice exposed to different doses of BPA (0, 5, 50, 500, and 5000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) were used to assay by qPCR the relative expression of genes involved in (A) cholesterol biosynthesis (Mvd: Mevalonate diphospho decarboxylase, Lss: Lanosterol synthase, Hmgcr: Hmg-coenzyme A reductase and Sqle: Squalene epoxidase), (B) master transcriptional regulators of cholesterol metabolism (Lxra: Liver X receptor alpha, Srebp-2: Sterol regulatory element binding transcription factor 2, FXR: Farnesoid X Receptor), (C) cholesterol ester synthesis (Acat1: acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1) and bile salt synthesis (Cyp7a1: Cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1, Cyp27a1: Cytochrome P450, family 27, subfamily a, polypeptide 1) and (D) cholesterol import (LDLr: Low-density lipoprotein receptor) and export (AbcA1: ATP-binding cassette transporter, AbcG1: ATP binding cassette transporter G1). All the data were normalized to TBP (TATA-box binding protein) mRNA expression levels. Values shown are the mean \pm sem (n = 6 per group). The data were analyzed by anova followed by post-hoc Student's test with a pooled variance estimate. Asterisk denotes a significant difference compared with control condition (0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ of BPA): *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

Figure 2. Effects of BPA exposure on hepatic gene expression related to glucose and lipid metabolisms. Hepatic mRNAs from male CD-1 mice exposed to different doses of BPA (0, 5, 50, 500, and 5000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) were used to assay by qPCR the relative expression of genes involved in (A) glucose metabolism (Pepck: Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1, Gck: Glucokinase, G6pase: Glucose-6-phosphatase and L-pk: Liver pyruvate kinase) and (B) lipogenesis (Acly: ATP citrate lyase, Scd1: Stearoyl-CoA desaturase-1, Fasn: Fatty acid synthase, Pnpla3: Patatin-like phosphoholipase domain containing 3, Spot14: Thyroid hormone responsive Spot14 homolog). All data were normalized to TBP (TATA-box binding protein) mRNA expression levels. Values shown are the mean \pm sem (n = 6 per group). Data were analyzed by anova followed by post-hoc Student's test with a pooled variance estimate. Asterisk denotes a significant difference compared with control condition (0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ of BPA): *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

Figure 3. Effects of BPA exposure on hepatic gene expression related to liver inflammation, and on liver and plasma biochemical parameters. (A) Hepatic mRNAs from male CD-1 mice exposed to different doses of BPA (0, 5, 50, 500, and 5000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) were used to assay by qPCR the relative expression of genes markers of liver injury (TNF α : Tumor necrosis factor- α , Il-6: Interleukin 6). (B) Neutral lipids were extracted from the livers of the same animals. After extraction, lipids were analyzed by gas chromatography. The presence of internal standards allowed quantifying neutral lipids. (C) Quantification of plasma total, HDL- and LDL- cholesterol and of (D) plasma insulin, glucose, free fatty acids and triglycerides from the same animals. Values shown are the mean \pm sem (n = 6 per group). The data were analyzed by anova followed by post-hoc Student's test with a pooled variance estimate. Asterisk denotes a significant difference compared with control condition (0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ of BPA): *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

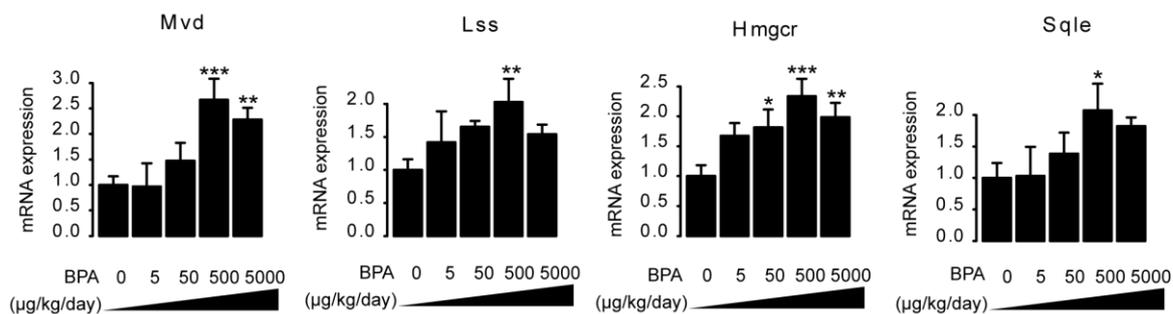
Figure 4. BPA increases the cellular lipid content and induces gene expression related to cholesterol and lipid metabolism *in vitro*. (A) Lipid accumulation was observed through confocal laser-scanning microscopy (magnification $\times 63$) after BODIPY 493/503 staining (green channel), for HepaI cells exposed for 24 hours to BPA (10^{-9} to 10^{-6} M), ethanol (Control) or oleic acid. Images are representative for one independent experiment. (B) mRNAs from mouse HepaI cell line exposed for 24 hours to different doses of BPA (10^{-9} to 10^{-6} M), DMSO (T), as the negative control of the experiment, were used to assay by qPCR the relative expression of genes involved in (A) cholesterol biosynthesis (Mvd: Mevalonate (diphospho) decarboxylase, Lss: Lanosterol synthase, Hmgcr: Hmg-coenzyme A reductase and Sqle: Squalene epoxidase) and lipogenesis (Scd1: Stearoyl-CoA desaturase-1, Fasn: Fatty acid synthase). All the data were normalized to TBP (TATA-box binding protein) mRNA expression levels. The data were analyzed by anova followed by post-hoc Student's test with a pooled variance estimate. Asterisk denotes a significant difference compared with control condition (DMSO): *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

Table 1. Oligonucleotide sequences for real time PCR

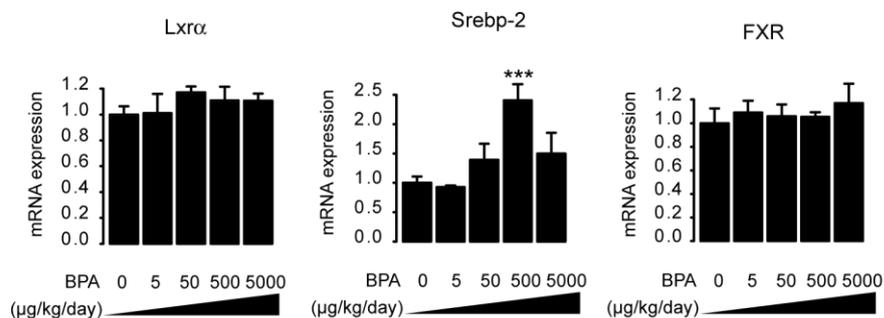
Gene	NCBI Refseq	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
Lipogenesis			
Acly	NM_134037	AAAGCTTGGCCTCGTCGG	GGGACGAAGGGTTCAATGAGA
Fasn	NM_007988	AGTCAGCTATGAAGCAATTGTGGA	CACCCAGACGCCAGTGTTC
Pnpla3	NM_054088	ACGCGGTACACCTTCGTGT	AGCCCGTCTCTGATGCACTT
Scd1	NM_009127	CCGAGACCCCTTAGATCGA	TAGCCTGTAAAAGATTTCTGCAAACC
Thsrp-Spot14	NM_009381	AACGGAGGAGGCCGAAGAAG	GTTGATGCACCTCGGGGTCT
Bile acid synthesis			
Cyp27a1	NM_024264	CTGCACTTGCCCGACCTC	CACTAGCCAGATTCACATTGGTGT
Cyp7a1	NM_007824	AGCAACTAAACAACCTGCCAGTACTA	GCCGCAGAGCCTCCTTG
Cholesterol biosynthesis			
Mvd	NM_138656	CGGTCAACATCGCAGTTATCAA	GTGCAGCGTGACGCTCAG
Hmgcr	NM_008255	CTTGTGGAATGCCTTGTGATTG	GAAGAATGTCATGAACACAAAGTAGTTG
Lss	NM_146006	ATGAGTTGGGTCGGCAGAGAT	GCGCTTTTGGAAGTCCGTG
Sqle	NM_009270	GGAGGCTACCGTGTCTCCA	CTGCACTTGGTTGGTTTCTGAC
Cholesterol esterification			
Acat1	NM_144784	ATTACTCCCATCACCATCTCAGTG	CACGGTCTTGAGCTTTGGC
Cholesterol import/export			
Ldlr	NM_010700	GCAAGGACATGAGCGACGA	CTCCCCACTGTGACACTTGAAC
AbcA1	NM_013454	GCGCTACAACATGGACATCCT	GCTGGGTCGGGAGATGAGA
AbcG1	NM_009593	CGGCCGTGAACATCGAAT	AGCTCCAGAAGGACCCATGA
Fatty acid oxydation			
Cyp4a14	NM_007822	TCAGTCTATTTCTGGTGTCTTC	GAGCTCCTTGTCTTCAGATGGT
Peci	NM_011868	CCCTTCTGGGACTATTTGATGCT	TGGCTGAATGGAGTATGAAACG
Glycolysis			
Gck	NM_010292	TCGAGGTGGAGAGCGA	TCGCAGTCGGCGACAGA
L-pk	NM_013631	TCGACTCAGAGCCTGTGGC	AGTCGTGCAATGTTTCATCCCT
Markers of liver injury			
Il-6	NM_031168	AGCCAGAGTCCTTCAGAGAGATACA	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTCT
TNF α	NM_013693	TCCCAAAGGGATGAGAAGTTC	GCGCTGGCTCAGCCACT
Neoglucogenesis			
G6pase	NM_008061	CTCACTTTCCCACCAGGTC	GCTGAAAGTTTCAGCCACAGC
Pepck	NM_011044	GAACCCAGCCTGCC	GAGCAACTCMAAAAAACCCG
Transcription factors			
Fxr	NM_009108	CCACCGGCTGTCAGGATT	CGCGTGTCTGTTAGCATACCTT
LXR α	NM_013839	GGAGTGTGACTTCGCAAATG	TCAAGCGGATCTGTTCTTCTGAC
Srebp-1c	NM_011480	CAGACTGGCCGAGATGTG	CTTGGTTGTTGATGAGCTGGAG
Srebp-2	NM_033218	GTA CTGCGCCAGAGGAGC	GCCTGAGGTTTCACCAAGGAC

Figure 1

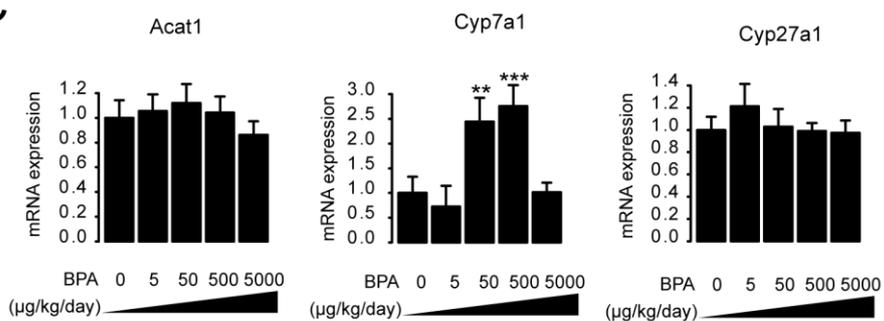
A



B



C



D

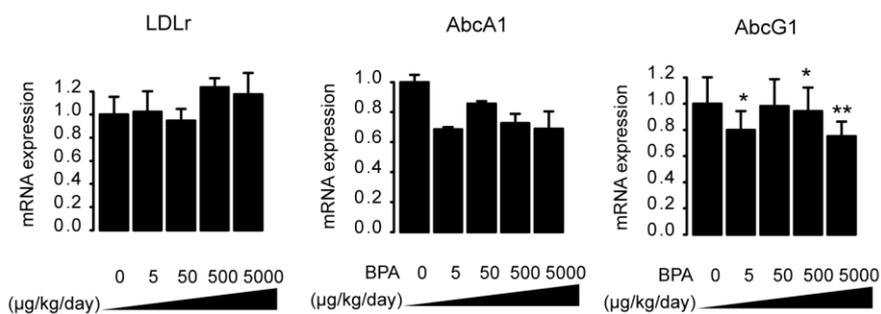
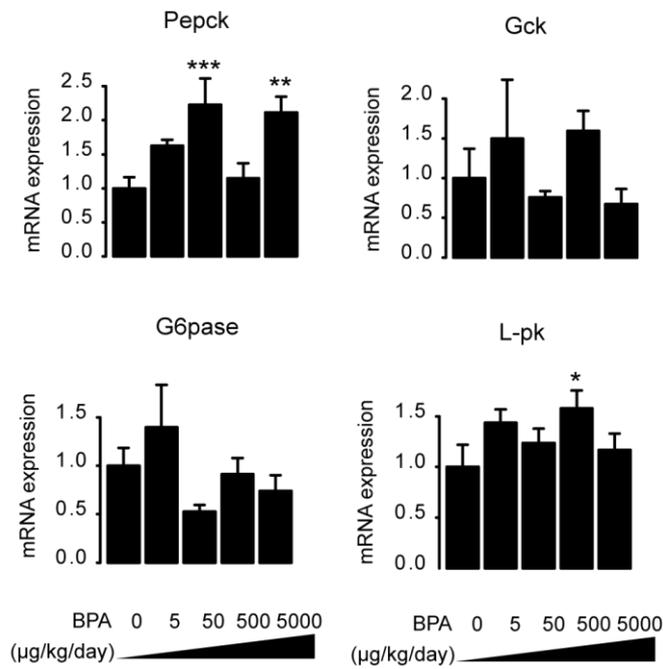


Figure 2

A



B

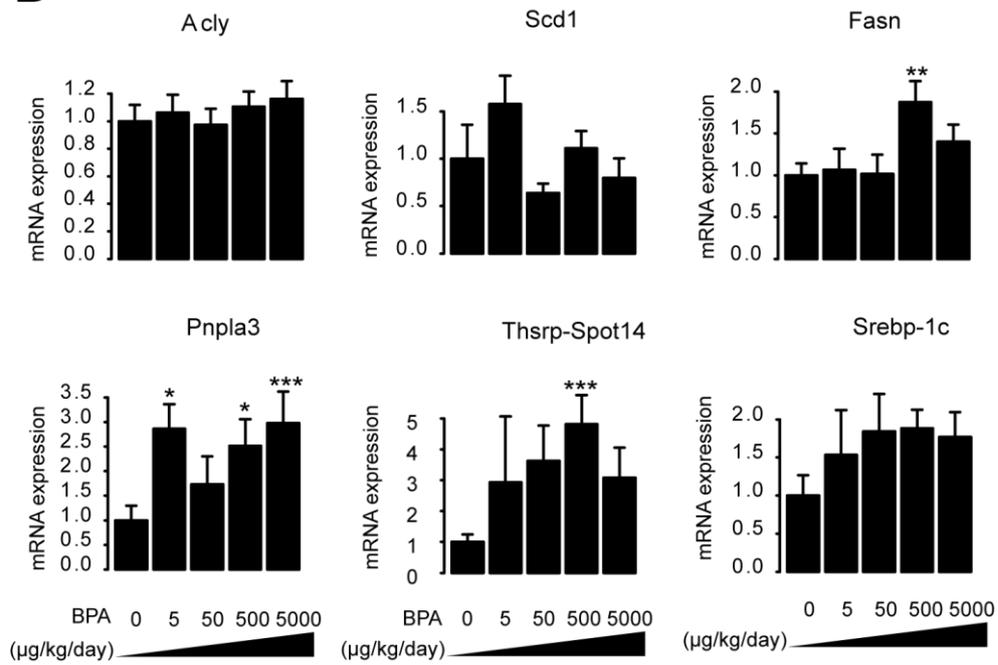
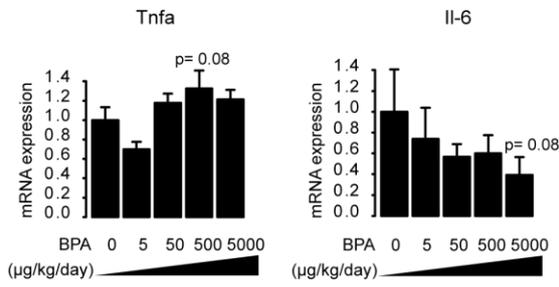
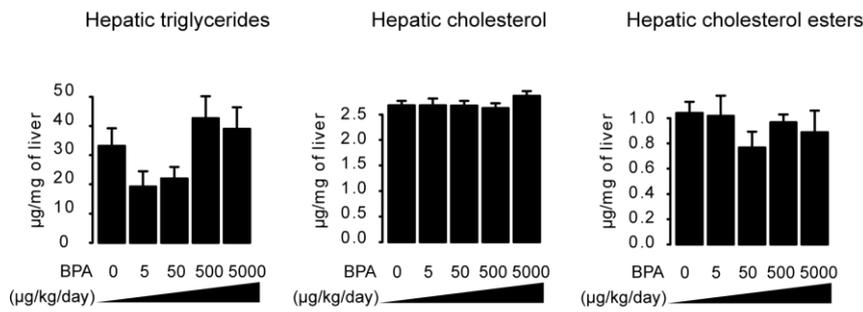


Figure 3

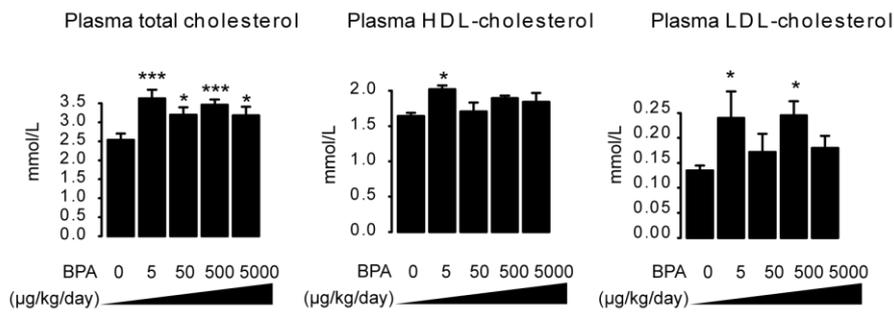
A



B



C



D

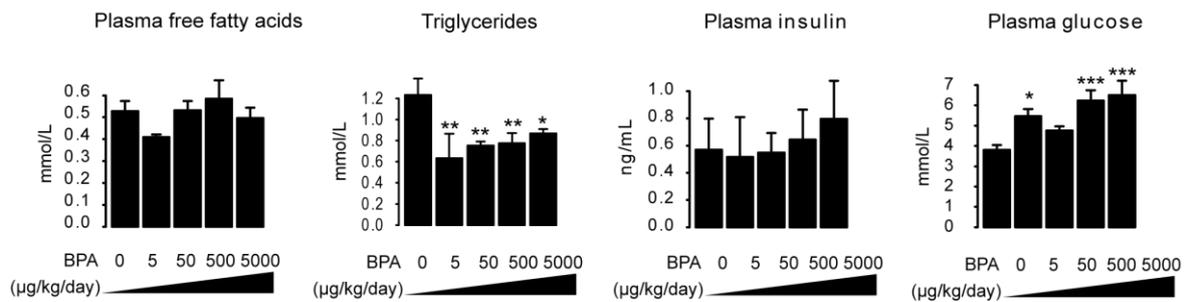
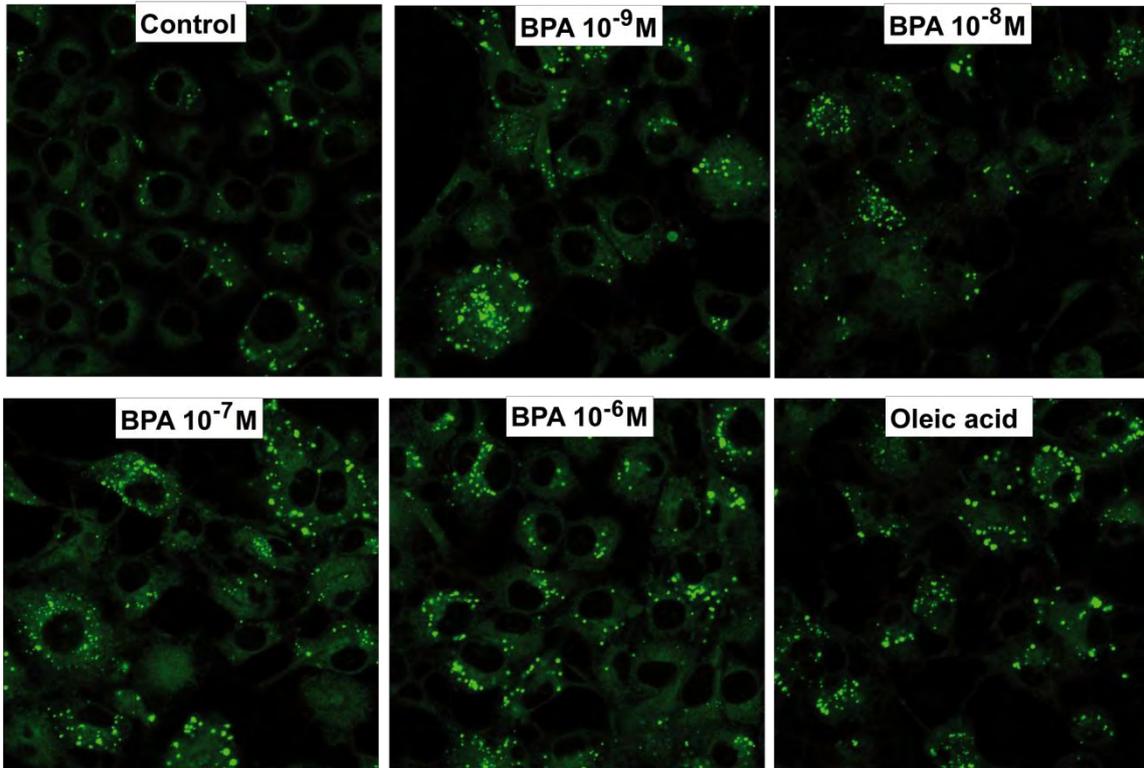


Figure 4

A



B

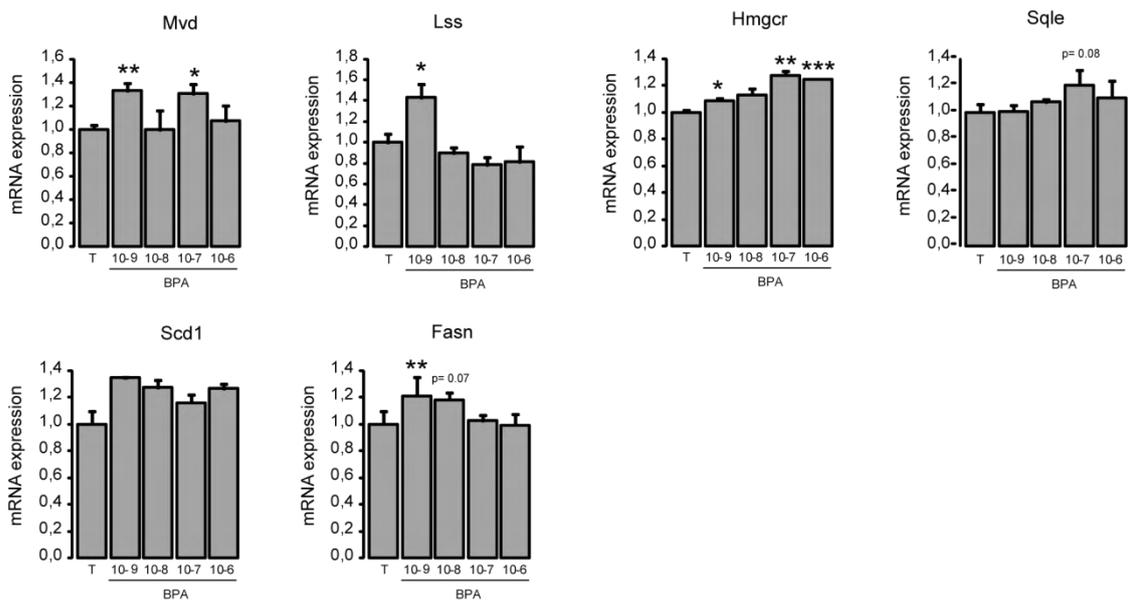


Table 2. Cellular lipid content after *in vitro* BPA exposure. Cellular neutral lipid content of HepaI cells was evaluated by flow cytometry using BODIPY 493/503 after a 24h BPA (10^{-9} to 10^{-6} M) or oleic acid treatment. The figures indicated in the table represent the median values obtained from the histograms relative to BODIPY fluorescence.

Treatment	Bodipy Median 493nm-A
Control	2.69
BPA 10^{-9} M	56.91
BPA 10^{-8} M	56.89
BPA 10^{-7} M	61.53
BPA 10^{-6} M	49.94
Oleic acid	71.79

ARTICLE EN PRÉPARATION N°2: ADIPONUTRIN/PNPLA3, A MARKER OF HEPATIC STEATOSIS IS REGULATED BY THE CONSTITUTIVE ANDROSTANE RECEPTOR

Les récepteurs nucléaires CAR et PXR protègent l'organisme contre l'agression par des toxiques environnementaux, en participant à la régulation transcriptionnelle des enzymes essentielles aux voies de détoxification qui permettent de les métaboliser et de les éliminer. Des études récentes attribuent à ces récepteurs un rôle dans le métabolisme énergétique. Mais cette dernière fonction reste mal comprise et les données de la littérature sont contradictoires.

Dans cette étude, nous avons mis en évidence une régulation du gène de l'adiponutrine/Pnpla3 par les récepteurs nucléaires CAR. Ce gène dont la fonction, associée à la lipogenèse hépatique, est encore mal caractérisée, a émergé comme un marqueur génétique de la stéatose hépatique. Un variant de ce gène (I148M, substitution d'une méthionine à la place d'une isoleucine au niveau du résidu 148), a récemment été associé à la stéatose hépatique et à son évolution vers des formes plus graves (Dubuquoy, Burnol et al. 2012; Kawaguchi, Sumida et al. 2012). La régulation de Pnpla3 indique plutôt un rôle en faveur de la lipogenèse (activité de type transacylase) (He, McPhaul et al. 2010; Qiao, Liang et al. 2011). Les médiateurs clés de cette régulation sont les facteurs de transcription ChREBP, SREBP-1c et LXR (Huang, He et al. 2010; Dubuquoy, Robichon et al. 2011).

Dans cette étude nous avons mis en évidence une régulation de l'expression de ce gène par le récepteur nucléaire CAR. Chez la souris, l'activation de CAR par un agoniste puissant, le TCPOBOP (3 mg/kg/j ; 72h ; injection intra péritonéale), induit l'expression hépatique du gène Pnpla3. Ces effets sont dépendants du récepteur CAR puisqu'ils sont perdus dans un modèle de souris transgéniques déficientes pour ce récepteur (souris CAR^{-/-}). Le même profil d'expression a été observé pour un autre membre de la famille des PNPLA, le gène Pnpla5, dont la fonction est encore mal définie mais semble similaire à celle du gène Pnpla3. L'induction d'expression de Pnpla3 par CAR a été confirmée *in vitro* sur des lignées d'hépatocytes murins et humains surexprimant ce récepteur. Une première approche *in silico*, réalisée en collaboration avec le Dr Jean-Marc Pascussi, montre un élément de réponse de type DR-4 à -2800 pb en amont du promoteur du gène Pnpla3. Des analyses sont actuellement en cours avec des plasmides portant différents fragments du promoteur du gène Pnpla3 (fragments de -3.3 kb, -1.8 kb, -0.7 kb, -0.3 kb) en amont du gène de la luciférase pour mieux localiser l'élément de réponse à CAR au niveau de ce promoteur. Ce travail est fait en collaboration avec l'équipe de Catherine Postic qui a cloné ce promoteur (Dubuquoy et al., 2012).

Parallèlement à l'induction de Pnpla3, nous avons également mis en évidence une induction d'expression par CAR d'autres gènes lipogéniques (Fas, Spot14) ainsi que de ceux impliqués dans la synthèse du cholestérol (Hmgcr, Mvd, Sqle). Ces dérégulations transcriptomiques ont conduit à une accumulation de

triglycérides et d'esters de cholestérol au niveau hépatique. Ces effets sont CAR-dépendants puisque non observés chez les souris CAR^{-/-}. Ces résultats complètent les données de la littérature, assez contradictoires, au sujet de l'implication de CAR en tant que régulateur du métabolisme énergétique. De plus, ils mettent en évidence le risque de développement des troubles métaboliques chez les patients exposés à des médicaments ou polluants activateurs du xénorécepteur CAR.

Dans ce manuscrit, nous avons choisi de ne reporter que les effets de régulation de PNPLA3 par CAR mais nos résultats préliminaires suggèrent que ce gène est régulé de la même manière par le récepteur PXR.

En effet, chez la souris, l'activation du récepteur PXR par le PCN (40 mg/kg/j ; 72 heures ; injection intra-péritonéale) conduit à l'induction hépatique des gènes cibles de ce récepteur (Cyp2b10 et Cyp3a11) et du gène Pnpla3. Ces effets ne sont plus observés chez les souris transgéniques déficientes pour le récepteur PXR (PXR^{-/-}) traitées au PCN (**Figure 29**).

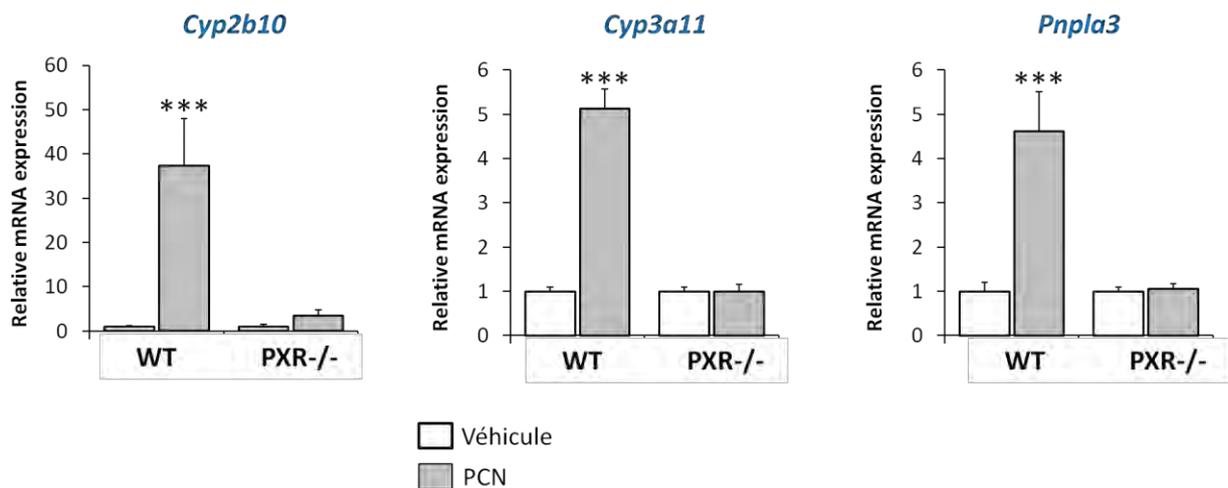


Figure 29. Le traitement au PCN induit l'expression de Pnpla3, de manière PXR-dépendante.

Des souris mâles contrôles ou déficientes pour le récepteur nucléaire PXR (fond génétique C57BL/6J ; 6 semaines) ont été traitées au PCN à (40 mg/kg/j ; 72 heures ; injection intra péritonéale 100 µl d'huile), un activateur de ce récepteur. Les foies ont été prélevés et l'analyse relative des gènes cibles de PXR (Cyp2b10, Cyp3a11) et du gène d'intérêt Pnpla3 a été réalisée par qPCR. Toutes les données ont été normalisées avec les niveaux d'expression du gène TBP. Les valeurs indiquées représentent la moyenne +/- l'erreur type de la moyenne. Les données ont été analysées par l'analyse de la variance suivie par un test de student avec le logiciel R. Les astérisques indiquent une différence significative entre la condition traitée (PCN) par rapport à la condition non traitée (Véhicule) pour chaque génotype, ***P<0,001.

ADIPONUTRIN, A MARKER OF HEPATIC STEATOSIS IS REGULATED BY THE CONSTITUTIVE ANDROSTANE RECEPTOR

Alice Marmugi^{a, b}, et al.

^a INRA; TOXALIM (Research Centre in Food Toxicology); 180 chemin de Tournefeuille, F-31027 Toulouse, France.

^b Université de Toulouse; INP; UPS; TOXALIM; F-31027 Toulouse, France

Correspondence to: Dr Laila Mselli-Lakhal, ToxAlim UMR1331 INRA/INPT/UPS, Integrative Toxicology & Metabolism group, 180 chemin de Tournefeuille, BP 93173, 31027 Toulouse Cedex 3, FRANCE. Tel: +33 561285153. Fax: +33 561285310. laila.lakhal@toulouse.inra.fr

Keywords: Steatosis; SNP; xenosensor; Xenobiotic receptor; Drug-metabolizing enzyme; lipid metabolism

Acknowledgments: This work was supported by grants from the ANR (CES PerinaTox program and CRISALIS) and by the Région Midi-Pyrénées. Alice Marmugi is funded by a grant from INRA Animal Health Department and the Région Midi-Pyrénées.

Abbreviations: CAR, constitutive androstane receptor; steatosis, PNPLA3, adiponutrin

Abstract

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is an emerging epidemic disease. The etiology of NAFLD is multifactorial. However, a single nucleotide polymorphism (SNP) rs738409 or I148M in patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3) has recently been associated with hepatic fat accumulation and disease progression in patients with NAFLD. While its *in vivo* function remains controversial, PNPLA3 shows triacylglycerol hydrolase and transacylase activities *in vitro*. Hepatic expression of PNPLA3 depends on the nutritional status. It is weakly expressed in fasting animals but strongly induced with carbohydrate feeding. This nutritional regulation involves transcription factors such as the sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c), the liver X receptor (LXR) and the carbohydrate response element binding protein (ChREBP), known to be key mediators of lipid and glucose homeostasis. In the present study, we report the induction of PNPLA3 gene expression in animals treated with TCPOBOP which is a pharmacological agonist of the constitutive androstane receptor (CAR). The same pattern of expression was observed for PNPLA5 but not for PNPLA2, two other members of PNPLA family. Several other hepatic genes involved in lipogenesis (Fas, Spot14, Gpat) and cholesterol biosynthesis (Hmgcr, Mvd, Sqle) were up-regulated in TCPOBOP-treated animals. This was associated with a significant increase in hepatic triglyceride and cholesterol ester accumulation. Such changes in the hepatic expression of PNPLA3 and lipid metabolism occur in a CAR-dependant way since they were not observed in CAR^{-/-} mice.

In conclusion, these results identify PNPLA3 as a new target gene for CAR and highlight the increased risk of NAFLD in response to drug or pollutant exposure likely to activate the CAR xenosensor.

Introduction

Non-alcoholic fatty liver diseases (NAFLD) encompass a wide spectrum of hepatic abnormalities associated with the accumulation of lipids in the liver (Yu and Keeffe 2002). This spectrum ranges from benign lipid accumulation, which does not disturb the liver function, to more severe liver damage associated with inflammation called nonalcoholic steatohepatitis (NASH), and in more severe cases to advanced fibrosis or cirrhosis (Yu and Keeffe 2002; Cohen, Horton et al. 2011). NAFLD and NASH are the hepatic manifestations of the metabolic syndrome (Milic and Stimac 2012). It has become a common cause of liver transplant and an important risk factor for the development of hepatocellular carcinoma mostly due to NAFLD-associated cirrhosis (Marrero, Fontana et al. 2002; Bullock, Zaitoun et al. 2004).

The etiology of NAFLD is multifactorial (Cave, Deaciuc et al. 2007). Environmental factors such as caloric imbalance and diet composition, sedentary lifestyle and obesity are key players in the increasing risk for NAFLD development and progression. Xenobiotics exposure to drugs and industrial petrochemical agents has been documented to induce NAFLD even in the absence of obesity, diabetes, dyslipidemia and insulin resistance (Cotrim, Andrade et al. 1999; Cotrim, De Freitas et al. 2004). Hepatic steatosis induced by xenobiotics appears to be associated with more than one mechanism, including increased *de novo* fatty acid (FA) synthesis, decreased FA oxidation, decreased export of FA from the liver mediated by very-low-density lipoprotein (VLDL) secretion, or the increased influx of FA to the liver from peripheral organs (Amacher 2011).

Family studies and interethnic variations in susceptibility suggest that genetic factors are also important in determining NAFLD risk development and evolution (Osterreicher and Brenner 2007). It has been suggested that polymorphisms in the genes encoding microsomal triglyceride transfer protein (MTT), *insulin receptor substrate 1 (IRS-1)*, adipose triglyceride lipase (*ATGL*), tumor necrosis factor alpha ($\text{TNF-}\alpha$), transforming growth factor-beta ($\text{TGF-}\beta$), and angiotensinogen may be associated with steatohepatitis and/or fibrosis (Day 2006; Hooper, Adams

et al. 2011).

Recently, a polymorphism in the *adiponutrin/PNPLA3* gene has emerged as a new genetic marker of human hepatic steatosis (Romeo, Kozlitina et al. 2008). The sequence variant in PNPLA3 (rs738409 C/G) leads to an isoleucine to methionine substitution at the amino acid position 148 of ADPN (I148M). The PNPLA3 gene encodes a 481 amino acid protein belonging to a large family of PNPLA (patatin-like phospholipase domain containing) enzymes, defined by the presence of a patatin domain, harboring a lipase/esterase activity, which was originally discovered in the potato tuber (Wilson, Gardner et al. 2006; Kienesberger, Oberer et al. 2009). Despite its high clinical relevance, the molecular function of PNPLA3 and the mechanism through which I148M variant affects hepatic metabolism are unclear. Lastly, overexpression of this variant in human hepatoma cells was shown to increase triglyceride (TG) accumulation, suggesting that PNPLA3 could participate in liver lipid homeostasis (Dubuquoy, Robichon et al. 2011). In a more recent study, Kumari et al. reported a lysophosphatidic acid acyltransferase (LPAAT) activity of PNPLA3, this activity being increased in the I148M variant of human PNPLA3 (Kumari, Schoiswohl et al. 2012). Liver-specific over-expression of Pnpla3 I148M human mutant in mice was shown to increase hepatic TG content with numerous enlarged lipid droplets (Li, Huang et al. 2012). PNPLA3 is regulated by the nutritional status; its expression is induced upon high-carbohydrate diet feeding and decreased upon fasting (Lake, Sun et al. 2005; Huang, He et al. 2010). PNPLA3 gene expression was shown to be under the transcriptional control of SREBP-1c (sterol regulatory element binding protein1c) and ChREBP (carbohydrate-response element-binding protein) in response to insulin and glucose respectively (Dubuquoy, Robichon et al. 2011; Qiao, Liang et al. 2011). The LXR agonist TO901317 also induced PNPLA3 expression in a SREBP-1c dependent way (Huang, He et al. 2010).

In the present study we report the regulation of PNPLA3 gene expression by another nuclear receptor, the constitutive androstane receptor (CAR, NR1I3). CAR was initially identified as a

xenosensor regulating xenobiotic and drug metabolism, and elimination (Willson and Kliewer 2002). An increasing body of evidence suggests that CAR also plays a critical role in energy homeostasis through the regulation of glucose and lipid metabolism (Moreau, Vilarem et al. 2008; Wada, Gao et al. 2009; Gao and Xie 2010). These new data highlight the risk of metabolic disorder development as a consequence of the crossroad between xenobiotic and energy regulation by the liver.

Material and methods

Chemicals. Culture media and additives were purchased from Gibco-Life technologies (Saint Aubin, France). Dimethylsulfoxide (DMSO), 1,4-Bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene (TCPOBOP) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

Animals and treatment. 11-week-old male C57BL/6J wild-type mice (WT) and CAR null mice (CAR^{-/-}) (n=6/group) were administered TCPOBOP (3 mg/kg) by intraperitoneal injection in corn-oil for 3 days. Mice were housed in a pathogen-free animal facility under a standard 12-h light, 12-h dark cycle with free access to water and food. Experiments were conducted under E.U. guidelines for the use and care of laboratory animals and were approved by an independent ethic committee.

Blood and Organ Sampling. Blood was collected at the submandibular vein in heparin-coated capillaries. Plasma was prepared by centrifugation (2,000g; 10 minutes) and kept at 80°C until use. Following euthanasia (fed state), the liver and the perigonadic white adipose tissue (pWAT) were removed, weighed, dissected, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until use.

Biochemical Assays. Hepatic lipid content and FA composition were determined as described in (Zadravec, Brolinson et al. 2010). Plasma levels of triglycerides, free fatty acids, glucose, total cholesterol, low- or high-density lipoprotein (LDL, HDL) cholesterol were determined on a biochemical analyzer, COBASMIRA+. Plasma insulin was assayed with the ultrasensitive mouse insulin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Crystal Chem, Downers Grove, IL).

Histology. Frozen liver samples were embedded in Neg 50 (Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). Sections (5 μm , Leica RM2145 microtome, Nanterre, France) were stained with Oil-Red-O and hematoxylin/ eosin and visualized with a Leica DFC300 camera (Leica).

Culture cell experiments. Mouse and human hepatocyte cell lines (respectively Jwz and HepG2 cell lines) were seeded at a density of respectively 8×10^5 and 4×10^5 cells in a six-well plate and were transfected using lipofectamine 2000 (Invitrogen, Cergy Pontoise) with 5 μg of pCR3 plasmid (empty plasmid) or with pmCAR and phCAR plasmids (respectively murine and human isoforms) in a pCR3 plasmid construction.

Luciferase reporter gene assay. The 3.3 kb and 0.2 kb Pnpla3 promoter construct (1.3 μg), cloned into pGL3-basic vector and obtained from Dr Modes (Dubuquoy, Robichon et al. 2011) and the (NR1)₅-tk-luc pGL3 construct (0.2 μg), used as positive control and obtained from Dr. Negishi, were transfected with 25 ng of pRL-TK plasmid expressing the renilla luciferase, and 0.2 μg of pmCAR or pCR3 on NIH3T3 cells into 12-well tissue culture plates, by using Superfect transfection reagent (Quiagen, Courtaboeuf). Three hours after transfection, cells were treated with 10 μM of DMSO or androstenol (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier), a CAR inverse agonist. After 24 hours exposure, cells were lysed in cell culture lysis reagent (Promega, Madison, USA). Luciferase activities were determined according to the manufacturer's instruction (Dual-Luciferase® Reporter (DLR™) Assay System, Promega). Lysate samples were assayed in

triplicate. The firefly luciferase activity of each sample was normalized to the renilla luciferase activity. Results are expressed as mean +/- SEM of three independent experiments.

Gene expression studies. Total RNA was extracted with TRIzol reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Transcriptomic profiles were obtained by real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR), total RNA samples (2 µg) were reverse-transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Primers for SYBR Green assays are presented in Table 1. Amplifications were performed on an ABI Prism 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems). qPCR data were normalized by TATA-box binding protein (TBP) messenger RNA (mRNA) levels and analyzed with LinRegPCR (Ruijter et al., 2009).

Statistical Analysis. All the data were analyzed using R (www.r-project.org). Differential effects were analyzed through analysis of variance (ANOVA) followed by Student's t tests with a pooled variance estimate. $p < 0.05$ was considered significant.

Results

TCPOBOP treatment increased the liver weight. Male C57BL/6J wild type or CAR null mice (CAR^{-/-}) were administered 3 mg/kg/day of the CAR agonist TCPOBOP for three days. TCPOBOP treatment had no effect on body weight gain and perigonadic white adipose tissue (pWAT) but induced an expected CAR-dependent increase in liver weight (Figure 1) (Costa, Kalinichenko et al. 2005).

TCPOBOP treatment induces Pnpla3 and Pnpla5 gene expression both in vivo and in vitro. Gene expression analysis revealed a CAR-dependent induction of the prototypic CAR target genes Cyp2b10 (cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 10), Cyp2c29 (cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 29) and Cyp3a11 (cytochrome P450, family 3, subfamily A,

polypeptide 11) in response to TCPOBOP treatment (Figure 2A). TCPOBOP-treated animals also presented an increase in the patatin-like phospholipase domain-containing proteins 3 and 5 (Pnpla3 and Pnpla5) but not 2 (Pnpla2) (Figure 2B). The effect is more pronounced on Pnpla3 (8 fold induction) than on Pnpla5 (4 fold induction). The TCPOBOP- Pnpla3 and Pnpla5 inductions were observed in WT mice but not in transgenic mice lacking CAR (CAR^{-/-}), suggesting an involvement of this nuclear receptor in the regulation of these two Pnpla genes.

In mouse (JWZ) and human (HepG2) hepatocyte cell lines, the surexpression of murin (pmCAR) or human (phCAR) CAR proteins, which have been shown to be constitutively active in these cell lines (Kawamoto, Sueyoshi et al. 1999), resulted in the induction of expression of Cyp2b10 and CYP2B6 respectively (Figure 3). In both cases a significant induction of Pnpla3 gene expression was observed, suggesting a possible extrapolation of the results obtained in mice to humans.

Analysis of Pnpla3 promoter. To better understand the mechanisms of Pnpla3 regulation by CAR, we investigated, through *in silico* analysis, the Pnpla3 promoter for the presence of CAR specific responsive elements. A DR4 element was found in the -2740 pb up stream of Pnpla3 ATG (data not shown). Mouse Pnpla3 promoter luciferase reporter assays in NIH3T3 cells have shown an increase of luciferase activity when Pnpla3 3.3 kb construct was co-transfected with pmCAR. This effect is abrogated when androstenol- a CAR inverse agonist- was used, suggesting a possible interaction of CAR with Pnpla3 promoter (Figure 4).

TCPOBOP treatment induces deregulation of hepatic genes related to lipid and glucose metabolism. We then investigated the expression of other metabolic genes that were deregulated in response to CAR activation by TCPOBOP treatment. We evaluated through qPCR analysis the effects of the TCPOBOP treatment on the deregulation of essential pathways involved in carbohydrate and fat metabolism in the liver. We evidenced an effect of TCPOBOP treatment on genes involved in glucose homeostasis through the repression of Phosphoenolpyruvate

carboxykinase 1 (Pepck) and induction of Glucokinase (Gck) without impacting Glut 2 transporter and Glucose-6-phosphatase (G6pase) (Figure 5A). CAR activation also impacted the expression of some lipogenic genes. A significant effect was observed on the expression of the fatty acid synthase (Fas) and of the glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) involved in triacylglycerol synthesis (Figure 5B). The Thyroid hormone responsive Spot14 homolog (Spot14), a protein known to transduce hormone-related and nutriment-related signals to genes involved in lipogenesis through a molecular mechanism which has not been elucidated yet (Figure 5B), was also highly induced (5 fold induction compared to control). All of these regulations were CAR-dependent since they were observed in the WT but not in the CAR^{-/-} mice.

The expression of some genes involved in oxidative pathways was also observed in the TCPOBOP-treated mice. CAR activation resulted in Cytochrome P450, family 4, subfamily A, polypeptide 14 (Cyp4a14) and Canitine palmitoyltransferase (Cpt1a) repression in a CAR-dependent way (Figure 5C). The mitochondrial 3-2-trans enoyl-CoA isomerase (ECI) expression was induced by TCPOBOP while the expression of Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1 (Acox1) was not modified (Figure 5C).

TCPOBOP influences the expression of genes involved in cholesterol synthesis. Finally cholesterol metabolism was impacted by a CAR-dependant induction of key enzymes of cholesterol biosynthesis such as the Hydroxy methyl glutaryl-coenzyme A reductase (Hmgcr), the Mevalonate diphospho decarboxylase (Mvd), and the Squalene epoxidase (Sqle). It also induced the expression of low density lipoprotein receptor (Ldlr), the major transport cholesterol-carrying lipoprotein particles into hepatocytes, and repressed the ATP-binding cassette transporter AbcA1 gene, involved in cholesterol efflux (Figure 5D).

Hepatic lipid accumulation in response to TCPOBOP. To evaluate whether such changes in gene expression are correlated with changes in hepatic lipids, we stained hepatic neutral lipids with Oil-

red-O. The pictures in Figure 6A illustrate a greater accumulation of lipids in the livers of mice exposed to TCPOBOP compared to controls (WT mice). This increase was not observed in the CAR^{-/-} mouse liver. A difference was observed in the basal lipid accumulation between the WT mice and the CAR^{-/-} mice. The CAR^{-/-} mice accumulated slightly more lipid contents than the WT mice. The quantification of liver lipid content by gas chromatography confirmed these observations. Liver triglycerides and cholesterol ester were significantly increased for the TCPOBOP-treated mice compared to control (Figure 6B), while this was unchanged in the CAR^{-/-} mice. TCPOBOP treatment had no effect on the level of total hepatic cholesterol (Figure 6B). A CAR-dependent decrease in plasma total cholesterol, HDL-cholesterol (high density lipoprotein), LDL-cholesterol-LDL (low density lipoprotein), triglyceride and in glucose levels was also observed in the TCPOBOP-treated animals while no significant effect was observed in the plasma levels of insulin and free fatty acids (Figure 6C).

Discussion

This study is the first report on the regulation of Pnpla3 and 5 gene expression by the CAR xenosensor. CAR was initially characterized as a xenosensor regulating the responses of mammals to xenotoxicants. Recently published results have also implicated this receptor in the control of energy metabolism. However, the exact role of CAR in the regulation of metabolism remains controversial. Many studies reported a decrease of rate-limiting enzymes of FA oxidation like Cyp4A14, Cpt1 and ECI (Ueda, Hamadeh et al. 2002; Maglich, Lobe et al. 2009), and gluconeogenesis like PEPCCK and G6Pase (Argaud, Halimi et al. 1991; Ueda, Hamadeh et al. 2002) in response to CAR activation. The results obtained in our study are consistent with these data since we observed a decrease in Cyp4A14, Cpt1 and PEPCCK in the TCPOBOP-treated animals. However, the effect of CAR on lipogenesis is more controversial. In some studies, CAR was shown to induce *de novo* FA synthesis or uptake through up-regulation of Spot14, a gene known to transduce hormone and nutriment related signals to genes regulating lipid metabolism

(Breuker, Moreau et al. 2010). In some others, CAR agonist administration was shown to suppress lipogenic gene expression and reduce triglyceride levels, to relieve hepatic steatosis and to reduce VLDL secretion from the liver (Dong, Saha et al. 2009; Gao, He et al. 2009; Masuyama and Hiramatsu 2012), suggesting that CAR activation may be an interesting target in the treatment of fatty liver diseases (Swanson, Wada et al. 2012). However, these observations were made in leptine deficient mice (ob/ob), in high-fat diet (HFD)-induced type 2 diabetic model or in HFD-induced obese pregnant mice. The present study evaluated CAR activation effect on lipogenesis in the context of a normal diet. In this case, our results are consistent with those observed by Breuker et al. (Breuker, Moreau et al. 2010) since we observe an increase of lipogenic genes and of liver triglycerides rather than a decrease. Thus, CAR nuclear receptor seems to exert concomitant and antagonist actions; the overall effect resulting from a subtle balance, depending on the metabolic context.

Treatment with phenobarbital, a representative of CAR activators, has long been known to affect serum cholesterol levels in rodents and humans, suggesting the association of CAR with cholesterol homeostasis (Luoma, Myllyla et al. 1982; Salonen, Happonen et al. 1987; Heller, Desager et al. 1988; Kiyosawa, Tanaka et al. 2004). However, there is little evidence demonstrating that CAR is involved in the transcriptional regulation of cholesterologenic genes (Ueda, Hamadeh et al. 2002; Rezen, Tamasi et al. 2009; Tojima, Kakizaki et al. 2012). In the present study we have found that CAR activation increases the mRNA levels of *Hmgcr*, *Mvd*, and *Sqle*, three key enzymes of cholesterol biosynthesis. Cholesterol ester were also increased in the liver of TCPOBOP treated animals, but decreased in the plasma. This is probably due to a higher uptake of LDL particles from blood to the liver and a decrease of cholesterol efflux, since we observed respectively an up-regulation of the *Ldlr* and a down-regulation of *AbcA1* gene expression in TCPOBOP-treated animals in a CAR-dependant way.

There are some data on the mechanisms through which CAR regulates genes involved in gluconeogenesis or β -oxidation, but little information on the mechanisms of regulation of lipogenic genes. It was suggested that CAR inhibits gluconeogenic enzyme gene expression through competition or direct binding to other transcription factors like hepatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4 α) (Miao, Fang et al. 2006) and the Forkhead box protein O1 (FOXO1) (Kodama, Koike et al. 2004). Interaction with another Forkhead box protein, the FOXA-2, was suggested to explain the inhibition of β -oxydation-related genes like CPT1 by PXR (a cousin of CAR) (Nakamura, Moore et al. 2007). The PXR-mediated lipogenesis was shown to be independent of SREBP-1c, which is distinct from that mediated by LXR (Zhou, Zhai et al. 2006). In the present study we identified a DR-4 type CAR-responsive element in the mouse Pnpla3 promoter, suggesting a direct activation of this gene by CAR. LXR was also shown to promote Pnpla3 transcription when activated with its agonist, the T0901317. But the mechanism proposed was through an activation of SREBP-1c rather than by direct binding to Pnpla3 gene (Huang, He et al. 2010). It was proposed that hepatic lipid accumulation induced by the CAR and PXR xenosensors may trap lipophilic xenobiotics through intracellular vacuolar sequestration. This may reduce or retard the deleterious accumulation of these lipophilic compounds (Breuker, Moreau et al. 2010). However it can be speculated that long-term exposure to CAR and PXR drug and pollutant activators may also promote aberrant hepatic *de novo* lipogenesis, leading potentially to fatty liver diseases. Furthermore, the identification of Pnpla3 as a CAR sensitive gene suggests that the drugs targeting CAR may have very harmful effects on liver functions in patients with the rs738409 (GG) genotype.

References

1. Yu AS, Keeffe EB. Nonalcoholic fatty liver disease. Rev Gastroenterol Disord 2002;2:11-19.

2. Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science* 2011;332:1519-1523.
3. Milic S, Stimac D. Nonalcoholic fatty liver disease/steatohepatitis: epidemiology, pathogenesis, clinical presentation and treatment. *Dig Dis* 2012;30:158-162.
4. Marrero JA, Fontana RJ, Su GL, Conjeevaram HS, Emick DM, Lok AS. NAFLD may be a common underlying liver disease in patients with hepatocellular carcinoma in the United States. *Hepatology* 2002;36:1349-1354.
5. Bullock RE, Zaitoun AM, Aithal GP, Ryder SD, Beckingham IJ, Lobo DN. Association of non-alcoholic steatohepatitis without significant fibrosis with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2004;41:685-686.
6. Cave M, Deaciuc I, Mendez C, Song Z, Joshi-Barve S, Barve S, McClain C. Nonalcoholic fatty liver disease: predisposing factors and the role of nutrition. *J Nutr Biochem* 2007;18:184-195.
7. Cotrim HP, Andrade ZA, Parana R, Portugal M, Lyra LG, Freitas LA. Nonalcoholic steatohepatitis: a toxic liver disease in industrial workers. *Liver* 1999;19:299-304.
8. Cotrim HP, De Freitas LA, Freitas C, Braga L, Sousa R, Carvalho F, Parana R, et al. Clinical and histopathological features of NASH in workers exposed to chemicals with or without associated metabolic conditions. *Liver Int* 2004;24:131-135.
9. Amacher DE. The mechanistic basis for the induction of hepatic steatosis by xenobiotics. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2011;7:949-965.
10. Osterreicher CH, Brenner DA. The genetics of nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol* 2007;6:83-88.
11. Hooper AJ, Adams LA, Burnett JR. Genetic determinants of hepatic steatosis in man. *J Lipid Res* 2011;52:593-617.
12. Day CP. Genes or environment to determine alcoholic liver disease and non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2006;26:1021-1028.
13. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, Boerwinkle E, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet* 2008;40:1461-1465.
14. Wilson PA, Gardner SD, Lambie NM, Commans SA, Crowther DJ. Characterization of the human patatin-like phospholipase family. *J Lipid Res* 2006;47:1940-1949.
15. Kienesberger PC, Oberer M, Lass A, Zechner R. Mammalian patatin domain containing proteins: a family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions. *J Lipid Res* 2009;50 Suppl:S63-68.
16. Dubuquoy C, Robichon C, Lasnier F, Langlois C, Dugail I, Fougelle F, Girard J, et al. Distinct regulation of adiponutrin/PNPLA3 gene expression by the transcription factors ChREBP and SREBP1c in mouse and human hepatocytes. *J Hepatol* 2011;55:145-153.
17. Kumari M, Schoiswohl G, Chitraju C, Paar M, Cornaciu I, Rangrez AY, Wongsiriroj N, et al. Adiponutrin functions as a nutritionally regulated lysophosphatidic acid acyltransferase. *Cell Metab* 2012;15:691-702.
18. Li JZ, Huang Y, Karaman R, Ivanova PT, Brown HA, Roddy T, Castro-Perez J, et al. Chronic overexpression of PNPLA3I148M in mouse liver causes hepatic steatosis. *J Clin Invest* 2012.
19. Huang Y, He S, Li JZ, Seo YK, Osborne TF, Cohen JC, Hobbs HH. A feed-forward loop amplifies nutritional regulation of PNPLA3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:7892-7897.
20. Lake AC, Sun Y, Li JL, Kim JE, Johnson JW, Li D, Revett T, et al. Expression, regulation, and triglyceride hydrolase activity of Adiponutrin family members. *J Lipid Res* 2005;46:2477-2487.

21. Qiao A, Liang J, Ke Y, Li C, Cui Y, Shen L, Zhang H, et al. Mouse patatin-like phospholipase domain-containing 3 influences systemic lipid and glucose homeostasis. *Hepatology* 2011;54:509-521.
22. Willson TM, Kliewer SA. PXR, CAR and drug metabolism. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1:259-266.
23. Gao J, Xie W. Pregnane X receptor and constitutive androstane receptor at the crossroads of drug metabolism and energy metabolism. *Drug Metab Dispos* 2010;38:2091-2095.
24. Wada T, Gao J, Xie W. PXR and CAR in energy metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2009;20:273-279.
25. Moreau A, Vilarem MJ, Maurel P, Pascussi JM. Xenoreceptors CAR and PXR activation and consequences on lipid metabolism, glucose homeostasis, and inflammatory response. *Mol Pharm* 2008;5:35-41.
26. Zadavec D, Brolinson A, Fisher RM, Carneheim C, Csikasz RI, Bertrand-Michel J, Boren J, et al. Ablation of the very-long-chain fatty acid elongase ELOVL3 in mice leads to constrained lipid storage and resistance to diet-induced obesity. *FASEB J* 2010;24:4366-4377.
27. Costa RH, Kalinichenko VV, Tan Y, Wang IC. The CAR nuclear receptor and hepatocyte proliferation. *Hepatology* 2005;42:1004-1008.
28. Kawamoto T, Sueyoshi T, Zelko I, Moore R, Washburn K, Negishi M. Phenobarbital-responsive nuclear translocation of the receptor CAR in induction of the CYP2B gene. *Mol Cell Biol* 1999;19:6318-6322.
29. Ueda A, Hamadeh HK, Webb HK, Yamamoto Y, Sueyoshi T, Afshari CA, Lehmann JM, et al. Diverse roles of the nuclear orphan receptor CAR in regulating hepatic genes in response to phenobarbital. *Mol Pharmacol* 2002;61:1-6.
30. Maglich JM, Lobe DC, Moore JT. The nuclear receptor CAR (NR1I3) regulates serum triglyceride levels under conditions of metabolic stress. *J Lipid Res* 2009;50:439-445.
31. Argaud D, Halimi S, Catelloni F, Leverve XM. Inhibition of gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes after chronic treatment with phenobarbital. *Biochem J* 1991;280 (Pt 3):663-669.
32. Breuker C, Moreau A, Lakhel L, Tamasi V, Parmentier Y, Meyer U, Maurel P, et al. Hepatic expression of thyroid hormone-responsive spot 14 protein is regulated by constitutive androstane receptor (NR1I3). *Endocrinology* 2010;151:1653-1661.
33. Masuyama H, Hiramatsu Y. Treatment with a constitutive androstane receptor ligand ameliorates the signs of preeclampsia in high-fat diet-induced obese pregnant mice. *Mol Cell Endocrinol* 2012;348:120-127.
34. Dong B, Saha PK, Huang W, Chen W, Abu-Elheiga LA, Wakil SJ, Stevens RD, et al. Activation of nuclear receptor CAR ameliorates diabetes and fatty liver disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:18831-18836.
35. Gao J, He J, Zhai Y, Wada T, Xie W. The constitutive androstane receptor is an anti-obesity nuclear receptor that improves insulin sensitivity. *J Biol Chem* 2009;284:25984-25992.
36. Swanson H, Wada T, Xie W, Renga B, Zampella A, Distrutti E, Fiorucci S, et al. Role of Nuclear Receptors in Lipid Dysfunction and Obesity-related Diseases. *Drug Metab Dispos* 2012.
37. Heller FR, Desager JP, Harvengt C. Changes in plasma activities of lipolytic enzymes and lipids of normolipidemic subjects given phenobarbital, a strong microsomal inducer, alone or in combination with fenofibrate. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1988;26:138-142.

38. Kiyosawa N, Tanaka K, Hirao J, Ito K, Niino N, Sakuma K, Kanbori M, et al. Molecular mechanism investigation of phenobarbital-induced serum cholesterol elevation in rat livers by microarray analysis. *Arch Toxicol* 2004;78:435-442.
39. Salonen JT, Happonen P, Salonen R, Korhonen H, Nissinen A, Puska P, Tuomilehto J, et al. Interdependence of associations of physical activity, smoking, and alcohol and coffee consumption with serum high-density lipoprotein and non-high-density lipoprotein cholesterol--a population study in eastern Finland. *Prev Med* 1987;16:647-658.
40. Luoma PV, Myllyla VV, Hokkanen E. Relationship between plasma high-density lipoprotein cholesterol and anticonvulsant levels in epileptics. *J Cardiovasc Pharmacol* 1982;4:1024-1027.
41. Tojima H, Kakizaki S, Yamazaki Y, Takizawa D, Horiguchi N, Sato K, Mori M. Ligand dependent hepatic gene expression profiles of nuclear receptors CAR and PXR. *Toxicol Lett* 2012;212:288-297.
42. Rezen T, Tamasi V, Lovgren-Sandblom A, Bjorkhem I, Meyer UA, Rozman D. Effect of CAR activation on selected metabolic pathways in normal and hyperlipidemic mouse livers. *BMC Genomics* 2009;10:384.
43. Miao J, Fang S, Bae Y, Kemper JK. Functional inhibitory cross-talk between constitutive androstane receptor and hepatic nuclear factor-4 in hepatic lipid/glucose metabolism is mediated by competition for binding to the DR1 motif and to the common coactivators, GRIP-1 and PGC-1alpha. *J Biol Chem* 2006;281:14537-14546.
44. Kodama S, Koike C, Negishi M, Yamamoto Y. Nuclear receptors CAR and PXR cross talk with FOXO1 to regulate genes that encode drug-metabolizing and gluconeogenic enzymes. *Mol Cell Biol* 2004;24:7931-7940.
45. Nakamura K, Moore R, Negishi M, Sueyoshi T. Nuclear pregnane X receptor cross-talk with FoxA2 to mediate drug-induced regulation of lipid metabolism in fasting mouse liver. *J Biol Chem* 2007;282:9768-9776.
46. Zhou J, Zhai Y, Mu Y, Gong H, Uppal H, Toma D, Ren S, et al. A novel pregnane X receptor-mediated and sterol regulatory element-binding protein-independent lipogenic pathway. *J Biol Chem* 2006;281:15013-15020.

Figure legends

Figure 1. Effects of TCPOBOP treatment on wild-type (WT) and CAR null (CAR^{-/-}) mice on body weight gain, liver and adipose tissue weight. Body weight gain, liver weight (relative to body weight) and perigonadic white adipose tissue (pWAT) weight (relative to body weight) of male WT and CAR^{-/-} mice treated for 72 h with vehicle or TCPOBOP (3 mg/kg/day; n=6 animals/group; 4 i.p injection) were measured. The data were analyzed by anova followed by post-hoc Student's test with a pooled variance estimate. Asterisk denotes a significant difference compared with control condition for each genotype: ***P<0.001.

Figure 2. CAR activation induces Pnpla3 gene expression *in vivo*. Hepatic mRNAs from male WT and CAR^{-/-} mice treated for 72 h with vehicle or TCPOBOP (3 mg/kg/day; 4 i.p injections) were used to assay by qPCR the relative expression of (A) Cytochrome P450 family as positive

controls of the experiment (Cyp2b10: Cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 10, Cyp2c29: Cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 29, Cyp3a11: Cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 11), and (B) PNPLA family (Pnpla3, 5, 2: Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3, 5, 2). All the data were normalized to TBP (TATA-box binding protein) mRNA expression levels. Values shown are the mean \pm sem (n = 6 per group). The data were analyzed by anova followed by post-hoc Student's test with a pooled variance estimate. Asterisk denotes a significant difference compared with control condition of each genotype: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

Figure 3. CAR activation induces Pnpla3 *in vitro*. Mouse and human hepatocyte cell lines (respectively Jwz and HepG2 cell lines) were transfected with pCR3 plasmid (empty) or with CAR (respectively murine or human isoform) cloned in pCR3 plasmid. Levels of Cyp2b10(mouse)/CYP2B6(human) and Pnpla3 mRNAs were quantified and normalized to TBP. The data were analyzed by anova followed by post-hoc Student's test with a pooled variance estimate. Asterisk denotes a significant difference compared with pCR3 conditions: *P<0.05; **P<0.01.

Figure 4. Luciferase reporter gene assay for the analysis of Pnpla3 promoter. The NIH3T3 cell line was transfected with 3.3 kb Pnpla3 promoter construct or 0.2 kb Pnpla3 promoter construct or the (NR1)₅-tk-luc construct, respectively used as negative and positive control of the transfection, and co-transfected with the plasmids pmCAR or pCR3. Three hours after transfection, cells were treated with 10 μ M of DMSO or androstenol, a CAR inverse agonist. The firefly luciferase activity of each sample was normalized to the renilla luciferase activity. Results are expressed as mean \pm SEM of three independent experiments.

Figure 5. Effects of CAR on hepatic gene expression related to glucose metabolism, lipogenesis, fatty acid oxidation and cholesterol biosynthesis. Hepatic mRNAs from male WT and CAR null mice (CAR^{-/-}) treated with the CAR agonist, TCPOBOP (3mg/kg/day; 72h; 4 i.p injections) were used to assay by qPCR the relative expression of genes involved in (A) glucose metabolism (Pepck: Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1, Glut 2: Glucose transporter 2, Gck: Glucokinase and G6pase: Glucose-6-phosphatase); (B) lipogenesis (Acly: ATP citrate lyase, , Fas: Fatty acid synthase, Scd1: Stearoyl-CoA desaturase-1, Spot14: Thyroid hormone responsive Spot14 homolog); (C) fatty acid oxidation (Cpt1a: Carnitine palmitoyltransferase 1A, Eci: enoyl-

CoA isomerase, Acox1: Acyl-coenzyme A oxidase 1, Cyp4a14: Cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 14); (D) cholesterol biosynthesis (Hmgcr: Hmg-coenzyme A reductase, Mvd: Mevalonate (diphospho) decarboxylase, Sqle: Squalene epoxidase) and transport (Ldlr: Low-density lipoprotein receptor, AbcA1: ATP-binding cassette transporter, AbcG1: ATP binding cassette transporter G1). All the data were normalized to TBP (TATA-box binding protein) mRNA expression levels. The values shown are the mean \pm sem (n = 6 per group). The data were analyzed by anova followed by post-hoc Student's test with a pooled variance estimate. Asterisk denotes a significant difference compared with control condition for each genotype: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

Figure 6. Accumulation of hepatic triglycerides and cholesterol esters after CAR activation and effects on plasma parameters. (A) Oil-red O-staining of neutral lipids performed on histological sections of livers from WT and CAR^{-/-} mice treated to CAR agonist TCPOBOP. Neutral lipids appear in red (original magnification X 200). (B) Neutral lipids were extracted from the liver of WT and CAR^{-/-} mice TCPOBOP-treated. After extraction, lipids were analyzed by gas chromatography. The presence of internal standards enabled to quantify the neutral lipids. (C) Quantification of plasma glucose, insulin, triglycerides, free fatty acids (FFA) and cholesterol (total, HDL, LDL) from the same animals. The data were analyzed by anova followed by post-hoc Student's test with a pooled variance estimate. Asterisk denotes a significant difference compared with control condition for each genotype: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

Figure 1

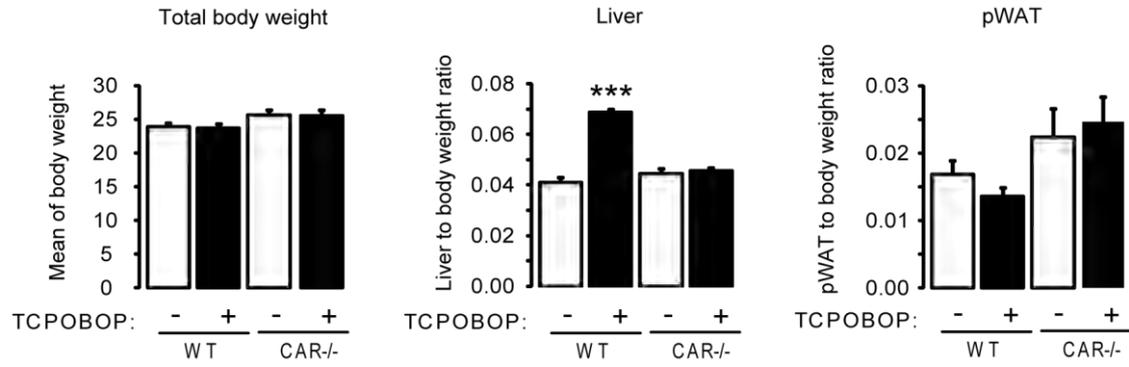
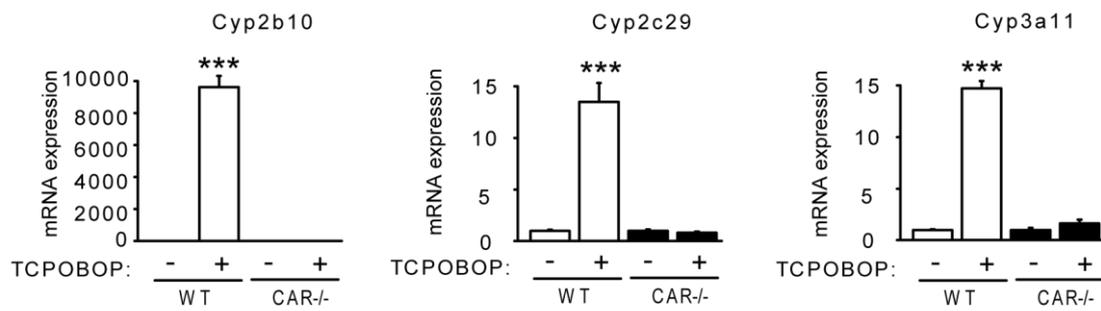


Figure 2

A



B

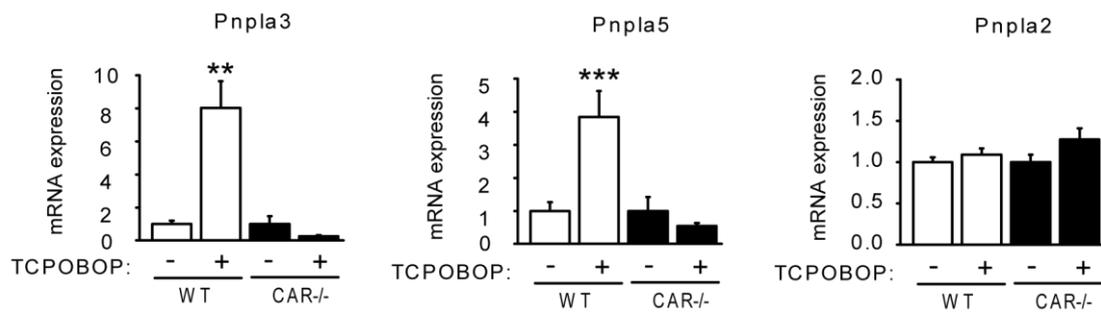


Figure 3

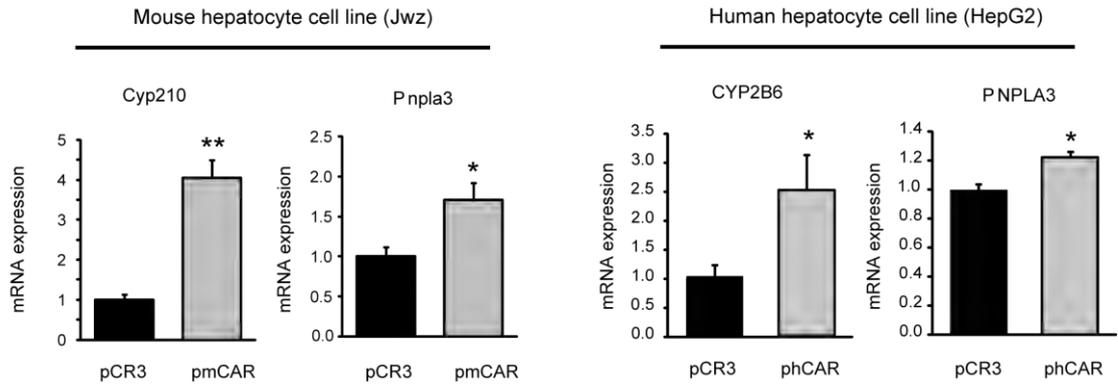


Figure 4

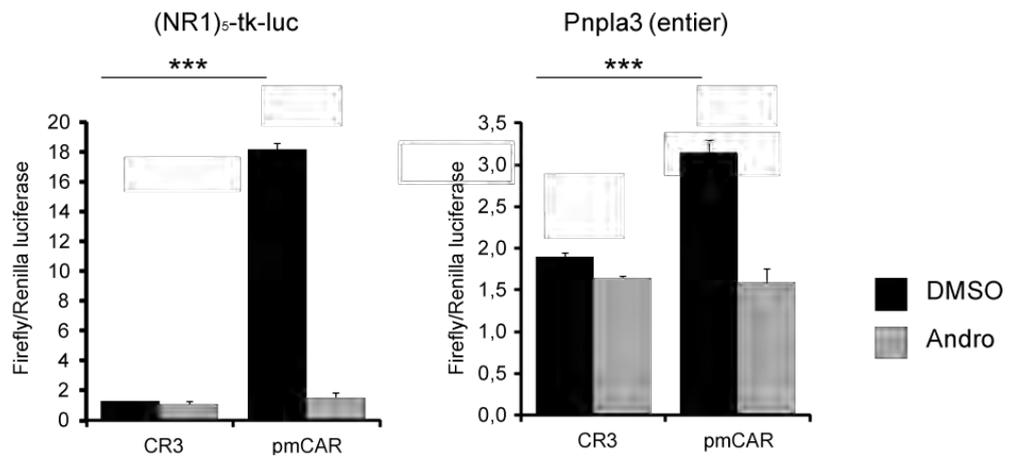
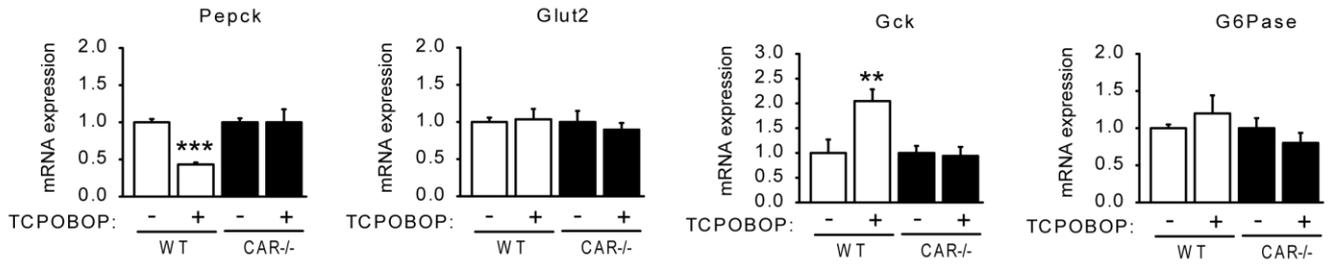
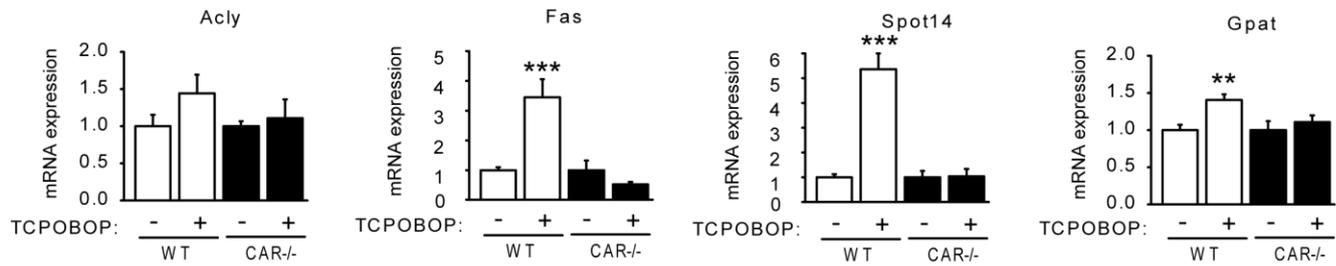


Figure 5

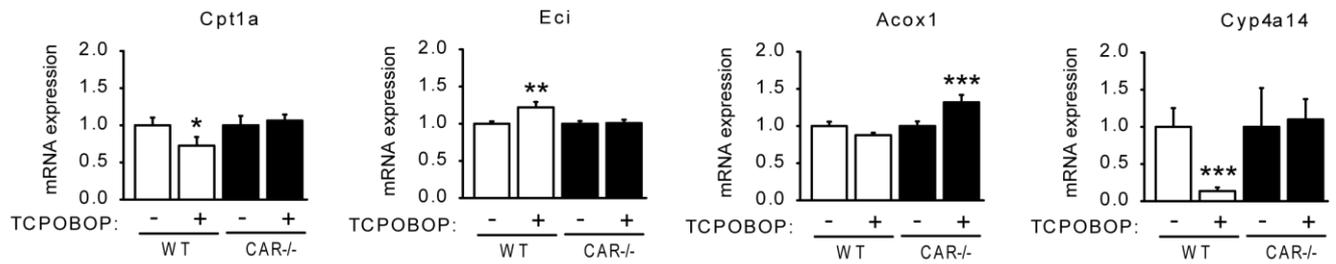
A



B



C



D

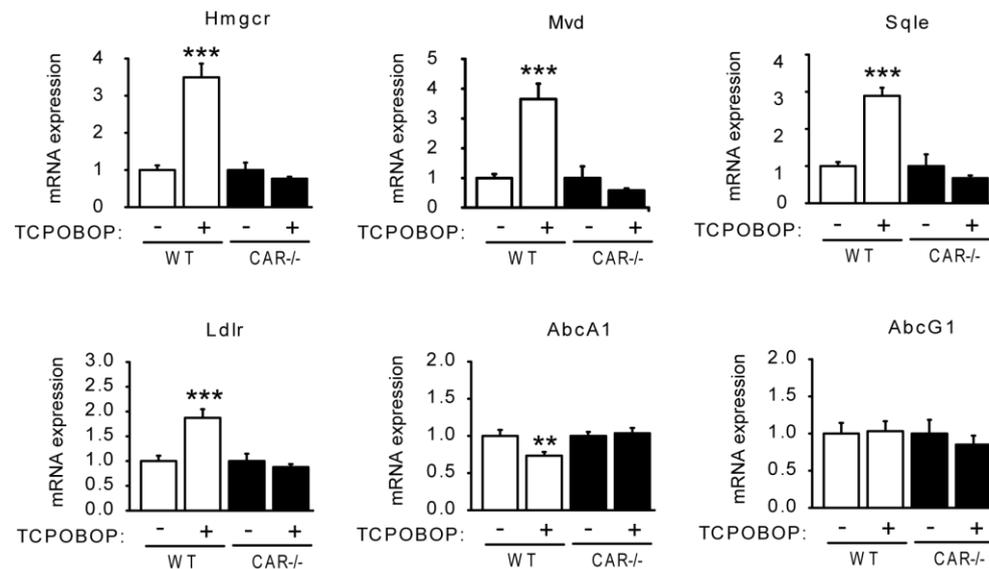
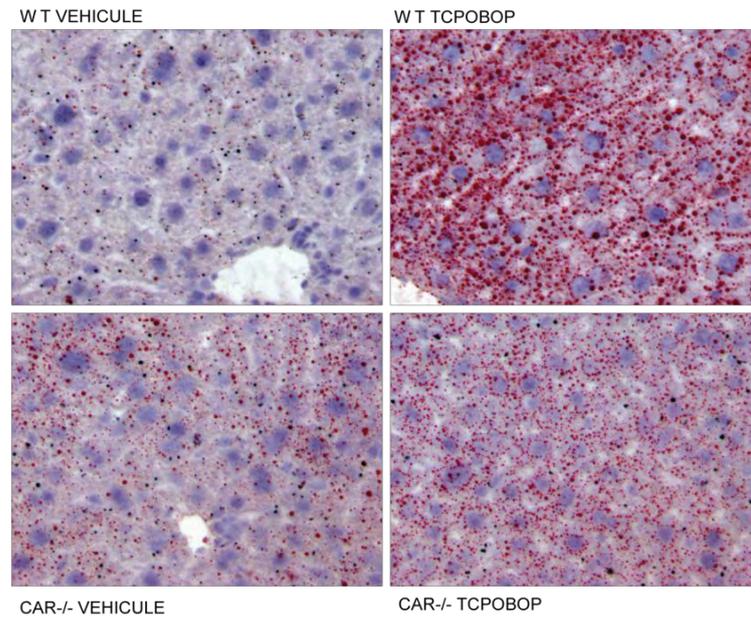
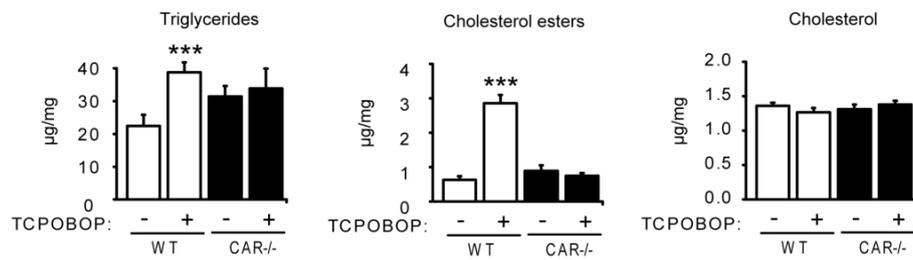


Figure 6

A



B



C

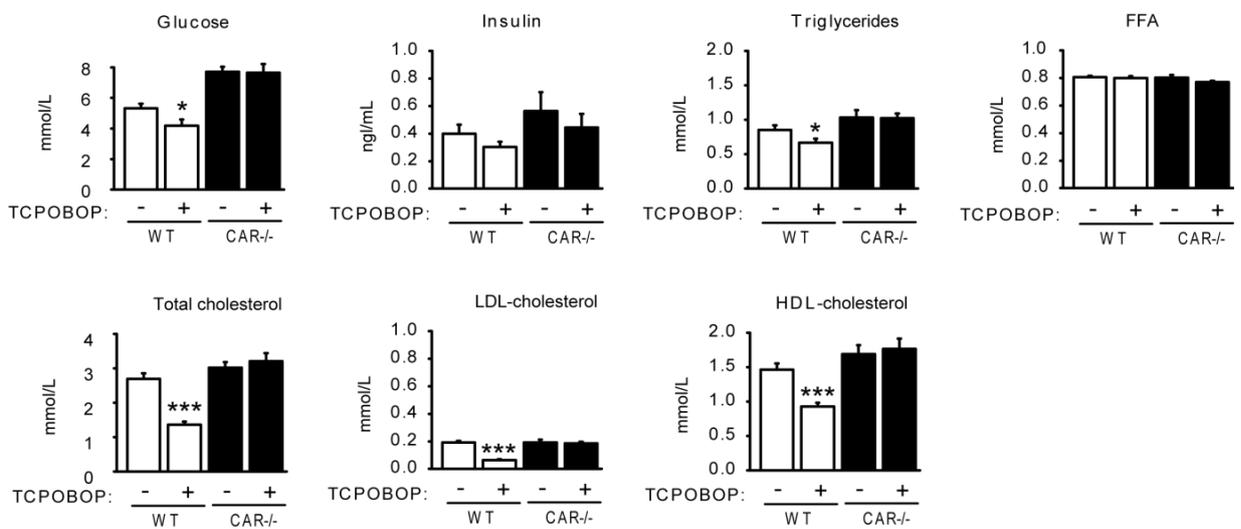


Table 1 : Oligonucleotide sequences for real time PCR

Mus Muculus

Gene	NCBI Refseq	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
Acly	NM_134037	AAAGCTTGGCCTCGTCGG	GGGACGAAGGGTTCAATGAGA
AbcA1	NM_013454	GCGCTACAACATGGACATCCT	GCTGGGTCGGGAGATGAGA
AbcG1	NM_009593	CGGCCGTGAACATCGAAT	AGCTCCAGAAGGACCCATGA
Acox1	NM_015729	CAGACCCTGAAGAAATCATGTGG	CAGGAACATGCCCAAGTGAAG
Cpt1a	NM_013495	GAAGAAGAAGTTCATCCGATTCAAG	GATATCACACCCACCACCACG
Cyp2b10	NM_009999	TTTCTGCCCTTCTCAACAGGAA	ATGGACGTGAAGAAAAGGAACAAC
Cyp2c29	NM_007815	GCTCAAAGCCTACTGTCA	CATGAGTGTAATCGTCTCA
Cyp3a11	NM_007818	TCACACACACAGTTGTAGGCAGAA	GTTTACGAGTCCCATATCGGTAGAG
Cyp4a14	NM_007822	TCAGTCTATTTCTGGTGTCTTC	GAGCTCCTTGCTTTCAGATGGT
Eci	NM_010023	GTTACCATCAGCCTGGAGAAG	AGAAGATACCCGGGCATTCC
Fas	NM_007988	AGTCAGCTATGAAGCAATTGTGGA	CACCCAGACGCCAGTGTTCC
G6pase	NM_008061	CTCACTTTCCCACCAGGTC	GCTGAAAGTTTCAGCCACAGC
Gck	NM_010292	TCGCAGGTGGAGAGCGA	TCGCAGTCGGCGACAGA
Glut2	NM_031197	TTTGCAGTGGCGGAATGG	GCCAACATTGCTTTGATCCTT
Gpat	NM_008149	AGACGAAGCCTCCGACGA	TGGACATGATAGCGCAGGACT
Hmgcr	NM_008255	CTTGTGGAATGCCTTGTGATTG	GAAGAATGTCATGAACACAAAGTAGTTG
Ldlr	NM_010700	GCAAGGACATGAGCGACGA	CTCCCCACTGTGACACTTGAAC
Mvd	NM_138656	CGGTCAACATCGCAGTTATCAA	GTGCAGCGTGACGCTCAG
Pepck	NM_011044	GAACCCCAGCCTGCCC	GAGCAACTCCAAAAACCCG
Pnpla2	NM_025802	AGTGTCTTCACCATCCGCTT	GGATATCTTCAGGGACATCAGGC
Pnpla3	NM_054088	ACGCGGTCACCTTCGTGT	AGCCCGTCTCTGATGCACCTT
Pnpla5	NM_029427	GCTACTGCCCTGTACACTGCC	GATGCTCCTCATCCAATCCAA
Scd1	NM_009127	CCGGAGACCCCTTAGATCGA	TAGCCTGTAAAAGATTTCTGCAAACC
Spot14	NM_009381	AACGGAGGAGGCCGAAGAAG	GTTGATGCACCTCGGGGTCT
Sqle	NM_009270	GGAGGCTACCGTGTCTCCA	CTGCACTTGGTTGGTTTCTGAC

Homo Sapiens

Gene	NCBI Refseq	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
CYP2B6	NM_000767	GGAGGAGCGGATTCAGGAG	TGGAATCGTTTTCCAAGACG
PNPLA3	NM_025225	ACCCTCTCGCCAGGCT	CACCTTTGCTTTTCATTTCTCACTC

DISCUSSION & PERSPECTIVES

Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés à la survenue de perturbations métaboliques, résultant d'exposition à des xénobiotiques, au niveau du foie, un organe représentant un carrefour important entre détoxification et métabolisme énergétique. Nous avons utilisé deux approches, la première consistant à étudier les effets de l'exposition à un perturbateur métabolique de type endocrinien, le BPA. La seconde a consisté à étudier les effets de l'activation de CAR et, à un degré moindre, de PXR, par une approche pharmacologique. Ces deux récepteurs nucléaires jouant un rôle primordial dans la régulation du métabolisme des xénobiotiques ont récemment été identifiés comme des régulateurs du métabolisme énergétique.

IMPACT DE L'ENVIRONNEMENT SUR LA SURVENUE DE DÉSORDRES MÉTABOLIQUES : L'EXEMPLE DU BPA

Au commencement de ce travail, de nombreuses études réalisées sur modèles animaux avaient montré une grande variété d'effets liés à une exposition périnatale au BPA (altération de certaines fonctions cérébrales, du système reproducteur, du système immunitaire et du métabolisme). Des études épidémiologiques montraient une corrélation entre les concentrations urinaires de BPA et la prévalence de pathologies cardiovasculaires, du diabète et de l'élévation de marqueurs de toxicité hépatique, et que 90% de la population américaine était exposée à ce contaminant (Calafat, Ye et al. 2008). Des études réalisées sur modèles rongeurs permettaient de corréler une exposition périnatale au BPA et des troubles métaboliques de type perturbation de l'homéostasie glucidique et lipidique, une augmentation de la masse du tissu adipeux et du poids des animaux (Alonso-Magdalena, Vieira et al.; Miyawaki, Sakayama et al. 2007; Somm, Schwitzgebel et al. 2009; Wei, Lin et al. 2011). Les conséquences d'exposition au BPA sur le foie avaient été peu abordées. Nos travaux réalisés chez la souris adulte exposée pendant 4 semaines au BPA montrent pour la première fois un effet de ce contaminant sur l'accumulation de lipides hépatiques, associée à une induction de l'expression des gènes clés du métabolisme lipido-glucidique. Les niveaux en insuline sont également augmentés. De manière intéressante, l'ensemble de ces dérégulations suit une courbe dose-réponse non monotone, c'est-à-dire que les effets significatifs sont observés à des doses de BPA proches voire inférieures à la dose journalière tolérable (50 µg/kg/jour), alors qu'ils sont modestes voir inexistantes aux plus fortes doses (5 mg/kg/j). L'utilisation d'une gamme de 4 doses différentes de BPA a permis de bien illustrer cet effet en cloche (**Figure 30**) qui était auparavant rapporté par d'autres auteurs mais souvent illustré par une gamme de doses plus restreintes (Miyawaki, Sakayama et al. 2007; Alonso-Magdalena, Vieira et al. 2010). Au sein de la communauté scientifique, les premières observations d'effets « en cloche » suite à l'exposition à des produits toxiques, perturbateurs endocriniens, furent très contestées. Elles remettent fortement en question le dogme de Paracelse qui prime encore dans le domaine de la toxicologie selon lequel « Rien n'est poison, tout est poison: seule la dose fait le poison ».

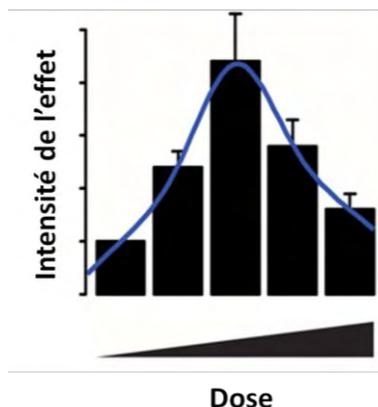


Figure 30. Illustration d'effets non monotones en U inversé

A l'heure actuelle, plusieurs études *in vivo*, dont la nôtre, viennent conforter ce type d'effets observés pour les perturbateurs endocriniens (Vandenberg, Colborn et al. 2012). Le fait qu'ils agissent à de faibles voire de très faibles doses n'est pas étonnant dans la mesure où ils ciblent le système endocrinien (Schug, Janesick et al. 2011). En effet, les hormones comme l'œstradiol sont connues pour agir à des doses de l'ordre du picomolaire (Vandenberg, Colborn et al. 2012). Ce qui est plus difficile à expliquer c'est le fait que ces effets disparaissent pour les plus fortes doses. Les mécanismes impliqués restent encore à élucider. L'hypothèse la plus plausible pour les expliquer serait que ces effets résulteraient de plusieurs mécanismes complémentaires et difficilement dissociables (Schug, Janesick et al. 2011). Si nous prenons l'exemple des effets observés au niveau du foie, les profils dose-réponse non-monotones obtenus pour l'insuline plasmatique des animaux traités au BPA suggèrent que les effets hépatiques pourraient résulter au moins en partie d'effets du BPA sur le pancréas. Ces effets ont été caractérisés par l'équipe du Pr Nadal et suivent également un profil dose-réponse non-monotone (Alonso-Magdalena, Ropero et al. 2008; Alonso-Magdalena, Vieira et al. 2010; Alonso-Magdalena, Ropero et al. 2012). Il n'est pas à exclure que le tissu adipeux altère les fonctions métaboliques hépatiques par l'intermédiaire d'adipokines (leptine, adiponectine) et des cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-6), dont la synthèse et la sécrétion est altérée aux faibles doses de BPA (Pereira and Draznin 2005; Hugo, Brandebourg et al. 2008; Ben-Jonathan, Hugo et al. 2009). Des effets directs du BPA au niveau du foie sont également à considérer puisque les résultats publiés par Huc et al. et nos résultats montrent une accumulation de lipides dans des lignées d'hépatocytes humains et murins lorsqu'ils sont exposés à de faibles doses de BPA. L'étude de Huc et al. (2012) suggère que cette accumulation dérive d'une altération de la fonction mitochondriale (Huc, Lemarie et al. 2012). Nos résultats préliminaires obtenus sur une lignée d'hépatocytes de souris suggèrent également un effet direct du BPA sur l'induction d'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse du cholestérol (Mvd, Lss, Hmgcr). Ces effets pourraient s'expliquer par une action du BPA sur le récepteur ER α , qui, par son action sur SREBP-2, peut induire les gènes de la synthèse du cholestérol (Wang, Afdhal et al. 2006). Cette hypothèse est renforcée par une augmentation de l'expression génique et protéique de ER α , dans notre étude *in vivo*, spécifiquement aux plus faibles doses de BPA. Par ailleurs, le récepteur couplé aux protéines

G, GPR30, pourrait expliquer les effets dose réponse non monotones que nous observons. Ce récepteur, exprimé dans le foie (Feng and Gregor 1997), a été identifié comme un médiateur de certains des effets de l'œstradiol au niveau hépatique (Hsieh, Yu et al. 2007; Ikeda, Tajima et al. 2012). Certains le suspectent d'agir sur le métabolisme du cholestérol, de manière similaire à ER α (Wang, Liu et al. 2009). Ce modèle de régulation croisée entre ER α/β et GPR30 a été particulièrement bien décrit en réponse à l'œstradiol au niveau la cellule β -pancréatique (Nadal, Alonso-Magdalena et al. 2011; Ropero, Pang et al. 2012). Dans ce modèle cellulaire, le BPA agit de manière similaire au niveau des récepteurs ER et semble également perturber les fonctions de la cellule β *via* le récepteur GPR30 (**Figure 31**) (Ropero, Pang et al. 2012; Soriano, Alonso-Magdalena et al. 2012).

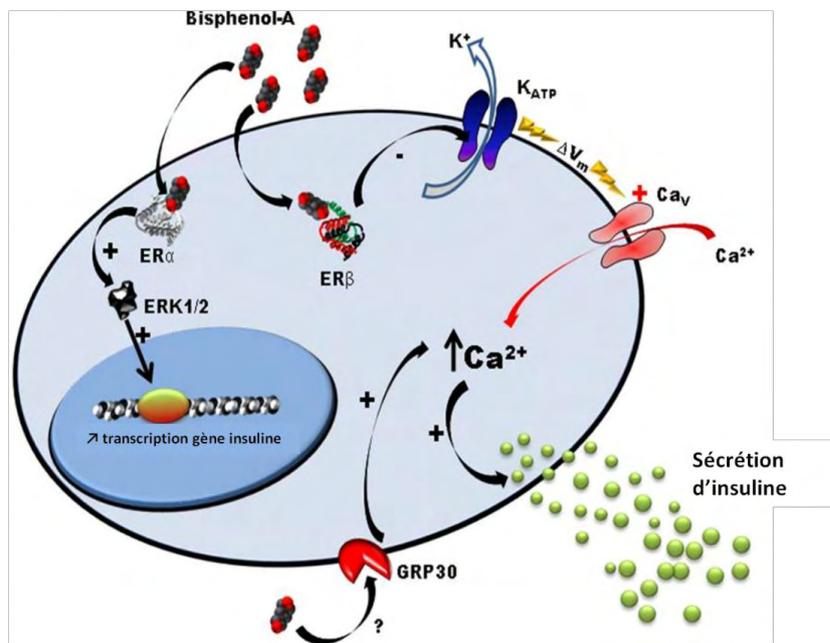


Figure 31. Modèle d'action du BPA sur la cellule β pancréatique. D'après (Ropero, Pang et al. 2012; Soriano, Alonso-Magdalena et al. 2012).

Le récepteur ER α membranaire est impliqué dans la régulation de la biosynthèse de l'insuline en réponse au BPA, et le récepteur ER β joue un rôle dans la signalisation calcique. En présence de concentrations stimulatrices de glucose, le BPA, à faibles concentrations, diminue rapidement l'activité de canaux potassiques K_{ATP} par une activation du récepteur membranaire. Ceci génère une activité électrique oscillatoire augmentant le taux de calcium intracellulaire (Ca²⁺), ce qui déclenche la sécrétion d'insuline. En plus du récepteur ER β , GPR30 participerait à l'effet insulino-trope du BPA sur les cellules β pancréatiques.

L'ensemble de ces données montre qu'une partie des effets observés résulte de propriétés estrogénomimétiques du BPA, mais ils pourraient résulter de mécanismes indépendants des récepteurs ER. D'autres récepteurs comme AhR, CAR, PXR, régulant le système de détoxification, pourraient également être impliqués dans la survenue de ces effets. Ceci est illustré par nos résultats montrant que le BPA régule de manière dose-réponse classique le gène Ugt1a1 (Marmugi et al., 2012), un gène intervenant dans la glucuronidation du BPA en vue de son élimination (Hanioka, Naito et al. 2008; Trdan Lusin, Roskar et al.

2012), et connu pour être régulé par ces trois récepteurs (Buckley and Klaassen 2009). Ainsi, le système de détoxification conduirait à la métabolisation et à l'élimination de ce contaminant à fortes doses l'empêchant ainsi d'agir. Pour mieux évaluer l'implication de ces différents récepteurs dans les effets induits par le BPA, des modèles murins transgéniques déficients pourraient être utilisés.

Au terme de cette première étude, nous avons cherché à déterminer les conséquences possibles d'expositions plus longues à ce contaminant. Des souris adultes ont été exposées au BPA pendant 7 mois *via* l'eau de boisson en nous référant aux protocoles publiés (Miyawaki, Sakayama et al. 2007; Somm, Schwitzgebel et al. 2009). Ce changement de mode d'administration permettait un meilleur suivi de la consommation en BPA, la poudre alimentaire étant très volatile. Aussi, une étude que nous avons réalisée au préalable, montrait des effets similaires de différentes doses de BPA (0, 50 et 5000 µg/kg/j), qu'elles soient administrées *via* l'eau de boisson, la poudre alimentaire ou un gavage, après 28 jours d'exposition. Nos résultats indiquent que lors d'expositions prolongées à ce contaminant, les effets du BPA sont plus marqués sur l'homéostasie du cholestérol. Les animaux exposés présentent une hypercholestérolémie et une induction d'expression des gènes impliqués dans la voie de synthèse du cholestérol au niveau hépatique. Pour aller plus loin dans l'étude de l'activation de la cholestérogénèse au niveau hépatique nous envisageons une mesure de la présence de biomarqueurs plasmatiques de la biosynthèse du cholestérol (collaboration INSERM UMR-1087, Nantes). L'implication du facteur de transcription SREBP-2 dont nous avons mis en évidence une induction d'expression chez les animaux exposés au BPA, sera également approfondie par l'étude de sa translocation nucléaire à l'aide d'un anticorps spécifiques. Alors que dans notre première étude les effets du BPA étaient observés aux plus faibles doses, dans cette seconde étude nous avons mis en évidence un décalage des effets vers les plus fortes doses. Ce décalage pourrait résulter de concentrations différentes en BPA et/ou de ses métabolites, au niveau du plasma et des organes selon le mode d'administration. Un dosage du BPA total, libre et conjugué aurait permis de vérifier ces concentrations. Cependant, l'usage de faibles doses de BPA et les faibles quantités de sang et de tissu disponibles chez la souris, rendent difficile la quantification de BPA par les techniques de dosages classiques (Taylor, Welshons et al. 2008). Nos résultats sont en accord avec ceux de Miyawaki et al. qui montrent une hypercholestérolémie des animaux exposés en périodes péri- et post-natale au BPA (Miyawaki, Sakayama et al. 2007). Ces données sont à mettre en lien avec les nombreuses études épidémiologiques faisant un lien entre des taux urinaires de BPA élevés et la survenue de maladies cardiovasculaires (Melzer, Rice et al. 2010), comprenant des sténoses des artères coronaires (Melzer, Gates et al. 2012), l'apparition de plaques d'athérosclérose (Lind and Lind 2011) et l'augmentation des facteurs de risque tels que les troubles du rythme cardiaque et la tension artérielle (Bae, Kim et al. 2012; Shankar, Teppala et al. 2012). Pour conforter ces observations, une cinétique d'exposition au BPA pourrait être réalisée afin de suivre en parallèle l'évolution des concentrations sériques en cholestérol total, HDL et LDL et la survenue de lésions d'athérosclérose au niveau des valves aortiques (mise en évidence de dépôts lipidiques et d'infiltrations de macrophages) (Sberna, Assem et al. 2011).

Dans nos études, les expositions au BPA ont été réalisées chez l'adulte, or la fenêtre d'exposition aux perturbateurs endocriniens considérée comme la plus critique est la période périnatale. Il sera donc intéressant de déterminer si les effets que nous avons observés sont retrouvés lors d'expositions au BPA en période périnatale. Ces expérimentations sont envisagées dans l'équipe dans le cadre du projet Perinatox financé par l'ANR et regroupant plusieurs équipes de recherche (INRA ToxAlim Toulouse, INSERM UMR 1048, Toulouse et INSERM UMR991, Rennes). Ce projet vise à évaluer les conséquences d'expositions périnatales au BPA sur différents organes comme l'intestin, le foie et le tissu adipeux. Pour mieux révéler d'éventuelles fragilités acquises sous exposition au BPA pendant la période périnatale, les animaux adultes pourront être exposés à un stress métabolique, provoqué par exemple par un régime riche en graisses et en carbohydrates ou par une alternance de phases jeûne/re-nourriture. Aussi, les données de la littérature et les nôtres ont consisté à mettre en évidence des marqueurs d'exposition au BPA, principalement par la mesure de modulations d'expressions géniques. Il serait intéressant d'aller plus loin en déterminant si les fonctions des organes du métabolisme sont directement affectées en mesurant par exemple les activités lipogénique au niveau du foie et lipolytique au niveau du tissu adipeux.

Il serait également intéressant d'évaluer l'effet non plus d'un seul mais de plusieurs contaminants puisque la population humaine est soumise à un mélange de plusieurs polluants différents (Wild 2005). Cela rend particulièrement complexe l'analyse des conséquences physiologiques d'une co-exposition. Pour commencer à appréhender cette problématique des mélanges, nous avons étudié les effets sur le foie de combinaisons de différentes doses de BPA et de phtalate de bis(2-éthylhexyle) (DEHP) (Lasserre et al., en préparation). En effet, le DEHP est un autre plastifiant auquel la population humaine est fortement exposée et nous savons qu'il influe sur le métabolisme hépatique (Eveillard, Lasserre et al. 2009; Eveillard, Mselli-Lakhal et al. 2009). Des études épidémiologiques et expérimentales ont montré un impact du DEHP sur l'appareil reproducteur (Joensen, Frederiksen et al. 2012; Pocar, Fiandanese et al. 2012; Suzuki, Yoshinaga et al. 2012), les fonctions thyroïdiennes (Meeker and Ferguson 2011), cérébrales (Carbone, Samaniego et al. 2012) ou encore le métabolisme énergétique (Hao, Cheng et al. 2012; Rajesh, Sathish et al. 2012) en agissant dans quelques cas selon un effet dose-réponse non monotone (Andrade, Grande et al. 2006; Do, Stahlhut et al. 2012). Nos résultats rapportés dans l'annexe A (Lasserre et al., article en préparation) montrent que comme pour le BPA, des niveaux d'insuline plasmatique plus importants sont observés chez les animaux exposés à la plus faible dose de DEHP par rapport à ceux exposés à la plus forte dose. Lorsque les deux molécules sont combinées, aucun effet synergique ou antagoniste sur la production d'insuline n'est observé, suggérant un mode d'action similaire pour le BPA et le DEHP (Figure 1; Annexe A). Les modifications en insuline plasmatique sont associées à un effet similaire sur l'expression hépatique des gènes de la lipogénèse selon un effet dose-réponse non monotone (Figure 2; Annexe A). Certains gènes des voies de la β -oxydation mitochondriale et de la synthèse du cholestérol semblent régulés de manière synergique par de fortes doses de BPA et du DEHP (Figure 2; Annexe A). Ainsi, les effets combinés du BPA et du DEHP sont complexes et ne semblent pas toujours exercer leurs effets de manière synergique,

comme cela a été montré pour les modulations en insuline plasmatique et les modulations des gènes de la lipogenèse. En effet, l'insulinémie des animaux exposés à l'un ou l'autre de ces contaminants est dérégulée de manière similaire, le pancréas serait donc la cible du BPA mais également du DEHP. Ces données renforcent l'idée évoquée dans le paragraphe précédent selon laquelle les effets du BPA au niveau hépatiques seraient à la fois des effets directs sur le foie et la résultante d'effets sur d'autres organes comme le pancréas. L'exposition d'hépatocytes primaires murins ou humains à des mélanges de ces 2 plastifiants pourrait s'avérer utile à la compréhension des voies de régulation impliquées dans les effets observés.

La démarche utilisée dans le cadre de ma thèse et les outils mis en place pour les études *in vivo* et *in vitro* pourront également être appliqués par la suite pour évaluer les effets d'autres contaminants suspectés de perturber le métabolisme énergétique. Ils pourraient également permettre d'évaluer les effets sur le métabolisme hépatique de molécules de substitution au BPA, l'utilisation de ce dernier dans les conditionnements à vocation alimentaire étant interdit à compter de 2015.

PERTURBATION MÉTABOLIQUE PAR L'ACTIVATION DES XÉNOSENSEURS CAR ET PXR

Les récepteurs nucléaires CAR et PXR sont au carrefour entre deux fonctions hépatiques importantes, le métabolisme et la détoxification. Leur rôle dans la détoxification a été établi depuis plusieurs années. En revanche, leur implication dans la régulation du métabolisme énergétique reste difficile à appréhender tant les données sont parfois contradictoires, surtout pour le récepteur CAR. Il apparaît dans certaines études comme un récepteur « anti-obésogène » (diminution de la résistance à l'insuline, amélioration de la tolérance au glucose) mais ce caractère n'a été mis en évidence que dans un contexte physiopathologique dans lequel les animaux sont rendus obèses et résistants à l'insuline, suite à la délétion du gène de la leptine (souris *ob/ob*) (Dong, Saha et al. 2009) ou par un régime hypercalorique et hyperlipidique (Gao, He et al. 2009; Masuyama and Hiramatsu 2012). En situation de jeûne, les niveaux de glucagon et d'épinéphrine augmentent, il s'en suit une augmentation des concentrations en AMP cyclique régulant l'expression du facteur PGC1 α , connu pour induire l'expression de CAR (Ding, Lichti et al. 2006). CAR apparaît, dans ces conditions métaboliques, comme un facteur limitant la perte de poids en ralentissant le métabolisme basal des animaux (augmentation du catabolisme des hormones thyroïdiennes) (Krotkiewski 2000; Maglich, Watson et al. 2004). Dans notre étude, nous montrons que son activation par le TCPOBOP dans des conditions nutritionnelles normales conduit à l'induction d'expression de gènes impliqués dans la lipogenèse *de novo*. Ces effets sont associés à une accumulation significative de lipides au niveau hépatique, de manière CAR-dépendante. Des résultats similaires ont été observés en réponse à un médicament, le phénobarbital, et à des doses élevées d'un fongicide, le cyproconazole (Peffer, Moggs et al. 2007). Nous avons identifié un nouveau gène cible régulé par le récepteur CAR, il s'agit du gène *Pnpla3*. Nos données préliminaires montrent un effet direct de CAR sur le promoteur de ce gène. Des études seront entreprises pour mieux identifier les éléments de réponse à ce récepteur au niveau du promoteur du gène *Pnpla3*. L'implication des facteurs de transcription SREBP-1c et ChREBP sera également évaluée par

l'étude de leur translocation nucléaire dans les cellules hépatiques d'animaux exposés au TCPOBOP. Même si la fonction exacte du gène *Pnpla3* n'est pas encore bien caractérisée, sa régulation en fonction du statut nutritionnel, son expression dans les tissus lipogéniques, et son activité AGPAT (Jenkins, Mancuso et al. 2004) lui confèrent plutôt un rôle de type anabolique en faveur de la synthèse de lipides (Baulande, Lasnier et al. 2001; Jenkins, Mancuso et al. 2004; Lake, Sun et al. 2005; Moldes, Beaugard et al. 2006). Nos données préliminaires obtenues sur une lignée humaine d'hépatocytes suggèrent également une induction de l'expression de *Pnpla3* par la forme humaine du récepteur CAR. Or, chez l'homme, le gène *Pnpla3* présente un polymorphisme. Les porteurs du variant SNP I148M ont un risque accru de développer une stéatose (Rotman, Koh et al. 2010; Hyysalo, Stojkovic et al. 2012) et des atteintes hépatiques plus graves (Valenti, Al-Serri et al. 2010; Guyot, Sutton et al. 2012). Dans ce contexte, l'exposition de ces individus à des médicaments (phénobarbital, acide valproïque, pravastatine, acétaminophène) ou polluants (BPA, nonylphénol, DEHP), activateurs de CAR (Kretschmer and Baldwin 2005; Chang and Waxman 2006), devrait être pris en considération dans l'évolution de ces maladies. Pour mieux comprendre les mécanismes mis en jeu, des cultures primaires d'hépatocytes d'individus, identifiés comme porteurs ou non du variant SNP I148M, pourrait être exposées à ces activateurs.

Nos résultats préliminaires montrent que le gène *Pnpla3* est également régulé par le récepteur PXR. Le rôle de PXR dans l'induction des gènes lipogéniques est bien mieux établi que celui de CAR (Gao and Xie 2012) et son activation entraîne une accumulation excessive de triglycérides hépatiques (Nakamura, Moore et al. 2007). CAR et PXR sont des récepteurs très proches qui partagent des gènes cibles et des agonistes communs. Cependant, PXR reconnaît un nombre plus important de xénobiotiques en raison d'une poche de ligand plus grande (di Masi, De Marinis et al. 2009). Au-delà de sa fonction de régulation du métabolisme des xénobiotiques, CAR semble également impliqué dans des réponses plus sensibles à l'état physiologique de la cellule (jeûne, régime riche en lipides). L'accumulation hépatique de lipides induite par CAR et PXR en réponse à leur activateurs pourrait être, comme cela a été suggéré par d'autres auteurs (Breuker, Moreau et al. 2010), un moyen de piéger les xénobiotiques, de nature lipophile, dans des gouttelettes lipidiques, et retarder leurs effets délétères. Cependant, une exposition chronique à des composés activateurs de CAR ou PXR pourrait conduire à des ruptures au niveau de l'homéostasie métabolique principalement au niveau hépatique. Ces risques pourraient être plus importants chez certaines populations, comme celles portant le mutant SNP I148M du gène *Pnpla3*. Nous avons réalisé des expositions de trois jours et il serait intéressant de tester des expositions plus longues afin de déterminer si les effets observés sont transitoires ou s'ils persistent à plus long terme. Des activateurs de CAR autres que le TCPOBOP, tels que l'acide valproïque, pourront également être testés pour leur capacité à provoquer ces troubles métaboliques. Aussi, l'implication du récepteur CAR dans la survenue des désordres hépatiques observés en réponse au BPA pourrait également être testée, par l'utilisation des souris sauvages et transgéniques déficientes pour ce récepteur.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Nous avons mis en évidence des effets du BPA sur le foie, qui se traduisent essentiellement par l'activation de différentes voies métaboliques hépatiques à travers l'induction d'expression de gènes clés. Ces dérégulations se traduisent dans certains cas par des conséquences biochimiques (stéatose hépatique, hypercholestérolémie). La question qui se pose alors est de savoir si ces perturbations restent transitoires ou si elles aboutissent, particulièrement lors d'expositions chroniques, à une perturbation de l'homéostasie énergétique de l'organisme. L'exposition à long terme que nous avons réalisée montre une perturbation des paramètres plasmatiques des animaux mais aucune défaillance importante n'est observée. Les explorations que nous avons menées restent certainement insuffisantes pour appréhender l'ensemble des éventuelles conséquences de cette exposition. Il est donc probable que l'exposition à ces contaminants ou à des mélanges de contaminants s'ajoute aux autres stress (physiologiques ou non) fragilisant ainsi l'organisme dans son maintien de l'homéostasie énergétique. Ces « fragilités » n'étant pas toujours faciles à mettre en évidence, et les mécanismes sous-jacents étant difficiles à appréhender de par leur complexité, le débat sur les risques liés à l'exposition à ces contaminants reste d'actualité. C'est probablement l'accumulation de données qui finira par permettre de statuer sur les risques réels associés à l'exposition chronique et à faibles doses de mélanges de plusieurs centaines de polluants différents.

Nous avons également mis en évidence des perturbations métaboliques, principalement au niveau hépatique, résultant de l'activation du récepteur nucléaire CAR. Nous nous sommes intéressés à ce récepteur et à son rôle dans la régulation de *Pnpla3*, un gène dont l'expression est sensible au BPA dans nos deux études réalisées *in vivo*. CAR étant considéré comme un xénosenseur, nous avons voulu tester son influence sur *Pnpla3*, en utilisant une approche pharmacologique. Nos résultats indiquent que l'activité de CAR régule l'expression de *Pnpla3* chez la souris. Il reste essentiel de voir si ce résultat se transpose à l'Homme, chez lequel, un polymorphisme sur *Pnpla3* est associé à un risque accru de développement de pathologies hépatiques. Aussi, les xénobiotiques, influant sur l'activité de CAR, pourraient avoir un effet particulièrement fort chez les individus porteurs de cette mutation.

Ces deux types de perturbations métaboliques pourraient constituer deux mécanismes différents, l'un plutôt de type perturbation endocrinienne donc se manifestant aux plus faibles doses et l'autre résultant de l'activation chronique de xénosenseurs par un nombre de contaminants qui a beaucoup augmenté au cours de ces dernières années.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agius, L. (2010). "Physiological control of liver glycogen metabolism: lessons from novel glycogen phosphorylase inhibitors." *Mini Rev Med Chem* **10**(12): 1175-87.
- Agius, L. and K. G. Alberti (1985). "Regulation of flux through pyruvate dehydrogenase and pyruvate carboxylase in rat hepatocytes. Effects of fatty acids and glucagon." *Eur J Biochem* **152**(3): 699-707.
- Akkaoui, M., I. Cohen, et al. (2009). "Modulation of the hepatic malonyl-CoA-carnitine palmitoyltransferase 1A partnership creates a metabolic switch allowing oxidation of de novo fatty acids." *Biochem J* **420**(3): 429-38.
- Al-Hiyasat, A. S., H. Darmani, et al. (2002). "Effects of bisphenol A on adult male mouse fertility." *Eur J Oral Sci* **110**(2): 163-7.
- Al-Salman, F. and N. Plant (2012). "Non-coplanar polychlorinated biphenyls (PCBs) are direct agonists for the human pregnane-X receptor and constitutive androstane receptor, and activate target gene expression in a tissue-specific manner." *Toxicol Appl Pharmacol* **263**(1): 7-13.
- Alaynick, W. A. (2008). "Nuclear receptors, mitochondria and lipid metabolism." *Mitochondrion* **8**(4): 329-37.
- Alberti, S., G. Schuster, et al. (2001). "Hepatic cholesterol metabolism and resistance to dietary cholesterol in LXRbeta-deficient mice." *J Clin Invest* **107**(5): 565-73.
- Aleksunes, L. M. and C. D. Klaassen (2012). "Coordinated regulation of hepatic phase I and II drug-metabolizing genes and transporters using AhR-, CAR-, PXR-, PPARalpha-, and Nrf2-null mice." *Drug Metab Dispos* **40**(7): 1366-79.
- Alisi, A., S. Cianfarani, et al. (2012). "Non-alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome in adolescents: pathogenetic role of genetic background and intrauterine environment." *Ann Med* **44**(1): 29-40.
- Alonso-Magdalena, P., O. Laribi, et al. (2005). "Low doses of bisphenol A and diethylstilbestrol impair Ca²⁺ signals in pancreatic alpha-cells through a nonclassical membrane estrogen receptor within intact islets of Langerhans." *Environ Health Perspect* **113**(8): 969-77.
- Alonso-Magdalena, P., S. Morimoto, et al. (2006). "The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic beta-cell function in vivo and induces insulin resistance." *Environ Health Perspect* **114**(1): 106-12.
- Alonso-Magdalena, P., A. B. Ropero, et al. (2008). "Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER alpha." *PLoS One* **3**(4): e2069.
- Alonso-Magdalena, P., A. B. Ropero, et al. (2012). "Bisphenol-A acts as a potent estrogen via non-classical estrogen triggered pathways." *Mol Cell Endocrinol* **355**(2): 201-7.
- Alonso-Magdalena, P., E. Vieira, et al. "Bisphenol A exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring." *Environ Health Perspect* **118**(9): 1243-50.
- Alonso-Magdalena, P., E. Vieira, et al. (2010). "Bisphenol A exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring." *Environ Health Perspect* **118**(9): 1243-50.
- Amacher, D. E. (2011). "The mechanistic basis for the induction of hepatic steatosis by xenobiotics." *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **7**(8): 949-65.
- Anderson, N. and J. Borlak (2008). "Molecular mechanisms and therapeutic targets in steatosis and steatohepatitis." *Pharmacol Rev* **60**(3): 311-57.
- Andrade, A. J., S. W. Grande, et al. (2006). "A dose-response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP): non-monotonic dose-response and low dose effects on rat brain aromatase activity." *Toxicology* **227**(3): 185-92.
- Angrish, M. M., C. Y. Dominici, et al. (2012). "TCDD-Elicited Effects on Liver, Serum, and Adipose Lipid Composition in C57BL/6 Mice." *Toxicol Sci*.
- Angrish, M. M., B. D. Mets, et al. (2012). "Dietary fat is a lipid source in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-rhodioxin (TCDD)-elicited hepatic steatosis in C57BL/6 mice." *Toxicol Sci* **128**(2): 377-86.
- Antherieu, S., A. Rogue, et al. (2011). "Induction of vesicular steatosis by amiodarone and tetracycline is associated with up-regulation of lipogenic genes in HepaRG cells." *Hepatology* **53**(6): 1895-905.
- Aoyama, H., H. Daitoku, et al. (2006). "Nutrient control of phosphorylation and translocation of Foxo1 in C57BL/6 and db/db mice." *Int J Mol Med* **18**(3): 433-9.

- Aranda, A. and A. Pascual (2001). "Nuclear hormone receptors and gene expression." Physiol Rev **81**(3): 1269-304.
- Araya, J., R. Rodrigo, et al. (2004). "Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n - 6/n - 3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease." Clin Sci (Lond) **106**(6): 635-43.
- Argaud, D., S. Halimi, et al. (1991). "Inhibition of gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes after chronic treatment with phenobarbital." Biochem J **280 (Pt 3)**: 663-9.
- Argo, C. K., P. G. Northup, et al. (2009). "Systematic review of risk factors for fibrosis progression in non-alcoholic steatohepatitis." J Hepatol **51**(2): 371-9.
- Arsenescu, V., R. I. Arsenescu, et al. (2008). "Polychlorinated biphenyl-77 induces adipocyte differentiation and proinflammatory adipokines and promotes obesity and atherosclerosis." Environ Health Perspect **116**(6): 761-8.
- Asahi, J., H. Kamo, et al. (2010). "Bisphenol A induces endoplasmic reticulum stress-associated apoptosis in mouse non-parenchymal hepatocytes." Life Sci **87**(13-14): 431-8.
- Aubert, J., K. Begriche, et al. (2011). "Increased expression of cytochrome P450 2E1 in nonalcoholic fatty liver disease: mechanisms and pathophysiological role." Clin Res Hepatol Gastroenterol **35**(10): 630-7.
- Aynaci, F. M., F. Orhan, et al. (2001). "Effect of Antiepileptic drugs on plasma lipoprotein (a) and other lipid levels in childhood." J Child Neuro **16**(5): 367-9.
- Ayyanan, A., O. Laribi, et al. (2011). "Perinatal exposure to bisphenol a increases adult mammary gland progesterone response and cell number." Mol Endocrinol **25**(11): 1915-23.
- Babany, G., F. Uzzan, et al. (1989). "Alcoholic-like liver lesions induced by nifedipine." J Hepatol **9**(2): 252-5.
- Bachmann, K., H. Patel, et al. (2004). "PXR and the regulation of apoA1 and HDL-cholesterol in rodents." Pharmacol Res **50**(3): 237-46.
- Bae, S., J. H. Kim, et al. (2012). "Associations of bisphenol A exposure with heart rate variability and blood pressure." Hypertension **60**(3): 786-93.
- Baes, M., T. Gulick, et al. (1994). "A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily that interacts with a subset of retinoic acid response elements." Mol Cell Biol **14**(3): 1544-52.
- Baillie-Hamilton, P. F. (2002). "Chemical toxins: a hypothesis to explain the global obesity epidemic." J Altern Complement Med **8**(2): 185-92.
- Barnes, K. K., D. W. Kolpin, et al. (2008). "A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States--I) groundwater." Sci Total Environ **402**(2-3): 192-200.
- Barrett, J. R. (2012). "BPA and PXR activation: human receptor is affected, mouse receptor is not." Environ Health Perspect **120**(3): A122.
- Basantani, M. K., M. T. Sitnick, et al. (2011). "Pnpla3/Adiponutrin deficiency in mice does not contribute to fatty liver disease or metabolic syndrome." J Lipid Res **52**(2): 318-29.
- Basaranoglu, M. and G. Basaranoglu (2011). "Pathophysiology of insulin resistance and steatosis in patients with chronic viral hepatitis." World J Gastroenterol **17**(36): 4055-62.
- Batista, T. M., P. Alonso-Magdalena, et al. (2012). "Short-term treatment with bisphenol-A leads to metabolic abnormalities in adult male mice." PLoS One **7**(3): e33814.
- Baulande, S. and C. Langlois (2010). "[Proteins sharing PNPLA domain, a new family of enzymes regulating lipid metabolism]." Med Sci (Paris) **26**(2): 177-84.
- Baulande, S., F. Lasnier, et al. (2001). "Adiponutrin, a transmembrane protein corresponding to a novel dietary- and obesity-linked mRNA specifically expressed in the adipose lineage." J Biol Chem **276**(36): 33336-44.
- Bechmann, L. P., R. A. Hannivoort, et al. (2012). "The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases." J Hepatol **56**(4): 952-64.
- Becker, K., T. Goen, et al. (2009). "GerES IV: phthalate metabolites and bisphenol A in urine of German children." Int J Hyg Environ Health **212**(6): 685-92.

- Begrache, K., J. Massart, et al. (2011). "Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver." *J Hepatol* **54**(4): 773-94.
- Ben-Jonathan, N., E. R. Hugo, et al. (2009). "Effects of bisphenol A on adipokine release from human adipose tissue: Implications for the metabolic syndrome." *Mol Cell Endocrinol* **304**(1-2): 49-54.
- Bertilsson, G., J. Heidrich, et al. (1998). "Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(21): 12208-13.
- Bhalla, S., C. Ozalp, et al. (2004). "Ligand-activated pregnane X receptor interferes with HNF-4 signaling by targeting a common coactivator PGC-1alpha. Functional implications in hepatic cholesterol and glucose metabolism." *J Biol Chem* **279**(43): 45139-47.
- Biedermann, S., P. Tschudin, et al. (2010). "Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin." *Anal Bioanal Chem* **398**(1): 571-6.
- Bilici, A., M. Ozguroglu, et al. (2007). "A case-control study of non-alcoholic fatty liver disease in breast cancer." *Med Oncol* **24**(4): 367-71.
- Biour, M., C. Ben Salem, et al. (2004). "[Drug-induced liver injury; fourteenth updated edition of the bibliographic database of liver injuries and related drugs]." *Gastroenterol Clin Biol* **28**(8-9): 720-59.
- Bjornsson, E. (2009). "The natural history of drug-induced liver injury." *Semin Liver Dis* **29**(4): 357-63.
- Bonds, R. S. and T. Midoro-Horiuti (2012). "Estrogen effects in allergy and asthma." *Curr Opin Allergy Clin Immunol*.
- Bonefeld-Jorgensen, E. C., M. Long, et al. (2007). "Endocrine-disrupting potential of bisphenol A, bisphenol A dimethacrylate, 4-n-nonylphenol, and 4-n-octylphenol in vitro: new data and a brief review." *Environ Health Perspect* **115 Suppl 1**: 69-76.
- Bono-Blay, F., A. Guart, et al. (2012). "Survey of phthalates, alkylphenols, bisphenol A and herbicides in Spanish source waters intended for bottling." *Environ Sci Pollut Res Int*.
- Borst, P., N. Zelcer, et al. (2000). "ABC transporters in lipid transport." *Biochim Biophys Acta* **1486**(1): 128-44.
- Bosch, T. M., I. Meijerman, et al. (2006). "Genetic polymorphisms of drug-metabolising enzymes and drug transporters in the chemotherapeutic treatment of cancer." *Clin Pharmacokinet* **45**(3): 253-85.
- Bottcher, J. P., P. A. Knolle, et al. (2011). "Mechanisms balancing tolerance and immunity in the liver." *Dig Dis* **29**(4): 384-90.
- Boverhof, D. R., L. D. Burgoon, et al. (2006). "Comparative toxicogenomic analysis of the hepatotoxic effects of TCDD in Sprague Dawley rats and C57BL/6 mice." *Toxicol Sci* **94**(2): 398-416.
- BPA_Effets_sur_la_reproduction_Rapport_INSERM (2010).
["http://www.google.fr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=OCCsQFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.inserm.fr%2Fcontent%2Fdownload%2F11756%2F88171%2Ffile%2Fsynthese_E_C_bisphenol_a_vers_final.pdf&ei=FLpyUN2yH4Wf0QW6loHoAQ&usq=AFQjCNECt95sVzMDyT0DwRKG6lQr3m1rIQ&sig2=fQmrvqV2b7-hLw3ZP8hbCw."](http://www.google.fr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=OCCsQFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.inserm.fr%2Fcontent%2Fdownload%2F11756%2F88171%2Ffile%2Fsynthese_E_C_bisphenol_a_vers_final.pdf&ei=FLpyUN2yH4Wf0QW6loHoAQ&usq=AFQjCNECt95sVzMDyT0DwRKG6lQr3m1rIQ&sig2=fQmrvqV2b7-hLw3ZP8hbCw.)
- Bradley, S. E., F. J. Ingelfinger, et al. (1945). "The Estimation of Hepatic Blood Flow in Man." *J Clin Invest* **24**(6): 890-7.
- Braniste, V., A. Jouault, et al. (2010). "Impact of oral bisphenol A at reference doses on intestinal barrier function and sex differences after perinatal exposure in rats." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(1): 448-53.
- Brasaemle, D. L. (2007). "Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis." *J Lipid Res* **48**(12): 2547-59.
- Braun, J. M. and R. Hauser (2011). "Bisphenol A and children's health." *Curr Opin Pediatr* **23**(2): 233-9.
- Braun, J. M., K. Yolton, et al. (2009). "Prenatal bisphenol A exposure and early childhood behavior." *Environ Health Perspect* **117**(12): 1945-52.
- Breuker, C., A. Moreau, et al. (2010). "Hepatic expression of thyroid hormone-responsive spot 14 protein is regulated by constitutive androstane receptor (NR1I3)." *Endocrinology* **151**(4): 1653-61.

- Bricambert, J., J. Miranda, et al. (2010). "Salt-inducible kinase 2 links transcriptional coactivator p300 phosphorylation to the prevention of ChREBP-dependent hepatic steatosis in mice." J Clin Invest **120**(12): 4316-31.
- Brieno-Enriquez, M. A., R. Reig-Viader, et al. (2012). "Gene expression is altered after bisphenol A exposure in human fetal oocytes in vitro." Mol Hum Reprod **18**(4): 171-83.
- Brissova, M., M. J. Fowler, et al. (2005). "Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy." J Histochem Cytochem **53**(9): 1087-97.
- Bromer, J. G., Y. Zhou, et al. (2010). "Bisphenol-A exposure in utero leads to epigenetic alterations in the developmental programming of uterine estrogen response." FASEB J **24**(7): 2273-80.
- Brown, M. S. and J. L. Goldstein (2009). "Cholesterol feedback: from Schoenheimer's bottle to Scap's MELADL." J Lipid Res **50** Suppl: S15-27.
- Brown, S. B., M. Maloney, et al. (1997). "'Spot 14" protein functions at the pretranslational level in the regulation of hepatic metabolism by thyroid hormone and glucose." J Biol Chem **272**(4): 2163-6.
- Browning, J. D. and J. D. Horton (2004). "Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury." J Clin Invest **114**(2): 147-52.
- Browning, J. D., L. S. Szczepaniak, et al. (2004). "Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity." Hepatology **40**(6): 1387-95.
- Brunt, E. M. (2001). "Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology." Semin Liver Dis **21**(1): 3-16.
- Buckley, D. B. and C. D. Klaassen (2009). "Induction of mouse UDP-glucuronosyltransferase mRNA expression in liver and intestine by activators of aryl-hydrocarbon receptor, constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, peroxisome proliferator-activated receptor alpha, and nuclear factor erythroid 2-related factor 2." Drug Metab Dispos **37**(4): 847-56.
- Bullock, R. E., A. M. Zaitoun, et al. (2004). "Association of non-alcoholic steatohepatitis without significant fibrosis with hepatocellular carcinoma." J Hepatol **41**(4): 685-6.
- Burris, T. P., S. A. Busby, et al. (2012). "Targeting orphan nuclear receptors for treatment of metabolic diseases and autoimmunity." Chem Biol **19**(1): 51-9.
- Burt, A. D., A. Mutton, et al. (1998). "Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis." Semin Diagn Pathol **15**(4): 246-58.
- Buzon, V., L. R. Carbo, et al. (2012). "A conserved surface on the ligand binding domain of nuclear receptors for allosteric control." Mol Cell Endocrinol **348**(2): 394-402.
- Cabaton, N. J., P. R. Wadia, et al. (2011). "Perinatal exposure to environmentally relevant levels of bisphenol A decreases fertility and fecundity in CD-1 mice." Environ Health Perspect **119**(4): 547-52.
- Cabrera, O., D. M. Berman, et al. (2006). "The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(7): 2334-9.
- Calafat, A. M., Z. Kuklennyik, et al. (2005). "Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population." Environ Health Perspect **113**(4): 391-5.
- Calafat, A. M., X. Ye, et al. (2008). "Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004." Environ Health Perspect **116**(1): 39-44.
- Calandre, E. P., C. Rodriguez-Lopez, et al. (1991). "Serum lipids, lipoproteins and apolipoproteins A and B in epileptic patients treated with valproic acid, carbamazepine or phenobarbital." Acta Neurol Scand **83**(4): 250-3.
- Calkin, A. C. and P. Tontonoz (2012). "Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR." Nat Rev Mol Cell Biol **13**(4): 213-24.
- Cao, J., J. A. Mickens, et al. (2012). "Neonatal Bisphenol A exposure alters sexually dimorphic gene expression in the postnatal rat hypothalamus." Neurotoxicology **33**(1): 23-36.
- Carbone, S., Y. A. Samaniego, et al. (2012). "Different effects by sex on hypothalamic-pituitary axis of prepubertal offspring rats produced by in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)." Neurotoxicology **33**(1): 78-84.
- Carr, A., K. Samaras, et al. (1998). "A syndrome of peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia and insulin resistance in patients receiving HIV protease inhibitors." AIDS **12**(7): F51-8.

- Carwile, J. L., H. T. Luu, et al. (2009). "Polycarbonate bottle use and urinary bisphenol A concentrations." Environ Health Perspect **117**(9): 1368-72.
- Carwile, J. L. and K. B. Michels (2011). "Urinary bisphenol A and obesity: NHANES 2003-2006." Environ Res **111**(6): 825-30.
- Casals-Casas, C. and B. Desvergne (2011). "Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption." Annu Rev Physiol **73**: 135-62.
- Cases, S., S. J. Smith, et al. (1998). "Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(22): 13018-23.
- Cases, S., S. J. Stone, et al. (2001). "Cloning of DGAT2, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, and related family members." J Biol Chem **276**(42): 38870-6.
- Cave, M., S. Appana, et al. (2010). "Polychlorinated biphenyls, lead, and mercury are associated with liver disease in American adults: NHANES 2003-2004." Environ Health Perspect **118**(12): 1735-42.
- Cave, M., I. Deaciuc, et al. (2007). "Nonalcoholic fatty liver disease: predisposing factors and the role of nutrition." J Nutr Biochem **18**(3): 184-95.
- Cervený, L., L. Svecova, et al. (2007). "Valproic acid induces CYP3A4 and MDR1 gene expression by activation of constitutive androstane receptor and pregnane X receptor pathways." Drug Metab Dispos **35**(7): 1032-41.
- Cha, J. Y. and J. J. Repa (2007). "The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR." J Biol Chem **282**(1): 743-51.
- Chamorro-Garcia, R., S. Kirchner, et al. (2012). "Bisphenol A diglycidyl ether induces adipogenic differentiation of multipotent stromal stem cells through a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent mechanism." Environ Health Perspect **120**(7): 984-9.
- Chang, C. C., N. Sakashita, et al. (2000). "Immunological quantitation and localization of ACAT-1 and ACAT-2 in human liver and small intestine." J Biol Chem **275**(36): 28083-92.
- Chang, T. K. and D. J. Waxman (2006). "Synthetic drugs and natural products as modulators of constitutive androstane receptor (CAR) and pregnane X receptor (PXR)." Drug Metab Rev **38**(1-2): 51-73.
- Chapin, R. E., J. Adams, et al. (2008). "NTP-CERHR expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of bisphenol A." Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol **83**(3): 157-395.
- Chawla, A., J. J. Repa, et al. (2001). "Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files." Science **294**(5548): 1866-70.
- Chen, J. D. and R. M. Evans (1995). "A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors." Nature **377**(6548): 454-7.
- Chen, W., B. Chang, et al. (2010). "Patatin-like phospholipase domain-containing 3/adiponutrin deficiency in mice is not associated with fatty liver disease." Hepatology **52**(3): 1134-42.
- Chen, Y., Y. Tang, et al. (2012). "Nuclear receptors in the multidrug resistance through the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters." Biochem Pharmacol **83**(8): 1112-26.
- Chen, Y., Y. Tang, et al. (2007). "Human pregnane X receptor and resistance to chemotherapy in prostate cancer." Cancer Res **67**(21): 10361-7.
- Cheng, X. and C. D. Klaassen (2009). "Tissue distribution, ontogeny, and hormonal regulation of xenobiotic transporters in mouse kidneys." Drug Metab Dispos **37**(11): 2178-85.
- Cherrington, N. J., D. P. Hartley, et al. (2002). "Organ distribution of multidrug resistance proteins 1, 2, and 3 (Mrp1, 2, and 3) mRNA and hepatic induction of Mrp3 by constitutive androstane receptor activators in rats." J Pharmacol Exp Ther **300**(1): 97-104.
- Chevalier, N., A. Vega, et al. (2012). "GPR30, the non-classical membrane G protein related estrogen receptor, is overexpressed in human seminoma and promotes seminoma cell proliferation." PLoS One **7**(4): e34672.
- Choi, H. S., M. Chung, et al. (1997). "Differential transactivation by two isoforms of the orphan nuclear hormone receptor CAR." J Biol Chem **272**(38): 23565-71.
- Cimafranca, M. A., P. R. Hanlon, et al. (2004). "TCDD administration after the pro-adipogenic differentiation stimulus inhibits PPARgamma through a MEK-dependent process but less effectively suppresses adipogenesis." Toxicol Appl Pharmacol **196**(1): 156-68.

- Clarke, S. D. (1993). "Regulation of fatty acid synthase gene expression: an approach for reducing fat accumulation." *J Anim Sci* **71**(7): 1957-65.
- Clarke, S. D. (2001). "Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome." *J Nutr* **131**(4): 1129-32.
- Clayton, E. M., M. Todd, et al. (2011). "The impact of bisphenol A and triclosan on immune parameters in the U.S. population, NHANES 2003-2006." *Environ Health Perspect* **119**(3): 390-6.
- Cohen, J. C., J. D. Horton, et al. (2011). "Human fatty liver disease: old questions and new insights." *Science* **332**(6037): 1519-23.
- Coleman, R. A. and D. G. Mashek (2011). "Mammalian triacylglycerol metabolism: synthesis, lipolysis, and signaling." *Chem Rev* **111**(10): 6359-86.
- Comar, K. M. and R. K. Sterling (2006). "Review article: Drug therapy for non-alcoholic fatty liver disease." *Aliment Pharmacol Ther* **23**(2): 207-15.
- Costa, R. H., V. V. Kalinichenko, et al. (2005). "The CAR nuclear receptor and hepatocyte proliferation." *Hepatology* **42**(5): 1004-8.
- Cotrim, H. P., Z. A. Andrade, et al. (1999). "Nonalcoholic steatohepatitis: a toxic liver disease in industrial workers." *Liver* **19**(4): 299-304.
- Cotrim, H. P., L. A. De Freitas, et al. (2004). "Clinical and histopathological features of NASH in workers exposed to chemicals with or without associated metabolic conditions." *Liver Int* **24**(2): 131-5.
- Coughtrie, M. W., B. Burchell, et al. (1988). "The inadequacy of perinatal glucuronidation: immunoblot analysis of the developmental expression of individual UDP-glucuronosyltransferase isoenzymes in rat and human liver microsomes." *Mol Pharmacol* **34**(6): 729-35.
- Court, M. H. (2010). "Interindividual variability in hepatic drug glucuronidation: studies into the role of age, sex, enzyme inducers, and genetic polymorphism using the human liver bank as a model system." *Drug Metab Rev* **42**(1): 209-24.
- Crespo, J., A. Cayon, et al. (2001). "Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients." *Hepatology* **34**(6): 1158-63.
- Cusi, K. (2012). "Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications." *Gastroenterology* **142**(4): 711-725 e6.
- Dahlman-Wright, K., V. Cavailles, et al. (2006). "International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors." *Pharmacol Rev* **58**(4): 773-81.
- Das, S. K. and V. Balakrishnan (2011). "Role of cytokines in the pathogenesis of non-alcoholic Fatty liver disease." *Indian J Clin Biochem* **26**(2): 202-9.
- Day, C. P. (2006). "Genes or environment to determine alcoholic liver disease and non-alcoholic fatty liver disease." *Liver Int* **26**(9): 1021-8.
- de Haan, W., J. de Vries-van der Weij, et al. (2009). "PXR agonism decreases plasma HDL levels in ApoE3-Leiden.CETP mice." *Biochim Biophys Acta* **1791**(3): 191-7.
- Dekant, W. and W. Volkel (2008). "Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: methods, results and assessment of environmental exposures." *Toxicol Appl Pharmacol* **228**(1): 114-34.
- DeKeyser, J. G., E. M. Laurenzana, et al. (2011). "Selective phthalate activation of naturally occurring human constitutive androstane receptor splice variants and the pregnane X receptor." *Toxicol Sci* **120**(2): 381-91.
- Delfosse, V., M. Grimaldi, et al. (2012). "Structural and mechanistic insights into bisphenols action provide guidelines for risk assessment and discovery of bisphenol A substitutes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(37): 14930-5.
- Della Seta, D., I. Minder, et al. (2005). "Bisphenol-A exposure during pregnancy and lactation affects maternal behavior in rats." *Brain Res Bull* **65**(3): 255-60.
- Delvecchio, C. J., P. Bilan, et al. (2007). "Liver X receptor stimulates cholesterol efflux and inhibits expression of proinflammatory mediators in human airway smooth muscle cells." *Mol Endocrinol* **21**(6): 1324-34.
- Dentin, R., J. Girard, et al. (2005). "Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver." *Biochimie* **87**(1): 81-6.

- Dentin, R., J. P. Pegorier, et al. (2004). "Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression." *J Biol Chem* **279**(19): 20314-26.
- Dentin, R., L. Tomas-Cobos, et al. (2012). "Glucose 6-phosphate, rather than xylulose 5-phosphate, is required for the activation of ChREBP in response to glucose in the liver." *J Hepatol* **56**(1): 199-209.
- Desvergne, B., L. Michalik, et al. (2006). "Transcriptional regulation of metabolism." *Physiol Rev* **86**(2): 465-514.
- di Masi, A., E. De Marinis, et al. (2009). "Nuclear receptors CAR and PXR: Molecular, functional, and biomedical aspects." *Mol Aspects Med* **30**(5): 297-343.
- Ding, X., K. Lichti, et al. (2006). "Regulation of constitutive androstane receptor and its target genes by fasting, cAMP, hepatocyte nuclear factor alpha, and the coactivator peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha." *J Biol Chem* **281**(36): 26540-51.
- Diraison, F., V. Yankah, et al. (2003). "Differences in the regulation of adipose tissue and liver lipogenesis by carbohydrates in humans." *J Lipid Res* **44**(4): 846-53.
- Do, R. P., R. W. Stahlhut, et al. (2012). "Non-monotonic dose effects of in utero exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on testicular and serum testosterone and anogenital distance in male mouse fetuses." *Reprod Toxicol*.
- Dodds, E. C. a. L., W. (1936). "Synthetic estrogenic agents without the phenanthrene nucleus." *Nature* **137**: 996.
- Doerge, D. R., N. C. Twaddle, et al. "Pharmacokinetics of bisphenol A in neonatal and adult rhesus monkeys." *Toxicol Appl Pharmacol* **248**(1): 1-11.
- Dolinoy, D. C., D. Huang, et al. (2007). "Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(32): 13056-61.
- Dong, B., P. K. Saha, et al. (2009). "Activation of nuclear receptor CAR ameliorates diabetes and fatty liver disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(44): 18831-6.
- Doshi, T., S. S. Mehta, et al. (2011). "Hypermethylation of estrogen receptor promoter region in adult testis of rats exposed neonatally to bisphenol A." *Toxicology* **289**(2-3): 74-82.
- Drocourt, L., J. M. Pascussi, et al. (2001). "Calcium channel modulators of the dihydropyridine family are human pregnane X receptor activators and inducers of CYP3A, CYP2B, and CYP2C in human hepatocytes." *Drug Metab Dispos* **29**(10): 1325-31.
- Dubuquoy, C., A. F. Burnol, et al. (2012). "PNPLA3, a genetic marker of progressive liver disease, still hiding its metabolic function?" *Clin Res Hepatol Gastroenterol*.
- Dubuquoy, C., C. Robichon, et al. (2011). "Distinct regulation of adiponutrin/PNPLA3 gene expression by the transcription factors ChREBP and SREBP1c in mouse and human hepatocytes." *J Hepatol* **55**(1): 145-53.
- Ducheix, S., J. M. Lobaccaro, et al. (2011). "Liver X Receptor: an oxysterol sensor and a major player in the control of lipogenesis." *Chem Phys Lipids* **164**(6): 500-14.
- Edgington, A. N. and L. Ritter (2009). "Predicting plasma concentrations of bisphenol A in children younger than 2 years of age after typical feeding schedules, using a physiologically based toxicokinetic model." *Environ Health Perspect* **117**(4): 645-52.
- Edlow, A. G., M. Chen, et al. (2012). "Fetal bisphenol A exposure: concentration of conjugated and unconjugated bisphenol A in amniotic fluid in the second and third trimesters." *Reprod Toxicol* **34**(1): 1-7.
- Ehrlich, S., P. L. Williams, et al. (2012). "Urinary bisphenol A concentrations and early reproductive health outcomes among women undergoing IVF." *Hum Reprod*.
- Eiris, J. M., S. Lojo, et al. (1995). "Effects of long-term treatment with antiepileptic drugs on serum lipid levels in children with epilepsy." *Neurology* **45**(6): 1155-7.
- Engel, S. M., B. Levy, et al. (2006). "Xenobiotic phenols in early pregnancy amniotic fluid." *Reprod Toxicol* **21**(1): 110-2.

- Evans, N. P., T. North, et al. (2004). "Differential effects of the endocrine-disrupting compounds bisphenol-A and octylphenol on gonadotropin secretion, in prepubertal ewe lambs." Domest Anim Endocrinol **26**(1): 61-73.
- Eveillard, A., F. Lasserre, et al. (2009). "Identification of potential mechanisms of toxicity after di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) adult exposure in the liver using a systems biology approach." Toxicol Appl Pharmacol **236**(3): 282-92.
- Eveillard, A., L. Mselli-Lakhal, et al. (2009). "Di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) activates the constitutive androstane receptor (CAR): a novel signalling pathway sensitive to phthalates." Biochem Pharmacol **77**(11): 1735-46.
- Fabbrini, E., S. Sullivan, et al. (2010). "Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications." Hepatology **51**(2): 679-89.
- Farabollini, F., S. Porrini, et al. (2002). "Effects of perinatal exposure to bisphenol A on sociosexual behavior of female and male rats." Environ Health Perspect **110 Suppl 3**: 409-14.
- Faucette, S. R., T. Sueyoshi, et al. (2006). "Differential regulation of hepatic CYP2B6 and CYP3A4 genes by constitutive androstane receptor but not pregnane X receptor." J Pharmacol Exp Ther **317**(3): 1200-9.
- Febbraio, M. and R. L. Silverstein (2007). "CD36: implications in cardiovascular disease." Int J Biochem Cell Biol **39**(11): 2012-30.
- Feige, J. N., L. Gelman, et al. (2007). "The endocrine disruptor monoethyl-hexyl-phthalate is a selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulator that promotes adipogenesis." J Biol Chem **282**(26): 19152-66.
- Feng, Y. and P. Gregor (1997). "Cloning of a novel member of the G protein-coupled receptor family related to peptide receptors." Biochem Biophys Res Commun **231**(3): 651-4.
- Fent, G., W. J. Hein, et al. (2003). "Fate of 14C-bisphenol A in soils." Chemosphere **51**(8): 735-46.
- Fernandez, M. F., J. P. Arrebola, et al. (2007). "Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women." Reprod Toxicol **24**(2): 259-64.
- Ferre, P. and F. Foufelle (2010). "Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c." Diabetes Obes Metab **12 Suppl 2**: 83-92.
- Fierens, S., H. Mairesse, et al. (2003). "Dioxin/polychlorinated biphenyl body burden, diabetes and endometriosis: findings in a population-based study in Belgium." Biomarkers **8**(6): 529-34.
- Finn, P. F. and J. F. Dice (2006). "Proteolytic and lipolytic responses to starvation." Nutrition **22**(7-8): 830-44.
- Fiorucci, S., A. Zampella, et al. (2012). "Development of FXR, PXR and CAR agonists and antagonists for treatment of liver disorders." Curr Top Med Chem **12**(6): 605-24.
- Fleischmann, M. and P. B. Linedjian (2000). "Regulation of sterol regulatory-element binding protein 1 gene expression in liver: role of insulin and protein kinase B/cAkt." Biochem J **349**(Pt 1): 13-7.
- Forman, B. M., I. Tzameli, et al. (1998). "Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR-beta." Nature **395**(6702): 612-5.
- Foufelle, F., J. Girard, et al. (1996). "Regulation of lipogenic enzyme expression by glucose in liver and adipose tissue: a review of the potential cellular and molecular mechanisms." Adv Enzyme Regul **36**: 199-226.
- Francis, G. A., E. Fayard, et al. (2003). "Nuclear receptors and the control of metabolism." Annu Rev Physiol **65**: 261-311.
- Franzoni, E., M. Govoni, et al. (1992). "Total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, and triglycerides in children receiving antiepileptic drugs." Epilepsia **33**(5): 932-5.
- Fromenty, B. and D. Pessayre (1995). "Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity." Pharmacol Ther **67**(1): 101-54.
- Fu, S., L. Yang, et al. (2011). "Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity." Nature **473**(7348): 528-31.
- Fujimoto, V. Y., D. Kim, et al. (2011). "Serum unconjugated bisphenol A concentrations in women may adversely influence oocyte quality during in vitro fertilization." Fertil Steril **95**(5): 1816-9.

- Fujita, K., Y. Nozaki, et al. (2009). "Dysfunctional very-low-density lipoprotein synthesis and release is a key factor in nonalcoholic steatohepatitis pathogenesis." *Hepatology* **50**(3): 772-80.
- Fukao, T., G. D. Lopaschuk, et al. (2004). "Pathways and control of ketone body metabolism: on the fringe of lipid biochemistry." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **70**(3): 243-51.
- Fukata, H., H. Miyagawa, et al. (2006). "Comparison of Elisa- and LC-MS-Based Methodologies for the Exposure Assessment of Bisphenol A." *Toxicol Mech Methods* **16**(8): 427-30.
- Gao, J., J. He, et al. (2009). "The constitutive androstane receptor is an anti-obesity nuclear receptor that improves insulin sensitivity." *J Biol Chem* **284**(38): 25984-92.
- Gao, J. and W. Xie (2010). "Pregnane X receptor and constitutive androstane receptor at the crossroads of drug metabolism and energy metabolism." *Drug Metab Dispos* **38**(12): 2091-5.
- Gao, J. and W. Xie (2012). "Targeting xenobiotic receptors PXR and CAR for metabolic diseases." *Trends Pharmacol Sci*.
- Ge, Q., T. Nakagawa, et al. (2011). "Importin-alpha protein binding to a nuclear localization signal of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP)." *J Biol Chem* **286**(32): 28119-27.
- Geens, T., L. Goeyens, et al. (2011). "Are potential sources for human exposure to bisphenol-A overlooked?" *Int J Hyg Environ Health* **214**(5): 339-47.
- Geens, T., H. Neels, et al. (2012). "Distribution of bisphenol-A, triclosan and n-nonylphenol in human adipose tissue, liver and brain." *Chemosphere* **87**(7): 796-802.
- Gelissen, I. C., M. Harris, et al. (2006). "ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**(3): 534-40.
- Germain, P., B. Staels, et al. (2006). "Overview of nomenclature of nuclear receptors." *Pharmacol Rev* **58**(4): 685-704.
- Gervois, P. and J. C. Fruchart (2003). "[PPAR gamma: a major nuclear receptor in adipogenesis]." *Med Sci (Paris)* **19**(1): 20-2.
- Gibbons, G. F., A. M. Brown, et al. (2002). "The roles of insulin and fatty acids in the regulation of hepatic very-low-density lipoprotein assembly." *J R Soc Med* **95 Suppl 42**: 23-32.
- Ginsberg, G., K. Guyton, et al. (2010). "Genetic polymorphism in metabolism and host defense enzymes: implications for human health risk assessment." *Crit Rev Toxicol* **40**(7): 575-619.
- Ginsberg, G. and D. C. Rice (2009). "Does rapid metabolism ensure negligible risk from bisphenol A?" *Environ Health Perspect* **117**(11): 1639-43.
- Gonzalez-Bulnes, A. and C. Ovilo (2012). "Genetic basis, nutritional challenges and adaptive responses in the prenatal origin of obesity and type-2 diabetes." *Curr Diabetes Rev* **8**(2): 144-54.
- Goran, M. I., R. Walker, et al. (2010). "Effects of PNPLA3 on liver fat and metabolic profile in Hispanic children and adolescents." *Diabetes* **59**(12): 3127-30.
- Greco, D., A. Kotronen, et al. (2008). "Gene expression in human NAFLD." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **294**(5): G1281-7.
- Grun, F. (2010). "Obesogens." *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* **17**(5): 453-9.
- Grun, F. and B. Blumberg (2006). "Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling." *Endocrinology* **147**(6 Suppl): S50-5.
- Grundy, S. M. (1983). "Absorption and metabolism of dietary cholesterol." *Annu Rev Nutr* **3**: 71-96.
- Gueguen, Y., K. Mouzat, et al. (2006). "[Cytochromes P450: xenobiotic metabolism, regulation and clinical importance]." *Ann Biol Clin (Paris)* **64**(6): 535-48.
- Guillou, H., D. Zadavec, et al. (2010). "The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice." *Prog Lipid Res* **49**(2): 186-99.
- Guinez, C., G. Filhoulaud, et al. (2011). "O-GlcNAcylation increases ChREBP protein content and transcriptional activity in the liver." *Diabetes* **60**(5): 1399-413.
- Gupta, C. (2000). "Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals." *Proc Soc Exp Biol Med* **224**(2): 61-8.
- Gupta, S., W. M. Pandak, et al. (2002). "LXR alpha is the dominant regulator of CYP7A1 transcription." *Biochem Biophys Res Commun* **293**(1): 338-43.
- Guyot, E., A. Sutton, et al. (2012). "PNPLA3 rs738409, hepatocellular carcinoma occurrence and risk model prediction in patients with cirrhosis." *J Hepatol*.

- Haase, T. N., S. Ringholm, et al. (2011). "Role of PGC-1 α in exercise and fasting-induced adaptations in mouse liver." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **301**(5): R1501-9.
- Han, L. Q., H. J. Li, et al. (2012). "[mRNA expression of lipogenic genes in mouse mammary gland in different lactation stages]." *Yi Chuan* **34**(3): 335-41.
- Hanioka, N., T. Naito, et al. (2008). "Human UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in bisphenol A glucuronidation." *Chemosphere* **74**(1): 33-6.
- Hanioka, N., H. Oka, et al. (2011). "Effect of UDP-glucuronosyltransferase 2B15 polymorphism on bisphenol A glucuronidation." *Arch Toxicol* **85**(11): 1373-81.
- Hao, C., X. Cheng, et al. (2012). "The endocrine disruptor monoethyl-hexyl-phthalate promotes adipocyte differentiation and induces obesity in mice." *Biosci Rep*.
- Hardie, D. G. (2012). "Organismal carbohydrate and lipid homeostasis." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**(5).
- Hassan, Z. K., M. A. Elobeid, et al. (2012). "Bisphenol A Induces Hepatotoxicity through Oxidative Stress in Rat Model." *Oxid Med Cell Longev* **2012**: 194829.
- Hautekeete, M. L., C. Degott, et al. (1990). "Microvesicular steatosis of the liver." *Acta Clin Belg* **45**(5): 311-26.
- He, J., S. Nishida, et al. (2011). "PXR prevents cholesterol gallstone disease by regulating biosynthesis and transport of bile salts." *Gastroenterology* **140**(7): 2095-106.
- He, S., C. McPhaul, et al. (2010). "A sequence variation (I148M) in PNPLA3 associated with nonalcoholic fatty liver disease disrupts triglyceride hydrolysis." *J Biol Chem* **285**(9): 6706-15.
- Hegardt, F. G. (1999). "Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase: a control enzyme in ketogenesis." *Biochem J* **338** (Pt 3): 569-82.
- Heindel, J. J. (2003). "Endocrine disruptors and the obesity epidemic." *Toxicol Sci* **76**(2): 247-9.
- Heller, F. R., J. P. Desager, et al. (1988). "Changes in plasma activities of lipolytic enzymes and lipids of normolipidemic subjects given phenobarbital, a strong microsomal inducer, alone or in combination with fenofibrate." *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* **26**(3): 138-42.
- Hensley, K., Y. Kotake, et al. (2000). "Dietary choline restriction causes complex I dysfunction and increased H₂O₂ generation in liver mitochondria." *Carcinogenesis* **21**(5): 983-9.
- Hernandez, J. P., W. Huang, et al. (2007). "The environmental estrogen, nonylphenol, activates the constitutive androstane receptor." *Toxicol Sci* **98**(2): 416-26.
- Hers, H. G. (1976). "The control of glycogen metabolism in the liver." *Annu Rev Biochem* **45**: 167-89.
- Herzig, S., F. Long, et al. (2001). "CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1." *Nature* **413**(6852): 179-83.
- Higuchi, H. and G. J. Gores (2003). "Mechanisms of liver injury: an overview." *Curr Mol Med* **3**(6): 483-90.
- Higuchi, N., M. Kato, et al. (2008). "Liver X receptor in cooperation with SREBP-1c is a major lipid synthesis regulator in nonalcoholic fatty liver disease." *Hepatology* **38**(11): 1122-9.
- Hinson, J. A. and P. G. Forkert (1995). "Phase II enzymes and bioactivation." *Can J Physiol Pharmacol* **73**(10): 1407-13.
- Hirschberg, H. J., J. W. Simons, et al. (2001). "Cloning, expression, purification and characterization of patatin, a novel phospholipase A." *Eur J Biochem* **268**(19): 5037-44.
- Ho, S. M., W. Y. Tang, et al. (2006). "Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4." *Cancer Res* **66**(11): 5624-32.
- Hong, N. S., K. S. Kim, et al. (2012). "The association between obesity and mortality in the elderly differs by serum concentrations of persistent organic pollutants: a possible explanation for the obesity paradox." *Int J Obes (Lond)* **36**(9): 1170-5.
- Honma, S., A. Suzuki, et al. (2002). "Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction." *Reprod Toxicol* **16**(2): 117-22.
- Hooper, A. J., L. A. Adams, et al. (2011). "Genetic determinants of hepatic steatosis in man." *J Lipid Res* **52**(4): 593-617.
- Hoover, R. N., M. Hyer, et al. (2011). "Adverse health outcomes in women exposed in utero to diethylstilbestrol." *N Engl J Med* **365**(14): 1304-14.

- Horlein, A. J., A. M. Naar, et al. (1995). "Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor." *Nature* **377**(6548): 397-404.
- Horton, J. D., J. L. Goldstein, et al. (2002). "SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver." *J Clin Invest* **109**(9): 1125-31.
- Howdeshell, K. L., A. K. Hotchkiss, et al. (1999). "Exposure to bisphenol A advances puberty." *Nature* **401**(6755): 763-4.
- Hsieh, Y. C., H. P. Yu, et al. (2007). "G protein-coupled receptor 30-dependent protein kinase A pathway is critical in nongenomic effects of estrogen in attenuating liver injury after trauma-hemorrhage." *Am J Pathol* **170**(4): 1210-8.
- Hu, G., C. Xu, et al. (2010). "Pregnane X receptor is SUMOylated to repress the inflammatory response." *J Pharmacol Exp Ther* **335**(2): 342-50.
- Hu, J., Z. Zhang, et al. (2010). "Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones." *Nutr Metab (Lond)* **7**: 47.
- Hua, T., D. Wu, et al. (2012). "Studies of human 2,4-dienoyl CoA reductase shed new light on peroxisomal beta-oxidation of unsaturated fatty acids." *J Biol Chem* **287**(34): 28956-65.
- Huang, Y., J. C. Cohen, et al. (2011). "Expression and characterization of a PNPLA3 protein isoform (I148M) associated with nonalcoholic fatty liver disease." *J Biol Chem* **286**(43): 37085-93.
- Huang, Y., S. He, et al. (2010). "A feed-forward loop amplifies nutritional regulation of PNPLA3." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(17): 7892-7.
- Huc, L., A. Lemarie, et al. (2012). "Low concentrations of bisphenol A induce lipid accumulation mediated by the production of reactive oxygen species in the mitochondria of HepG2 cells." *Toxicol In Vitro* **26**(5): 709-17.
- Hugo, E. R., T. D. Brandebourg, et al. (2008). "Bisphenol A at environmentally relevant doses inhibits adiponectin release from human adipose tissue explants and adipocytes." *Environ Health Perspect* **116**(12): 1642-7.
- Hussain, M. M., J. Shi, et al. (2003). "Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly." *J Lipid Res* **44**(1): 22-32.
- Hyysalo, J., I. Stojkovic, et al. (2012). "Genetic variation in PNPLA3 but not APOC3 influences liver fat in non-alcoholic fatty liver disease." *J Gastroenterol Hepatol* **27**(5): 951-6.
- Iizuka, K., R. K. Bruick, et al. (2004). "Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(19): 7281-6.
- Ikeda, Y., S. Tajima, et al. (2012). "Estrogen regulates hepcidin expression via GPR30-BMP6-dependent signaling in hepatocytes." *PLoS One* **7**(7): e40465.
- Ikezuki, Y., O. Tsutsumi, et al. (2002). "Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure." *Hum Reprod* **17**(11): 2839-41.
- Ikonen, E. (2008). "Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(2): 125-38.
- Ingelman-Sundberg, M. (2001). "Genetic variability in susceptibility and response to toxicants." *Toxicol Lett* **120**(1-3): 259-68.
- Inoue, H., G. Yuki, et al. (2003). "Bisphenol A glucuronidation and absorption in rat intestine." *Drug Metab Dispos* **31**(1): 140-4.
- Ishido, M., Y. Masuo, et al. (2004). "Bisphenol A causes hyperactivity in the rat concomitantly with impairment of tyrosine hydroxylase immunoreactivity." *J Neurosci Res* **76**(3): 423-33.
- Itoh, H., M. Iwasaki, et al. (2007). "Urinary bisphenol-A concentration in infertile Japanese women and its association with endometriosis: A cross-sectional study." *Environ Health Prev Med* **12**(6): 258-64.
- Iwamuro, S., M. Yamada, et al. (2006). "Effects of bisphenol A on thyroid hormone-dependent up-regulation of thyroid hormone receptor alpha and beta and down-regulation of retinoid X receptor gamma in Xenopus tail culture." *Life Sci* **79**(23): 2165-71.
- Janesick, A. and B. Blumberg (2011). "Minireview: PPARgamma as the target of obesogens." *J Steroid Biochem Mol Biol* **127**(1-2): 4-8.
- Janesick, A. and B. Blumberg (2012). "Obesogens, stem cells and the developmental programming of obesity." *Int J Androl* **35**(3): 437-48.

- Jenkins, C. M., D. J. Mancuso, et al. (2004). "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* **279**(47): 48968-75.
- Jenkins, S., J. Wang, et al. (2011). "Chronic oral exposure to bisphenol A results in a nonmonotonic dose response in mammary carcinogenesis and metastasis in MMTV-erbB2 mice." *Environ Health Perspect* **119**(11): 1604-9.
- Jitrapakdee, S. (2012). "Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis." *Int J Biochem Cell Biol* **44**(1): 33-45.
- Joensen, U. N., H. Frederiksen, et al. (2012). "Phthalate excretion pattern and testicular function: a study of 881 healthy danish men." *Environ Health Perspect* **120**(10): 1397-403.
- Johansson, I. and M. Ingelman-Sundberg (2011). "Genetic polymorphism and toxicology--with emphasis on cytochrome p450." *Toxicol Sci* **120**(1): 1-13.
- Johansson, L. E., L. M. Johansson, et al. (2009). "Genetic variance in the adiponutrin gene family and childhood obesity." *PLoS One* **4**(4): e5327.
- Johansson, L. E., U. Lindblad, et al. (2008). "Polymorphisms in the adiponutrin gene are associated with increased insulin secretion and obesity." *Eur J Endocrinol* **159**(5): 577-83.
- Jump, D. B. (2008). "N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription." *Curr Opin Lipidol* **19**(3): 242-7.
- Jung, D., D. J. Mangelsdorf, et al. (2006). "Pregnane X receptor is a target of farnesoid X receptor." *J Biol Chem* **281**(28): 19081-91.
- Juvel, L. K., S. M. Andresen, et al. (2003). "On the role of liver X receptors in lipid accumulation in adipocytes." *Mol Endocrinol* **17**(2): 172-82.
- Kabuto, H., M. Amakawa, et al. (2004). "Exposure to bisphenol A during embryonic/fetal life and infancy increases oxidative injury and causes underdevelopment of the brain and testis in mice." *Life Sci* **74**(24): 2931-40.
- Kakizaki, S., Y. Yamazaki, et al. (2008). "New insights on the xenobiotic-sensing nuclear receptors in liver diseases--CAR and PXR." *Curr Drug Metab* **9**(7): 614-21.
- Kang, J. H. and F. Kondo (2005). "Bisphenol A degradation in seawater is different from that in river water." *Chemosphere* **60**(9): 1288-92.
- Kang, J. H., F. Kondo, et al. (2006). "Human exposure to bisphenol A." *Toxicology* **226**(2-3): 79-89.
- Kassam, A., C. J. Winrow, et al. (2000). "The peroxisome proliferator response element of the gene encoding the peroxisomal beta-oxidation enzyme enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase is a target for constitutive androstane receptor beta/9-cis-retinoic acid receptor-mediated transactivation." *J Biol Chem* **275**(6): 4345-50.
- Kast, H. R., B. Goodwin, et al. (2002). "Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor." *J Biol Chem* **277**(4): 2908-15.
- Kawaguchi, T., K. Osatomi, et al. (2002). "Mechanism for fatty acid "sparing" effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase." *J Biol Chem* **277**(6): 3829-35.
- Kawaguchi, T., Y. Sumida, et al. (2012). "Genetic polymorphisms of the human PNPLA3 gene are strongly associated with severity of non-alcoholic fatty liver disease in Japanese." *PLoS One* **7**(6): e38322.
- Kawahata, H., H. Ohta, et al. (2004). "Endocrine disrupter nonylphenol and bisphenol A contamination in Okinawa and Ishigaki Islands, Japan--within coral reefs and adjacent river mouths." *Chemosphere* **55**(11): 1519-27.
- Kawai, K., T. Nozaki, et al. (2003). "Aggressive behavior and serum testosterone concentration during the maturation process of male mice: the effects of fetal exposure to bisphenol A." *Environ Health Perspect* **111**(2): 175-8.
- Kawamoto, T., T. Sueyoshi, et al. (1999). "Phenobarbital-responsive nuclear translocation of the receptor CAR in induction of the CYP2B gene." *Mol Cell Biol* **19**(9): 6318-22.
- Khogali, A. M., B. I. Chazan, et al. (1974). "Hyperlipidaemia as a complication of rifampicin treatment." *Tubercle* **55**(3): 231-3.

- Kidani, T., S. Kamei, et al. (2010). "Bisphenol A downregulates Akt signaling and inhibits adiponectin production and secretion in 3T3-L1 adipocytes." *J Atheroscler Thromb* **17**(8): 834-43.
- Kienesberger, P. C., M. Oberer, et al. (2009). "Mammalian patatin domain containing proteins: a family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions." *J Lipid Res* **50** Suppl: S63-8.
- Kim, D. K., J. R. Kim, et al. (2011). "Estrogen-related receptor gamma (ERRgamma) is a novel transcriptional regulator of phosphatidic acid phosphatase, LIPIN1, and inhibits hepatic insulin signaling." *J Biol Chem* **286**(44): 38035-42.
- Kim, D. K., D. Ryu, et al. (2012). "Orphan Nuclear Receptor Estrogen-Related Receptor gamma (ERRgamma) Is Key Regulator of Hepatic Gluconeogenesis." *J Biol Chem* **287**(26): 21628-39.
- Kim, J. B., P. Sarraf, et al. (1998). "Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1." *J Clin Invest* **101**(1): 1-9.
- Kimmel, A. R., D. L. Brasaemle, et al. (2010). "Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins." *J Lipid Res* **51**(3): 468-71.
- King, C. D., G. R. Rios, et al. (2000). "UDP-glucuronosyltransferases." *Curr Drug Metab* **1**(2): 143-61.
- Kinlaw, W. B., J. L. Church, et al. (1995). "Direct evidence for a role of the "spot 14" protein in the regulation of lipid synthesis." *J Biol Chem* **270**(28): 16615-8.
- Kirchner, S., T. Kieu, et al. (2010). "Prenatal exposure to the environmental obesogen tributyltin predisposes multipotent stem cells to become adipocytes." *Mol Endocrinol* **24**(3): 526-39.
- Kitamura, S., T. Suzuki, et al. (2005). "Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds." *Toxicol Sci* **84**(2): 249-59.
- Kiyosawa, N., K. Tanaka, et al. (2004). "Molecular mechanism investigation of phenobarbital-induced serum cholesterol elevation in rat livers by microarray analysis." *Arch Toxicol* **78**(8): 435-42.
- Kleiner, D. E. and E. M. Brunt (2012). "Nonalcoholic fatty liver disease: pathologic patterns and biopsy evaluation in clinical research." *Semin Liver Dis* **32**(1): 3-13.
- Kletzien, R. F., S. D. Clarke, et al. (1992). "Enhancement of adipocyte differentiation by an insulin-sensitizing agent." *Mol Pharmacol* **41**(2): 393-8.
- Kmieciak, Z. (2001). "Cooperation of liver cells in health and disease." *Adv Anat Embryol Cell Biol* **161**: III-XIII, 1-151.
- Knockaert, L., B. Fromenty, et al. (2011). "Mechanisms of mitochondrial targeting of cytochrome P450 2E1: physiopathological role in liver injury and obesity." *FEBS J* **278**(22): 4252-60.
- Kodama, S., C. Koike, et al. (2004). "Nuclear receptors CAR and PXR cross talk with FOXO1 to regulate genes that encode drug-metabolizing and gluconeogenic enzymes." *Mol Cell Biol* **24**(18): 7931-40.
- Kodama, S., R. Moore, et al. (2007). "Human nuclear pregnane X receptor cross-talk with CREB to repress cAMP activation of the glucose-6-phosphatase gene." *Biochem J* **407**(3): 373-81.
- Koh, K. H., S. Jurkovic, et al. (2012). "Estradiol induces cytochrome P450 2B6 expression at high concentrations: implication in estrogen-mediated gene regulation in pregnancy." *Biochem Pharmacol* **84**(1): 93-103.
- Kohjima, M., M. Enjoji, et al. (2007). "Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease." *Int J Mol Med* **20**(3): 351-8.
- Konig, M., S. Bulik, et al. (2012). "Quantifying the contribution of the liver to glucose homeostasis: a detailed kinetic model of human hepatic glucose metabolism." *PLoS Comput Biol* **8**(6): e1002577.
- Konno, Y., M. Negishi, et al. (2008). "The roles of nuclear receptors CAR and PXR in hepatic energy metabolism." *Drug Metab Pharmacokinet* **23**(1): 8-13.
- Koo, S. H., A. K. Dutcher, et al. (2001). "Glucose and insulin function through two distinct transcription factors to stimulate expression of lipogenic enzyme genes in liver." *J Biol Chem* **276**(12): 9437-45.
- Koo, S. H. and H. C. Towle (2000). "Glucose regulation of mouse S(14) gene expression in hepatocytes. Involvement of a novel transcription factor complex." *J Biol Chem* **275**(7): 5200-7.
- Koonen, D. P., M. Febbraio, et al. (2007). "CD36 expression contributes to age-induced cardiomyopathy in mice." *Circulation* **116**(19): 2139-47.
- Koonen, D. P., R. L. Jacobs, et al. (2007). "Increased hepatic CD36 expression contributes to dyslipidemia associated with diet-induced obesity." *Diabetes* **56**(12): 2863-71.

- Kopec, A. K., L. D. Burgoon, et al. (2010). "Automated dose-response analysis and comparative toxicogenomic evaluation of the hepatic effects elicited by TCDD, TCDF, and PCB126 in C57BL/6 mice." Toxicol Sci **118**(1): 286-97.
- Korach-Andre, M., A. Archer, et al. (2011). "Both liver-X receptor (LXR) isoforms control energy expenditure by regulating brown adipose tissue activity." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(1): 403-8.
- Koyano, S., K. Kurose, et al. (2004). "Functional characterization of four naturally occurring variants of human pregnane X receptor (PXR): one variant causes dramatic loss of both DNA binding activity and the transactivation of the CYP3A4 promoter/enhancer region." Drug Metab Dispos **32**(1): 149-54.
- Kretschmer, X. C. and W. S. Baldwin (2005). "CAR and PXR: xenosensors of endocrine disrupters?" Chem Biol Interact **155**(3): 111-28.
- Krotkiewski, M. (2000). "Thyroid hormones and treatment of obesity." Int J Obes Relat Metab Disord **24 Suppl 2**: S116-9.
- Kubo, K., O. Arai, et al. (2003). "Low dose effects of bisphenol A on sexual differentiation of the brain and behavior in rats." Neurosci Res **45**(3): 345-56.
- Kubo, M., N. Ijichi, et al. (2009). "Modulation of adipogenesis-related gene expression by estrogen-related receptor gamma during adipocytic differentiation." Biochim Biophys Acta **1789**(2): 71-7.
- Kumari, M., G. Schoiswohl, et al. (2012). "Adiponutrin functions as a nutritionally regulated lysophosphatidic acid acyltransferase." Cell Metab **15**(5): 691-702.
- Kurukulasuriya, R., J. T. Link, et al. (2003). "Potential drug targets and progress towards pharmacologic inhibition of hepatic glucose production." Curr Med Chem **10**(2): 123-53.
- Kuruto-Niwa, R., Y. Tateoka, et al. (2007). "Measurement of bisphenol A concentrations in human colostrum." Chemosphere **66**(6): 1160-4.
- La Merrill, M. and L. S. Birnbaum (2011). "Childhood obesity and environmental chemicals." Mt Sinai J Med **78**(1): 22-48.
- Labbe, G., D. Pessayre, et al. (2008). "Drug-induced liver injury through mitochondrial dysfunction: mechanisms and detection during preclinical safety studies." Fundam Clin Pharmacol **22**(4): 335-53.
- Lahtela, J. T., A. J. Arranto, et al. (1985). "Enzyme inducers improve insulin sensitivity in non-insulin-dependent diabetic subjects." Diabetes **34**(9): 911-6.
- Lai, I. K., K. Dhakal, et al. (2012). "N-acetylcysteine (NAC) diminishes the severity of PCB 126-induced fatty liver in male rodents." Toxicology **302**(1): 25-33.
- Lai, Y., W. Pan, et al. (2011). "Theoretical evaluation of the configurations and Raman spectra of 209 polychlorinated biphenyl congeners." Chemosphere **85**(3): 412-7.
- Lake, A. C., Y. Sun, et al. (2005). "Expression, regulation, and triglyceride hydrolase activity of Adiponutrin family members." J Lipid Res **46**(11): 2477-87.
- Lakind, J. S. and D. Q. Naiman (2008). "Bisphenol A (BPA) daily intakes in the United States: estimates from the 2003-2004 NHANES urinary BPA data." J Expo Sci Environ Epidemiol **18**(6): 608-15.
- Lammert, C., E. Bjornsson, et al. (2010). "Oral medications with significant hepatic metabolism at higher risk for hepatic adverse events." Hepatology **51**(2): 615-20.
- Lang, I. A., T. S. Galloway, et al. (2008). "Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults." JAMA **300**(11): 1303-10.
- Lanthier, N., Y. Horsmans, et al. (2009). "The metabolic syndrome: how it may influence hepatic stellate cell activation and hepatic fibrosis." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **12**(4): 404-11.
- Lapinskas, P. J., S. Brown, et al. (2005). "Role of PPARalpha in mediating the effects of phthalates and metabolites in the liver." Toxicology **207**(1): 149-63.
- Larrey, D. (2000). "Drug-induced liver diseases." J Hepatol **32**(1 Suppl): 77-88.
- Larter, C. Z., S. Chitturi, et al. (2010). "A fresh look at NASH pathogenesis. Part 1: the metabolic movers." J Gastroenterol Hepatol **25**(4): 672-90.
- Le Borgne and Demarquoy (2003). "Carnitine and athletic performance." Science & Sports **18**(3): 125-133.
- le Maire, A., M. Grimaldi, et al. (2009). "Activation of RXR-PPAR heterodimers by organotin environmental endocrine disruptors." EMBO Rep **10**(4): 367-73.

- Lee, D. H., I. K. Lee, et al. (2007). "Relationship between serum concentrations of persistent organic pollutants and the prevalence of metabolic syndrome among non-diabetic adults: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002." *Diabetologia* **50**(9): 1841-51.
- Lee, D. H., M. W. Steffes, et al. (2010). "Low dose of some persistent organic pollutants predicts type 2 diabetes: a nested case-control study." *Environ Health Perspect* **118**(9): 1235-42.
- Lee, J. H., J. Zhou, et al. (2008). "PXR and LXR in hepatic steatosis: a new dog and an old dog with new tricks." *Mol Pharm* **5**(1): 60-6.
- Lee, M. H., J. W. Kim, et al. (2010). "Gene expression profiling of murine hepatic steatosis induced by tamoxifen." *Toxicol Lett* **199**(3): 416-24.
- Lee, Y. J., H. Y. Ryu, et al. (2008). "Maternal and fetal exposure to bisphenol A in Korea." *Reprod Toxicol* **25**(4): 413-9.
- Lemaire, G., W. Mnif, et al. (2006). "Identification of new human pregnane X receptor ligands among pesticides using a stable reporter cell system." *Toxicol Sci* **91**(2): 501-9.
- Lemoine, M., L. Serfaty, et al. (2012). "From nonalcoholic fatty liver to nonalcoholic steatohepatitis and cirrhosis in HIV-infected patients: diagnosis and management." *Curr Opin Infect Dis* **25**(1): 10-6.
- Leranth, C., K. Szigeti-Buck, et al. (2008). "Bisphenol A prevents the synaptogenic response to testosterone in the brain of adult male rats." *Endocrinology* **149**(3): 988-94.
- Leung, T. M. and N. Nieto (2012). "CYP2E1 and Oxidant Stress in Alcoholic and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *J Hepatol*.
- Lewis, D. F. (2004). "57 varieties: the human cytochromes P450." *Pharmacogenomics* **5**(3): 305-18.
- Li, D., Z. Zhou, et al. (2010). "Occupational exposure to bisphenol-A (BPA) and the risk of self-reported male sexual dysfunction." *Hum Reprod* **25**(2): 519-27.
- Li, D. K., Z. Zhou, et al. (2011). "Urine bisphenol-A (BPA) level in relation to semen quality." *Fertil Steril* **95**(2): 625-30 e1-4.
- Li, J. Z., Y. Huang, et al. (2012). "Chronic overexpression of PNPLA3I148M in mouse liver causes hepatic steatosis." *J Clin Invest*.
- Li, T., W. Chen, et al. (2007). "PXR induces CYP27A1 and regulates cholesterol metabolism in the intestine." *J Lipid Res* **48**(2): 373-84.
- Li, T. and J. Y. Chiang (2005). "Mechanism of rifampicin and pregnane X receptor inhibition of human cholesterol 7 alpha-hydroxylase gene transcription." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **288**(1): G74-84.
- Li, X., J. Ycaza, et al. (2011). "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.
- Li, Y., C. Xing, et al. (2012). "Genetic variant I148M in PNPLA3 is associated with the ultrasonography-determined steatosis degree in a Chinese population." *BMC Med Genet* **13**(1): 113.
- Liao, C. and K. Kannan (2011). "Widespread occurrence of bisphenol A in paper and paper products: implications for human exposure." *Environ Sci Technol* **45**(21): 9372-9.
- Lima-Cabello, E., M. V. Garcia-Mediavilla, et al. (2011). "Enhanced expression of pro-inflammatory mediators and liver X-receptor-regulated lipogenic genes in non-alcoholic fatty liver disease and hepatitis C." *Clin Sci (Lond)* **120**(6): 239-50.
- Lind, P. M. and L. Lind (2011). "Circulating levels of bisphenol A and phthalates are related to carotid atherosclerosis in the elderly." *Atherosclerosis* **218**(1): 207-13.
- Linehan, C., S. Gupta, et al. (2012). "Bisphenol A-mediated suppression of LPL gene expression inhibits triglyceride accumulation during adipogenic differentiation of human adult stem cells." *PLoS One* **7**(5): e36109.
- Lio, Y. C. and E. A. Dennis (1998). "Interfacial activation, lysophospholipase and transacylase activity of group VI Ca²⁺-independent phospholipase A2." *Biochim Biophys Acta* **1392**(2-3): 320-32.
- Liu, C. and J. D. Lin (2011). "PGC-1 coactivators in the control of energy metabolism." *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **43**(4): 248-57.
- Liu, L., C. Ma, et al. (2012). "[Effect of bisphenol A exposure during early development on body weight and glucose metabolism of female filial rats]." *Wei Sheng Yan Jiu* **41**(4): 543-5, 550.

- Liu, X., A. Matsushima, et al. (2012). "Fine spatial assembly for construction of the phenol-binding pocket to capture bisphenol A in the human nuclear receptor estrogen-related receptor gamma." *J Biochem* **151**(4): 403-15.
- Liu, X., A. Matsushima, et al. (2010). "Distinction of the binding modes for human nuclear receptor ERRgamma between bisphenol A and 4-hydroxytamoxifen." *J Biochem* **148**(2): 247-54.
- Liu, Y. M., Y. P. Shen, et al. (2011). "[A correlative study on Bisphenol A and recurrent spontaneous abortion]." *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* **45**(4): 344-9.
- Loos, R., G. Locoro, et al. (2010). "Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water." *Water Res* **44**(14): 4115-26.
- Lopez-Velazquez, J. A., L. D. Carrillo-Cordova, et al. (2012). "Nuclear receptors in nonalcoholic Fatty liver disease." *J Lipids* **2012**: 139875.
- Louet, J. F., C. Le May, et al. (2001). "Regulation of liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by hormones and fatty acids." *Biochem Soc Trans* **29**(Pt 2): 310-6.
- Luo, G., M. Cunningham, et al. (2002). "CYP3A4 induction by drugs: correlation between a pregnane X receptor reporter gene assay and CYP3A4 expression in human hepatocytes." *Drug Metab Dispos* **30**(7): 795-804.
- Luoma, P. V., V. V. Myllyla, et al. (1982). "Relationship between plasma high-density lipoprotein cholesterol and anticonvulsant levels in epileptics." *J Cardiovasc Pharmacol* **4**(6): 1024-7.
- Luoma, P. V., V. V. Myllyla, et al. (1979). "Plasma HDL cholesterol in epileptics with elevated triglyceride and cholesterol." *Acta Neurol Scand* **60**(1): 56-63.
- MacLusky, N. J., T. Hajszan, et al. (2005). "The environmental estrogen bisphenol a inhibits estradiol-induced hippocampal synaptogenesis." *Environ Health Perspect* **113**(6): 675-9.
- Maglich, J. M., D. C. Lobe, et al. (2009). "The nuclear receptor CAR (NR113) regulates serum triglyceride levels under conditions of metabolic stress." *J Lipid Res* **50**(3): 439-45.
- Maglich, J. M., J. Watson, et al. (2004). "The nuclear receptor CAR is a regulator of thyroid hormone metabolism during caloric restriction." *J Biol Chem* **279**(19): 19832-8.
- Maher, J. J. (1997). "Exploring alcohol's effects on liver function." *Alcohol Health Res World* **21**(1): 5-12.
- Makaji, E., S. Raha, et al. (2011). "Effect of environmental contaminants on Beta cell function." *Int J Toxicol* **30**(4): 410-8.
- Malarkey, D. E., K. Johnson, et al. (2005). "New insights into functional aspects of liver morphology." *Toxicol Pathol* **33**(1): 27-34.
- Maloney, E. K. and D. J. Waxman (1999). "trans-Activation of PPARalpha and PPARgamma by structurally diverse environmental chemicals." *Toxicol Appl Pharmacol* **161**(2): 209-18.
- Manenti, G., T. A. Dragani, et al. (1987). "Effects of phenobarbital and 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene on differentiated functions in mouse liver." *Chem Biol Interact* **64**(1-2): 83-92.
- Mangelsdorf, D. J., C. Thummel, et al. (1995). "The nuclear receptor superfamily: the second decade." *Cell* **83**(6): 835-9.
- Marino, M., P. Ascenzi, et al. (2006). "S-palmitoylation modulates estrogen receptor alpha localization and functions." *Steroids* **71**(4): 298-303.
- Markey, C. M., B. S. Rubin, et al. (2002). "Endocrine disruptors: from Wingspread to environmental developmental biology." *J Steroid Biochem Mol Biol* **83**(1-5): 235-44.
- Markey, C. M., P. R. Wadia, et al. (2005). "Long-term effects of fetal exposure to low doses of the xenoestrogen bisphenol-A in the female mouse genital tract." *Biol Reprod* **72**(6): 1344-51.
- Marmugi, A., S. Ducheix, et al. (2012). "Low doses of bisphenol A induce gene expression related to lipid synthesis and trigger triglyceride accumulation in adult mouse liver." *Hepatology* **55**(2): 395-407.
- Maronpot, R. R., K. Yoshizawa, et al. (2010). "Hepatic enzyme induction: histopathology." *Toxicol Pathol* **38**(5): 776-95.
- Marrero, J. A., R. J. Fontana, et al. (2002). "NAFLD may be a common underlying liver disease in patients with hepatocellular carcinoma in the United States." *Hepatology* **36**(6): 1349-54.
- Masson, D., M. Qatanani, et al. (2008). "Activation of the constitutive androstane receptor decreases HDL in wild-type and human apoA-I transgenic mice." *J Lipid Res* **49**(8): 1682-91.

- Masuno, H., J. Iwanami, et al. (2005). "Bisphenol a accelerates terminal differentiation of 3T3-L1 cells into adipocytes through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway." Toxicol Sci **84**(2): 319-27.
- Masuno, H., T. Kidani, et al. (2002). "Bisphenol A in combination with insulin can accelerate the conversion of 3T3-L1 fibroblasts to adipocytes." J Lipid Res **43**(5): 676-84.
- Masuyama, H. and Y. Hiramatsu (2012). "Treatment with a constitutive androstane receptor ligand ameliorates the signs of preeclampsia in high-fat diet-induced obese pregnant mice." Mol Cell Endocrinol **348**(1): 120-7.
- Masuyama, H. and Y. Hiramatsu (2012). "Treatment with constitutive androstane receptor ligand during pregnancy prevents insulin resistance in offspring from high-fat diet-induced obese pregnant mice." Am J Physiol Endocrinol Metab **303**(2): E293-300.
- Masuyama, H. and Y. Hiramatsu (2012a). "Treatment with a constitutive androstane receptor ligand ameliorates the signs of preeclampsia in high-fat diet-induced obese pregnant mice." Mol Cell Endocrinol **348**(1): 120-7.
- Masuyama, H. and Y. Hiramatsu (2012b). "Treatment with constitutive androstane receptor ligand during pregnancy prevents insulin resistance in offspring from high-fat diet-induced obese pregnant mice." Am J Physiol Endocrinol Metab **303**(2): E293-300.
- Matsuzaka, T., H. Shimano, et al. (2002). "Cloning and characterization of a mammalian fatty acyl-CoA elongase as a lipogenic enzyme regulated by SREBPs." J Lipid Res **43**(6): 911-20.
- Mazur, C. S., J. F. Kenneke, et al. (2010). "Differences between human and rat intestinal and hepatic bisphenol A glucuronidation and the influence of alamethicin on in vitro kinetic measurements." Drug Metab Dispos **38**(12): 2232-8.
- McKinney, J. D. and C. L. Waller (1994). "Polychlorinated biphenyls as hormonally active structural analogues." Environ Health Perspect **102**(3): 290-7.
- Meeker, J. D. and K. K. Ferguson (2011). "Relationship between urinary phthalate and bisphenol A concentrations and serum thyroid measures in U.S. adults and adolescents from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2007-2008." Environ Health Perspect **119**(10): 1396-402.
- Melzer, D., P. Gates, et al. (2012). "Urinary bisphenol a concentration and angiography-defined coronary artery stenosis." PLoS One **7**(8): e43378.
- Melzer, D., N. J. Osborne, et al. (2012). "Urinary bisphenol A concentration and risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women." Circulation **125**(12): 1482-90.
- Melzer, D., N. E. Rice, et al. (2010). "Association of urinary bisphenol a concentration with heart disease: evidence from NHANES 2003/06." PLoS One **5**(1): e8673.
- Miao, J., S. Fang, et al. (2006). "Functional inhibitory cross-talk between constitutive androstane receptor and hepatic nuclear factor-4 in hepatic lipid/glucose metabolism is mediated by competition for binding to the DR1 motif and to the common coactivators, GRIP-1 and PGC-1alpha." J Biol Chem **281**(21): 14537-46.
- Midoro-Horiuti, T., R. Tiwari, et al. (2010). "Maternal bisphenol a exposure promotes the development of experimental asthma in mouse pups." Environ Health Perspect **118**(2): 273-7.
- Mielke, H. and U. Gundert-Remy (2009). "Bisphenol A levels in blood depend on age and exposure." Toxicol Lett **190**(1): 32-40.
- Milic, S. and D. Stimac (2012). "Nonalcoholic fatty liver disease/steatohepatitis: epidemiology, pathogenesis, clinical presentation and treatment." Dig Dis **30**(2): 158-62.
- Mithieux, G., A. Gautier-Stein, et al. (2006). "Contribution of intestine and kidney to glucose fluxes in different nutritional states in rat." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **143**(2): 195-200.
- Mitrakou, A. (2011). "Kidney: its impact on glucose homeostasis and hormonal regulation." Diabetes Res Clin Pract **93 Suppl 1**: S66-72.
- Mittendorf, R. (1995). "Teratogen update: carcinogenesis and teratogenesis associated with exposure to diethylstilbestrol (DES) in utero." Teratology **51**(6): 435-45.
- Miyawaki, J., K. Sakayama, et al. (2007). "Perinatal and postnatal exposure to bisphenol a increases adipose tissue mass and serum cholesterol level in mice." J Atheroscler Thromb **14**(5): 245-52.

- Miyazaki, M., M. T. Flowers, et al. (2007). "Hepatic stearoyl-CoA desaturase-1 deficiency protects mice from carbohydrate-induced adiposity and hepatic steatosis." *Cell Metab* **6**(6): 484-96.
- Miyazaki, M., Y. C. Kim, et al. (2001). "A lipogenic diet in mice with a disruption of the stearoyl-CoA desaturase 1 gene reveals a stringent requirement of endogenous monounsaturated fatty acids for triglyceride synthesis." *J Lipid Res* **42**(7): 1018-24.
- Mo, S. L., Y. H. Liu, et al. (2009). "Substrate specificity, regulation, and polymorphism of human cytochrome P450 2B6." *Curr Drug Metab* **10**(7): 730-53.
- Moczulski, D., I. Majak, et al. (2009). "An overview of beta-oxidation disorders." *Postepy Hig Med Dosw (Online)* **63**: 266-77.
- Mok-Lin, E., S. Ehrlich, et al. (2011). "Urinary bisphenol A concentrations and ovarian response among women undergoing IVF." *Int J Androl* **33**(2): 385-93.
- Moldes, M., G. Beauregard, et al. (2006). "Adiponutrin gene is regulated by insulin and glucose in human adipose tissue." *Eur J Endocrinol* **155**(3): 461-8.
- Monje, L., J. Varayoud, et al. (2007). "Neonatal exposure to bisphenol A modifies the abundance of estrogen receptor alpha transcripts with alternative 5'-untranslated regions in the female rat preoptic area." *J Endocrinol* **194**(1): 201-12.
- Monje, L., J. Varayoud, et al. (2010). "Exposure of neonatal female rats to bisphenol A disrupts hypothalamic LHRH pre-mRNA processing and estrogen receptor alpha expression in nuclei controlling estrous cyclicity." *Reprod Toxicol* **30**(4): 625-34.
- Moon, M. K., M. J. Kim, et al. (2012). "Bisphenol A impairs mitochondrial function in the liver at doses below the no observed adverse effect level." *J Korean Med Sci* **27**(6): 644-52.
- Moon, Y. A., N. A. Shah, et al. (2001). "Identification of a mammalian long chain fatty acyl elongase regulated by sterol regulatory element-binding proteins." *J Biol Chem* **276**(48): 45358-66.
- Moreau, A., C. Teruel, et al. (2009). "A novel pregnane X receptor and S14-mediated lipogenic pathway in human hepatocyte." *Hepatology* **49**(6): 2068-79.
- Moreau, A., M. J. Vilarem, et al. (2008). "Xenoreceptors CAR and PXR activation and consequences on lipid metabolism, glucose homeostasis, and inflammatory response." *Mol Pharm* **5**(1): 35-41.
- Morere, P., G. Nouvet, et al. (1975). "[Information obtained by liver biopsy in 100 tuberculous patients]." *Sem Hop* **51**(31-34): 2095-102.
- Moriyama, K., T. Tagami, et al. (2002). "Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist." *J Clin Endocrinol Metab* **87**(11): 5185-90.
- Moya, M., M. J. Gomez-Lechon, et al. (2010). "Enhanced steatosis by nuclear receptor ligands: a study in cultured human hepatocytes and hepatoma cells with a characterized nuclear receptor expression profile." *Chem Biol Interact* **184**(3): 376-87.
- Muller, M. and P. L. Jansen (1997). "Molecular aspects of hepatobiliary transport." *Am J Physiol* **272**(6 Pt 1): G1285-303.
- Mullerova, D. and J. Kopecky (2007). "White adipose tissue: storage and effector site for environmental pollutants." *Physiol Res* **56**(4): 375-81.
- Munoz-de-Toro, M., C. M. Markey, et al. (2005). "Perinatal exposure to bisphenol-A alters peripubertal mammary gland development in mice." *Endocrinology* **146**(9): 4138-47.
- Muoio, D. M. (2010). "Intramuscular triacylglycerol and insulin resistance: guilty as charged or wrongly accused?" *Biochim Biophys Acta* **1801**(3): 281-8.
- Murphy, M. P. (2009). "How mitochondria produce reactive oxygen species." *Biochem J* **417**(1): 1-13.
- Murray, T. J., M. V. Maffini, et al. (2007). "Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma in situ following fetal bisphenol A exposure." *Reprod Toxicol* **23**(3): 383-90.
- Nadal, A., P. Alonso-Magdalena, et al. (2009). "The pancreatic beta-cell as a target of estrogens and xenoestrogens: Implications for blood glucose homeostasis and diabetes." *Mol Cell Endocrinol* **304**(1-2): 63-8.
- Nadal, A., P. Alonso-Magdalena, et al. (2011). "Role of estrogen receptors alpha, beta and GPER1/GPR30 in pancreatic beta-cells." *Front Biosci* **16**: 251-60.
- Nadeau, K. J., J. W. Leitner, et al. (2004). "Insulin regulation of sterol regulatory element-binding protein-1 expression in L-6 muscle cells and 3T3 L1 adipocytes." *J Biol Chem* **279**(33): 34380-7.

- Nagel, S. C., F. S. vom Saal, et al. (1997). "Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol." *Environ Health Perspect* **105**(1): 70-6.
- Nakamura, K., R. Moore, et al. (2007). "Nuclear pregnane X receptor cross-talk with FoxA2 to mediate drug-induced regulation of lipid metabolism in fasting mouse liver." *J Biol Chem* **282**(13): 9768-76.
- NCSL_Policy_Update:_State_Restrictions_on_BPA "<http://www.ncsl.org/issues-research/env-res/policy-update-on-state-restrictions-on-bisphenol-a.aspx>."
- Nebert, D. W. and D. W. Russell (2002). "Clinical importance of the cytochromes P450." *Lancet* **360**(9340): 1155-62.
- Neel, B. A. and R. M. Sargis (2011). "The paradox of progress: environmental disruption of metabolism and the diabetes epidemic." *Diabetes* **60**(7): 1838-48.
- Ness, G. C., Z. Zhao, et al. (1994). "Insulin and glucagon modulate hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase activity by affecting immunoreactive protein levels." *J Biol Chem* **269**(46): 29168-72.
- Neve, E. P. and M. Ingelman-Sundberg (2008). "Intracellular transport and localization of microsomal cytochrome P450." *Anal Bioanal Chem* **392**(6): 1075-84.
- Newbold, R. R. (2008). "Prenatal exposure to diethylstilbestrol (DES)." *Fertil Steril* **89**(2 Suppl): e55-6.
- Newbold, R. R. (2011). "Developmental exposure to endocrine-disrupting chemicals programs for reproductive tract alterations and obesity later in life." *Am J Clin Nutr* **94**(6 Suppl): 1939S-1942S.
- Newbold, R. R., W. N. Jefferson, et al. (2007). "Long-term adverse effects of neonatal exposure to bisphenol A on the murine female reproductive tract." *Reprod Toxicol* **24**(2): 253-8.
- Newbold, R. R., W. N. Jefferson, et al. (2009). "Prenatal exposure to bisphenol a at environmentally relevant doses adversely affects the murine female reproductive tract later in life." *Environ Health Perspect* **117**(6): 879-85.
- Newbold, R. R., E. Padilla-Banks, et al. (2009). "Environmental estrogens and obesity." *Mol Cell Endocrinol* **304**(1-2): 84-9.
- Newbold, R. R., E. Padilla-Banks, et al. (2005). "Developmental exposure to estrogenic compounds and obesity." *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* **73**(7): 478-80.
- Niwa, T., M. Fujimoto, et al. (2001). "Metabolism and interaction of bisphenol A in human hepatic cytochrome P450 and steroidogenic CYP17." *Biol Pharm Bull* **24**(9): 1064-7.
- Nordlie, R. C., J. D. Foster, et al. (1999). "Regulation of glucose production by the liver." *Annu Rev Nutr* **19**: 379-406.
- Ohsaki, Y., J. Cheng, et al. (2009). "Biogenesis of cytoplasmic lipid droplets: from the lipid ester globule in the membrane to the visible structure." *Biochim Biophys Acta* **1791**(6): 399-407.
- Okada, H., T. Tokunaga, et al. (2008). "Direct evidence revealing structural elements essential for the high binding ability of bisphenol A to human estrogen-related receptor-gamma." *Environ Health Perspect* **116**(1): 32-8.
- Olea, J. P. A., J. Taoufiki, R. Fernández-Valades, R. Prada, N. Navea, J. M. Molina-Molina & M. F. Fernandez (2008). "Alkylphenols and bisphenol-A and its chlorinated derivatives in adipose tissue of children." *ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY II 110, KUNGOLOS A, ZAMORANO M (Eds). Wit transactions on ecology and the environment* **129-138**.
- Olsen, L., L. Lind, et al. (2012). "Associations between circulating levels of bisphenol A and phthalate metabolites and coronary risk in the elderly." *Ecotoxicol Environ Saf* **80**: 179-83.
- Orland, M. J., R. Chyn, et al. (1985). "Modulation of proinsulin messenger RNA after partial pancreatectomy in rats. Relationships to glucose homeostasis." *J Clin Invest* **75**(6): 2047-55.
- Oscarson, M., U. M. Zanger, et al. (2006). "Transcriptional profiling of genes induced in the livers of patients treated with carbamazepine." *Clin Pharmacol Ther* **80**(5): 440-456.
- Osterreicher, C. H. and D. A. Brenner (2007). "The genetics of nonalcoholic fatty liver disease." *Ann Hepatol* **6**(2): 83-8.
- Otaka, H., A. Yasuhara, et al. (2003). "Determination of bisphenol A and 4-nonylphenol in human milk using alkaline digestion and cleanup by solid-phase extraction." *Anal Sci* **19**(12): 1663-6.

- Padmanabhan, V., K. Siefert, et al. (2008). "Maternal bisphenol-A levels at delivery: a looming problem?" J Perinatol **28**(4): 258-63.
- Pakharukova, M., M. Smetanina, et al. (2010). "The increased CAR-dependent metabolism of thyroid hormones in mice with high cancer susceptibility." Life Sci **87**(13-14): 439-44.
- Palmer, C. N., C. Maglio, et al. (2012). "Paradoxical Lower Serum Triglyceride Levels and Higher Type 2 Diabetes Mellitus Susceptibility in Obese Individuals with the PNPLA3 148M Variant." PLoS One **7**(6): e39362.
- Palmer, J. R., A. L. Herbst, et al. (2009). "Urogenital abnormalities in men exposed to diethylstilbestrol in utero: a cohort study." Environ Health **8**: 37.
- Paquot, N., J. De Flines, et al. (2012). "[Obesity: a model of complex interactions between genetics and environment]." Rev Med Liege **67**(5-6): 332-6.
- Paris, F., P. Balaguer, et al. (2002). "Phenylphenols, biphenols, bisphenol-A and 4-tert-octylphenol exhibit alpha and beta estrogen activities and antiandrogen activity in reporter cell lines." Mol Cell Endocrinol **193**(1-2): 43-9.
- Parkinson, A., D. R. Mudra, et al. (2004). "The effects of gender, age, ethnicity, and liver cirrhosis on cytochrome P450 enzyme activity in human liver microsomes and inducibility in cultured human hepatocytes." Toxicol Appl Pharmacol **199**(3): 193-209.
- Pascussi, J. M., S. Gerbal-Chaloin, et al. (2003). "The expression of CYP2B6, CYP2C9 and CYP3A4 genes: a tangle of networks of nuclear and steroid receptors." Biochim Biophys Acta **1619**(3): 243-53.
- Pascussi, J. M., S. Gerbal-Chaloin, et al. (2008). "The tangle of nuclear receptors that controls xenobiotic metabolism and transport: crosstalk and consequences." Annu Rev Pharmacol Toxicol **48**: 1-32.
- Pascussi, J. M. and M. J. Vilarem (2008). "[Inflammation and drug metabolism: NF-kappaB and the CAR and PXR xeno-receptors]." Med Sci (Paris) **24**(3): 301-5.
- Patisaul, H. B., A. E. Fortino, et al. (2006). "Neonatal genistein or bisphenol-A exposure alters sexual differentiation of the AVPV." Neurotoxicol Teratol **28**(1): 111-8.
- Pawar, A., D. Botolin, et al. (2003). "The role of liver X receptor-alpha in the fatty acid regulation of hepatic gene expression." J Biol Chem **278**(42): 40736-43.
- Pearen, M. A. and G. E. Muscat (2012). "Orphan nuclear receptors and the regulation of nutrient metabolism: understanding obesity." Physiology (Bethesda) **27**(3): 156-66.
- Peet, D. J., S. D. Turley, et al. (1998). "Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha." Cell **93**(5): 693-704.
- Peffer, R. C., J. G. Moggs, et al. (2007). "Mouse liver effects of cyproconazole, a triazole fungicide: role of the constitutive androstane receptor." Toxicol Sci **99**(1): 315-25.
- Pereira, R. I. and B. Draznin (2005). "Inhibition of the phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway leads to decreased insulin-stimulated adiponectin secretion from 3T3-L1 adipocytes." Metabolism **54**(12): 1636-43.
- Perera, F., J. Vishnevetsky, et al. (2012). "Prenatal bisphenol a exposure and child behavior in an inner-city cohort." Environ Health Perspect **120**(8): 1190-4.
- Perera, F., J. Vishnevetsky, et al. (2012). "Prenatal Bisphenol A Exposure and Child Behavior in an Inner City Cohort." Environ Health Perspect.
- Perez, E., W. Bourguet, et al. (2012). "Modulation of RXR function through ligand design." Biochim Biophys Acta **1821**(1): 57-69.
- Perttila, J., C. Huaman-Samanez, et al. (2012). "PNPLA3 is regulated by glucose in human hepatocytes, and its I148M mutant slows down triglyceride hydrolysis." Am J Physiol Endocrinol Metab **302**(9): E1063-9.
- Pessayre, D., B. Fromenty, et al. (2012). "Central role of mitochondria in drug-induced liver injury." Drug Metab Rev **44**(1): 34-87.
- Phrakonkham, P., S. Viengchareun, et al. (2008). "Dietary xenoestrogens differentially impair 3T3-L1 preadipocyte differentiation and persistently affect leptin synthesis." J Steroid Biochem Mol Biol **110**(1-2): 95-103.
- Plee-Gautier, E., J. Antoun, et al. (2012). "Statins increase cytochrome P450 4F3-mediated eicosanoids production in human liver cells: a PXR dependent mechanism." Biochem Pharmacol **84**(4): 571-9.

- Pocar, P., N. Fiandanese, et al. (2012). "Exposure to di(2-ethyl-hexyl) phthalate (DEHP) in utero and during lactation causes long-term pituitary-gonadal axis disruption in male and female mouse offspring." Endocrinology **153**(2): 937-48.
- Poitout, V., D. Hagman, et al. (2006). "Regulation of the insulin gene by glucose and fatty acids." J Nutr **136**(4): 873-6.
- Polson, D. A. and M. P. Thompson (2004). "Macronutrient composition of the diet differentially affects leptin and adiponutrin mRNA expression in response to meal feeding." J Nutr Biochem **15**(4): 242-6.
- Poole, A., P. van Herwijnen, et al. (2004). "Review of the toxicology, human exposure and safety assessment for bisphenol A diglycidylether (BADGE)." Food Addit Contam **21**(9): 905-19.
- Porrini, S., V. Belloni, et al. (2005). "Early exposure to a low dose of bisphenol A affects socio-sexual behavior of juvenile female rats." Brain Res Bull **65**(3): 261-6.
- Postic, C. and J. Girard (2008). "The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis." Diabetes Metab **34**(6 Pt 2): 643-8.
- Pottenger, L. H., J. Y. Domoradzki, et al. (2000). "The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration." Toxicol Sci **54**(1): 3-18.
- Prasanth, G. K., L. M. Divya, et al. (2010). "Bisphenol-A can bind to human glucocorticoid receptor as an agonist: an in silico study." J Appl Toxicol **30**(8): 769-74.
- Previs, S. F., D. Z. Brunengraber, et al. (2009). "Is there glucose production outside of the liver and kidney?" Annu Rev Nutr **29**: 43-57.
- Prins, G. S., L. Birch, et al. (2007). "Developmental estrogen exposures predispose to prostate carcinogenesis with aging." Reprod Toxicol **23**(3): 374-82.
- Qatanani, M. and D. D. Moore (2005). "CAR, the continuously advancing receptor, in drug metabolism and disease." Curr Drug Metab **6**(4): 329-39.
- Qatanani, M., J. Zhang, et al. (2005). "Role of the constitutive androstane receptor in xenobiotic-induced thyroid hormone metabolism." Endocrinology **146**(3): 995-1002.
- Qiao, A., J. Liang, et al. (2011). "Mouse patatin-like phospholipase domain-containing 3 influences systemic lipid and glucose homeostasis." Hepatology **54**(2): 509-21.
- Rae-Whitcombe, S. M., D. Kennedy, et al. (2010). "Regulation of the promoter region of the human adiponutrin/PNPLA3 gene by glucose and insulin." Biochem Biophys Res Commun **402**(4): 767-72.
- Raghow, R., C. Yellaturu, et al. (2008). "SREBPs: the crossroads of physiological and pathological lipid homeostasis." Trends Endocrinol Metab **19**(2): 65-73.
- Rajesh, P., S. Sathish, et al. (2012). "Exposure to diethyl hexyl phthalate (DEHP) to adult male rat is associated with insulin resistance in adipose tissue: Protective role of antioxidant vitamins (C & E)." J Cell Biochem.
- Ramnanan, C. J., D. S. Edgerton, et al. (2011). "Physiologic action of glucagon on liver glucose metabolism." Diabetes Obes Metab **13** Suppl 1: 118-25.
- Rapport_du_Sénat (2010). "<http://www.senat.fr/rap/I09-318/I09-3183.html>."
- Razzoli, M., P. Valsecchi, et al. (2005). "Chronic exposure to low doses bisphenol A interferes with pair-bonding and exploration in female Mongolian gerbils." Brain Res Bull **65**(3): 249-54.
- Réglement_(UE)_8/2011 (2011). "<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:026:0011:0014:EN:PDF>."
- Reid, A. E. (2001). "Nonalcoholic steatohepatitis." Gastroenterology **121**(3): 710-23.
- Repa, J. J., G. Liang, et al. (2000). "Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta." Genes Dev **14**(22): 2819-30.
- Rezen, T., D. Rozman, et al. (2011). "Interplay between cholesterol and drug metabolism." Biochim Biophys Acta **1814**(1): 146-60.
- Rezen, T., V. Tamasi, et al. (2009). "Effect of CAR activation on selected metabolic pathways in normal and hyperlipidemic mouse livers." BMC Genomics **10**: 384.
- Richter, C. A., L. S. Birnbaum, et al. (2007). "In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies." Reprod Toxicol **24**(2): 199-224.
- Ring, J. A., H. Ghabrial, et al. (1999). "Fetal hepatic drug elimination." Pharmacol Ther **84**(3): 429-45.

- Ritter, R., M. Scheringer, et al. (2011). "Intrinsic human elimination half-lives of polychlorinated biphenyls derived from the temporal evolution of cross-sectional biomonitoring data from the United Kingdom." *Environ Health Perspect* **119**(2): 225-31.
- Riu, A., M. Grimaldi, et al. (2011). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is a target for halogenated analogs of bisphenol A." *Environ Health Perspect* **119**(9): 1227-32.
- Riu, A., M. Grimaldi, et al. (2012). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is a target for halogenated analogs of bisphenol A." *Environ Health Perspect* **119**(9): 1227-32.
- Roach, P. J., A. A. Depaoli-Roach, et al. (2012). "Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes." *Biochem J* **441**(3): 763-87.
- Robichon, C., J. Girard, et al. (2008). "[Can the hyperactivity of lipogenesis cause hepatic steatosis? A role for ChREBP]." *Med Sci (Paris)* **24**(10): 841-6.
- Rodriguez-Antona, C., A. Gomez, et al. (2010). "Molecular genetics and epigenetics of the cytochrome P450 gene family and its relevance for cancer risk and treatment." *Hum Genet* **127**(1): 1-17.
- Romeo, S., J. Kozlitina, et al. (2008). "Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease." *Nat Genet* **40**(12): 1461-5.
- Ropero, A. B., P. Alonso-Magdalena, et al. (2008). "Bisphenol-A disruption of the endocrine pancreas and blood glucose homeostasis." *Int J Androl* **31**(2): 194-200.
- Ropero, A. B., Y. Pang, et al. (2012). "Role of ERbeta and GPR30 in the endocrine pancreas: A matter of estrogen dose." *Steroids* **77**(10): 951-8.
- Rosenfeld, J. M., R. Vargas, Jr., et al. (2003). "Genetic profiling defines the xenobiotic gene network controlled by the nuclear receptor pregnane X receptor." *Mol Endocrinol* **17**(7): 1268-82.
- Roth, A., R. Looser, et al. (2008). "Regulatory cross-talk between drug metabolism and lipid homeostasis: constitutive androstane receptor and pregnane X receptor increase Insig-1 expression." *Mol Pharmacol* **73**(4): 1282-9.
- Roth, A., R. Looser, et al. (2008). "Sterol regulatory element binding protein 1 interacts with pregnane X receptor and constitutive androstane receptor and represses their target genes." *Pharmacogenet Genomics* **18**(4): 325-37.
- Rothblat, G. H. and M. C. Phillips (2010). "High-density lipoprotein heterogeneity and function in reverse cholesterol transport." *Curr Opin Lipidol* **21**(3): 229-38.
- Rotman, Y., C. Koh, et al. (2010). "The association of genetic variability in patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3) with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease." *Hepatology* **52**(3): 894-903.
- Routledge, E. J., R. White, et al. (2000). "Differential effects of xenoestrogens on coactivator recruitment by estrogen receptor (ER) alpha and ERbeta." *J Biol Chem* **275**(46): 35986-93.
- Rubin, B. S. (2011). "Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects." *J Steroid Biochem Mol Biol* **127**(1-2): 27-34.
- Rubin, B. S., J. R. Lenkowski, et al. (2006). "Evidence of altered brain sexual differentiation in mice exposed perinatally to low, environmentally relevant levels of bisphenol A." *Endocrinology* **147**(8): 3681-91.
- Rubin, B. S., M. K. Murray, et al. (2001). "Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels." *Environ Health Perspect* **109**(7): 675-80.
- Rubin, B. S. and A. M. Soto (2009). "Bisphenol A: Perinatal exposure and body weight." *Mol Cell Endocrinol* **304**(1-2): 55-62.
- Rudel, R. A., J. G. Brody, et al. (2001). "Identification of selected hormonally active agents and animal mammary carcinogens in commercial and residential air and dust samples." *J Air Waste Manag Assoc* **51**(4): 499-513.
- Rudel, R. A., J. M. Gray, et al. (2011). "Food packaging and bisphenol A and bis(2-ethylhexyl) phthalate exposure: findings from a dietary intervention." *Environ Health Perspect* **119**(7): 914-20.
- Rufer, A. C., R. Thoma, et al. (2009). "Structural insight into function and regulation of carnitine palmitoyltransferase." *Cell Mol Life Sci* **66**(15): 2489-501.

- Ruhlen, R. L., K. L. Howdeshell, et al. (2008). "Low phytoestrogen levels in feed increase fetal serum estradiol resulting in the "fetal estrogenization syndrome" and obesity in CD-1 mice." Environ Health Perspect **116**(3): 322-8.
- Ruijter, J. M., C. Ramakers, et al. (2009). "Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data." Nucleic Acids Res **37**(6): e45.
- Ryan, B. C. and J. G. Vandenberg (2006). "Developmental exposure to environmental estrogens alters anxiety and spatial memory in female mice." Horm Behav **50**(1): 85-93.
- Rydel, T. J., J. M. Williams, et al. (2003). "The crystal structure, mutagenesis, and activity studies reveal that patatin is a lipid acyl hydrolase with a Ser-Asp catalytic dyad." Biochemistry **42**(22): 6696-708.
- Ryden, M. and P. Arner (2007). "Tumour necrosis factor-alpha in human adipose tissue -- from signalling mechanisms to clinical implications." J Intern Med **262**(4): 431-8.
- Rylander, L., A. Rignell-Hydbom, et al. (2005). "A cross-sectional study of the association between persistent organochlorine pollutants and diabetes." Environ Health **4**: 28.
- Saini, S. P., J. Sonoda, et al. (2004). "A novel constitutive androstane receptor-mediated and CYP3A-independent pathway of bile acid detoxification." Mol Pharmacol **65**(2): 292-300.
- Sakakura, Y., H. Shimano, et al. (2001). "Sterol regulatory element-binding proteins induce an entire pathway of cholesterol synthesis." Biochem Biophys Res Commun **286**(1): 176-83.
- Sakamoto, H., H. Yokota, et al. (2002). "Excretion of bisphenol A-glucuronide into the small intestine and deconjugation in the cecum of the rat." Biochim Biophys Acta **1573**(2): 171-6.
- Sakiyama, H., R. M. Wynn, et al. (2008). "Regulation of nuclear import/export of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP): interaction of an alpha-helix of ChREBP with the 14-3-3 proteins and regulation by phosphorylation." J Biol Chem **283**(36): 24899-908.
- Sakurai, K., M. Kawazuma, et al. (2004). "Bisphenol A affects glucose transport in mouse 3T3-F442A adipocytes." Br J Pharmacol **141**(2): 209-14.
- Saleh, D. A., M. A. Ismail, et al. (2012). "Non alcoholic fatty liver disease, insulin resistance, dyslipidemia and atherogenic ratios in epileptic children and adolescents on long term antiepileptic drug therapy." Pak J Biol Sci **15**(2): 68-77.
- Salian, S., T. Doshi, et al. (2009). "Perinatal exposure of rats to Bisphenol A affects the fertility of male offspring." Life Sci **85**(21-22): 742-52.
- Salonen, J. T., P. Happonen, et al. (1987). "Interdependence of associations of physical activity, smoking, and alcohol and coffee consumption with serum high-density lipoprotein and non-high-density lipoprotein cholesterol--a population study in eastern Finland." Prev Med **16**(5): 647-58.
- Sampath, H. and J. M. Ntambi (2011). "The role of stearoyl-CoA desaturase in obesity, insulin resistance, and inflammation." Ann N Y Acad Sci **1243**: 47-53.
- Sanders, R. J., R. Ofman, et al. (2008). "Characterization of the human omega-oxidation pathway for omega-hydroxy-very-long-chain fatty acids." FASEB J **22**(6): 2064-71.
- Santoro, N., R. Kursawe, et al. (2010). "A common variant in the patatin-like phospholipase 3 gene (PNPLA3) is associated with fatty liver disease in obese children and adolescents." Hepatology **52**(4): 1281-90.
- Santoro, N., C. K. Zhang, et al. (2012). "Variant in the glucokinase regulatory protein (GCKR) gene is associated with fatty liver in obese children and adolescents." Hepatology **55**(3): 781-9.
- Sanyal, A. J., C. Campbell-Sargent, et al. (2001). "Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities." Gastroenterology **120**(5): 1183-92.
- Saradhi, M., A. Sengupta, et al. (2005). "Pregnane and Xenobiotic Receptor (PXR/SXR) resides predominantly in the nuclear compartment of the interphase cell and associates with the condensed chromosomes during mitosis." Biochim Biophys Acta **1746**(2): 85-94.
- Sargis, R. M., D. N. Johnson, et al. (2010). "Environmental endocrine disruptors promote adipogenesis in the 3T3-L1 cell line through glucocorticoid receptor activation." Obesity (Silver Spring) **18**(7): 1283-8.
- Sato, R. (2010). "Sterol metabolism and SREBP activation." Arch Biochem Biophys **501**(2): 177-81.
- Savage, D. B. and R. K. Semple (2010). "Recent insights into fatty liver, metabolic dyslipidaemia and their links to insulin resistance." Curr Opin Lipidol **21**(4): 329-36.

- Sawai, C., K. Anderson, et al. (2003). "Effect of bisphenol A on murine immune function: modulation of interferon-gamma, IgG2a, and disease symptoms in NZB X NZW F1 mice." *Environ Health Perspect* **111**(16): 1883-7.
- Sberna, A. L., M. Assem, et al. (2011). "Constitutive androstane receptor activation stimulates faecal bile acid excretion and reverse cholesterol transport in mice." *J Hepatol* **55**(1): 154-61.
- Sberna, A. L., M. Assem, et al. (2011). "Constitutive androstane receptor activation decreases plasma apolipoprotein B-containing lipoproteins and atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**(10): 2232-9.
- Scheepers, A., H. G. Joost, et al. (2004). "The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function." *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **28**(5): 364-71.
- Schmitz, G., A. Becker, et al. (1996). "ACAT/CEH and ACEH/LAL: two key enzymes in hepatic cellular cholesterol homeostasis and their involvement in genetic disorders." *Z Gastroenterol* **34 Suppl 3**: 68-72.
- Schmitz, G. and W. E. Kaminski (2001). "ABC transporters and cholesterol metabolism." *Front Biosci* **6**: D505-14.
- Schrader, M. and H. D. Fahimi (2004). "Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species." *Histochem Cell Biol* **122**(4): 383-93.
- Schrager, S. and B. E. Potter (2004). "Diethylstilbestrol exposure." *Am Fam Physician* **69**(10): 2395-400.
- Schreurs, M., F. Kuipers, et al. (2010). "Regulatory enzymes of mitochondrial beta-oxidation as targets for treatment of the metabolic syndrome." *Obes Rev* **11**(5): 380-8.
- Schuetz, E. G., C. Brimer, et al. (1998). "Environmental xenobiotics and the antihormones cyproterone acetate and spironolactone use the nuclear hormone pregnenolone X receptor to activate the CYP3A23 hormone response element." *Mol Pharmacol* **54**(6): 1113-7.
- Schug, T. T., A. Janesick, et al. (2011). "Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility." *J Steroid Biochem Mol Biol* **127**(3-5): 204-15.
- Schultz, J. R., H. Tu, et al. (2000). "Role of LXRs in control of lipogenesis." *Genes Dev* **14**(22): 2831-8.
- Schutz, Y. (2011). "Protein turnover, ureagenesis and gluconeogenesis." *Int J Vitam Nutr Res* **81**(2-3): 101-7.
- Shankar, A. and S. Teppala (2011). "Relationship between urinary bisphenol A levels and diabetes mellitus." *J Clin Endocrinol Metab* **96**(12): 3822-6.
- Shankar, A. and S. Teppala (2012). "Urinary bisphenol A and hypertension in a multiethnic sample of US adults." *J Environ Public Health* **2012**: 481641.
- Shankar, A., S. Teppala, et al. (2012). "Bisphenol A and Peripheral Arterial Disease: Results from the NHANES." *Environ Health Perspect* **120**(9): 1297-300.
- Shankar, A., S. Teppala, et al. (2012). "Bisphenol A and Peripheral Arterial Disease: Results from the NHANES." *Environ Health Perspect*.
- Sharma, G. and E. R. Prossnitz (2011). "Mechanisms of estradiol-induced insulin secretion by the G protein-coupled estrogen receptor GPR30/GPER in pancreatic beta-cells." *Endocrinology* **152**(8): 3030-9.
- Sheng, Z. G., Y. Tang, et al. (2012). "Low concentrations of bisphenol a suppress thyroid hormone receptor transcription through a nongenomic mechanism." *Toxicol Appl Pharmacol* **259**(1): 133-42.
- Shi, X., B. Wahlang, et al. (2012). "Metabolomic analysis of the effects of polychlorinated biphenyls in nonalcoholic fatty liver disease." *J Proteome Res* **11**(7): 3805-15.
- Shimizu, M., K. Ohta, et al. (2002). "Sulfation of bisphenol A abolished its estrogenicity based on proliferation and gene expression in human breast cancer MCF-7 cells." *Toxicol In Vitro* **16**(5): 549-56.
- Shimomura, I., R. E. Hammer, et al. (1998). "Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy." *Genes Dev* **12**(20): 3182-94.
- Shiraki, T., N. Sakai, et al. (2003). "Activation of orphan nuclear constitutive androstane receptor requires subnuclear targeting by peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha. A possible link between xenobiotic response and nutritional state." *J Biol Chem* **278**(13): 11344-50.

- Smith, B. W. and L. A. Adams (2011). "Non-alcoholic fatty liver disease." *Crit Rev Clin Lab Sci* **48**(3): 97-113.
- Soccio, R. E. and J. L. Breslow (2004). "Intracellular cholesterol transport." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**(7): 1150-60.
- Sohoni, P. and J. P. Sumpter (1998). "Several environmental oestrogens are also anti-androgens." *J Endocrinol* **158**(3): 327-39.
- Somm, E., V. M. Schwitzgebel, et al. (2009). "Perinatal exposure to bisphenol a alters early adipogenesis in the rat." *Environ Health Perspect* **117**(10): 1549-55.
- Sookoian, S. and C. J. Pirola (2011). "Meta-analysis of the influence of I148M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease." *Hepatology* **53**(6): 1883-94.
- Sookoian, S. and C. J. Pirola (2012). "PNPLA3, the triacylglycerol synthesis/hydrolysis/storage dilemma, and nonalcoholic fatty liver disease." *World J Gastroenterol* **18**(42): 6018-26.
- Soriano, S., P. Alonso-Magdalena, et al. (2012). "Rapid insulinotropic action of low doses of bisphenol-A on mouse and human islets of Langerhans: role of estrogen receptor beta." *PLoS One* **7**(2): e31109.
- Spranger, J., A. Kroke, et al. (2003). "Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study." *Diabetes* **52**(3): 812-7.
- Squires, E. J., T. Sueyoshi, et al. (2004). "Cytoplasmic localization of pregnane X receptor and ligand-dependent nuclear translocation in mouse liver." *J Biol Chem* **279**(47): 49307-14.
- Staels, B. (2007). "PPAR agonists and the metabolic syndrome." *Therapie* **62**(4): 319-26.
- Staples, C. A., P. B. Dorn, et al. (1998). "A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A." *Chemosphere* **36**(10): 2149-73.
- Staudinger, J., Y. Liu, et al. (2001). "Coordinate regulation of xenobiotic and bile acid homeostasis by pregnane X receptor." *Drug Metab Dispos* **29**(11): 1467-72.
- Staudinger, J. L., B. Goodwin, et al. (2001). "The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(6): 3369-74.
- Staudinger, J. L., A. Madan, et al. (2003). "Regulation of drug transporter gene expression by nuclear receptors." *Drug Metab Dispos* **31**(5): 523-7.
- Stedman, C. A., C. Liddle, et al. (2005). "Nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor ameliorate cholestatic liver injury." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(6): 2063-8.
- Stoekman, A. K., L. Ma, et al. (2004). "Mlx is the functional heteromeric partner of the carbohydrate response element-binding protein in glucose regulation of lipogenic enzyme genes." *J Biol Chem* **279**(15): 15662-9.
- Sueyoshi, T., T. Kawamoto, et al. (1999). "The repressed nuclear receptor CAR responds to phenobarbital in activating the human CYP2B6 gene." *J Biol Chem* **274**(10): 6043-6.
- Sui, Y., N. Ai, et al. (2012). "Bisphenol A and its analogues activate human pregnane X receptor." *Environ Health Perspect* **120**(3): 399-405.
- Sun, Y., M. Irie, et al. (2004). "Determination of bisphenol A in human breast milk by HPLC with column-switching and fluorescence detection." *Biomed Chromatogr* **18**(8): 501-7.
- Suzuki, Y., J. Yoshinaga, et al. (2012). "Foetal exposure to phthalate esters and anogenital distance in male newborns." *Int J Androl* **35**(3): 236-44.
- Swales, K. and M. Negishi (2004). "CAR, driving into the future." *Mol Endocrinol* **18**(7): 1589-98.
- Swanson, H., T. Wada, et al. (2012). "Role of Nuclear Receptors in Lipid Dysfunction and Obesity-related Diseases." *Drug Metab Dispos*.
- Tabb, M. M., V. Kholodovych, et al. (2004). "Highly chlorinated PCBs inhibit the human xenobiotic response mediated by the steroid and xenobiotic receptor (SXR)." *Environ Health Perspect* **112**(2): 163-9.
- Takayanagi, S., T. Tokunaga, et al. (2006). "Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor gamma (ERRgamma) with high constitutive activity." *Toxicol Lett* **167**(2): 95-105.

- Takekita, A., N. Koibuchi, et al. (2001). "Bisphenol-A, an environmental estrogen, activates the human orphan nuclear receptor, steroid and xenobiotic receptor-mediated transcription." Eur J Endocrinol **145**(4): 513-7.
- Takeuchi, T., O. Tsutsumi, et al. (2004). "Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol A, in normal women and women with ovarian dysfunction." Endocr J **51**(2): 165-9.
- Tamura, Y., T. Ogihara, et al. (2007). "Amelioration of glucose tolerance by hepatic inhibition of nuclear factor kappaB in db/db mice." Diabetologia **50**(1): 131-41.
- Tang, W. Y., L. M. Morey, et al. (2012). "Neonatal exposure to estradiol/bisphenol A alters promoter methylation and expression of Nsbp1 and Hpcal1 genes and transcriptional programs of Dnmt3a/b and Mbd2/4 in the rat prostate gland throughout life." Endocrinology **153**(1): 42-55.
- Tanos, R., I. A. Murray, et al. (2012). "Role of the ah receptor in homeostatic control of Fatty Acid synthesis in the liver." Toxicol Sci **129**(2): 372-9.
- Taylor, J. A., F. S. Vom Saal, et al. (2011). "Similarity of bisphenol A pharmacokinetics in rhesus monkeys and mice: relevance for human exposure." Environ Health Perspect **119**(4): 422-30.
- Taylor, J. A., W. V. Welshons, et al. (2008). "No effect of route of exposure (oral; subcutaneous injection) on plasma bisphenol A throughout 24h after administration in neonatal female mice." Reprod Toxicol **25**(2): 169-76.
- TexteAssemblée Nationale (2011). "<http://www.assemblee-nationale.fr/13/ta/ta0747.asp>."
- Texte_de_loi_suspension_totale_BPA_2015 (2012). "<http://www.senat.fr/leg/pp12-009.pdf>."
- Thayer, K. A., J. J. Heindel, et al. (2012). "Role of environmental chemicals in diabetes and obesity: a National Toxicology Program workshop review." Environ Health Perspect **120**(6): 779-89.
- Thomas, P. and J. Dong (2006). "Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: a potential novel mechanism of endocrine disruption." J Steroid Biochem Mol Biol **102**(1-5): 175-9.
- Thompson, R. C., C. J. Moore, et al. (2009). "Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **364**(1526): 2153-66.
- Tian, Y. H., J. H. Baek, et al. (2012). "Prenatal and postnatal exposure to bisphenol a induces anxiolytic behaviors and cognitive deficits in mice." Synapse **64**(6): 432-9.
- Timms, B. G., K. L. Howdeshell, et al. (2005). "Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(19): 7014-9.
- Timsit, Y. E. and M. Negishi (2007). "CAR and PXR: the xenobiotic-sensing receptors." Steroids **72**(3): 231-46.
- Tojima, H., S. Kakizaki, et al. (2012). "Ligand dependent hepatic gene expression profiles of nuclear receptors CAR and PXR." Toxicol Lett **212**(3): 288-97.
- Tolson, A. H. and H. Wang (2010). "Regulation of drug-metabolizing enzymes by xenobiotic receptors: PXR and CAR." Adv Drug Deliv Rev **62**(13): 1238-49.
- Trasande, L., T. M. Attina, et al. (2012). "Association between urinary bisphenol A concentration and obesity prevalence in children and adolescents." JAMA **308**(11): 1113-21.
- Trdan Lusin, T., R. Roskar, et al. (2012). "Evaluation of bisphenol A glucuronidation according to UGT1A1*28 polymorphism by a new LC-MS/MS assay." Toxicology **292**(1): 33-41.
- Tsatsos, N. G., L. B. Augustin, et al. (2008). "Hepatic expression of the SPOT 14 (S14) paralog S14-related (Mid1 interacting protein) is regulated by dietary carbohydrate." Endocrinology **149**(10): 5155-61.
- Tsatsos, N. G. and H. C. Towle (2006). "Glucose activation of ChREBP in hepatocytes occurs via a two-step mechanism." Biochem Biophys Res Commun **340**(2): 449-56.
- Ueda, A., H. K. Hamadeh, et al. (2002). "Diverse roles of the nuclear orphan receptor CAR in regulating hepatic genes in response to phenobarbital." Mol Pharmacol **61**(1): 1-6.
- Utzschneider, K. M. and S. E. Kahn (2006). "Review: The role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease." J Clin Endocrinol Metab **91**(12): 4753-61.
- Uyeda, K. and J. J. Repa (2006). "Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis." Cell Metab **4**(2): 107-10.

- Vacca, M., C. Degirolamo, et al. (2011). "Lipid-sensing nuclear receptors in the pathophysiology and treatment of the metabolic syndrome." *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **3**(5): 562-87.
- Valenti, L., A. Al-Serri, et al. (2010). "Homozygosity for the patatin-like phospholipase-3/adiponutrin I148M polymorphism influences liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease." *Hepatology* **51**(4): 1209-17.
- Valenti, L., A. Alisi, et al. (2010). "I148M patatin-like phospholipase domain-containing 3 gene variant and severity of pediatric nonalcoholic fatty liver disease." *Hepatology* **52**(4): 1274-80.
- van Weeghel, M., H. Te Brinke, et al. (2012). "Functional redundancy of mitochondrial enoyl-CoA isomerases in the oxidation of unsaturated fatty acids." *FASEB J* **26**(10): 4316-26.
- Vanacker, J. M., K. Pettersson, et al. (1999). "Transcriptional targets shared by estrogen receptor-related receptors (ERRs) and estrogen receptor (ER) alpha, but not by ERbeta." *EMBO J* **18**(15): 4270-9.
- Vandenberg, L. N., I. Chahoud, et al. (2012). "Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A." *Cien Saude Colet* **17**(2): 407-34.
- Vandenberg, L. N., T. Colborn, et al. (2012). "Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses." *Endocr Rev* **33**(3): 378-455.
- Vandenberg, L. N., R. Hauser, et al. (2007). "Human exposure to bisphenol A (BPA)." *Reprod Toxicol* **24**(2): 139-77.
- Vandenberg, L. N., M. V. Maffini, et al. (2008). "Perinatal exposure to the xenoestrogen bisphenol-A induces mammary intraductal hyperplasias in adult CD-1 mice." *Reprod Toxicol* **26**(3-4): 210-9.
- Verrotti, A., S. Agostinelli, et al. (2011). "Nonalcoholic fatty liver disease in adolescents receiving valproic acid." *Epilepsy Behav* **20**(2): 382-5.
- Viberg, H., A. Fredriksson, et al. (2011). "Dose-dependent behavioral disturbances after a single neonatal Bisphenol A dose." *Toxicology* **290**(2-3): 187-94.
- Videla, L. A., R. Rodrigo, et al. (2004). "Oxidative stress and depletion of hepatic long-chain polyunsaturated fatty acids may contribute to nonalcoholic fatty liver disease." *Free Radic Biol Med* **37**(9): 1499-507.
- Vogel, S. A. (2009). "The politics of plastics: the making and unmaking of bisphenol a "safety"." *Am J Public Health* **99** Suppl 3: S559-66.
- Volkel, W., N. Bittner, et al. (2005). "Quantitation of bisphenol A and bisphenol A glucuronide in biological samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *Drug Metab Dispos* **33**(11): 1748-57.
- Volkel, W., T. Colnot, et al. (2002). "Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration." *Chem Res Toxicol* **15**(10): 1281-7.
- vom Saal, F. S., P. S. Cooke, et al. (1998). "A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior." *Toxicol Ind Health* **14**(1-2): 239-60.
- vom Saal, F. S., C. A. Richter, et al. (2005). "Commercial animal feed: variability in estrogenic activity and effects on body weight in mice." *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* **73**(7): 474-5.
- von Goetz, N., M. Wormuth, et al. (2010). "Bisphenol a: how the most relevant exposure sources contribute to total consumer exposure." *Risk Anal* **30**(3): 473-87.
- Wada, K., H. Sakamoto, et al. (2007). "Life style-related diseases of the digestive system: endocrine disruptors stimulate lipid accumulation in target cells related to metabolic syndrome." *J Pharmacol Sci* **105**(2): 133-7.
- Wada, T., J. Gao, et al. (2009). "PXR and CAR in energy metabolism." *Trends Endocrinol Metab* **20**(6): 273-9.
- Wagner, M., E. Halilbasic, et al. (2005). "CAR and PXR agonists stimulate hepatic bile acid and bilirubin detoxification and elimination pathways in mice." *Hepatology* **42**(2): 420-30.
- Wang, C. W., H. Y. Lin, et al. (2011). "The PNPLA3 I148M polymorphism is associated with insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease in a normoglycaemic population." *Liver Int* **31**(9): 1326-31.
- Wang, F., J. Hua, et al. (2012). "High urinary bisphenol A concentrations in workers and possible laboratory abnormalities." *Occup Environ Med*.

- Wang, H. H., N. H. Afdhal, et al. (2006). "Overexpression of estrogen receptor alpha increases hepatic cholesterogenesis, leading to biliary hypersecretion in mice." *J Lipid Res* **47**(4): 778-86.
- Wang, H. H., M. Liu, et al. (2009). "New insights into the molecular mechanisms underlying effects of estrogen on cholesterol gallstone formation." *Biochim Biophys Acta* **1791**(11): 1037-47.
- Wang, J., B. Sun, et al. (2012). "The environmental obesogen bisphenol A promotes adipogenesis by increasing the amount of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in the adipose tissue of children." *Int J Obes (Lond)*.
- Wang, T., M. Li, et al. (2012). "Urinary bisphenol A (BPA) concentration associates with obesity and insulin resistance." *J Clin Endocrinol Metab* **97**(2): E223-7.
- Wang, Y. M., S. S. Ong, et al. (2012). "Role of CAR and PXR in xenobiotic sensing and metabolism." *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **8**(7): 803-17.
- Wang, Z., Y. Iwasaki, et al. (2009). "Hormonal regulation of glycolytic enzyme gene and pyruvate dehydrogenase kinase/phosphatase gene transcription." *Endocr J* **56**(8): 1019-30.
- Watkins, R. E., G. B. Wisely, et al. (2001). "The human nuclear xenobiotic receptor PXR: structural determinants of directed promiscuity." *Science* **292**(5525): 2329-33.
- Watson, C. S., Y. J. Jeng, et al. (2011). "Endocrine disruption via estrogen receptors that participate in nongenomic signaling pathways." *J Steroid Biochem Mol Biol* **127**(1-2): 44-50.
- Watson, C. S., Y. J. Jeng, et al. (2010). "Nongenomic signaling pathways of estrogen toxicity." *Toxicol Sci* **115**(1): 1-11.
- Wei, J., Y. Lin, et al. (2011). "Perinatal exposure to bisphenol A at reference dose predisposes offspring to metabolic syndrome in adult rats on a high-fat diet." *Endocrinology* **152**(8): 3049-61.
- Wei, P., J. Zhang, et al. (2000). "The nuclear receptor CAR mediates specific xenobiotic induction of drug metabolism." *Nature* **407**(6806): 920-3.
- Welshons, W. V., S. C. Nagel, et al. (2006). "Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure." *Endocrinology* **147**(6 Suppl): S56-69.
- Westin, M. A., M. C. Hunt, et al. (2008). "Short- and medium-chain carnitine acyltransferases and acyl-CoA thioesterases in mouse provide complementary systems for transport of beta-oxidation products out of peroxisomes." *Cell Mol Life Sci* **65**(6): 982-90.
- Wild, C. P. (2005). "Complementing the genome with an "exposome": the outstanding challenge of environmental exposure measurement in molecular epidemiology." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**(8): 1847-50.
- Willson, T. M. and S. A. Kliewer (2002). "PXR, CAR and drug metabolism." *Nat Rev Drug Discov* **1**(4): 259-66.
- Willson, T. M. and W. Wahli (1997). "Peroxisome proliferator-activated receptor agonists." *Curr Opin Chem Biol* **1**(2): 235-41.
- Wilson, P. A., S. D. Gardner, et al. (2006). "Characterization of the human patatin-like phospholipase family." *J Lipid Res* **47**(9): 1940-9.
- Wolfrum, C., E. Asilmaz, et al. (2004). "Foxa2 regulates lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes." *Nature* **432**(7020): 1027-32.
- Wolstenholme, J. T., J. A. Taylor, et al. (2011). "Gestational exposure to low dose bisphenol A alters social behavior in juvenile mice." *PLoS One* **6**(9): e25448.
- Wyde, M. E., S. E. Kirwan, et al. (2005). "Di-n-butyl phthalate activates constitutive androstane receptor and pregnane X receptor and enhances the expression of steroid-metabolizing enzymes in the liver of rat fetuses." *Toxicol Sci* **86**(2): 281-90.
- Xie, W., A. Radomska-Pandya, et al. (2001). "An essential role for nuclear receptors SXR/PXR in detoxification of cholestatic bile acids." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(6): 3375-80.
- Xu, C., C. Y. Li, et al. (2005). "Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics." *Arch Pharm Res* **28**(3): 249-68.
- Xu, R. X., M. H. Lambert, et al. (2004). "A structural basis for constitutive activity in the human CAR/RXRalpha heterodimer." *Mol Cell* **16**(6): 919-28.

- Yamada, H., I. Furuta, et al. (2002). "Maternal serum and amniotic fluid bisphenol A concentrations in the early second trimester." Reprod Toxicol **16**(6): 735-9.
- Yamamoto, T., S. Takahashi, et al. (1989). "The effect of phenobarbital on human plasma lipids." Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol **27**(9): 463-6.
- Yamashita, H., M. Takenoshita, et al. (2001). "A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(16): 9116-21.
- Yamauchi, T., J. Kamon, et al. (2001). "The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity." Nat Med **7**(8): 941-6.
- Yamazaki, Y., S. Kakizaki, et al. (2007). "The role of the nuclear receptor constitutive androstane receptor in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis." Gut **56**(4): 565-74.
- Yaoi, T., K. Itoh, et al. (2008). "Genome-wide analysis of epigenomic alterations in fetal mouse forebrain after exposure to low doses of bisphenol A." Biochem Biophys Res Commun **376**(3): 563-7.
- Ye, X., A. M. Bishop, et al. (2007). "Temporal stability of the conjugated species of bisphenol A, parabens, and other environmental phenols in human urine." J Expo Sci Environ Epidemiol **17**(6): 567-72.
- Ye, X., Z. Kuklennyik, et al. (2006). "Measuring environmental phenols and chlorinated organic chemicals in breast milk using automated on-line column-switching-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **831**(1-2): 110-5.
- Ye, X., F. H. Pierik, et al. (2008). "Urinary metabolite concentrations of organophosphorous pesticides, bisphenol A, and phthalates among pregnant women in Rotterdam, the Netherlands: the Generation R study." Environ Res **108**(2): 260-7.
- Ye, X., L. J. Tao, et al. (2008). "Automated on-line column-switching HPLC-MS/MS method for measuring environmental phenols and parabens in serum." Talanta **76**(4): 865-71.
- Yellaturu, C. R., X. Deng, et al. (2009). "Insulin enhances the biogenesis of nuclear sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1c by posttranscriptional down-regulation of Insig-2A and its dissociation from SREBP cleavage-activating protein (SCAP).SREBP-1c complex." J Biol Chem **284**(46): 31726-34.
- Yerian, L. (2012). "Histopathological evaluation of fatty and alcoholic liver diseases." J Dig Dis **12**(1): 17-24.
- Yoshihara, S., T. Mizutare, et al. (2004). "Potent estrogenic metabolites of bisphenol A and bisphenol B formed by rat liver S9 fraction: their structures and estrogenic potency." Toxicol Sci **78**(1): 50-9.
- Yoshinari, K., S. Takagi, et al. (2006). "Changes in the expression of cytochromes P450 and nuclear receptors in the liver of genetically diabetic db/db mice." Biol Pharm Bull **29**(8): 1634-8.
- Yoshino, S., K. Yamaki, et al. (2004). "Prenatal exposure to bisphenol A up-regulates immune responses, including T helper 1 and T helper 2 responses, in mice." Immunology **112**(3): 489-95.
- Yoshino, S., K. Yamaki, et al. (2003). "Effects of bisphenol A on antigen-specific antibody production, proliferative responses of lymphoid cells, and TH1 and TH2 immune responses in mice." Br J Pharmacol **138**(7): 1271-6.
- Yu, A. S. and E. B. Keefe (2002). "Nonalcoholic fatty liver disease." Rev Gastroenterol Disord **2**(1): 11-9.
- Zadravec, D., A. Brolinson, et al. (2010). "Ablation of the very-long-chain fatty acid elongase ELOVL3 in mice leads to constrained lipid storage and resistance to diet-induced obesity." FASEB J **24**(11): 4366-77.
- Zain, S. M., R. Mohamed, et al. (2012). "A multi-ethnic study of a PNPLA3 gene variant and its association with disease severity in non-alcoholic fatty liver disease." Hum Genet **131**(7): 1145-52.
- Zalko, D., C. Jacques, et al. (2011). "Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A." Chemosphere **82**(3): 424-30.
- Zalko, D., A. M. Soto, et al. (2003). "Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model: answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice." Environ Health Perspect **111**(3): 309-19.
- Zhang, G. L., X. F. Zhang, et al. (2012). "Exposure to bisphenol A results in a decline in mouse spermatogenesis." Reprod Fertil Dev.
- Zhang, H. Q., X. F. Zhang, et al. (2011). "Fetal exposure to bisphenol A affects the primordial follicle formation by inhibiting the meiotic progression of oocytes." Mol Biol Rep **39**(5): 5651-7.

- Zhang, J., W. Huang, et al. (2002). "Modulation of acetaminophen-induced hepatotoxicity by the xenobiotic receptor CAR." Science **298**(5592): 422-4.
- Zhang, Y. K., R. L. Yeager, et al. (2009). "Circadian expression profiles of drug-processing genes and transcription factors in mouse liver." Drug Metab Dispos **37**(1): 106-15.
- Zhou, C., N. King, et al. (2009). "Activation of PXR induces hypercholesterolemia in wild-type and accelerates atherosclerosis in apoE deficient mice." J Lipid Res **50**(10): 2004-13.
- Zhou, J., M. Febbraio, et al. (2008). "Hepatic fatty acid transporter Cd36 is a common target of LXR, PXR, and PPARgamma in promoting steatosis." Gastroenterology **134**(2): 556-67.
- Zhou, J., Y. Zhai, et al. (2006). "A novel pregnane X receptor-mediated and sterol regulatory element-binding protein-independent lipogenic pathway." J Biol Chem **281**(21): 15013-20.
- Zimmerman-Downs, J. M., D. Shuman, et al. (2012). "Bisphenol A blood and saliva levels prior to and after dental sealant placement in adults." J Dent Hyg **84**(3): 145-50.
- Zimmermann, R., J. G. Strauss, et al. (2004). "Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase." Science **306**(5700): 1383-6.
- Zmrzljak, U. P. and D. Rozman (2012). "Circadian regulation of the hepatic endobiotic and xenobiotic detoxification pathways: the time matters." Chem Res Toxicol **25**(4): 811-24.
- Zoeller, R. T. (2005). "Environmental chemicals as thyroid hormone analogues: new studies indicate that thyroid hormone receptors are targets of industrial chemicals?" Mol Cell Endocrinol **242**(1-2): 10-5.
- Zollner, G. and M. Trauner (2006). "Molecular mechanisms of cholestasis." Wien Med Wochenschr **156**(13-14): 380-5.
- Zuo, Z., S. Chen, et al. (2009). "Tributyltin causes obesity and hepatic steatosis in male mice." Environ Toxicol **26**(1): 79-85.
- Zuo, Z., S. Chen, et al. (2011). "Tributyltin causes obesity and hepatic steatosis in male mice." Environ Toxicol **26**(1): 79-85.

ANNEXE

RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES: CO-EXPOSURE TO DEHP INFLUENCES THE HEPATIC EFFECTS OF BPA

Lasserre F, Marmugi A, et al. Manuscrit en préparation.

Comme pour le BPA, les phtalates (ou esters de phtalates) suscitent l'inquiétude en raison de leur volume de production, entraînant leur présence massive dans l'environnement, et de leur capacité, en tant que perturbateurs endocriniens, à altérer diverses fonctions de l'organisme. Les phtalates sont utilisés dans la fabrication de PVC, que l'on retrouve dans les produits de revêtement de sol, laques, vernis, produits cosmétiques, certains produits de la pharmacie et dispositifs médicaux (poche de sang, tubulures et cathéters). Le phtalate de bis(2-éthylhexyle) (DEHP) est parmi les esters de phtalate les plus abondamment utilisés. Des études épidémiologiques et expérimentales ont montré un impact du DEHP sur différentes fonctions de l'organisme dont le métabolisme énergétique (Hao, Cheng et al. 2012; Rajesh, Sathish et al. 2012) en agissant dans quelques cas selon un effet dose-réponse non monotone (Andrade, Grande et al. 2006; Do, Stahlhut et al. 2012). Nos précédentes études avaient montré qu'il influe sur le métabolisme hépatique (Eveillard, Lasserre et al. 2009; Eveillard, Mselli-Lakhal et al. 2009).

Suite à nos travaux sur le BPA, nous nous sommes intéressés aux conséquences d'une exposition combinée à ces deux composés majeurs de l'industrie plastique (Thompson, Moore et al. 2009). Les conséquences de telles expositions restent encore très peu abordées dans la littérature. Au niveau épidémiologique, plusieurs études ont détecté la coexistence des métabolites de BPA et de DEHP dans les urines de femmes enceintes (Ye, Pierik et al. 2008) et chez l'enfant (Becker, Goen et al. 2009). A partir de la cohorte NHANES, Meeker et al. ont suggéré un effet combiné de ces deux contaminants sur la perturbation de diverses fonctions de l'organisme en se focalisant sur la fonction thyroïdienne (Meeker and Ferguson 2011).

Dans cette étude, des souris mâles adultes ont été exposées pendant 28 jours à de la poudre alimentaire contaminée par différentes doses de BPA (0; 5 et 5000 µg/kg/j) en combinaison avec le DEHP (0 ; 0,5 et 500 mgkg/j). Nos données préliminaires montrent, comme pour le BPA, des niveaux d'insuline plasmatique plus importants chez les animaux exposés à la plus faible dose de DEHP par rapport à ceux exposés à la plus forte dose. Lorsque les deux molécules sont combinées, aucun effet synergique ou antagoniste n'est observé, suggérant un mode d'action similaire pour le BPA et le DEHP. Les modifications en insuline plasmatique sont associées à un effet similaire sur l'expression hépatique des gènes de la lipogenèse selon un effet dose-réponse non monotone (Fas, Pnpla3). Certains gènes tels que

Cpt1a et Hmgcr, impliqués respectivement dans la β -oxydation mitochondriale et dans la synthèse du cholestérol, semblent régulés de manière synergique par de fortes doses de BPA et du DEHP. Ainsi, les effets combinés de BPA et du DEHP sont complexes et ne semblent pas toujours exercer leurs effets de manière synergique, comme cela a été montré pour les modulations en insuline plasmatique et les modulations des gènes de la lipogenèse. Puisque l'insulinémie des animaux exposés à l'un ou l'autre de ces contaminants est dérégulée de manière similaire, le pancréas serait donc la cible du BPA mais également du DEHP. Ces données renforcent l'idée selon laquelle les effets du BPA au niveau hépatiques seraient à la fois des effets directs sur le foie et la résultante d'effets sur d'autres organes comme le pancréas.

Co-exposure to DEHP influences the hepatic effects of BPA

F. Lasserre¹, A. Marmugi¹, S. Ducheix¹, A. Polizzi¹, N. Primenko¹, C. Canlet¹, T. Pineau¹, A. Paris², P. Martin¹, H. Guillou¹, L. Lakhal¹

¹ INRA ToxAlim, UMR1331 INRA/INP/UPS, 180 chemin de Tournefeuille, 31027 Toulouse cedex3, France

² INRA Metarisk, AgroParisTech, 16 rue Claude Bernard, 75231 Paris cedex05, France

Introduction

Phthalates and Bisphenol A (BPA) are widely used plasticizers whose impact on human health has been debated. They not only act as endocrine disruptors thereby influencing reproductive defects but they also impair metabolism and therefore have been referred to as metabolic disruptors. Several studies have highlighted their likely contribution to the obesity epidemic and to the associated metabolic syndrome. The observed effects of molecules such as di-2 ethylhexyl phthalate (DEHP), the most widely used phthalate, and Bisphenol A occur at very low doses and sometimes show nonmonotonic dose responses which make their toxicity particularly challenging to establish. In addition, very little is known about the possibility that combine exposure may influence the toxicological effects.

Aim of the study

We investigated whether co-exposure to one contaminant may influence the hepatic response to another at various doses.

Experimental design

6-weeks old CD-1 male mice
28-days exposure



Lipid transcriptomic analysis
Plasmatic insulin assay

BPA doses : 0 ; 5 ; 5000 µg/kg/day
DEHP doses : 0 ; 0.5 ; 500 mg/kg/day

Results

1 Effects of BPA and DEHP on plasmatic insulin levels

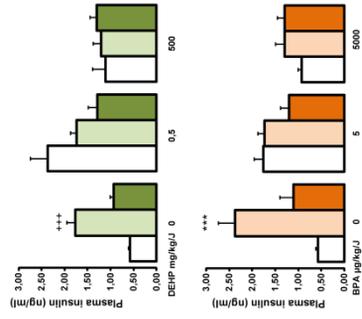
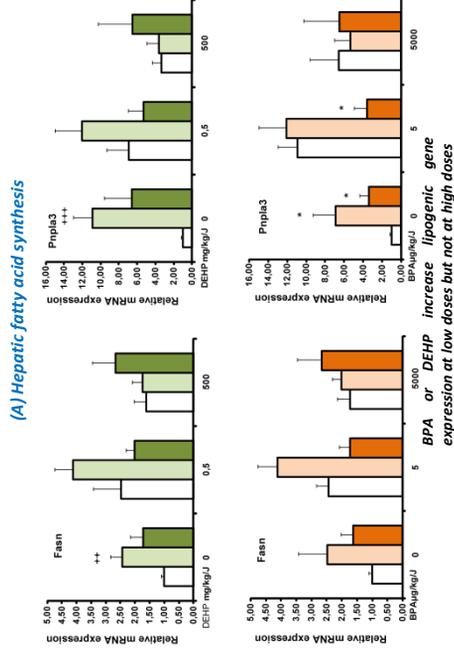


Figure 1 : BPA or DEHP increase plasmatic insulin levels at low doses but not at high doses

Blood was collected at the submandibular vein in heparin-coated capillaries. Plasma was prepared by centrifugation (2,000g, 10 minutes) and kept at -80°C until use. Plasma insulin was assayed with the ultrasensitive mouse insulin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Crystal Chem, Downers Grove, IL).

2 Effects of BPA and DEHP low doses on the expression of genes involved in fatty acid and cholesterol hepatic synthesis



Cpt1a expression is repressed by low doses of BPA or DEHP but induced by co-exposure to high doses of both

BPA and DEHP co-exposure at high doses increase Hmgcr expression

Figure 2: mRNA were extracted from liver of male CD-1 mice exposed to a low (5µg/kg/day) or a high (5000µg/kg/day) dose of BPA, and/or exposed to a low (0.5mg/kg/day) or a high (500mg/kg/day) dose of DEHP through their diet. Relative expression of genes involved in lipogenesis (Faen=Fatty Acid Synthase, Pcp1a3=patatin-like phospholipase domain containing 3), fatty acid transport (Cpt1a=carnitine palmitoyltransferase 1a), cholesterol synthesis (Hmgcr=3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase) were determined by qPCR. All data were normalized by TBP (TATA-box binding protein) mRNA expression levels. Values shown are the mean ± S.E.M. (n=6 per group). Data were analyzed by Anova followed by post-hoc Student's test with a pooled variance estimate. Asterisks denote a significant difference compared with control condition (0µg/kg/d BPA and 0mg/kg/d DEHP) : *or**p<0.05; **or***p<0.01; ****or***p<0.001

3 Effects of DEHP high dose on the expression of Cyp4a14 and Cyp2b10

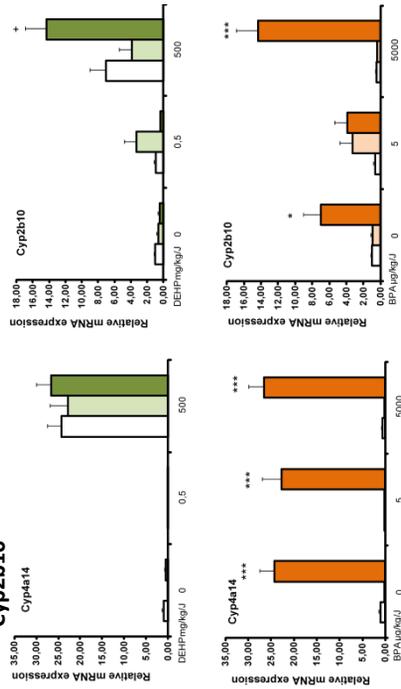
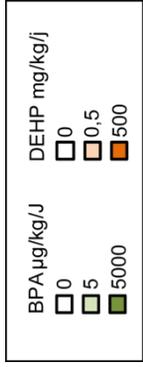


Figure 3 : DEHP activates the expression of PPAR α and CAR target genes mRNA were extracted from liver of male CD-1 mice exposed to a low (5µg/kg/day) or a high (5000µg/kg/day) dose of DEHP through their diet. Relative expression of BPA, and/or exposed to a low (0.5mg/kg/day) or a high (500mg/kg/day) dose of DEHP through their diet. Relative expression of genes involved in ω -hydroxylation (Cyp2b10-cytochrome P450, family 2, subfamily a, polypeptide 10) or detoxification (Cyp2b10-cytochrome-P450, family 2, subfamily b, polypeptide 10) were determined by qPCR as Figure 2



4 Mechanism involved?

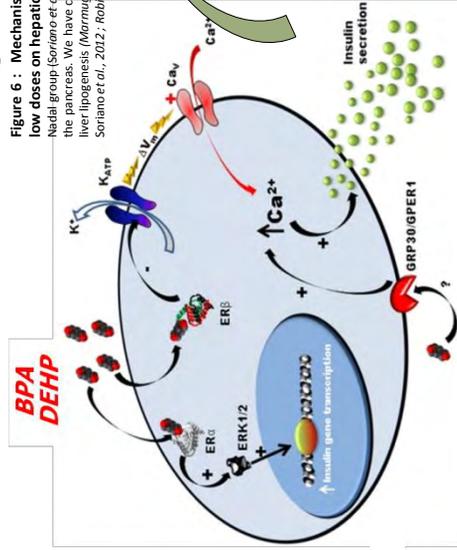
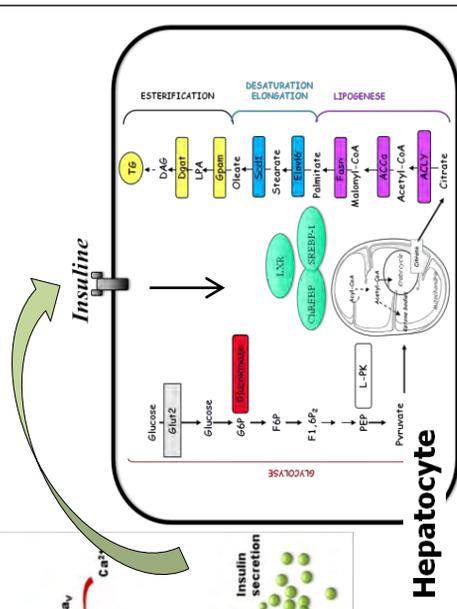


Figure 6 : Mechanisms which may contribute to the non monotonic effects of BPA and DEHP low doses on hepatic lipidomic genes expression. Nadal group (Soriano *et al.*, 2012) showed an effect of low doses of DPA on the production and secretion of insulin by the pancreas. We have confirmed this low doses-effect of BPA that could explain the induction of genes involved in liver lipogenesis (Marmugi *et al.*, 2012). Our data evidence similar effects with low doses of DEHP. Scheme inspired by Soriano *et al.*, 2012; Robichon *et al.*, 2008.



Conclusion

Consistent with previous observations exposure to BPA alone increases plasmatic insulin level at low dose but not at high dose. Remarkably, the same results are observed for exposure to DEHP alone. We observed for co-exposure no synergic or antagonist effect, suggesting a similar mode of action of the two molecules. Such changes in insulin plasmatic level are associated with a similar effect on lipogenic genes expression (Fasn, Pnpla3) at low doses but not at high doses for both DEHP and BPA.

Interestingly, a synergic effect for high doses of DEHP and BPA was observed on the expression of Cpt1 (fatty acid transport) and Hmgcr (cholesterol synthesis) genes.

Altogether, our data highlight for the first time the *in vivo* effect of co-exposure to DEHP and BPA on hepatic gene expression. More importantly, we first report an effect of low BPA and DEHP doses on insulin production by pancreatic β -cells with no synergic or antagonist effect. In contrast, a synergic effect is observed in the liver for some genes involved in lipid homeostasis.

Finally, this integrated research underlines the need for relevant strategies that will allow us to screen for the effect of combination of molecules.

AUTEUR : Alice MARMUGI

TITRE : PERTURBATIONS MÉTABOLIQUES HÉPATIQUES: IMPLICATION DES XÉNOSENSEURS CAR (CONSTITUTIVE ANDROSTANE RECEPTOR) ET PXR (PREGNANE X RECEPTOR) ET D'UN PERTURBATEUR ENDOCRINIEN, LE BISPHÉNOL A.

De nombreuses études expérimentales, cliniques et épidémiologiques récentes montrent que l'exposition à des contaminants de notre environnement pourrait perturber les fonctions métaboliques et endocriniennes des organismes. Ceci contribuerait au développement de l'obésité et des pathologies métaboliques associées telles que la stéatose hépatique non alcoolique, caractérisée par une accumulation massive de triglycérides dans le foie, et qui est susceptible d'évoluer vers des pathologies plus sévères (inflammation, fibrose, cirrhose, carcinome hépatocellulaire), regroupées sous le terme de NAFLD (*Non-Alcoholic Fatty Liver Diseases*).

Nos études réalisées chez le rongeur nous ont permis de mettre en évidence un impact sur le métabolisme hépatique suite à une exposition chronique au Bisphénol A (BPA), un contaminant œstrogéno-mimétique largement exploité dans l'industrie des emballages alimentaires plastiques. Il modifie l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des lipides, des glucides et du cholestérol et favorise l'accumulation de triglycérides et d'esters de cholestérol au niveau hépatique. Ces effets, qui pourraient contribuer à l'émergence de la stéatose hépatique, ont été observés en deçà de la dose de référence en toxicologie réglementaire (la dose journalière admissible) et suivent une courbe dose-réponse non monotone en U inversé. Ces résultats renforcent l'idée que le BPA est un perturbateur métabolique, surtout lors d'expositions à faibles doses.

Les récepteurs nucléaires représentent des cibles potentielles des perturbateurs métaboliques. Plusieurs études récentes montrent que les récepteurs nucléaires CAR (*Constitutive Androstane Receptor*) et PXR (*Pregnane X Receptor*), initialement identifiés comme des récepteurs clés du système de détoxification, sont également impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique. Nos travaux ont permis d'identifier une nouvelle cible de ces xénosenseurs : le gène codant pour l'adiponutrine/PNPLA3 (*Patatin-like phospholipase domain-containing*). Nous avons montré, *in vivo* et sur des lignées d'hépatocytes en culture, que les récepteurs CAR et PXR régulent l'expression du gène Pnpla3. Cette protéine présente une activité à la fois transacylase et lipase qui lui confère un rôle central dans la régulation du métabolisme lipidique hépatique. Chez l'Homme, un variant du gène Pnpla3 (*SNP I148M*) a été identifié comme un nouveau marqueur de la stéatose hépatique et est associé à un risque accru de développement de NAFLD. Les xénosenseurs CAR et PXR étant activés par de nombreux médicaments et polluants environnementaux, nos résultats mettent en exergue le risque de développement de stéatoses hépatiques suite à leur activation. L'ensemble de ces résultats renforce l'idée d'un risque de développement de pathologies métaboliques suite à l'exposition à différents contaminants environnementaux, qu'il s'agisse de perturbateurs endocriniens de type métaboliques ou d'activateurs des xénosenseurs CAR et PXR.

MOTS CLES : stéatose hépatique, métabolisme lipidique, adiponutrine / PNPLA3, contaminant, récepteur nucléaire, Bisphénol A.

DISCIPLINE : Biologie & Santé – Innovation pharmacologique

DIRECTEURS DE THESE : Dr. Laila MSELLI-LAKHAL & Dr. Thierry PINEAU