HAL open science

Conséquences Moléculaires de l'Exposition du Tissu Adipeux Humain à des Xénobiotiques Environnementaux

Sandrine Ellero

▶ **To cite this version:**

Sandrine Ellero. Conséquences Moléculaires de l'Exposition du Tissu Adipeux Humain à des Xénobiotiques Environnementaux. Toxicologie. AgroParisTech, 2010. Français. NNT : 2010AGPT0039 . pastel-00610847

HAL Id: pastel-00610847

https://pastel.hal.science/pastel-00610847

Submitted on 25 Jul 2011

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

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

ParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY

AgroParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET INDUSTRIES DU VIVANT ET DE L'ENVIRONNEMENT
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY FOR LIFE, FOOD AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

Ecole Doctorale ABIES
Agriculture Agriculture Alimentation Food Biologie Biology Environnement Environment Santé Health

Doctorat ParisTech

T H È S E

pour obtenir le grade de docteur délivré par

L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement

(AgroParisTech)

Spécialité : Toxicologie Moléculaire

présentée et soutenue publiquement par

Sandrine ELLERO

le 31 mai 2010

Conséquences moléculaires de l'exposition du tissu adipeux humain à des xénobiotiques environnementaux

Directeur de thèse : **Isabelle de Waziers**

Jury

M. Alain PARIS, Dr., INRA Métarisk, AgroParisTech	Rapporteur
M. Jean-Marc PASCUSSI, Dr., INSERM U661, Université Montpellier 1	Rapporteur
Mme Béatrice DESVERGNE, Pr., Center for Integrative Genomics, Université de Lausanne	Examinateur
M. Xavier LEVERVE, Pr., INSERM U0221, Université Joseph Fournier	Examinateur
M. Philippe BEAUNE, Pr., INSERM U775, Université Paris Descartes	Examinateur
Mme Isabelle de WAZIERS, Dr., INSERM U775, Université Paris Descartes	Directeur de thèse

AgroParisTech
INSERM UMR-S775 Bases Moléculaires de la Réponse aux Xénobiotiques
Université Paris Descartes, 45 rue des Saints Pères 75270 Paris Cedex 06

Résumé

Le tissu adipeux est un organe important pour la régulation de l'homéostasie énergétique de l'organisme. Constitué majoritairement de lipides, ce tissu représente de plus un lieu de stockage pour de nombreux composés environnementaux lipophiles. Les conséquences de cette accumulation, et plus généralement de l'exposition du tissu adipeux à des polluants environnementaux ont été encore peu étudiées. Pourtant, en modulant les fonctions physiologiques ou le développement de ce tissu, ces polluants pourraient jouer un rôle dans le développement de pathologies telles que l'obésité ou le diabète. Le but de cette thèse était d'améliorer notre compréhension des conséquences de l'exposition du tissu adipeux humain à des xénobiotiques environnementaux. Dans un premier temps, nous avons regardé les capacités de métabolisation des xénobiotiques *in situ* dans le tissu adipeux humain en caractérisant l'expression des 23 isoformes de cytochromes P450 impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques. Nous avons montré que seuls les CYP1B1 et CYP2U1 étaient exprimés dans le tissu adipeux humain et que la voie d'induction AhR était fonctionnelle, alors que les voies d'induction CAR et PXR ne semblaient pas l'être. Dans un deuxième temps, nous avons effectué une étude non ciblée par transcriptomique et métabonomique par ^{1}H-RMN des perturbations induites par le traitement de cultures primaires de préadipocytes humains différenciés *in vitro* avec 2 polluants en particulier : la 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) et le mono-2-ethyl hexyl-phthalate (MEHP). L'intégration de ces données a permis la génération d'un nombre important d'hypothèses quant aux mécanismes de toxicité induits par ces composés. Le MEHP en particulier semble posséder un effet pro-différenciateur sur les préadipocytes humains et induire la glycéronéogenèse dans les adipocyte matures, deux mécanismes par lesquels ce polluant pourrait avoir un effet pro-obésifiant chez l'Homme.

Abstract

Adipose tissue is a major regulator of energetic homeostasis in organisms. This tissue is filled with lipids, representing a major storage organ for many lipophilic environmental contaminants. The consequences of this accumulation, and more generally of the exposure of human adipose tissue to such pollutants have been poorly investigated. However, by modulating the physiological functions or the development of this tissue, environmental chemicals could play a role in the development of diseases like obesity or diabetes. The aim of this thesis was to improve our knowledge on the consequences of the exposure of human adipose tissue to environmental xenobiotics. First, we investigated the *in situ* metabolic capacities toward xenobiotics in human adipose tissue, by characterizing the expression of the 23 isoformes of cytochromes P450 involved in xenobiotic metabolism. Our results showed that only CYP1B1 and CYP2U1 were expressed in this tissue, and that the AhR induction pathway was functional, whereas CAR and PXR induction pathways were not. Then, we used an untargeted, "top-down", transcriptomic and ^{1}H-NMR based approach, to characterize the perturbations induced by the treatment of primary cultures of *in vitro* differentiated human preadipocytes with 2 pollutants: 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) and mono-2-ethyl hexyl-phthalate (MEHP). Data integration allowed the generation of many hypothesis regarding the mechanisms of toxicity induced by both compounds. MEHP in particular seemed to possess a pro-differentiating effect on human preadipocytes and to induce neoglycerogenesis in human adipocytes, two mechanisms through which this compound could have an obesogenic effect in human.

Remerciements

Mes premiers remerciements sont tout naturellement pour le Dr. Isabelle de Waziers qui a accepté la lourde tache de directeur de thèse. Merci Isabelle pour avoir supporté ma tendance naturelle à l'autocritique, voire au pessimisme dans mes résultats sans jamais perdre patience, pour toutes les soirées et les dimanches (et même ta voiture !) que tu as sacrifiés à l'autel de cette thèse, et pour ta sollicitude et ton soutien quasi maternels pendant toutes ces années.

Je tiens ensuite à remercier le Pr. Philippe Beaune pour avoir accepter une « matheuse » dans son Master de Toxicologie et dans son équipe de recherche. Merci Philippe pour toutes les mises au point biologiques dont j'avais bien besoin, pour les discussions animées autours de mes résultats et pour avoir toujours cherché les meilleures collaborations pour faire avancer mon projet.

Enfin, je remercie le Pr. Pierre Laurent-Puig de m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour la confiance qu'il a accordée à mon projet, même s'il était très éloigné de ses propres priorités de recherche, et pour avoir facilité la mise en place de nombreuses expériences et collaborations.

Je remercie le Dr. Jean-Marc Pascussi pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse, et le Pr. Béatrice Desvergne pour avoir accepté de faire partie de mon jury.

Je remercie chaleureusement le Dr. Alain Paris qui a suivi ce travail de thèse depuis le début, *via* de nombreux conseils et discussions, sa participation à mon comité de thèse, et enfin en sa qualité de rapporteur. De même, je remercie le Pr. Xavier Leverve dont le soutien et les conseils ont été déterminants pour le début de ma carrière scientifique. Merci M. Leverve d'avoir facilité ce travail dès le départ, ainsi que pour votre aide pratique et scientifique, et enfin pour votre implication dans mon comité et mon jury de thèse.

De plus, je souhaite remercier les différentes personnes du corps des Ingénieurs des Ponts et des Eaux et Forêts qui ont rendu possible cette Formation Complémentaire Par la Recherche et plus particulièrement à MM. Cyril Kao, Claude Millier et Gabriel Lang.

De nombreuses équipes de recherche ont accepté de me recevoir et de partager leur savoir-faire tout au long de ces quatre années. Ces collaborations riches et stimulantes ont été parmi les choses que j'ai le plus appréciées dans ce travail, et je remercie toutes les personnes qui y ont contribuées.

Merci plus particulièrement au Pr. Luc Pénicaud et à Corinne Saillan-Barreau de l'UMR 5241 à Toulouse pour leur accueil durant mon Master et pour m'avoir initiée à la culture primaire de préadipocytes humains.

Merci au Pr. Claude Forest de l'UMR 747 pour les discussions passionnantes autours de PEPCK, et aux membres de son équipe, Thomas Cadoudal, Anne-Marie Jaubert et Emilie Distel pour leur aide précieuse, leur disponibilité et leur gentillesse à divers moments de cette thèse. Merci tout particulièrement au Dr. Chantal Benelli pour m'avoir initiée aux mystères du métabolisme adipocytaire, pour son implication dans la dernière partie de ma thèse, et pour ses relectures patientes et ses commentaires rigoureux de mon manuscrit. Merci Chantal pour votre optimisme et votre rigueur scientifique qui m'ont permis de terminer cette thèse sur de très beaux résultats et de rester motivée dans les difficiles derniers mois.

Enfin, un grand merci au Pr. Jeremy Nicholson de m'avoir accueillie presque cinq mois dans son laboratoire de l'Imperial College de Londres, et à toute son équipe pour avoir fait de mes séjours londoniens de vrais moments de bonheur professionnel et personnel. Merci plus particulièrement à Olaf Beckonert pour son aide précieuse avec la RMN et pour donner son temps sans jamais le compter. Et surtout, merci au Dr. Sandrine Claus pour avoir pris le temps de me transmettre son immense savoir en RMN, en statistiques multivariées et en métabolisme. Merci Sandrine pour ta générosité à partager tout ce que tu sais, pour les beaux résultats que nous avons obtenus ensemble sur nos 2 projets, pour ton optimisme et ta disponibilité, et enfin, pour ton amitié. J'espère que mon choix de partir aux Pays-Bas ne nous empêchera pas de continuer ces belles collaborations.

Cette thèse n'aurait pas été aussi agréable sans la bonne ambiance qui règne au laboratoire. Merci à tous les membres de l'UMR 775 pour les bons moments partagés, au labo et au Frog, pour leur disponibilité, leur aide et leur gentillesse, et plus particulièrement, merci

à Céline, Claire, Delphine, Monique, Jean-Pierre, Marie-Anne, Hélène, Aline et Caroline qui ont partagé ces quatre ans. Je tiens à remercier Karine pour sa gentillesse et pour toutes les fois où elle a accepté de s'occuper de mes (délicates et très méchantes) cellules (même si cela m'a ruinée en macarons) ; ainsi que Fabien et Ariane, partenaires de cette aventure depuis le début, pour avoir partagé les hauts et les bas de la vie de thésard avec moi.

Sur un registre plus personnel, je remercie toutes les personnes qui, par leur solide amitié, ont rendu ces années parisiennes tellement agréables :

Fabien et Lydia, pour les nombreux déjeuners et coups de téléphones à partager les joies et les angoisses des IGREF en FCPR.

Les membres de mon équipe de volley, pour tous les mardis, jeudis et dimanches au gymnase. Cela peut paraître beaucoup mais en votre compagnie, c'était toujours un plaisir de venir s'entrainer : Hélène, Pascaline, Sonia, Aless, Géraldine, Thi-Nhung, Anne-Lise, Aurélie, Gayetan, Céline, et toutes les autres...

Mes amis, pour notre vie sociale très animée et pour tous les bons moments partagés : Antoine, Gaëlle, Thomas, Caroline, Aurélien, Sophie, Julie, Loic, Alix, Frederic, Magali, Romain, Danila, Anna, Stéphanie, Dan.

Céline, Céline, et Morgane, pour ces mercredis soirs inoubliables et qui me manquent déjà : que de mails échangés, de sueur partagée à la Gym Suédoise, de profs critiqués, de restaurants testés, de bouteilles vidées, de rires et de larmes partagés. Merci pour ces moments inoubliables qui m'ont rendu le sourire dans les moments difficiles et pour votre amitié qui m'est tellement précieuse.

« Last but not least », Morgane, mon amie, (la meilleure !) depuis tellement d'années qu'on ne veut même plus les compter, pour m'avoir écoutée et comprise (ou au moins pour avoir essayé) pendant ces années de thèse, et toutes celles qui les ont précédées.

Enfin, je voudrais remercier ma famille, pour le soutien et l'amour qu'ils m'ont toujours témoignés.

Merci à mes frères et sœurs, Jérémy et Emma, pour nos liens simples et forts.

Merci à mon père, mon premier et mon meilleur professeur, pour avoir toujours eu de l'ambition pour moi et pour m'avoir toujours poussée plus loin. « Tu vas voir ma chérie, l'année prochaine, ça sera plus dur ! ». Merci papa pour ce précieux conseil, mais j'espère que cette fois tu te trompes…

Merci à ma mère pour avoir de même toujours souhaité le meilleur pour moi. Merci pour ton oreille attentive durant ces années, pour les après-midi shopping qui m'ont remonté le moral, et plus généralement pour m'avoir transmis ton sens du féminisme et des réalités, pour avoir toujours cru en moi, et pour ton amour inconditionnel.

Enfin, merci à toi, Florian pour ta présence à mes cotés depuis « fuit, une sacré burette ». Ton soutien pendant ces années de thèse m'a été précieux et indispensable. Merci pour ton oreille incroyablement attentive et jamais lassée, pour tes paroles de réconfort et d'encouragement, et pour arriver si bien à faire le tri dans mes propres idées. Merci d'être toujours le plus beau, le plus fort et le plus intelligent. Merci de me donner toujours l'envie de franchir de nouvelles étapes à tes cotés. J'espère que notre prochaine aventure au pays des tulipes sera aussi riche en surprises et en bonnes nouvelles que ces quatre années de thèse partagées.

Table des matières

Liste des abréviations 10
Liste des figures 13
Liste des tableaux 16
AVANT-PROPOS 17
CHAPITRE I : LE METABOLISME DES XENOBIOTIQUES, LES CYTOCHROMES P450 22
I.1 Les P450s : historique 25
I.2 Classification et nomenclature 25
I.3 Structure 27
I.4 Localisation subcellulaire et transfert d'électrons 27
I.5 Réactions catalysées et cycle réactionnel 29
I.6 Fonctions biologiques et substrats 29
I.6.1 Métabolisme de substances endogènes 31
I.6.2 Métabolisme des xénobiotiques 31
I.7 Expression tissulaire 33
I.8 Focus sur les P450s des familles 1 à 3 33
I.8.1 Famille 1 33
I.8.2 Famille 2 34
I.8.3 Famille 3 35
I.9 Régulation transcriptionnelle de l'expression des P450s 36
I.9.1 Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) 38
I.9.2 Constitutive Androstane Receptor (CAR) 40
I.9.3 Pregnane X Receptor (PXR) 42
CHAPITRE II : LE TISSU ADIPEUX 43
II.1 Anatomie du TA 45
II.1.1 Le TA blanc viscéral 46
II.1.2 Le TA blanc sous-cutané 46
II.2 Le TA et la régulation de l'homéostasie énergétique 48
II.3 Le TA, organe endocrinien 50
II.4 Focus sur l'adipocyte 52

II.4.1 Morphologie 52
II.4.2 Lipogenèse 52
II.4.3 Lipolyse 56
II.5 Origine et développement du TA 58
II.6 La différenciation adipocytaire (adipogenèse) 60
II.6.1 Arrêt de la prolifération 60
II.6.2 Expansion clonale 61
II.6.3 Phase terminale de différenciation 62
II.7 Les modèles d'étude du TA 64
II.7.1 Les lignées de préadipocytes 64
II.7.2 Les préadipocytes en culture primaire 65
II.7.3 Les adipocytes isolés 66
II.7.4 Les explants de TA 67
II.7.5 Le TA *in vivo* 69
CHAPITRE III : TISSU ADIPEUX ET XENOBIOTIQUES 70
III.1 Exposition du TA aux polluants environnementaux 71
III.1.1 Polluants organiques persistants (POPs) 71
III.1.2 Autres composés 72
III.1.3 Classification des xénobiotiques 75
III.2 Enzymes du métabolisme des xénobiotiques et TA 75
III.2.1 EMX de phase 1 77
III.2.2 EMX de phase 2 79
III.2.3 Etude globale 79
III.3 Toxicité directe des xénobiotiques environnementaux sur le TA 80
III.3.1 Effet des xénobiotiques sur le poids corporel 81
III.3.2 Effet des xénobiotiques sur l'adipogenèse 90
III.3.3 Autres effets sur le TA 94
III.3.4 Conclusion 98
CHAPITRE IV : LES TECHNIQUES –OMIQUES, ET LEURS APPLICATIONS EN TOXICOLOGIE 99
IV.1 Présentation technique 102
IV.1.1 La transcriptomique 102
IV.1.2 La protéomique 106

IV.1.3 La métabonomique 110
IV.2 Applications en toxicologie 127
IV.2.1 La transcriptomique 128
IV.2.2 La métabonomique 132
OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE 138
CHAPITRE V : EXPRESSION ET INDUCTION DES CYTOCHROMES P450 DANS LE TISSU ADIPEUX HUMAIN141
CHAPITRE VI : ETUDE NON CIBLEE DES EFFETS DU MEHP ET DE LA TCDD SUR LES ADIPOCYTES HUMAINS 144
VI.1 Introduction 146
VI.2 Matériels et méthodes 150
VI.2.1 Culture cellulaire 150
VI.2.2 Transcriptomique-analyse de données 150
VI.2.3 Métabonomique par ^{1}H-RMN-analyse de données 152
VI.2.4 RT PCR 156
VI.2.5 Western-Blot 156
VI.2.6 Mesure d'un indice glycéronéogénique : acides gras non estérifiés libérés dans le milieu de culture 156
VI.3 Résultats 158
VI.3.1 Effets transcriptomiques de l'exposition des adipocytes humains à la TCDD et au MEHP . 158
VI.3.2 Etude métabonomique par ^{1}H-RMN des effets de l'exposition des adipocytes humains à la TCDD et au MEHP 174
VI.3.2 Intégration des données transcriptomiques et métabonomiques 196
VI.3.3 Effet du MEHP sur les adipocytes humains au cours du temps 198
VI.4 Discussion 202
VI.4.1 Le MEHP est un activateur des gènes cibles de PPARγ dans les adipocytes humains 202
VI.4.2 Le MEHP a-t-il un effet pro-différenciant sur les adipocytes humains ? 204
VI.4.3 Effets métaboliques liés au MEHP : génération d'hypothèses 208
VI.4.4 Le MEHP est un activateur précoce de la glycéronéogenèse dans les adipocytes humains 211
VI.4.5 Perturbations du TA et conséquences attendues de l'exposition humaine au MEHP 214
VI.4.6 La TCDD a-t-elle des effets sur les adipocytes humains ? 218
CHAPITRE VII : DISCUSSION GENERALE, PERSPECTIVES 221
VII.1 Forces et faiblesses des modèles *in vitro* utilisés dans cette thèse 222

VII.2 Forces et faiblesses de l'approche « top-down » utilisée..... 224
VII.3 Perspectives..... 226
Références..... 228
Annexe 1 : Publication en cours..... 244
Annexe 2 : Publication dans Drug Metabolism and Disposition 246

Liste des abréviations

ACP	Analyse en Composantes Principales
ACS	Acyl-CoA Synthetase
ADFP	Adipose Differentiation related Protein
AG	Acide Gras
AhR	Aryl hydrocarbon Receptor
aP2	Adipocyte Protein 2
AQP	Aquaporine
Arnt	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
ATGL	Adipose Triglyceride Lipase
BEZ	Bezafibrate
BNF	β-naphtoflavone
BPA	Bisphénol A
CAR	Constitutive Androstane Receptor
CDCP	Center for Disease Control and Prevention
CD36	Cluster of Differentiation 36
CEBP-α	CCAAT/Enhancer Binding Protein-α
CPT1	Carnitine Palmitotransférase 1
DAG	Diacylglycérol
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DDT	Dichlorodiphenyltrichloroéthane
DEHP	Di-2-ethyl hexyl phthalate
DiBP	Diisobutylphthalate
DMSO	Diméthylsulfoxide
EMX	Enzyme du Métabolisme des Xénobiotiques
FABP	Fatty Acid Binding Protein
FAS	Fatty Acid Synthase
FATP	Fatty Acid Transport Protein

FDR	False Discovery Rate
FID	Free Induction Decay
GST	Glutathion-S-Transférase
G3P	Glycérol-3-Phosphate
G3PDH	Glycérol-3-Phosphate Deshydrogénase
HAP	Hydrocarbure Aromatique Halogéné
HCB	Hexachlorobenzène
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethane sulfonique
IBMX	Isobutylmethylxanthine
IMC	Indice de Masse Corporelle
LCFA-CoA	Long Chain Fatty Acyl-CoA
LHS	Lipase Hormono-sensible
LPL	Lipoprotéine Lipase
MAG	Monoacylglycérol
MEHP	Mono-2-ethyl hexyl-phthalate
MPA	Acétate de Medroxyprogestérone
NHANES	National Health And Nutrition Examination Survey
O-PLS	Orthogonale-PLS
PBDE	Polybromodiphenyléthers
PC	Pyruvate Carboxylase
PCB	Polychlorobiphényl
PCDD	Polychlorodibenzo-p-dioxine
PCDF	Polychlorodibenzo-furane
PCs	Composantes Principales
PDK4	Pyruvate Deshydrogénase kinase 4
PEPCK	Phosphoénol Pyruvate Carboxykinase
PLS	Projection sur les Structures Latentes
PLS –DA	PLS-Discriminante Analysis
POP	Polluant Organique Persistant

ppm	Partie par millions
PPARγ	Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ
PPRE	Peroxisome Proliferator Response Element
PVC	Chlorure de polyvinyle
PXR	Pregnane X Receptor
P450	Cytochrome P450
RD	Relaxation Delay
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RT PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
SCD	Stearoyl-CoA désaturase
SD	Sprague Dawley
SM	Spectrométrie de Masse
STOCSY	Spectroscopie de Corrélation Totale Statistique
SVF	Sérum de Veau Fétal
TA	Tissu Adipeux
TBT	Tributyline
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine
TG	Triglycéride
TSP	Acide 3-triméthylsilylpropionique
TZD	Thiazolidinedione
UGT	UDP-Glucuronyl-Transférase
VLDL	Very Low Density Lipoprotein-Lipoprotéine à très faible densité

Liste des figures

Figure 0-1 Tendances en médecine de la reproduction aux Etats-Unis
Figure I-1 Métabolisme des xénobiotiques dans un hépatocyte
Figure I-2 Nomenclature des cytochromes P450 : exemple du CYP3A4
Figure I-3 Transfert d'électron
Figure I-4 Réactions d'oxydation généralement catalysées par les P450s
Figure I-5 Cycle catalytique des P450s
Figure I-6 Classification des 57 P450s humains, basée sur la nature de leur substrat principal
Figure I-7 Proportions des différentes isoformes de P450s présents dans le foie
Figure I-8 Régulation transcriptionnelle de l'expression des P450s par le récepteur Ah
Figure I-9 Régulation transcriptionnelle de l'expression des P450s par le récepteur CAR
Figure I-10 Régulation transcriptionnelle de l'expression des P450s par le récepteur PXR
Figure II-1 Anatomie du tissu adipeux
Figure II-2 Rôle du TA blanc et des organes périphériques en état post-prandial et à jeun
Figure II-3 Morphologie d'un adipocyte blanc
Figure II-4 Synthèse des triglycérides dans l'adipocyte
Figure II-5 Glycéronéogenèse et ré-estérification des acides gras
Figure II-6 Hydrolyse des triglycérides dans le tissu adipeux (lipolyse)
Figure II-7 Les différentes étapes de la différenciation adipocytaire
Figure III-1 Niveaux relatifs des ARNm des principaux facteurs de transcription impliqués dans les mécanismes d'induction des P450s dans le foie et le TA de rat
Figure III-2 Induction du CYP1A1 par la BNF chez des souris sensibles ou non aux ligands de AhR
Figure III-3 Effets de l'exposition trans-générationnelle et *in utero* au DEHP sur l'homéostasie métabolique
Figure III-4 Le MEHP induit l'adipogenèse dans les cellules 3T3-L1
Figure III-5 Le BPA inhibe la sécrétion d'adiponectine dans des explants de TA humain
Figure IV-1 Principe général de l'analyse de l'expression transcriptionnelle sur une puce de type « spottée »
Figure IV-2 Principe général de l'analyse de l'expression transcriptionnelle sur une puce de type Affymetrix
Figure IV-3 Les différentes étapes d'une expérience utilisant des puces à ADN
Figure IV-4 Gel d'électrophorèse bidimensionnel coloré au Bleu de Coomassie
Figure IV-5 Un spectre RMN typique
Figure IV-6 Un spectre LC-MS typique
Figure IV-7 Spectres ^{1}H-RMN de biofluides

Figure IV-8 Représentation graphique de la projection d'un nuage de point sur les 2 premiers axes d'une ACP
Figure IV-9 Résultats d'une analyse par ACP
Figure IV-10 Résultats d'une analyse d'O-PLS-DA
Figure IV-11 Analyse STOCSY à une dimension
Figure IV-12 Prédiction du statut de l'artère coronaire, basée sur un modèle de PLS-DA utilisant les spectres RMN de sérum de patients
Figure VI-1 Métabolisme du DEHP
Figure VI-2 Plan d'expérience pour l'évaluation non ciblée des effets de la TCDD et du MEHP sur les adipocytes humains
Figure VI-3 Résultats de l'ACP conduite sur l'ensemble des données des puces d'expression Affymetrix
Figure VI-4 Résultats de l'ACP conduite sur l'ensemble des données des puces d'expression Affymetrix (TCDD vs DMSO)
Figure VI-5 Résultats de l'analyse d'ontologie de gènes pour les gènes différentiellement exprimés lors du traitement des adipocytes humains à la TCDD
Figure VI-6 Résultats de l'ACP conduite sur l'ensemble des données des puces d'expression Affymetrix (MEHP vs DMSO)
Figure VI-7 Résultats de l'analyse d'ontologie de gènes pour les gènes différentiellement exprimés lors du traitement des adipocytes humains au MEHP
Figure VI-8 Spectres ^{1}H-RMN 600 MHz des milieux de culture
Figure VI-9 ACP conduite sur les spectres RMN des milieux de culture
Figure VI-10 ACP conduite sur les spectres RMN des milieux de culture (TCDD vs DMSO)
Figure VI-11 ACP conduite sur les spectres RMN des milieux de culture (MEHP vs DMSO)
Figure VI-12 Résultats de l'O-PLS-DA conduite sur les spectres RMN des milieux de culture des adipocytes traitées au MEHP pendant 24h et les cellules contrôles
Figure VI-13 Expérience de spike in de la proline pour l'identification du composé à 2.33 ppm
Figure VI-14 Spectre ^{1}H-RMN 600 MHz d'un extrait organique d'adipocytes humains
Figure VI-15 Résultats de l'O-PLS-DA conduite sur les spectres RMN des extraits organiques des adipocytes traitées au MEHP pendant 48h et les cellules contrôles
Figure VI-16 Spectre ^{1}H-RMN 600 MHz d'un extrait cellulaire aqueux d'adipocytes humains
Figure VI-17 ACP conduite sur les spectres ^{1}H -RMN 600 MHz des extraits cellulaires aqueux d'adipocytes humains
Figure VI-18 ACP conduite sur les spectres ^{1}H -RMN 600 MHz des extraits cellulaires aqueux d'adipocytes humains (TCDD vs DMSO)
Figure VI-19 ACP conduite sur les spectres ^{1}H -RMN 600 MHz des extraits cellulaires aqueux d'adipocytes humains (MEHP vs DMSO)

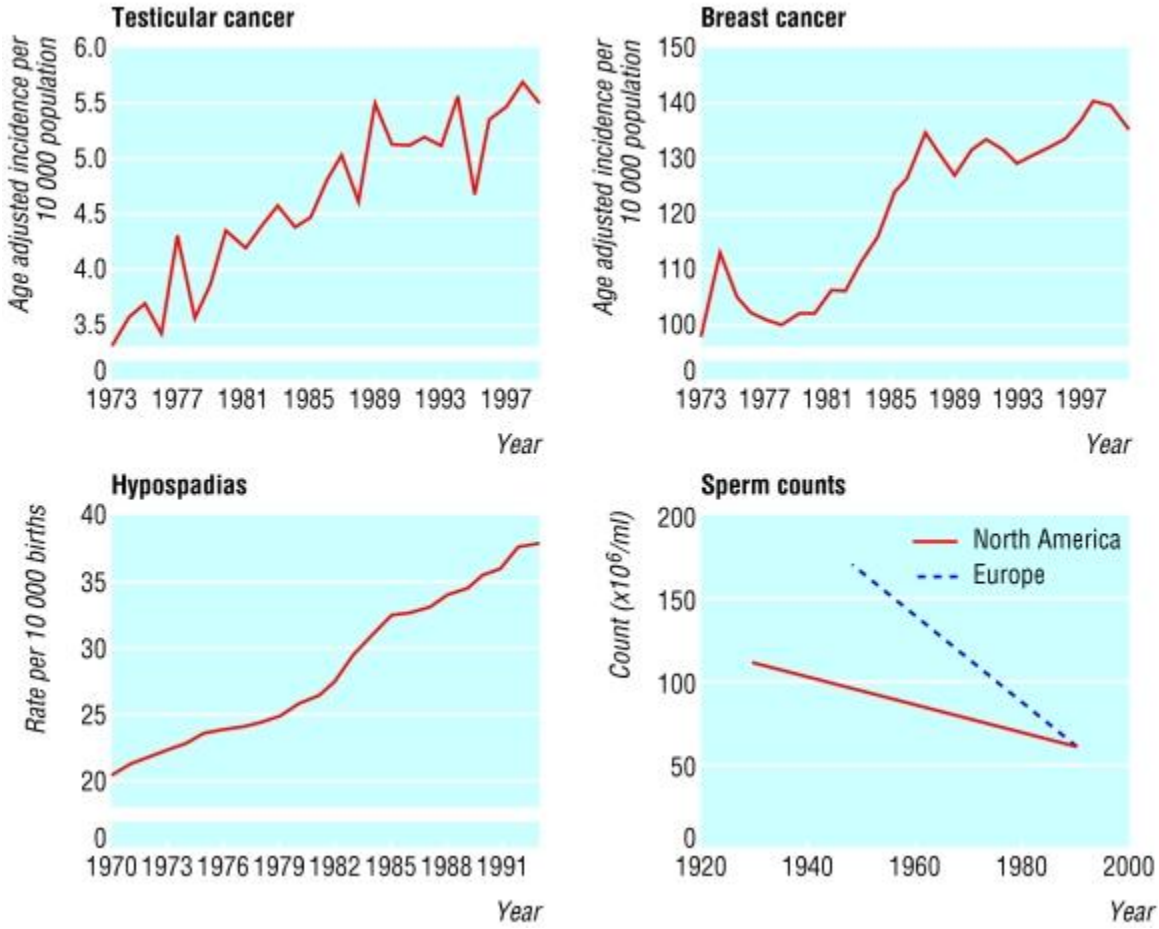
Figure VI-20 Résultats de l'O-PLS-DA conduite sur les spectres 1H-RMN 600 MHz des extaits aqueux des adipocytes traités au MEHP et les cellules contrôles
Figure VI-21 O-PLS : Intégration des données transcriptomiques et métabonomiques
Figure VI-22 Quantification de la quantité de triglycérides intracellulaires dans les adipocytes humains
Figure VI-23 Cinétique d'induction des gènes impliqués dans les différentes voies du métabolisme lipidique après le traitement des adipocytes au MEHP
Figure VI-24 Induction de la glycéronéogenèse dans les adipocytes humains traités au MEHP
Figure VI-25 Voie de signalisation des récepteurs PPAR (KEGG Pathway)
Figure VI-26 Résumé des effets métaboliques induits par le traitement au MEHP dans les adipocytes humains

Liste des tableaux

Table II-1 Quelques exemples de facteurs sécrétés par le TA
Table II-2 Modèles *in vitro* de lignées de préadipocytes et cultures primaires
Table II-3 Principales différences entre les TA de souris, de rat et d'homme
Table III-1 Caractéristiques des xénobiotiques environnementaux pouvant avoir un effet direct sur le TA humain
Table III-2 Niveaux relatifs d'ARNm de P450s dans le foie et le TA de rat
Table IV-1 Principaux types de puces à ADN
Table VI-1 Amorces utilisées pour la RT-PCR
Table VI-2 Gènes différentiellement exprimés lors du traitement des adipocytes humains à la TCDD
Table VI-3 Gènes différentiellement exprimés lors du traitement des adipocytes humains au MEHP

AVANT-PROPOS

Figure 0-1 : Tendances en médecine de la reproduction aux Etats-Unis (d'après (Sharpe and Irvine, 2004))



Dès les années 1950, des études ont mis en évidence dans de nombreux pays industrialisés une diminution de la fertilité masculine (altérations morphologiques et baisse du nombre de spermatozoïdes), une augmentation de la fréquence du cancer du testicule, de la prostate et du sein (Sharpe and Irvine, 2004) (Figure 0-1). Des études épidémiologiques, puis des expériences de laboratoire, ont montré que l'exposition à des molécules hormono-mimétiques pourrait être en partie responsable de ces phénomènes. La découverte de l'altération du système reproducteur des alligators sauvages vivant dans des lacs contaminés de Floride a relancé les travaux de recherche sur ce thème dans les années 1990 (Guillette et al., 1994). Il y a alors eu une prise de conscience de la présence dans l'environnement de substances capables d'affecter le fonctionnement du système endocrinien : les perturbateurs endocriniens. Les scientifiques qui travaillent sur les animaux sauvages ont été les premiers à tirer la sonnette d'alarme et leurs études sont, aujourd'hui encore, les plus convaincantes pour affirmer l'existence d'un lien entre l'exposition à des produits chimiques présents dans l'environnement et des effets délétères sur la santé (Carson, 1962). Le lien entre ces expositions et la santé humaine est beaucoup plus difficile à mettre en évidence. Cependant, de nombreuses études épidémiologiques ont soulevé l'existence possible d'un effet de ces polluants sur la fertilité masculine (Swan et al., 2003) et féminine (Cobellis et al., 2003), les altérations du système immunitaire, les troubles du comportement, l'augmentation de l'incidence de certains cancers (Czene et al., 2002), et plus récemment de certaines maladies métaboliques comme le diabète ou l'obésité…

Il existe trois voies d'absorption principales de ces composés chimiques : cutanée, respiratoire et digestive. Chez l'homme en général, l'alimentation est la voie d'exposition dominante. Quelle que soit la source d'exposition, l'absorption d'un composé est facilitée par certaines propriétés chimiques, dont la taille et la lipophilie. Ainsi, les composés de l'environnement de faible poids moléculaires et très lipophiles vont pénétrer facilement dans l'organisme et atteindre la circulation sanguine. De nombreuses études montrent aujourd'hui la présence de certains de ces composés dans le sang et l'urine des populations (Curtis and Wilding, 2010). Ces produits proviennent de résidus de produits chimiques utilisés en

agriculture mais aussi de certains produits de consommation quotidienne (plastiques, cosmétiques…). Ces résultats suggèrent ainsi une exposition constante des populations humaines à de nombreux composés chimiques.

L'organisme possède des systèmes enzymatiques sophistiqués capables de le débarrasser de la plupart de ces composés. Certains produits échappent cependant à ce système de détoxification et se déposent alors dans les sites adipeux de l'organisme, où ils peuvent rester parfois pendant des années : c'est la bioaccumulation. Des chercheurs qualifient même le tissu adipeux de « réservoir à produits chimiques » (Mullerova and Kopecky, 2007). Les conséquences de cette accumulation et les effets directs de ces polluants sur les fonctions physiologiques du tissu ont été assez peu étudiés. Pourtant, en modulant la différenciation, le métabolisme et les fonctions physiologiques du tissu adipeux, les polluants pourraient notamment influencer le développement de maladies comme l'obésité.

La prévalence de l'obésité a augmenté à des taux alarmants, avec 65.4% de la population adulte en surpoids aux Etats-Unis, et 30.5% des adultes en situation d'obésité (Flegal et al., 2002). (Wang et al., 2008b) prédisent que si la progression de l'épidémie continue aux mêmes taux, 86% de la population sera en surpoids en 2030 et 51% obèse, et tous les adultes américains seront en situation de surpoids d'ici 2048. L'étiologie de l'obésité chez l'homme est complexe. Les principales données épidémiologiques imputent la montée des taux d'obésité dans la population générale à des régimes hypercaloriques et/ou hyperlipidiques, couplés à une baisse de l'activité physique. La contribution de composantes génétiques est moins claire. Même si certaines variations génétiques contribuent à la propension individuelle à développer l'obésité, l'augmentation planétaire et rapide de cette maladie suggère que l'interaction avec l'environnement moderne potentialise ces différences génétiques inhérentes.

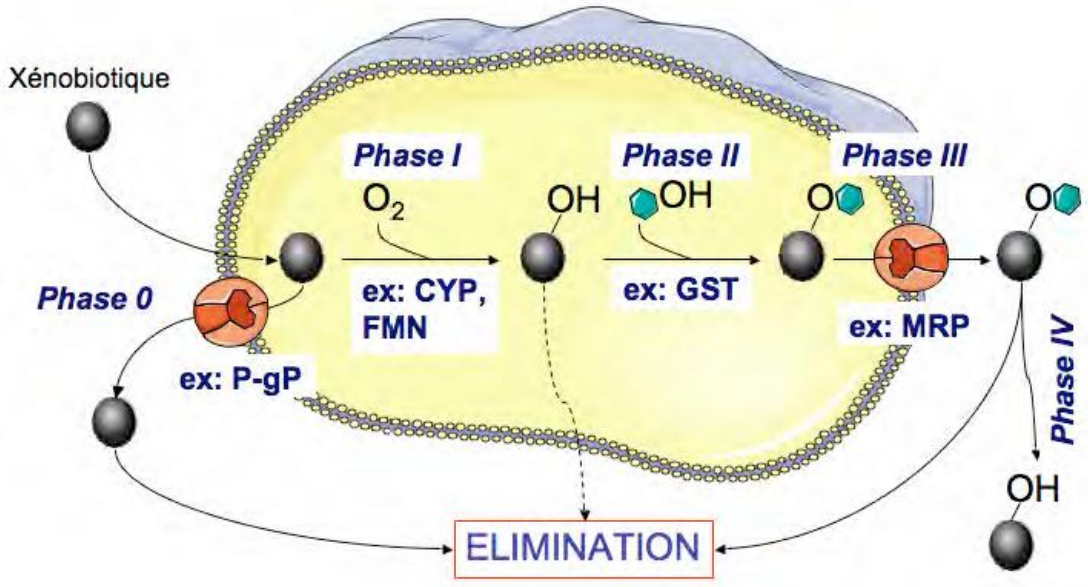
En accord avec cette idée, certains auteurs pensent que les polluants jouent un rôle dans le développement de l'obésité (Grun and Blumberg, 2009). Le taux d'accroissement de l'obésité augmentant en parallèle de l'utilisation de composés chimiques industriels depuis 40 ans, il

semble en effet possible d'associer l'exposition aux composés chimiques, qu'elle soit *in utero* ou chronique tout au long de la vie de l'individu, avec le développement de cette épidémie. Ainsi, un modèle d' « obésogènes environnementaux » prédit l'existence de composés chimiques qui dysrégulent le métabolisme lipidique et/ou l'adipogénèse, favorisant le développement de l'obésité. Des preuves concrètes pour supporter cette hypothèse demanderaient d'identifier ces obésogènes, leurs cibles moléculaires, et leurs mécanismes d'action. Pour l'instant, seules certaines données épidémiologiques et *in vitro* suggèrent un lien entre l'obésité et l'exposition aux polluants. Elles servent de « preuve de principe » à l'hypothèse des obésogènes chimiques. Par exemple, le risque d'obésité infantile est associé avec la consommation maternelle de tabac lors de la grossesse : fumer avant ou pendant la grossesse multiplie par deux le risque d'obésité chez les enfants en âge d'aller à l'école (Toschke et al., 2002). *In vitro*, la capacité de certains perturbateurs endocriniens à activer des facteurs de transcription qui contrôlent le développement et le métabolisme du tissu adipeux a été démontrée (Feige et al., 2007).

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés lors de ce travail de thèse aux conséquences de l'exposition du tissu adipeux humain à divers composés environnementaux. Dans la 1e partie de ce manuscrit figure une introduction bibliographique qui décrit tout d'abord les systèmes de métabolisme des composés chimiques dans l'organisme, et plus particulièrement celui des cytochromes P450 ; ensuite est présenté le tissu adipeux. Dans la suite de cette introduction sont résumés les différents travaux s'étant intéressés de manière générale au lien entre le tissu adipeux et l'exposition aux polluants, et enfin, les techniques « omiques » et leurs applications en toxicologie sont décrites. Les deux chapitres suivants présentent les travaux de recherche menés pendant cette thèse. Nous avons tout d'abord choisi d'utiliser des modèles *ex vivo* et *in vitro* de tissu adipeux humain, et de caractériser le système de métabolisme des xénobiotiques, et plus particulièrement les cytochromes P450, dans ce tissu. Nous avons ensuite utilisé des techniques –omiques non ciblées sur des adipocytes humains en culture primaire, afin d'obtenir une vue globale des perturbations induites par l'exposition des cellules à deux polluants : le mono-2-éthylhexyl-phthalate et la 2,3,7,8-tétrachorodibenzo-*p*-dioxine.

CHAPITRE I : LE METABOLISME DES XENOBIOTIQUES, LES CYTOCHROMES P450

Figure I-1 : Métabolisme des xénobiotiques dans un hépatocyte (d'après (Beaune and Loriot, 2000))



La membrane cellulaire constitue une barrière efficace protégeant la cellule contre les molécules toxiques et les xénobiotiques hydrosolubles. À l'inverse, la plupart des xénobiotiques auxquels nous sommes couramment exposés sont des molécules hydrophobes de faible poids moléculaire (<1000 Da), ayant la faculté de franchir aisément la membrane. Ils peuvent ainsi s'accumuler dans la cellule et atteindre rapidement un seuil de toxicité. Au cours de leur évolution, les organismes ont développé des systèmes limitant l'accumulation de ces composés: il s'agit de transporteurs membranaires permettant une sortie rapide des molécules indésirables et de systèmes de conversion chimique des molécules hydrophobes en molécules plus hydrophiles dont l'élimination par les fluides corporels est ainsi facilitée. Les enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMX) sont responsables de ces réactions.

Le métabolisme des xénobiotiques se décompose en plusieurs phases qui aboutissent à l'élimination de ces substances étrangères dans la bile ou l'urine. La Figure I-1 présente les différentes phases du métabolisme des xénobiotiques dans un hépatocyte.

Phase 0 : Le xénobiotique hydrophobe qui pénètre dans la cellule peut être rapidement expulsé par des pompes d'efflux comme la P-glycoprotéine ou d'autres transporteurs membranaires.

Phase I : Si le xénobiotique n'est pas expulsé directement, il peut être pris en charge par des enzymes de phase I (cytochromes P450 ou flavines monooxygénases). Ces enzymes catalysent le plus souvent des réactions de monooxygénation qui permettent de rendre le xénobiotique plus polaire en créant dans sa structure un groupement chimique –OH, $-NH_2$, -COOH. Cette phase est dite « de fonctionnalisation ».

Phase II : A ce stade, le xénobiotique peut être éliminé ou pris en charge par les enzymes de phase II (UDP-glucuronyl-transférases (UGTs), sulfotransférases, glutathion-S-transférases (GSTs), N-acétyl-transférases…) qui conjuguent le xénobiotique, fonctionnalisé ou non, avec un groupement acide glucuronique, sulfate, glutathion, acétyl… respectivement. Le rôle de ce groupement sera, soit de neutraliser un groupement réactif (thiol, amine, aldéhyde…), soit de rendre le xénobiotique plus hydrophile. Cette phase est dite « de conjugaison ».

Phase III : Enfin, le xénobiotique rendu hydrophile peut être transporté à travers la membrane cellulaire par des pompes d'efflux.

Parmi ces EMX, les cytochromes P450 (P450) constituent une super famille d'hémoprotéines qui jouent un rôle important dans le métabolisme oxydatif de nombreux xénobiotiques, mais aussi de composés endogènes. Une partie du travail de thèse s'est intéressée plus particulièrement aux P450s dans le tissu adipeux humain, c'est pourquoi la suite de ce chapitre sera consacrée à ces enzymes, et ne discutera pas le rôle des autres EMX.

I.1 Les P450s : historique

En 1958, M. Klingenberg et D. Garfinkel mirent en évidence un pigment dans des fractions microsomales hépatiques de rat et de cochon qui, réduit par le NADPH, présentait une absorption caractéristique à 450 nm en présence de monoxyde de carbone (Klingenberg, 1958) (Garfinkel, 1958). Quatre années plus tard, la structure biochimique de ces pigments était élucidée : il s'agissait d'hémoprotéines, appelées par la suite « cytochromes P450 » (Omura and Sato, 1962). Au début des années 60, l'implication des P450s dans la biotransformation des stéroïdes (Cooper et al., 1965a) puis dans l'oxydation des composés exogènes fut établie (Cooper et al., 1965b).

I.2 Classification et nomenclature

La purification, puis le séquençage des P450s au sein de nombreux laboratoires ont permis d'identifier chez l'Homme, l'existence de 57 gènes et 58 pseudogènes (http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html). Chaque isoforme possède des propriétés catalytiques propres, dépendantes de la structure de sa partie apoprotéique. Selon le degré d'homologie entre les séquences primaires en acides aminés constitutifs, les critères phylogénétiques et l'organisation génétique, les P450s ont été ainsi répartis en familles et sous-familles (Nebert et al., 1987).

Ainsi, dans une même famille, on regroupe les P450s présentant plus de 40% d'homologie dans leurs séquences en acides aminés. Au sein d'une même sous-famille cette

Figure I-2 : Nomenclature des cytochromes P450 : exemple du CYP3A4

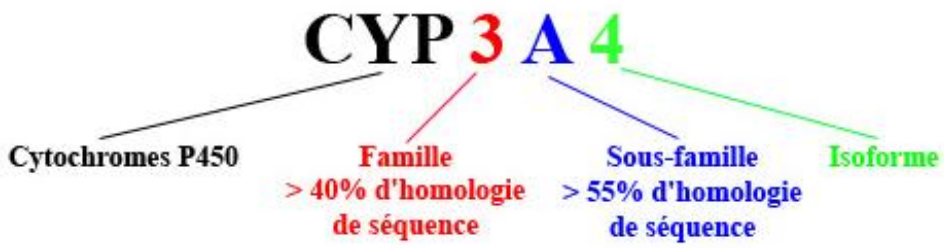
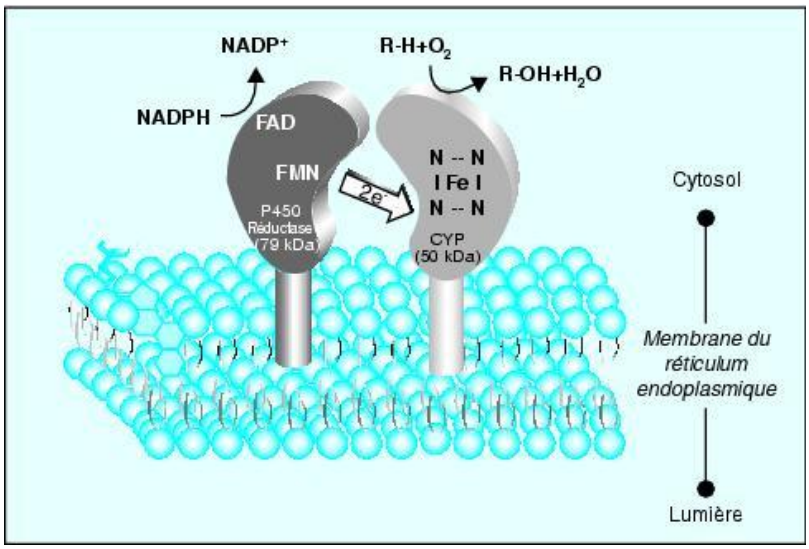


Figure I-3 : Transfert d'électrons (d'après (Gueguen et al., 2006))



Les P450s sont localisés dans la membrane du réticulum endoplasmique. La transformation d'un composé chimique par les P450s a lieu sur la face externe du réticulum endoplasmique où est ancrée l'enzyme. Le site actif du P450 contient un atome de fer (Fe) fixé par des liaisons de coordinances. Deux électrons, provenant d'une molécule de NADPH, sont transférés à l'hémoprotéine par une flavoprotéine (FAD-FMN) en présence du xénobiotique (R-H) et d'un atome d'oxygène. Le xénobiotique est oxydé et un atome d'oxygène moléculaire est incorporé (R-OH).

homologie est supérieure à 55%. Chaque sous-famille peut renfermer plusieurs isoformes. Enfin, les isoformes ayant moins de 3% de divergence sont classés comme variants alléliques.

La nomenclature actuelle des P450s consiste à nommer un gène ou un ADNc par le symbole CYP, suivi d'un chiffre arabe désignant la famille, d'une lettre majuscule désignant la sous-famille, puis d'un chiffre arabe pour chaque gène. Pour désigner l'ARNm ou la protéine, la même nomenclature est employée sans l'attribut italique (Figure I-2).

I.3 Structure

Les P450s sont des hémoprotéines constituées d'une apoprotéine reliée à un groupement prosthétique (hème) par le groupement thiolate d'une cystéine. Les isoformes de P450s présentent le même groupement prosthétique (lieu de la réaction enzymatique), mais différent par leur apoprotéine.

L'apoprotéine est une chaîne polypeptidique de masse moléculaire comprise entre 45 et 60 kDa et de séquence variable. Sa composition en acides aminés et sa structure tridimensionnelle conditionnent la sélection des substrats acceptés.

Le groupement prosthétique est une protoporphyrine IX de fer. Le fer se trouve à l'état Fe III. Il est lié aux 4 azotes pyrroliques de la protoporphyrine, à une cystéine axiale et éventuellement à un 6e ligand (H_20, CO, O_2, autre).

I.4 Localisation subcellulaire et transfert d'électrons

Contrairement aux P450s bactériens, les P450s eucaryotes sont associés à la membrane externe du réticulum endoplasmique ou se trouvent dans les mitochondries (membrane interne ou externe). Les P450s permettent un grand nombre de réactions, dont la plus importante est l'hydroxylation. Afin de les rendre fonctionnels, les P450s ont également besoin d'une source d'électrons (Figure I-3). Ces électrons sont apportés par une autre protéine : la NADPH cytochrome P450 réductase si le P450 est situé dans le réticulum endoplasmique, la ferredoxine

Figure I-4 : Réactions d'oxydation généralement catalysées par les P450s (d'après (Mansuy and Battioni, 2000))

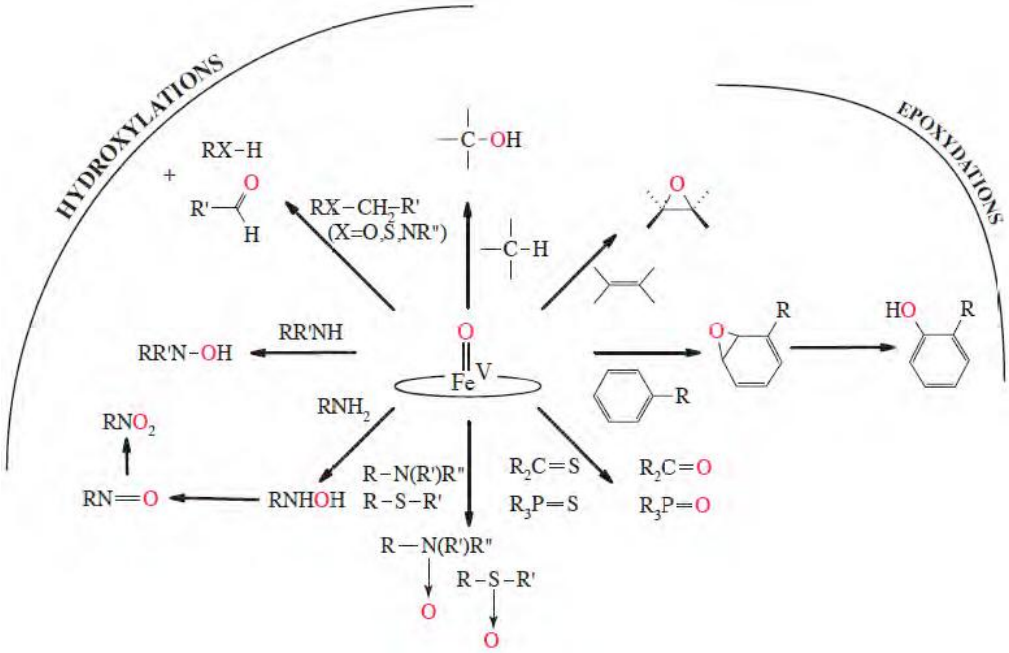
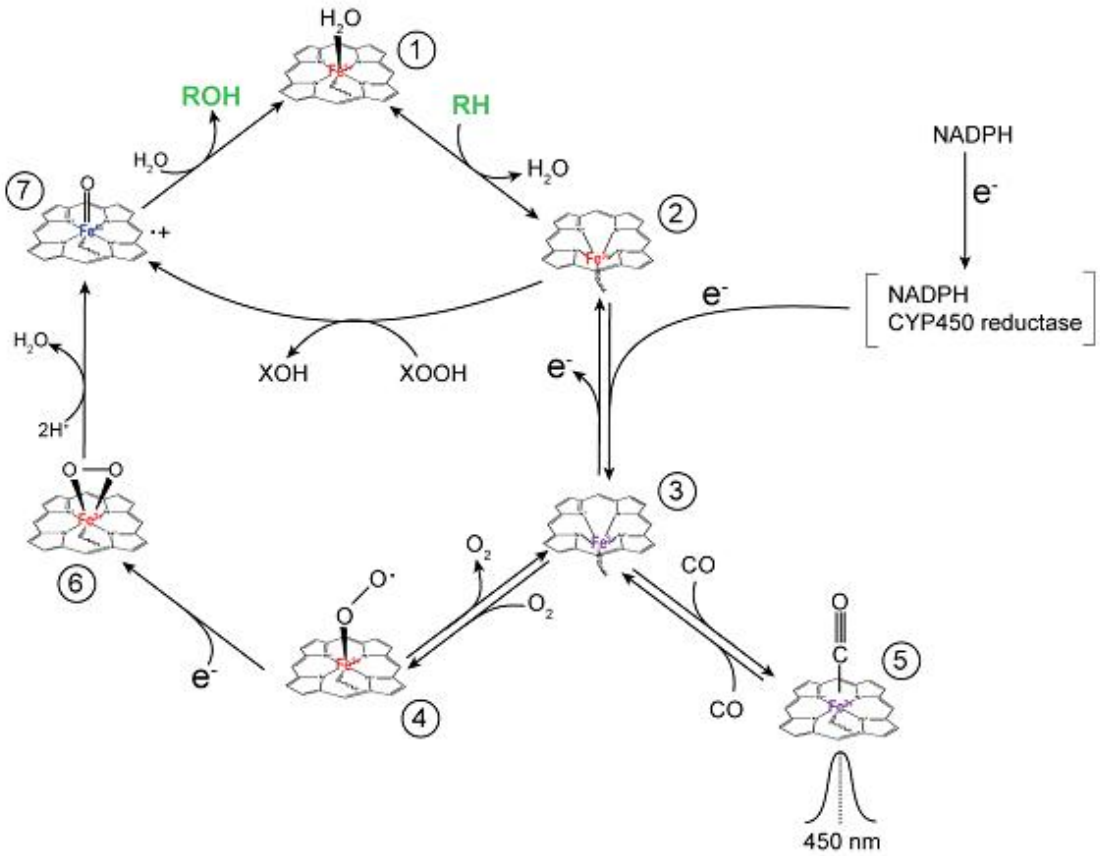


Figure I-5 : Cycle catalytique des P450s (Adapté de (Guengerich, 2007))



si le P450 est situé dans les mitochondries. Le NADPH est la source majeure d'électrons dans ce système.

I.5 Réactions catalysées et cycle réactionnel

Les P450s catalysent une grande diversité de réactions : mono-oxygénations principalement, mais aussi isomérisations, déshydratations, et réductions (Figure I-4). Parmi ces réactions, la plus courante pour le métabolisme des xénobiotiques est la mono-oxygénation, selon l'équation suivante :

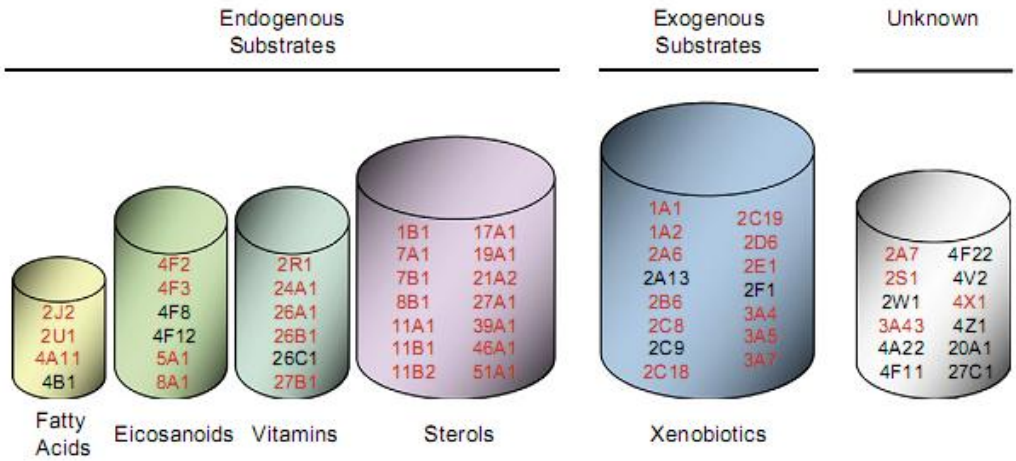
$$R\text{-}H + O_2 + 2e^- + 2H^+ \qquad R\text{-}O\text{-}H + H_2O$$

Le cycle catalytique des P450s est généralement composé de 8 étapes, illustrées dans la Figure I-5. Le substrat entre dans le cycle, en se liant au P450 de manière réversible (2). Puis un électron, provenant de la réduction du NADPH par la P450 reductase, réduit le Fe^{3+} de l'hème en Fe^{2+} (3). Après fixation de l'oxygène moléculaire, il y a production d'un complexe oxygéné (4). A cette étape, le complexe P450-Fe^{2+} peut aussi lier le monoxyde de carbone (5). Le complexe qui en résulte, P450-Fe^{2+}-CO, absorbe à 450 nm et permet le dosage des P450s selon la méthode d'Omura et Sato (Omura and Sato, 1964). Le complexe oxygéné est réduit en un complexe dit à oxygène actif (6) par un second électron fourni soit par le NADPH (*via* la réductase), soit par le NADH. L'arrivée de protons dans le cycle va entrainer la libération d'un des atomes d'oxygène du complexe et la formation d'une molécule d'eau et d'un complexe « oxénoïde » (7). Le dernier atome d'oxygène est alors transféré sur le substrat. Il y a alors dissociation du substrat et retour de l'enzyme à l'état natif (1).

I.6 Fonctions biologiques et substrats

Les fonctions biologiques des P450s peuvent se diviser en deux domaines: d'une part, le métabolisme de substances endogènes, et d'autre part, le métabolisme des xénobiotiques. Il est

Figure I-6 : Classification des 57 P450s humains, basée sur la nature de leur substrat principal (d'après (Dutheil et al., 2008))



probable que la plupart des P450s présentent des capacités de métabolisation pour les 2 types de substrats, à l'instar du CYP3A4, principal P450 métabolisant les médicaments dans le foie, capable aussi de métaboliser la testostérone (Usmani et al., 2003).

I.6.1 Métabolisme de substances endogènes

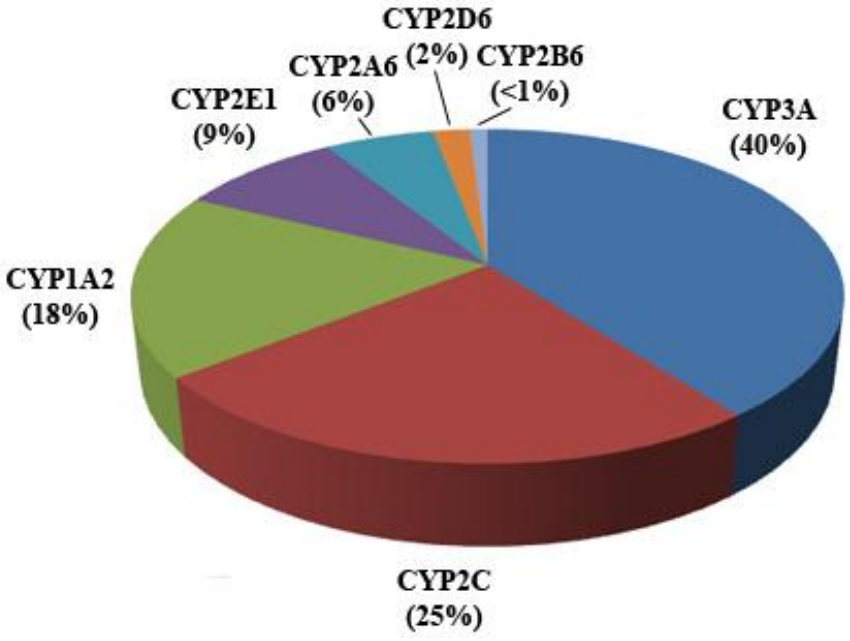
Les P450s sont impliqués dans le métabolisme du cholestérol et la biosynthèse des acides biliaires (Andersson et al., 1989), la synthèse et le métabolisme des stéroïdes (Miller, 1998), la synthèse et le métabolisme de la vitamine D3 (Kato, 1999), la métabolisation de l'acide arachidonique (Nebert and Russell, 2002). La plupart des P450s participant à ces réactions endogènes sont indispensables à l'organisme, ce sont principalement les P450s des familles 4 à 51 (Figure I-6).

I.6.2 Métabolisme des xénobiotiques

Parmi les 57 P450s humains, 23 sont impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques appartenant essentiellement aux familles 1, 2 et 3. Plus de 90 % du métabolisme des médicaments passent par l'activité des P450s et plus de 2000 substrats ont été identifiés à ce jour (Rendic, 2002). Les xénobiotiques sont principalement métabolisés dans le foie. Il est à noter que, contrairement aux P450s impliqués dans le métabolisme des endobiotiques, la variabilité inter-individuelle d'expression des isoformes impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques est très importante.

Ainsi, les P450s métabolisent un nombre considérable de molécules. Contrairement à une enzyme classique qui métabolise un substrat unique en un seul produit, un P450 peut transformer des substrats de taille et de polarité différentes. De plus, un même substrat peut être métabolisé par plusieurs P450s (spécificité de substrat relative et chevauchante). Un bon exemple de cette dualité de fonction (endogène et exogène) est observé pour les P450s qui métabolisent l'acide arachidonique. Au moins 14 P450s appartenant aux familles CYP1, 2, 3, 4, 5A et 8A participent directement ou secondairement à ce métabolisme. Les prostaglandines D, E, F, éicosanoïdes, leukotriènes et tromboxane A2 ainsi générés jouent un rôle dans de

Figure I-7 : Proportions des différentes isoformes de P450s présentes dans le foie (d'après (Guengerich, 2005))



nombreux processus biologiques : vasoconstriction et vasodilatation, réponse allergique, agrégation plaquettaire, transport ionique, hyperthermie… L'implication des mêmes systèmes de détoxication dans la transformation de molécules exogènes et endogènes peut se traduire par des interférences entre le métabolisme endogène et le métabolisme des xénobiotiques.

I.7 Expression tissulaire

Les P450s eucaryotes sont ubiquistes et exprimés dans la plupart des tissus selon leur fonction (Nishimura et al., 2003). Cependant, ils sont particulièrement abondants en quantité et en diversité au niveau du foie (Figure I-7). C'est le premier organe, après l'intestin grêle, à être en contact avec les xénobiotiques ingérés, *via* le système porte. La distribution tissulaire des P450s correspond à celle de leurs substrats. Ainsi, les P450s impliqués dans la biosynthèse des stéroïdes (CYP11A, 11B, 17, 19) s'expriment surtout dans les tissus stéroïdogènes (cortex surrénale, gonades, placenta, TA) (Waterman and Simpson, 1985), tandis que les P450s impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques se retrouvent plutôt dans les organes de filtration du sang (foie, rein), et aux différentes portes d'entrées des xénobiotiques dans l'organisme (appareil gastro-intestinal, appareil respiratoire, peau) (Bieche et al., 2007).

Dans la suite de cette thèse, nous nous intéresserons uniquement aux P450s des familles 1, 2 et 3, impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques.

I.8 Focus sur les P450s des familles 1 à 3

I.8.1 Famille 1

Cette famille est composée de trois gènes (CYP1A1, 1A2, 1B1) régulés au niveau transcriptionnel par la voie AhR-Arnt (aryl hydrocarbon receptor-aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator). Cette régulation sera discutée plus en détail par la suite. Le CYP1A1 humain est exprimé principalement dans les tissus extra-hépatiques, où son expression

constitutive est pratiquement indétectable (Bieche et al., 2007), mais est inductible dans de nombreux organes par des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), tels que le 3-méthycholantrène et le benzo[*a*]pyrène, et des hydrocarbures aromatiques halogénés comme la 2,3,7,8-tétrachorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD) (Gonzalez, 1988). Le CYP1A1 est une enzyme importante du métabolisme des xénobiotiques de par sa large spécificité de substrat et sa distribution dans l'organisme. Le CYP1B1 est différentiellement exprimé selon les tissus, avec les niveaux constitutifs d'ARNm les plus importants détectés dans des tissus extra-hépatiques comme l'utérus, le cœur, le cerveau, les poumons et le rein (Pavek and Dvorak, 2008). Le CYP1B1 métabolise un nombre important de HAP (Shimada et al., 1996) et est impliqué dans le métabolisme de stéroïdes endogènes (Murray et al., 2001). De plus, la 4-hydroxylation de l'œstradiol semble être une réaction caractéristique catalysée par le CYP1B1. Chez l'homme, le CYP1B1 est surexprimé dans certaines cellules tumorales et l'activation métabolique des œstrogènes pourrait être un facteur essentiel dans le développement des tumeurs mammaires (Murray et al., 2001). Le CYP1A2 est une enzyme hépatique, exprimée constitutivement et inductible par les mêmes composés que les CYP1A1 et 1B1 (Gonzalez, 1988). Le CYP1A2 métabolise de nombreux médicaments.

I.8.2 Famille 2

Cette famille est la plus grande famille de P450 chez l'homme. À la différence de la famille 1, les membres de cette famille ne partagent pas le même système de régulation. Les spécificités de substrats et de tissus sont également très différentes. Les CYP2C et CYP2D qui sont quantitativement les plus importants de cette famille dans le foie jouent un rôle majeur dans le métabolisme des médicaments. La famille CYP2C est composée de 4 gènes : CYP2C8, 2C9, 2C18 et 2C19. L'isoenzyme CYP2C9 est la plus abondante, suivi par les CYP2C8 et CYP2C19. En plus de transformer de nombreux composés endogènes comme l'acide arachidonique, ce système métabolise environ 25% des médicaments (Lewis, 2004). Chez l'homme, le CYP2D6 est le seul gène actif de la sous-famille CYP2D qui comprend trois gènes (2D6, 2D7 et 2D8). Certains polymorphismes du CYP2D6 entraînant une altération de son expression ou de son activité enzymatique ont été associés à une déficience du métabolisme des médicaments (Gonzalez et

al., 1988). À l'inverse, les formes avec plusieurs copies du gène, identifiées chez certains individus, aboutissent à un métabolisme très rapide des médicaments (Ingelman-Sundberg, 2005). Cette enzyme intervient également dans le métabolisme de composés endogènes, notamment certains neurotransmetteurs (Hiroi et al., 1998). L'expression du CYP2D6 pourrait également jouer un rôle dans la métabolisation de polluants chimiques environnementaux tels que les pesticides (Dutheil et al., 2008).

I.8.3 Famille 3

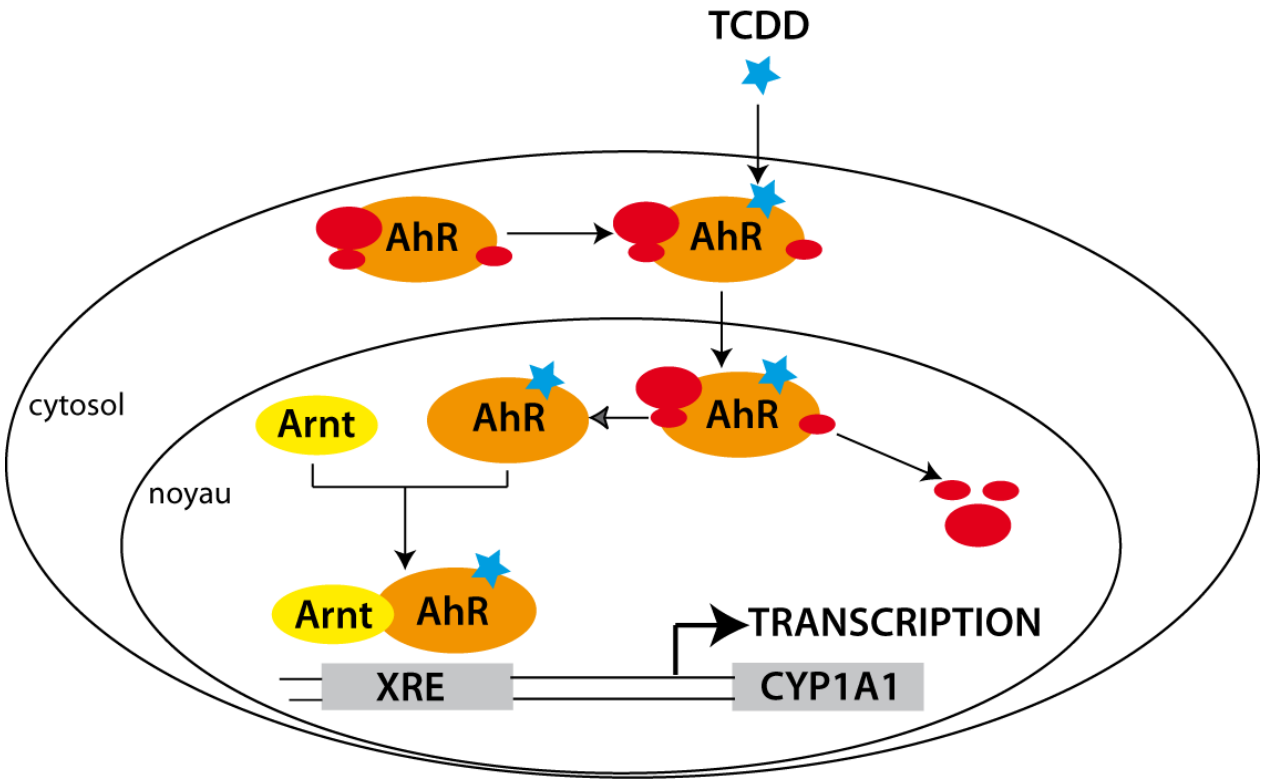
La famille 3 comprend seulement une sous-famille, le CYP3A composé de 4 gènes 3A4, 3A5, 3A7 et 3A43 dont l'expression tissulaire diffère : le CYP3A4 est exprimé principalement dans le foie, le CYP3A5 dans les tissus extra-hépatiques, et le CYP3A7 dans le foie fœtal. Le CYP3A4 a un rôle fondamental puisqu'on estime que plus de 50% des médicaments sont métabolisés par cette enzyme (Gueguen et al., 2006). Le CYP3A4 peut ainsi être impliqué dans de nombreuses interactions médicamenteuses importantes en clinique. Des stéroïdes naturels tels que la testostérone et la progestérone sont également métabolisés par cette enzyme (Maenpaa et al., 1993). Un important système de régulation contrôle son expression, notamment par l'activation de facteurs de transcription par des ligands spécifiques (Goodwin et al., 2002). Les propriétés pharmacologiques de ce système de régulation expliquent la capacité de certains médicaments à protéger l'organisme des effets toxiques d'autres composés. Selon qu'il se produit une activation ou une inhibition de cette enzyme, l'efficacité thérapeutique d'un médicament ou de sa forme active peut également être modulée. Par conséquent, l'administration concomitante par voie orale d'un inhibiteur du CYP3A4 (jus de pamplemousse) et d'un médicament substrat de cette même isoenzyme (statines) peut entraîner une augmentation très importante de la concentration plasmatique du médicament et conduire ainsi à une toxicité accrue (Dresser et al., 2000).

I.9 Régulation transcriptionnelle de l'expression des P450s

L'expression des P450s des familles 1 à 3 présente de grandes variations inter-tissulaires, mais aussi inter-individuelles. En effet, l'expression de ces protéines est sous l'influence de facteurs génétiques, épigénétiques, physiopathologiques et environnementaux (Beaune and Loriot, 2000). Des facteurs environnementaux, comme l'exposition aux xénobiotiques, sont en effet capables de modifier la quantité et/ou l'activité des P450s, agissant comme des régulateurs de leur propre métabolisme, grâce à l'induction ou la répression de ces enzymes. L'induction des P450s plus particulièrement, qui entraine une augmentation de la quantité de protéines et donc une accélération du métabolisme, apparaît comme une réponse adaptative de l'organisme à un environnement contenant des produits chimiques qui pourraient sinon être toxiques. L'induction de la plupart des P450s est transcriptionnelle, mais certains P450s, comme le CYP2E1, subissent des régulations post-traductionnelles (stabilisation de leur protéine). Seuls les mécanismes transcriptionnels d'induction des P450s, les plus fréquents dans le cas des familles 1 à 3, seront présentés dans la suite.

Les gènes codant les P450s sont donc inductibles par de nombreux xénobiotiques ou par des ligands endogènes. Ces molécules vont moduler l'activité transcriptionnelle de certains récepteurs ayant pour cibles les P450s. Ces récepteurs appartiennent à une grande famille de facteurs de transcription activés par des ligands. Dans la majorité des cas, la présence d'un ligand endogène ou exogène va moduler la transcription des gènes cibles selon une séquence mécanistique maintenant bien établie. Schématiquement, en absence de ligand les facteurs de transcription sont bloqués par des protéines nucléaires (corépresseurs) ou cytoplasmiques (chaperonnes). L'arrivée d'une molécule activatrice (ligand ou autre) va entraîner le départ des protéines « bloquantes » et la libération des capacités transcriptionnelles du facteur de transcription. Si de nombreux récepteurs nucléaires ont été associés à la régulation transcriptionnelle des P450s, nous focaliserons ce paragraphe sur les récepteurs nucléaires des prégnanes (PXR), de l'androstérone (CAR) et celui de la dioxine (AhR).

Figure I-8 : Régulation transcriptionnelle de l'expression des P450s par le récepteur Ah

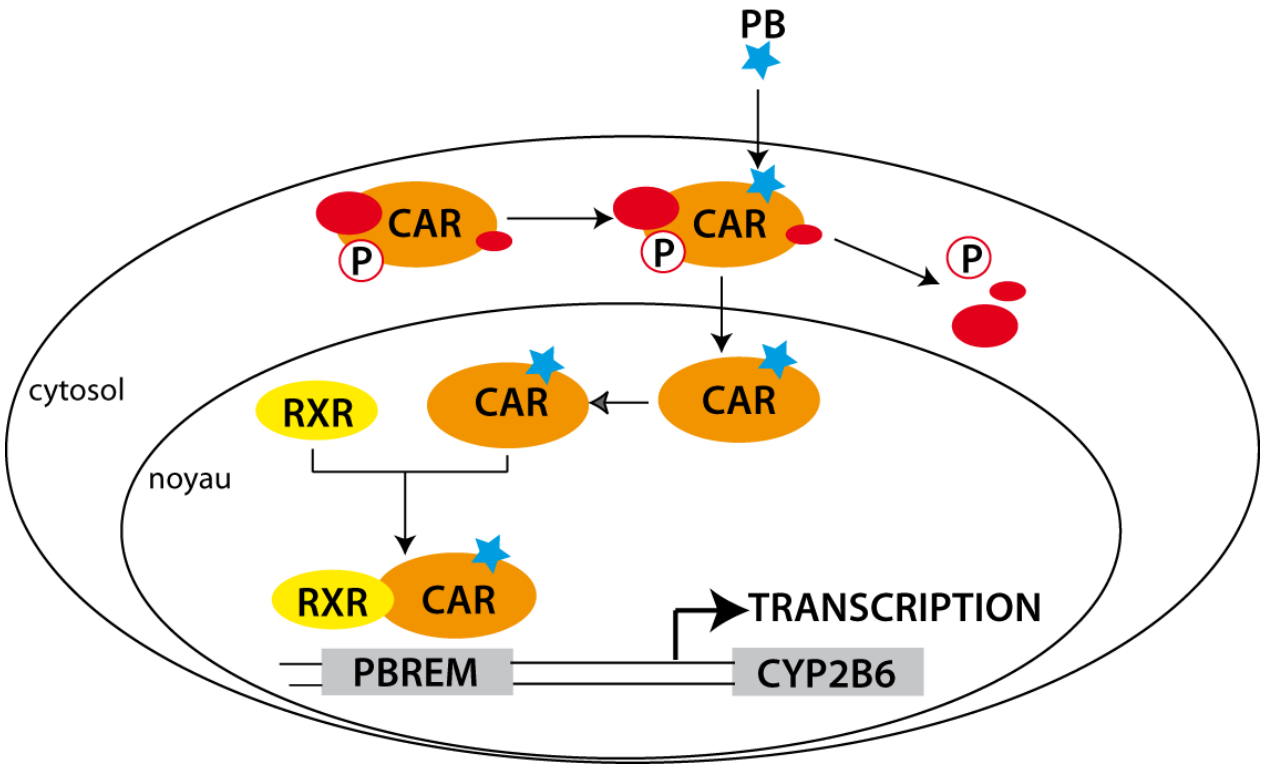


A l'état basal, le récepteur AhR se trouve dans le cytosol au sein d'un complexe de molécules chaperonnes. La fixation d'un ligand sur ce complexe entraine sa translocation vers le noyau, puis sa dissociation. Le complexe ligand-AhR va ensuite se fixer à la protéine Arnt. Ce nouveau complexe pourra ainsi se fixer sur une séquence spécifique au niveau du promoteur du gène, appelée XRE (Xenobiotic Response Element) et activer la transcription de gènes comme le CYP1A1.

I.9.1 Aryl hydrocarbon Receptor (AhR)

L'aryl hydrocarbon receptor (AhR) est structurellement distinct de la super-famille des récepteurs nucléaires. Il s'agit d'un facteur de transcription de la famille Per-Arnt-Sim présentant des domaines d'interaction hélice-boucle-hélice. Détecté chez presque tous les vertébrés, AhR est présent dans la glande mammaire, le foie, le système nerveux central, le système cardiovasculaire, et l'utérus (Gueguen et al., 2006). En absence de ligand, AhR est séquestré dans le cytoplasme dans un complexe de molécules chaperonnes (Figure I-8). La liaison du ligand entraîne la translocation nucléaire de AhR qui s'associe avec son partenaire AhR-nuclear translocator (Arnt). Le dimère Arnt-AhR avec son ligand peut alors se fixer en amont des gènes cibles au niveau des promoteurs pour moduler leur activité transcriptionnelle. Parmi la centaine de gènes cibles identifiés, les CYP1A1 et 1B1 occupent une place de choix, car ils sont impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques. Les ligands de AhR sont de nature hydrophobe et peuvent être endogènes ou exogènes. Ainsi, des molécules endogènes ont une faible affinité pour AhR comme la bilirubine et certains dérivés de l'acide arachidonique (Kerkvliet, 2009). Les ligands exogènes de AhR sont une dioxine, la TCDD (2,3,7,8-tétrachloro-dibenzo-p-dioxin) ou des hydrocarbures polycycliques aromatiques (benzo[a]pyrène et naphtoflavone).

Figure I-9 : Régulation transcriptionnelle de l'expression des P450s par le récepteur CAR



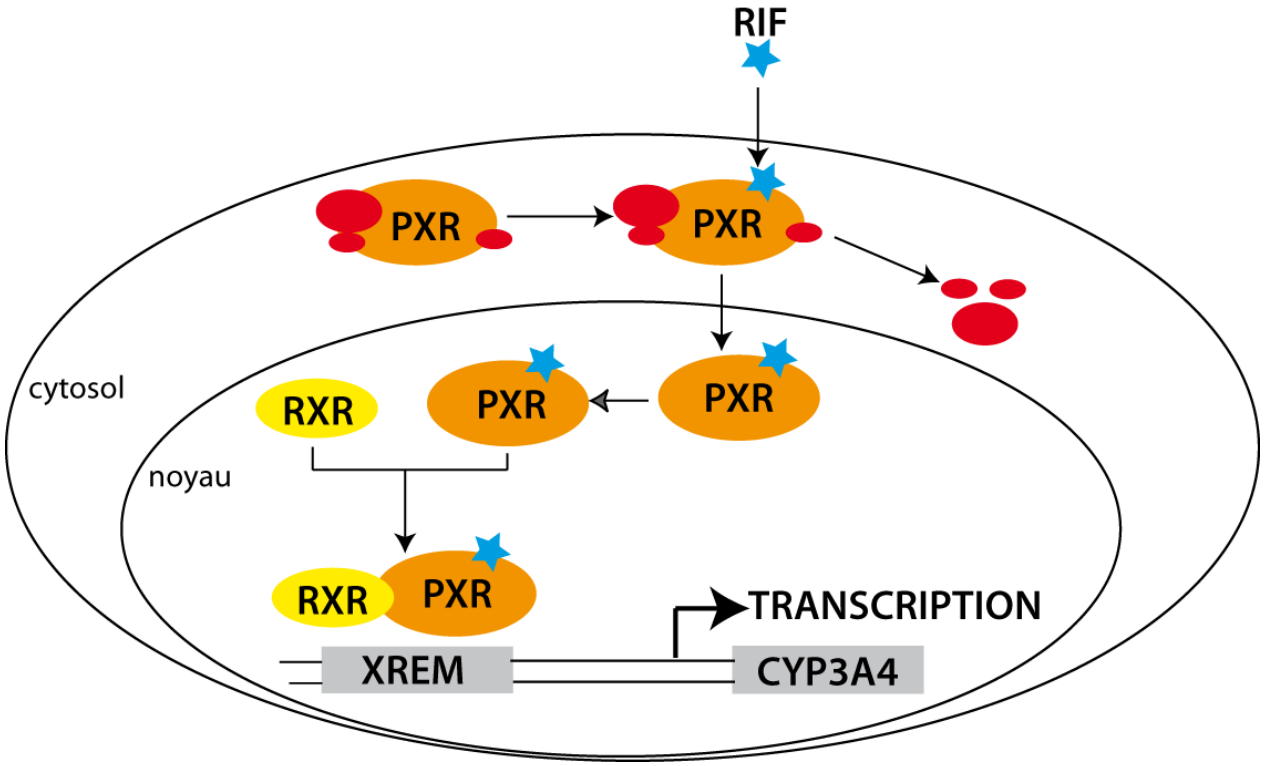
La fixation d'un ligand sur CAR permet à celui-ci de se détacher du complexe protéique dans lequel il se trouve à l'état basal, et sa déphosphorylation. Le complexe ligand-récepteur formé va pouvoir migrer vers le noyau puis se fixer à la protéine RXR. Ce nouveau complexe pourra ainsi se fixer sur des séquences spécifiques au niveau du promoteur du gène, appelées PBREM (Phenobarbital Responsive Element Module), et activer la transcription de gènes cibles comme le CYP2B6.

I.9.2 Constitutive Androstane Receptor (CAR)

Ce récepteur fut cloné pour la première fois en 1994. Il fut nommé « constitutif » en raison de sa capacité à se lier au Retinoid X Receptor (RXR) et à activer la transcription de gènes cibles en l'absence de ligand (Baes et al., 1994). Il est exprimé essentiellement dans le foie, et dans une moindre mesure dans l'intestin, les reins, les poumons, le cœur et les muscles. A l'état basal, CAR est séquestré dans le cytoplasme de la cellule. Il y forme un complexe avec les protéines chaperonnes HSP90 et CCRP (cytoplasmique CAR retention protein) jusqu'à la fixation du ligand qui entraine la dissociation de ce complexe, la migration de CAR vers le noyau, son hétérodimérisation avec RXR et l'activation de la transcription du gène cible (Figure 1-9). Cependant, un autre mécanisme d'activation de CAR, indépendant de la fixation du ligand sur le récepteur a été mis en évidence, notamment dans le cas de l'activation de CAR par le phénobarbital. Cette voie d'activation indirecte semble faire intervenir la déphosphorylation du récepteur (Mutoh et al., 2009). Dans l'espèce humaine, l'activation de CAR est associée à une induction des gènes codant des P450s tels que CYP2B6, 2C9, 2C19, 3A4.

,

Figure I-10 : Régulation transcriptionnelle de l'expression des P450s par le récepteur PXR



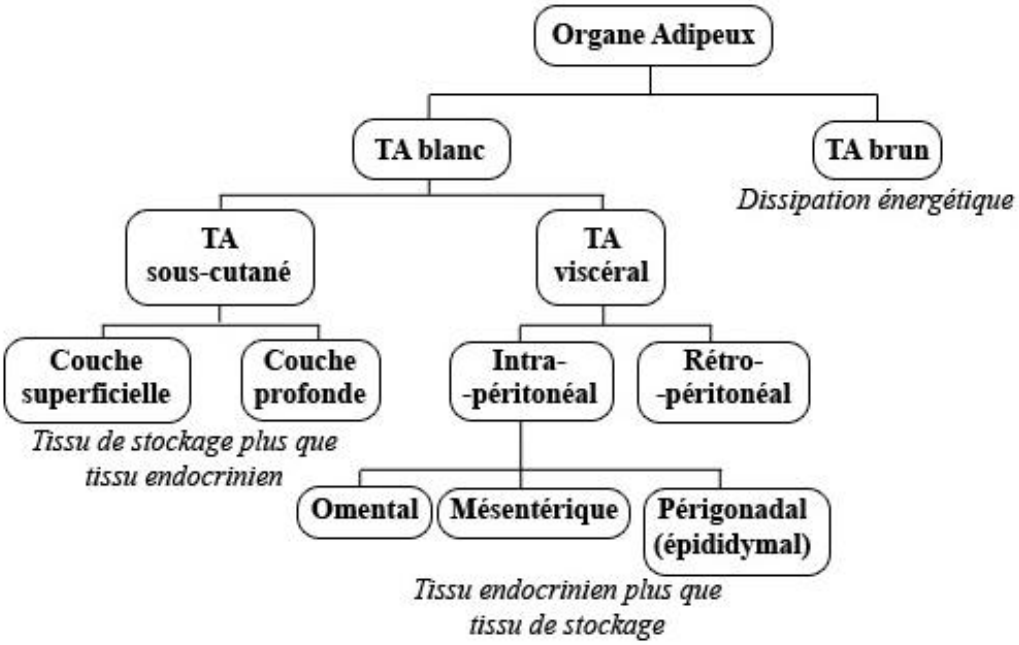
La fixation d'un ligand sur PXR permet à celui-ci de se détacher du complexe protéique dans lequel il se trouve à l'état basal. Le complexe ligand-récepteur formé va pouvoir migrer vers le noyau puis se fixer à la protéine RXR. Ce nouveau complexe pourra ainsi se fixer sur des séquences spécifiques au niveau du promoteur du gène, appelées XREM (Xenobiotic Responsive Element Module), et activer la transcription de gènes cibles comme le CYP3A4.

I.9.3 Pregnane X Receptor (PXR)

Le récepteur nucléaire orphelin PXR, aussi appelé récepteur des stéroïdes et des xénobiotiques (SXR), a été identifié par différentes équipes indépendamment, à la fois chez la souris et dans l'espèce humaine (pour une revue lire (Kliewer et al., 2002)). Des orthologues ont été identifiés par la suite chez le rat, le lapin, le chien et le porc. Ce récepteur est exprimé abondamment dans le foie, l'intestin grêle, le côlon et la glande mammaire. Il est intéressant de noter que ces mêmes tissus sont les sites majeurs d'expression des gènes codant les cytochromes CYP3A. Les principales étapes de la voie de signalisation de PXR sont similaires à celles de la voie CAR (Figure I-10). PXR est le régulateur transcriptionnel de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme et le transport des xénobiotiques. Parmi les gènes cibles chez l'homme, on retrouve ceux codant les enzymes de la phase I telles les CYP2B6, CYP2C8 et 2C9, CYP3A4 et 3A7. PXR peut également réguler la transcription des enzymes de conjugaison de la phase II comme les glutathion S transférases, les sulfotransférases et les UDP-glucuronosyltransférases. Enfin, PXR peut activer le gène Multi Drug Resistance 1 (MDR1) impliqué dans la sortie cellulaire des molécules exogènes. PXR est donc un acteur clé du système adaptatif de défense contre les xénobiotiques. L'analyse cristallographique de la poche de fixation du ligand a mis en évidence une cavité importante permettant l'interaction du récepteur avec de nombreux ligands endogènes ou exogènes et de structures variées (stéroïdes, antibiotiques, antifongiques, anticancéreux et l'antidépresseur naturel extrait de millepertuis).
Même si l'analyse des éléments de réponse localisés dans le promoteur des gènes suggère que les voies de régulation CAR et PXR sont distinctes, il existe de nombreuses similitudes entre ces deux voies, telles qu'un grand nombre de ligands communs (phénobarbital, phénytoïne), de gènes cibles communs (CYP3A4, 2B6, 2C9, ABCB1), un même profil d'expression tissulaire, et une participation au métabolisme endogène (acides biliaires). Ces similitudes pourraient être à l'origine d'une potentialisation de leurs effets (Pascussi et al., 2008).

CHAPITRE II : LE TISSU ADIPEUX

Figure II-1 : Anatomie du TA (adapté de (Anghel and Wahli, 2007))



Le tissu adipeux (TA) est un organe important, d'abord quantitativement, puisque même chez une personne maigre, il peut atteindre 15 à 25% du poids total, et cette proportion peut s'élever jusqu'à 50% dans les cas d'obésité morbide. Qualitativement ensuite, le TA possède deux fonctions principales au sein de l'organisme. Premièrement, il joue un rôle primordial dans le stockage et la libération des lipides, gérant ainsi les réserves énergétiques de l'organisme selon les besoins et les approvisionnements. Deuxièmement, c'est un organe endocrinien qui synthétise et sécrète des adipokines, qui peuvent agir au niveau local (par voie autocrine ou paracrine) ou systémique et influencer tous les autres organes impliqués dans la physiologie. Ce tissu a été longtemps négligé par les scientifiques, mais il devient maintenant évident que le tissu adipeux, ou plutôt les tissus adipeux, agissent en collaboration au sein d'un véritable organe adipeux qui contribue de façon significative à la régulation de l'homéostasie.

II.1 Anatomie du TA

Le TA est composé majoritairement d'adipocytes matures remplis de lipides, ainsi que de leurs précurseurs les préadipocytes, et d'une fraction stroma-vasculaire qui contient des cellules sanguines, des cellules endothéliales et des macrophages.

Il existe deux types de TA : le TA blanc et le TA brun, dont les rôles métaboliques sont distincts et complémentaires. Le TA blanc, formé principalement d'adipocytes blancs, accumule l'énergie en excès dans l'organisme sous forme de graisses et constitue ainsi le plus grand réservoir d'énergie chez les mammifères. Au contraire, le TA brun, dont la couleur est due à une irrigation plus dense et à un nombre important de mitochondries, est spécialisé dans la thermogenèse adaptative. Bien que le rôle du TA brun ait été beaucoup étudié chez les rongeurs et les nouveau-nés d'autres espèces, sa persistance et son importance chez les humains adultes sont activement étudiées et ses fonctions restent à déterminer.

La suite de cette introduction sera consacrée au TA blanc. Au sein du TA blanc, on trouve deux types de dépôts : le TA viscéral et le TA sous-cutané, qui possèdent des activités métaboliques et des sensibilités à l'insuline très différentes (Figure II-1).

II.1.1 Le TA blanc viscéral

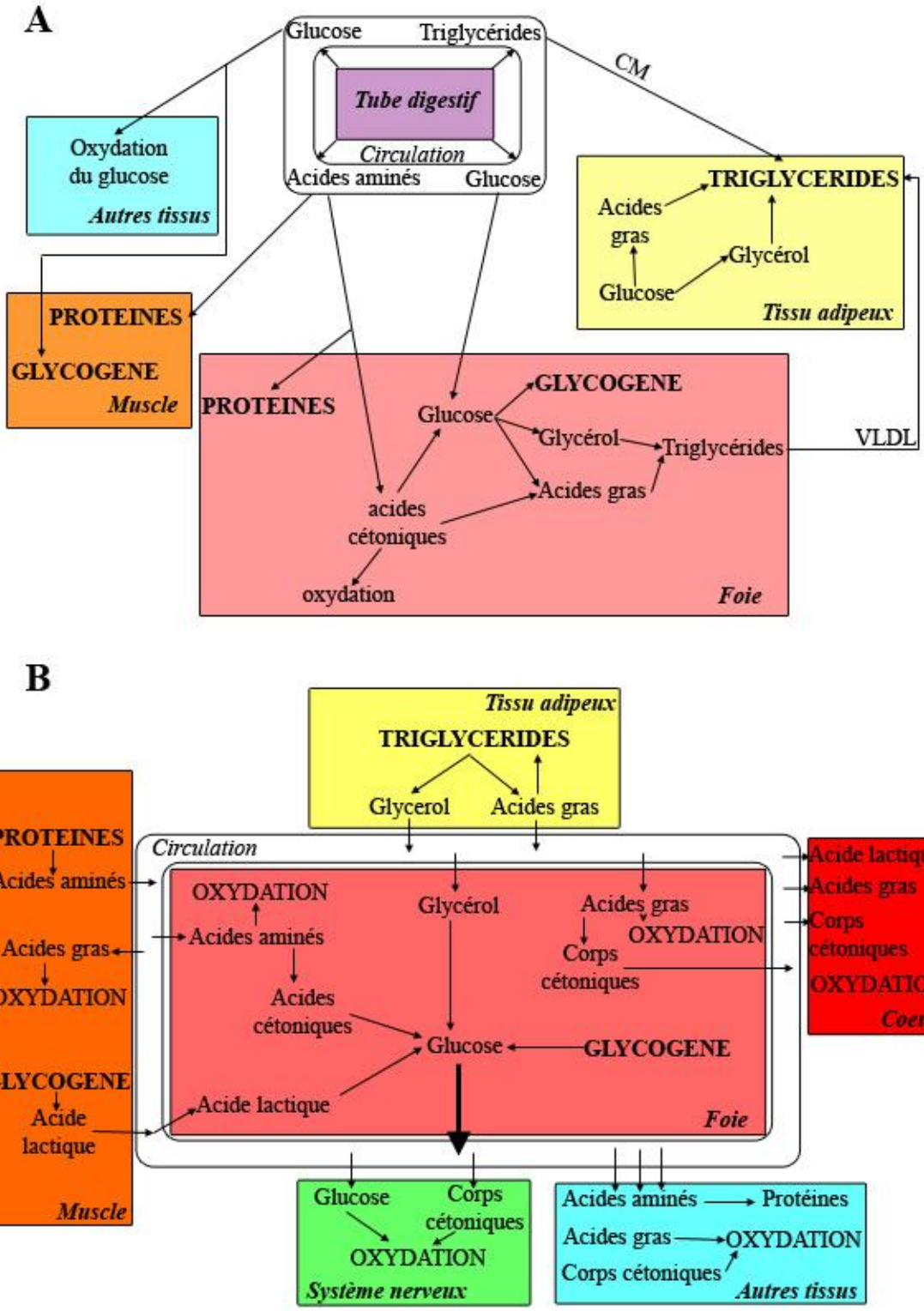
Le TA viscéral est constitué des compartiments intra- et rétropéritonéaux, et le TA intra-péritonéal est lui-même constitué du TA omental, mésentérique et, chez les rongeurs, périgonadal (épididymal). La délimitation entre les TA intra- et rétropéritonéaux est située le long de la surface ventrale du rein, et de la surface dorsale des intestins. Chez l'homme, le TA rétropéritonéal est minoritaire et ne représente que 25% du dépôt viscéral total (Wajchenberg, 2000). Le TA viscéral se distingue des autres dépôts par sa connexion directe au foie, *via* la veine porte.

Une diminution du TA viscéral améliore la sensibilité à l'insuline de l'organisme et induit le métabolisme du glucose. En fait, la masse de TA viscéral est positivement corrélée avec l'intolérance au glucose, l'altération du niveau plasmatique de lipoprotéines, l'augmentation des concentrations de triglycérides et de cholestérol, l'hypertension et la dyslipidémie (Thorne et al., 2002; Klein et al., 2004). De plus, l'analyse des voies de signalisation de l'insuline dans les TA viscéral et sous-cutané humains montre que le TA viscéral exprime des niveaux plus élevés de protéines spécifiques de la voie de signalisation de l'insuline et une plus grande sensibilité à l'insuline (Laviola et al., 2006). En bref, le TA viscéral est plus sensible à la perte de poids que le TA sous-cutané, plus actif métaboliquement, plus lipolytique et produit plus d'adipokines (Park and Lee, 2005).

II.1.2 Le TA blanc sous-cutané

Les dépôts sous-cutanés sont ceux qui subissent les plus importants changements de taille sans effet notable sur la sensibilité à l'insuline, le métabolisme du glucose ou le profil métabolique de l'organisme (Despres et al., 1989). Chez l'homme, il existe deux couches distinctes de TA sous-cutané : le TA sous-cutané superficiel et le TA sous-cutané profond. 51% du TA sous-cutané de la femme se trouvent dans les couches profondes de TA sous-cutané, alors que chez l'homme, ce sont 66% du TA sous-cutané total qui se trouvent dans cette couche. Il semblerait que l'obésité soit associée avec une augmentation préférentielle de la couche

Figure II-2 : Rôle du TA blanc et des organes périphériques en état postprandial (A) et à jeun (B) (adapté de (Anghel and Wahli, 2007))



CM : chylomicrons ; VLDL : Very Low Density Lipoproteins

profonde, et la perte de poids chez les sujets obèses impacte préférentiellement cette couche, suggérant que la couche profonde sous-cutanée est plus active que la couche superficielle (He et al., 2005).

II.2 Le TA et la régulation de l'homéostasie énergétique

Une des fonctions principales du TA est de stocker l'énergie en excès sous forme de lipides, qui sont ensuite mobilisées par d'autres tissus en réponse à des besoins métaboliques en périodes de restrictions alimentaires. Après de copieux repas, le TA stocke l'énergie excédentaire sous forme de triglycérides (TG), c'est la lipogenèse (Figure II-2A). L'adipocyte est capable d'accumuler des quantités incroyablement élevées de TG, qui sont stockés au sein de gouttelettes lipidiques intracellulaires entourées de protéines appelées périlipines, sans causer de lipotoxicité (Greenberg et al., 1993). Le jeûne induit le catabolisme de ces TG en acides gras (AG) libres et en glycérol, qui sont libérés dans la circulation (Figure II-2B), c'est la lipolyse. Les AG libres servent ensuite de source énergétique pour des tissus actifs métaboliquement comme les muscles, où leur oxydation en CO_2 et en eau génère de l'ATP. Une partie de ces AG libres peut cependant être réestérifiée directement dans le TA sans atteindre la circulation. Dans le foie, la plupart de l'acétyl-CoA produit par l'oxydation des AG libres est utilisée pour synthétiser des corps cétoniques (acétoacétate, β-hydroxybutyrate), qui sont libérés dans la circulation et utilisés comme source d'énergie par les tissus périphériques. Le glycérol généré par l'hydrolyse des TG sert pour la synthèse de glucose, qui est réservé pour les cellules qui en dépendent comme source énergétique (neurones, globules rouges). La régulation des stocks de TG est cruciale pour la survie, puisque sans le TA et ses réserves lipidiques, les organismes auraient besoin de s'alimenter de façon continue, ce qui n'est évidemment pas possible. La régulation du métabolisme lipidique dans le TA est contrôlée à 3 niveaux : la captation des AG, la lipogenèse, et la lipolyse. Lipogenèse et lipolyse coexistent « au ralenti » : c'est le jeu de l'offre (en AG des chylomicrons et des lipoprotéines à très faibles densités (VLDL)) et de la demande (en AG par les tissus consommateurs) qui décide de la vitesse de l'une ou l'autre voie. Chacun de ces processus

Table II-1 : Quelques exemples de facteurs sécrétés par le TA (adapté de (Anghel and Wahli, 2007))

Nom	Expression	Principales fonctions
Leptine	Adipocytes	Hormone, reflet de la masse adipeuse Signal de satiété par effet direct sur l'hypothalamus Stimule la lipolyse, inhibe la lipogénèse, stimule l'oxydation des AG
Adiponectine	Adipocytes	Hormone insulino-sensitive Stimule l'oxydation des AG Action anti-inflammatoire
Adipsine	Adipocytes	Composante du complément Stimule le stockage de TG, inhibe la lipolyse
Pref-1	Préadipocytes	Inhibe l'adipogénèse Sa surexpression dans le TA affecte la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline
TNFα	Macrophages	Cytokine pro-inflammatoire Induit l'insulino-résistance Augmente la lipolyse dans les adipocytes
IL-6	Adipocytes	Cytokine pro-inflammatoire Diminue les voies de signalisation de la leptine et de l'insuline
TGFβ	Adipocytes/ Macrophages	Facteur de croissance, adipokine anti-inflammatoire Effet sur la prolifération, la différenciation et l'apoptose Expression augmentée au cours de l'obésité
MCP1	Adipocytes/ Macrophages	Chémokine anti-inflammatoire Recrute les macrophages sur les sites inflammatoires Augmente la lipolyse et la sécrétion de leptine
PAI1	Adipocytes	Protéines vasculaires, puissant inhibiteur du système fibrinolytique Lié au développement de l'insulino-résistance Niveaux circulants augmentés en cas d'obésité

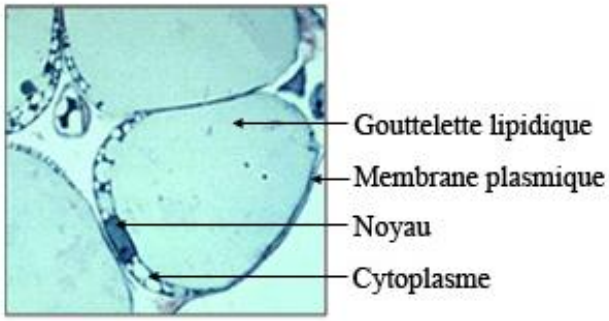
est contrôlé par des stimuli extérieurs dont l'insuline, les corticoïdes, les catécholamines, les peptides natriuretiques, et des cytokines comme le TNF-α.

II.3 Le TA, organe endocrinien

Longtemps considéré comme un organe inerte de stockage et de libération des lipides en fonction des besoins métaboliques, le TA apparaît aujourd'hui comme un véritable organe endocrinien capable d'intégrer des signaux hormonaux venant de différentes parties de l'organisme et d'y répondre en sécrétant ses propres peptides de signalisation appellés adipokines. Ces médiateurs ont un impact sur de nombreux tissus cibles, comme le foie ou les muscles squelettiques, et participent directement au contrôle général de la balance énergétique. Certaines de ces adipokines, comme la leptine ou l'adiponectine, activent des circuits neuronaux dans l'hypothalamus ou d'autres régions cérébrales avec un impact sur la régulation systémique de la dépense énergétique et le catabolisme lipidique (Ahima et al., 2006). En plus de la production de ces adipokines, le TA, en condition de stress, sécrète aussi des cytokines pro- ou anti-inflammatoires, avec des actions autocrines et/ou paracrines et qui contribuent aussi au contrôle de l'homéostasie énergétique. La production et la sécrétion de ces adipokines et de ces cytokines par le TA sont régulées par la masse adipeuse et le statut physiologique de l'organisme (Verreth et al., 2004).

Bien que de nouvelles adipokines impliquées dans l'homéostasie énergétique ont été découvertes ces dernières années, les plus étudiées restent la leptine, l'adiponectine, la resistine, l'angiopoietin-like protein 4, et le preadipocyte factor 1. Les autres molécules sécrétées par le TA (chemokines, adipokines, protéines vasculaires) sont impliquées dans des réactions pro-inflammatoires (TNFα, IL1, IL6) ou anti-inflammatoire (TGFβ, IL1Rα, IL10, MCP1, IL8, RANTES, IP10, PAI1, TF, angiotensin 2) (Tableau II-1).

Figure II-3 : Morphologie d'un adipocyte blanc



II.4 Focus sur l'adipocyte

II.4.1 Morphologie

L'adipocyte blanc est composé pour l'essentiel d'une gouttelette de lipides. Le noyau est refoulé à la périphérie et le cytoplasme limité à une mince couronne autour des lipides intracellulaires (Figure II-3). Les adipocytes mettent en réserve les AG libres sous forme de TG qui sont stockés dans la gouttelette lipidique (lipogenèse). La taille des adipocytes peut varier grandement, jusqu'à 20 fois. A l'inverse, en cas de besoin énergétique, les TG sont hydrolysés, ce qui libère des AG libres dans la circulation (lipolyse).

II.4.2 Lipogenèse

Les TG stockés dans les adipocytes sont synthétisés dans ces cellules à partir d'AG et de glycérol, l'un et l'autre devant être prélablement activés respectivement en acyl-CoA et en glycérol-3-phosphate (G3P). La plupart des AG utilisés pour cette synthèse proviennent des lipides plasmatiques circulants, tandis que le G3P peut avoir deux origines, la glycolyse et la glycéronéogenèse. Le site exact de la synthèse des TG et le moyen par lequel les nouveaux TG sont dirigés vers les gouttelettes lipidiques sont encore débattus.

II.4.2.1 Sources d'AG

La plupart des AG utilisés pour la synthèse de TG dans le TA humain provient des lipides plasmatiques circulants. Ces AG circulants sont, soit des AG non estérifiés (AGNE) liés à l'albumine, soit des TG incorporés dans des lipoprotéines, principalement des VLDL en état post-absortif et des chylomicrons en état post-prandial. Ces lipoprotéines doivent tout d'abord être hydrolysées par la lipoprotéine lipase (LPL), enzyme liée aux capillaires du TA (Mead et al., 2002), afin de libérer leurs AG. L'expression et l'activité de la LPL sont augmentées dans le TA à l'état nourri, particulièrement lors d'un régime riche en carbohydrates, probablement par

l'action de l'insuline, tandis que son expression et son activité sont réduites en période de jeûne et sous régime riche en lipides (Braun and Severson, 1992).

Quelque soit leur origine, la captation des AG à longue chaîne par les adipocytes requiert des processus spécifiques pour leur permettre de traverser la membrane plasmique (Luiken et al., 2004). Il est probable qu'un transport par des transporteurs spécifiques et une diffusion passive coexistent. Les adipocytes blancs humains expriment différents transporteurs des AG, qui facilitent et contrôlent leur transport : la protéine Cluster of Differentiation 36 (CD36) (homologue du transporteur des AG murin Fatty Acid Transporteur (FAT)), la protéine de transport des AG (Fatty Acid Transport Protein, FATP), et la protéine de la membrane plasmique liant les AG (Fatty-Acid-Binding Protein, FABP), CD36 étant responsable de la majorité de la captation des AG (Ibrahimi and Abumrad, 2002). L'insuline favorise ce transport en stimulant l'expression de ces transporteurs et leur transport jusqu'à la membrane plasmique (Czech, 2002).

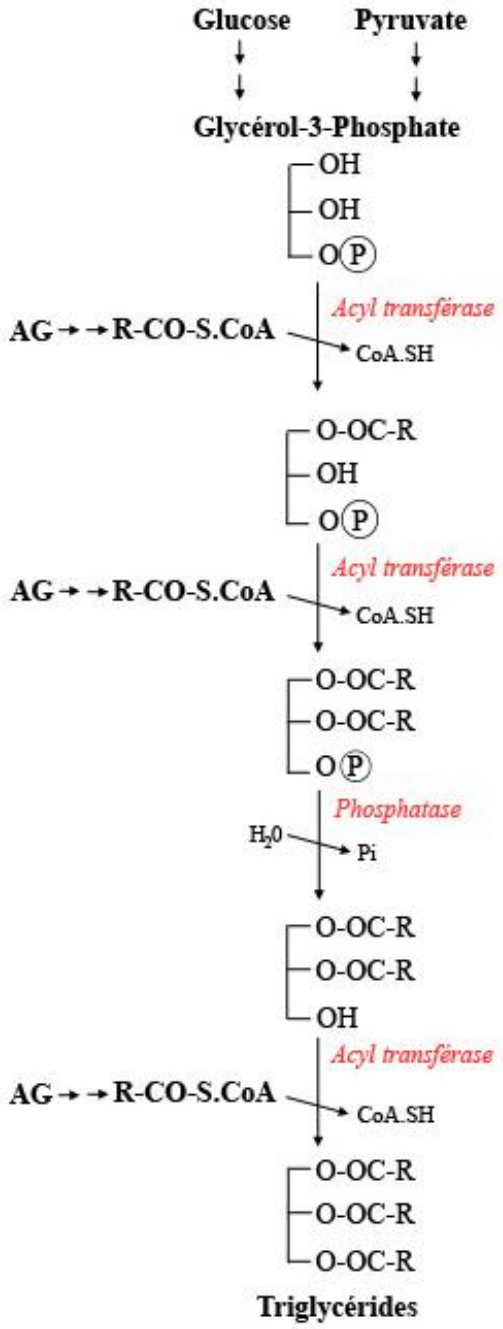
Les AG n'étant pas solubles dans le cytosol et pouvant avoir des effets toxiques sur les membranes, ils sont ensuite fermement liés par des protéines cytosoliques de liaisons aux lipides appelées FABP. Ces protéines transportent les AG de membranes en membranes jusqu'au site d'action de l'enzyme acyl-CoA synthase. Les adipocytes blancs humains expriment deux FABPs : adipocyte Protein 2 (aP2), produit du gène FABP4, exprimée uniquement dans les adipocytes et majoritaire, et la protéine de liaison des lipides des kératinocytes, exprimée aussi dans les macrophages, minoritaire (Fisher et al., 2002). Le premier pas du métabolisme des AG après leur captation et leur liaison aux FABP est leur activation en acyl-CoA à chaîne longue (Long Chain Fatty Acyl-CoA, LCFA-CoA) par l'acyl-CoA synthase (ACS). Les LCFA-CoA peuvent ensuite être dirigés vers l'oxydation ou dans la synthèse de lipides plus complexes comme les TG. Comme dans d'autres tissus, l'oxydation nécessite l'entrée des LCFA-CoA dans la mitochondrie par l'action de la carnitine-palmitoyl transférase I.

A part la captation d'AG circulants, une deuxième source d'AG est possible dans les adipocytes : la lipogenèse *de novo*. La lipogenèse *de novo* est la synthèse de nouvelles molécules d'AG à partir de substrats non lipidiques, principalement des carbohydrates chez les mammifères. L'expression et l'activité des chemins lipogénique et glycolitique sont ainsi intimement liées dans les tissus lipogéniques. Les deux principaux sites de lipogenèse *de novo* sont le foie et le TA. L'importance quantitative de ce phénomène, et les contributions respectives du foie et du TA varient selon les espèces. Globalement, la lipogenèse *de novo* est moins active chez l'homme que chez le rongeur et contribue bien moins aux stocks lipidiques de l'adipocyte que les TG alimentaires (Marin et al., 1992). Les enzymes clefs de la lipogenèse sont exprimées dans les adipocytes mais leur expression et leur activité sont plus faibles chez l'homme que chez le rat (Letexier et al., 2003). Il semble que la lipogenèse *de novo* chez l'homme soit moins active dans les adipocytes que dans le foie, exprimé par gramme de tissu, mais, en considérant l'organisme en entier, les contributions du foie (1.5 kg) et du TA (12 à 15 kg) sont comparables (1 à 2 grammes par jour pour chaque tissu) (Diraison et al., 2003). Elles restent cependant minoritaires comparées à l'ingestion des TG alimentaires (>100 g/jour).

II.4.2.2 Sources de G3P

La synthèse de TG nécessite du G3P pour l'étape initiale de l'estérification des AG. L'activité de la glycérol-kinase est très faible dans les adipocytes, et le G3P est produit soit à partir de glucose, par les premières étapes de la glycolyse, soit à partir de précurseurs gluconéogeniques, par la glycéronéogenèse (Reshef et al., 2003). Le glucose entre dans les adipocytes à l'aide des transporteurs de glucose 1 et 4 (Glut-1 et Glut-4) responsables respectivement de l'entrée de glucose basale et stimulée par l'insuline. L'autre source de G3P est la glycéronéogenèse, une version abrégée de la gluconéogenèse qui produit du G3P à partir de substrats gluconéogeniques comme le lactate et le pyruvate (Figure II-5). L'étape limitante de cette réaction est contrôlée par la forme cytosolique de la phosphoenol pyruvate carboxy kinase (PEPCK). Les contributions relatives de la glycolyse et de la glycéronéogenèse à la production de G3P varient en fonction de facteurs nutritionnels et pharmacologiques. La disponibilité globale

Figure II-4 : Synthèse des triglycérides dans l'adipocyte



AG : acides gras

de G3P contrôle le taux d'estérification des AG provenant de la lipogénèse *de novo* ou des lipides circulants, mais aussi la ré-estérification partielle des AG libérés lors de la lipolyse des TG.

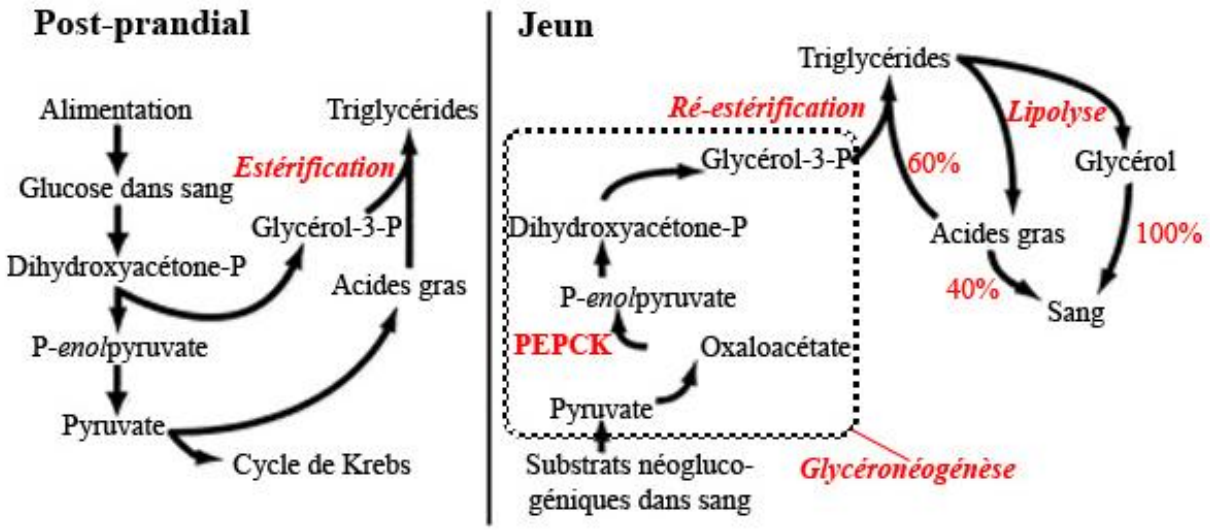
II.4.2.3 Synthèse des TG

Les TG sont constituées d'une molécule de glycérol, liée à 3 molécules d'AG. La biosynthèse des TG résulte de l'estérification successive des groupes alcool du G3P par différentes enzymes : trois acyl transférases et une phosphatase qui forment la triglycéride synthase, complexe multienzymatique lié à la membrane du réticulum endoplasmique (Figure II-4).

II.4.3 Lipolyse

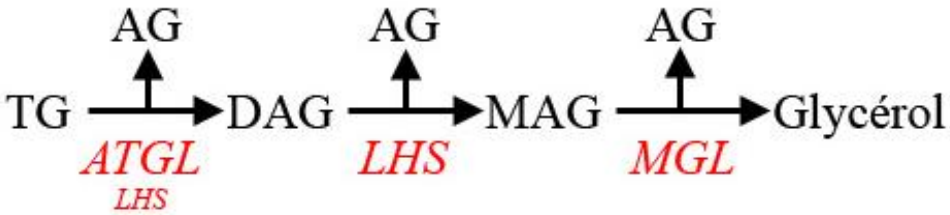
Les TG du TA sont hydrolysés lorsque les besoins énergétiques de l'organisme ne sont pas satisfaits par l'alimentation. Lors de cette lipolyse intracellulaire, les TG sont hydrolysés successivement en diacylglycérols (DAG) et monoacylglycérols (MAG), pour aboutir finalement à la libération de 3 molécules d'AG et d'une molécule de glycérol par molécule de TG. Cette hydrolyse est généralement complète, même si quelques DAG et MAG peuvent d'accumuler. Le TA ayant une activité glycérol-kinase très faible, le glycérol produit est libéré dans la circulation pour être utilisé par d'autres tissus. Cette libération de glycérol dépend en partie de l'aquaporine (AQP), une protéine formant un canal dans la membrane plasmique. Les AG libérés par l'hydrolyse des TG, au contraire, peuvent être soit libérés dans la circulation, soit ré-estérifiés en TG sans apparaître dans la circulation. Ce recyclage intracellulaire d'AG dépend de la disponibilité en G3P, et de l'expression des enzymes de ré-estérification. A l'état basal, post-absorptif, ce recyclage est limité, mais le taux de ré-estérification augmente en période de jeûne, ou dans des situations pathologiques comme l'hyperthyroidisme (Beylot et al., 1991), ou le stress (Bahr et al., 1990). Ces mécanismes de régulation du taux de ré-estérification participent à la régulation des taux d'AG plasmatiques (Figure II-5).

Figure II-5 : Glycéronéogenèse et ré-estérification (adapté de (Beale et al., 2002))



La glycéronéogénèse module la libération d'acides gras en période de jeun. Lorsqu'il n'y a plus d'énergie directe de l'alimentation, la lipolyse libère du glycérol et des acides gras à partir des triglycérides stockés dans le TA. Le jeûne diminue l'insuline et augmente l'AMPc intracellulaire, ce qui entraine une réduction de l'utilisation de glucose et une augmentation de la production de PEPCK-C. La libération d'acides gras est restreinte à cause de l'augmentation de la glycéronéogenèse et de la ré-estérification. Au contraire, presque 100% du glycérol est libéré dans la circulation car il ne peut pas être phosphorylé dans les adipocytes.

Figure II-6: Hydrolyse des triglycérides dans le TA (lipolyse) (adapté de (Zechner et al., 2005))



L'adipocyte triglyceride lipase (ATGL) hydrolyse les triglycérides (TG) en diacyl-glycérol (DAG). Les DAG sont ensuite hydrolysés par la lipase hormono-sensible (LHS) en monoacylglycérol (MAG). La dernière étape d'hydrolyse des MAG par une monoglycéride lipase (MGL) libère le dernier acide gras (AG) et le glycérol.

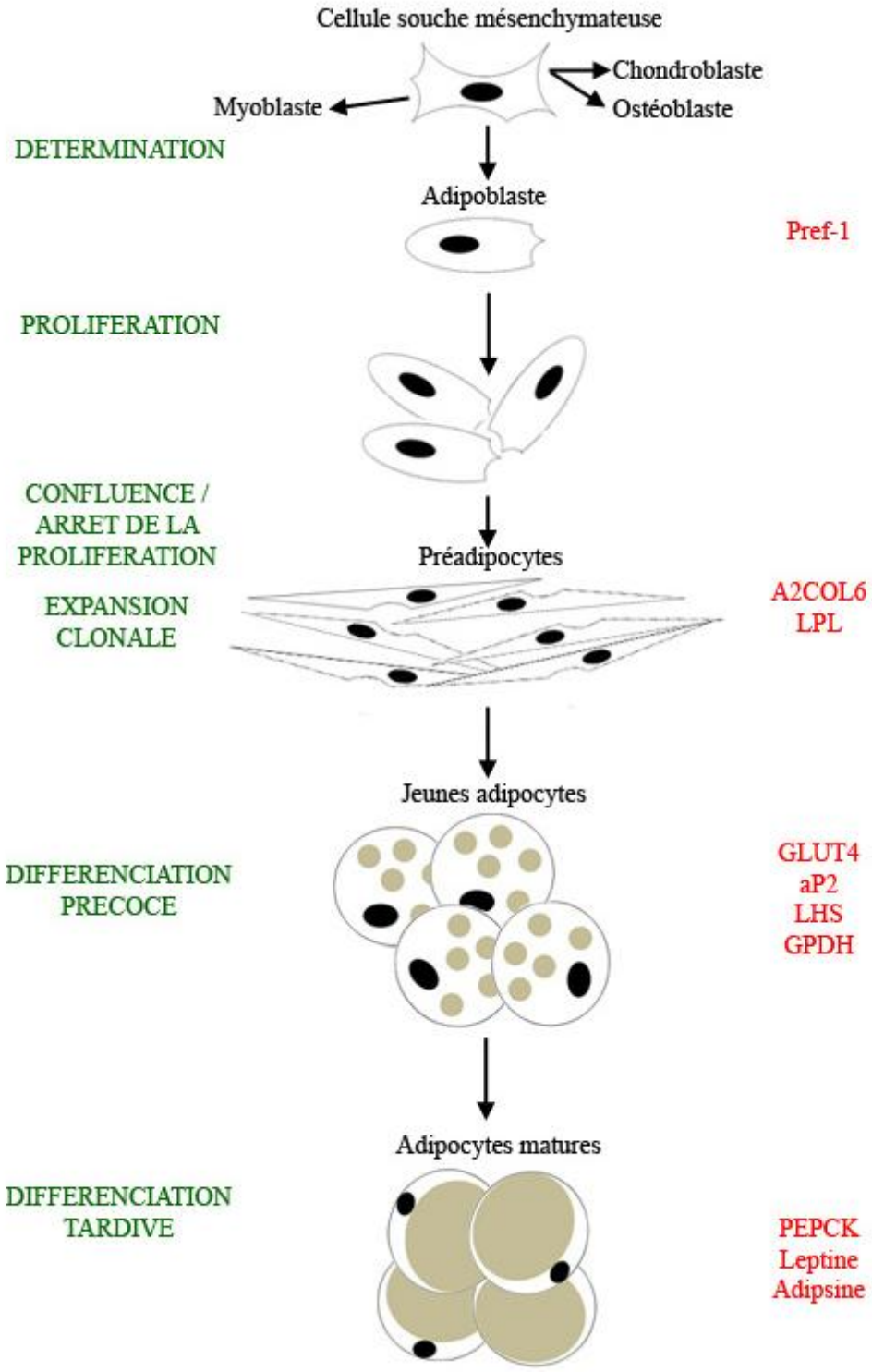
La lipase hormono-sensible (LHS) possède un rôle clef dans l'hydrolyse des TG. La lipolyse est activée par les hormones ou médiateurs activant le système adénylate cyclase (adrénalise, noradrénaline, glucacon), entrainant l'augmentation de la concentration intracellulaire en AMP cyclique, qui phosphoryle une protéine kinase A, qui à son tour active en les phosphorylant la LHS et les périlipines. L'inhibition de l'expression de la LHS chez la souris se traduit par l'accumulation de DAG au lieu de TG. Ceci suggère que, bien que la LHS soit capable d'hydrolyser les TG, ses substrats principaux sont les DAG.

L'adipose triglycéride lipase (ATGL), est une autre lipase présente dans le TA. L'inhibition simultanée de l'ATGL et de la LHS se traduit par une inhibition de plus de 90% de l'hydrolyse des TG dans le TA (Zimmermann et al., 2004). Ainsi, l'hydrolyse des TG est d'abord et majoritairement dépendante de l'ATGL, et accessoirement sous la dépendance de la LHS, l'hydrolyse des DAG est assurée par la LHS, puis une MAG lipase produit le dernier AG et un glycérol. Il est admis que la MAG lipase représente l'étape limitante de la libération de glycérol et d'AG libres (Figure II-6).

II.5 Origine et développement du TA

Dans la plupart des espèces, la formation du TA adipeux débute avant la naissance. L'expansion du TA se déroule rapidement après la naissance par une augmentation du nombre et de la taille des cellules adipeuses, phénomènes appelés respectivement hyperplasie et hypertrophie. De nombreuses études suggèrent que l'expansion du TA à l'âge adulte ne résulte pas seulement de l'augmentation de la taille des adipocytes, mais aussi d'une augmentation de leur nombre. L'hyperplasie adipocytaire a en effet été observée dans de nombreux modèles murins (Okuno et al., 1998) (Gregoire, 2001). Même si l'existence de l'hyperplasie adipocytaire reste controversée chez l'homme, des précurseurs adipocytaires pouvant être différenciés *in vitro* en adipocytes ont été isolés de TA adulte humain (Sen et al., 2001), démontrant que la capacité à générer de nouvelles cellules adipocytaires persistait tout au long de la vie. De plus, des cellules dérivant de cellules de la fraction stroma-vasculaire de TA humain peuvent se différencier *in vitro* en cellules adipogénique, chondrogénique, myogénique et osteogénique en

Figure II-7 : Les différentes étapes de la différenciation adipocytaire (adapté de (Ailhaud et al., 1992))



Les différentes étapes de la différenciation adipocytaire sont représentées en vert, les stades cellulaires en noir, et les marqueurs caractéristiques exprimés lors des différentes étapes en rouge.

présence de facteurs d'induction spécifiques (Zuk et al., 2001), confirmant la plasticité du TA. Cela suggère qu'en plus de cellules fibroblastiques déjà déterminées en adipocytes (les préadipocytes), le TA humain adulte contient des cellules précurseuses multipotentes. Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans la détermination de cellules primitives au lignage adipocytaire sont encore mal connus. Au contraire, les évènements moléculaires et cellulaires qui permettent la transition des cellules indifférenciées fibroblastiques en adipocytes matures ont été très étudiés. Ce dernier phénomène est appelé différenciation ou adipogenèse.

II.6 La différenciation adipocytaire (adipogenèse)

Pendant la différenciation adipocytaire, l'acquisition du phenotype adipocytaire est caractérisée par des changements chronologiques dans l'expression de nombreux gènes. Cela se reflète par l'apparition de marqueurs précoces, intermédiaires et tardifs d'ARNm ou de protéines, et par l'accumulation de TG. Ces changements sont principalement transcriptionnels. Les changements dans l'expression de gènes pendant les phases précoces et tardives de la différenciation adipocytaires ont été principalement caractérisés en utilisant des lignées cellulaires de préadipocytes, comme la lignée murine 3T3-L1 qui sera présentée ci-après. Les principales étapes de la différenciation adipocytaire sont présentées ci-dessous et résumées sur la Figure II-7. Pour une revue complète sur ce phénomène, voir (Gregoire et al., 1998).

II.6.1 Arrêt de la prolifération

Après une phase de croissance exponentielle (régulée par des facteurs mitogéniques), l'adipoblaste, qui présente un aspect fibroblastique, atteint un stade de confluence marqué par un arrêt de la prolifération. Plus que les phénomènes de contact cellulaire, cette interruption de croissance semble requise pour l'engagement vers la différenciation adipocytaire des adipoblastes qui deviennent alors des préadipocytes. Les deux facteurs de transcription CCAAT/Enhancer binding protein-α (C/EBP-α) et peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ), dont l'expression ne cesse d'augmenter au cours de la différenciation, semblent déjà

jouer un rôle dans cet arrêt de la prolifération cellulaire, malgré leur niveau d'expression faible dans les préadipocytes. Ces préadipocytes arrêtés en phase G0/G1 du cycle cellulaire expriment des marqueurs précoces tels que la chaîne α2 du collagène de type VI (A2COL6) ou la LPL. C'est aussi à ce moment là que s'éteint l'expression de pref-1 (preadipocyte factor 1), protéine soluble ayant un effet inhibiteur sur la différenciation adipocytaire (Sul et al., 2000).

II.6.2 Expansion clonale

Les préadipocytes ne peuvent progresser dans la différenciation que s'ils subissent une phase d'expansion clonale, qui correspond à plusieurs cycles de mitoses postconfluentes (Tang et al., 2003). Cependant, les préadipocytes primaires issus de TA humain ne nécessitent pas de division cellulaire pour entrer dans le processus de différenciation (Entenmann and Hauner, 1996). Dans ces cellules, l'inhibition de la mitose avec de la cytosine arabinoside n'affecte pas le développement adipocytaire, indiquant que l'amplification clonale de cellules déterminées n'est pas une étape critique.

Ces deux phases, l'arrêt de la croissance et l'expansion clonale s'accompagnent par des changements complexes dans l'expression des gènes qui peuvent dépendre du modèle cellulaire et des protocoles de différenciation utilisés. L'expression de l'ARNm de la LPL a été souvent citée comme un marqueur précoce de la différenciation adipocytaire, mais l'expression de la LPL est spontanée dans les préadipocytes à confluence et ne dépend pas de l'addition des agents nécessaires à la différenciation. Ceci suggère que la LPL serait plutôt un marqueur de la phase d'arrêt de croissance des cellules, plutôt qu'une étape précoce de la différenciation.

Au moins deux familles de facteurs de transcription sont induites précocement lors de la différenciation adipocytaire : C/EBP et PPAR. L'expression précoce de C/EBP et PPAR est logique, sachant leur implication majeure dans la phase de différenciation terminale des cellules, par transactivation de gènes spécifiques des adipocytes. PPARγ est adipocyte spécifique, il est exprimé à des niveaux faibles mais détectables dans les préadipocytes, et son expression

augmente rapidement après l'induction hormonale de la différenciation, jusqu'à atteindre un niveau maximal d'expression dans les adipocytes matures. Une induction transitoire de l'expression de C/EBP-β et C/EBP-δ précède l'induction de l'expression de PPARγ. La décroissance de l'expression de C/EBP-β et C/EBP-δ lors des stades précoces à moyen de la différenciation s'accompagne ensuite de l'induction de C/EBP-α. L'induction de C/EBP-α de déroule tout juste avant l'expression de gènes adipocytaires spécifiques.

Enfin, lors de la différenciation adipocytaire, les cellules passent d'un phénotype fibroblastique allongé à une cellule de forme sphérique, et des changements drastiques sont observés dans la morphologie cellulaire, les éléments du cytosquelette et les composants de la matrice extracellulaire. Une baisse de 90 et 95% de la synthèse de l'actine et de la tubuline sont observées dans les phases très précoces, ce phénomène représentant un évènement à part entière du processus de différenciation et non une conséquence de l'accumulation de lipides (Spiegelman and Farmer, 1982). De même, un switch dans l'expression des gènes de collagène est un évènement précoce de la différenciation adipocytaire, les concentrations de procollagène de type I et III diminuant lors de la différenciation des cellules 3T3-L1, et la sécrétion des collagènes de type IV augmentant (Weiner et al., 1989). Enfin, une augmentation de la production de chondroitin sulfate protéoglycanes (versican) a aussi lieu (Calvo et al., 1991).

II.6.3 Phase terminale de différenciation

Lors de la phase terminale de différenciation, les adipocytes en culture augmentent fortement la lipogénèse *de novo* et acquièrent leur sensibilité à l'insuline. L'activité, la protéine et l'ARNm des enzymes impliqués dans le métabolisme des TG augmentent de 10 à 100 fois : ATP citrate lyase, enzyme malique, acétyl CoA carboxylase, stearoyl-CoA desaturase, glycérol-3-phosphate acyltransférase, glycérol-3-phosphate dehydrogénase, fatty acid synthase… Les transporteurs au glucose (GLUT4) et à l'insuline, ainsi que la sensibilité à l'insuline augmentent. D'autres gènes spécifiques de l'adipocyte voient leur expression augmenter : aP2, CD36, perilipine, adipsine, leptine, PEPCK…

Table II-2 : Modèles *in vitro* de lignées de préadipocytes et cultures primaires (adapté de (Gregoire et al., 1998))

Lignées cellulaires	**Origines/Stade de développement**	**Agents utilisés pour induire la différenciation**
Cellules ES	Blastocytes de souris*	Acide rétinoïque
CH3 10T1/1	Embryons de souris**	Agent déméthylant 5-azacytidine
TA1	Dérivées de T1/2 traitée au 5-azacytidine§	10% FBS, insuline, Dex
3T3-L1	Embryons de souris de 17-19 jours désagrégés§	10% FBS, Dex et MIX, insuline (haute concentration)
3T3-F442A	Idem	10% FBS, insuline
Ob17	Dépôts épididymaux de souris adultes *Ob/Ob*§	8% FBS, insuline, T_3
Cultures primaires	**Source/Age**	**Agents utilisés pour induire la différenciation**
Rat	Sous-cutané, épididymal, rétropéritonéal Nouveau-né (48h), 4 semaines ou adulte	10% FBS, insuline (faible concentration) ou Sans sérum, insuline (haute concentration)
Souris	Sous-cutané / 8 à 12 jours	Sans sérum, insuline, HDL, Dex
Lapin	Péri rénal / 4 semaines	Sans sérum, insuline, Dex
Cochon	Péri rénal, sous-cutané Fœtus, nouveau-né (1 à 7 jours)	Sans sérum, insuline, avec ou sans glucocorticoïdes
Humain	Sous-cutané abdominal / Age variable	Sans sérum, insuline (haute concentration), glucocorticoïdes

FBS : Fetal Bovine Serum ; MIX : méthylisobutylxanthine ; Dex : déxaméthazone ; HDL : High density Lipoproteins ; T_3 : 3,3',5-triiodothyronine. * : cellules totipotentes ; ** : cellules multipotentes ; § : cellules déjà engagées dans le lignage adipocytaire.

II.7 Les modèles d'étude du TA

II.7.1 Les lignées de préadipocytes

La grande majorité des mécanismes participant à l'adipogenèse ont été découverts grâce à l'utilisation de lignées de préadipocytes, et sont maintenant largement confirmés par l'utilisation de souris transgéniques. Les lignées de préadipocytes, ainsi que les préadipocytes primaires (voir paragraphe suivant) sont déjà déterminés au lignage adipocytaire, même s'ils peuvent représenter différents stades de différenciation.

Les lignées cellulaires les plus utilisées sont les 3T3-L1 et les 3T3-F442A, qui ont été clonées à partir de cellules de souris Swiss 3T3 dérivées d'embryons désagrégés de 17 à 19 jours (Green and Kehinde, 1975). La lignée TA1 a été établie en traitant des fibroblastes d'embryons de souris CH310T1/2 avec l'agent déméthylant 5-azacytidine (Konieczny and Emerson, 1984). Les cellules Ob17 et leurs dérivés (Ob1771) ont été générées à partir de précurseurs adipocytaires présents dans les dépôts épididymaires de souris adultes génétiquement obèses Ob/Ob (Negrel et al., 1978).

En plus de ces modèles, des cellules souches embryoniques de souris ont montré la capacité à se différencier en adipocytes matures *in vitro*, donnant l'opportunité de mieux comprendre les évènements qui gouvernent le processus de détermination des progéniteurs au lignage adipocytaire (Dani et al., 1997). Les principales caractéristiques de ces modèles et leurs protocoles de différenciation sont présentés dans le Tableau II-2.

Malgré quelques différences entre les lignées de préadipocytes et les cultures primaires, les expériences menées *in vivo* ont clairement démontré que l'essentiel du processus adipogénique dans les lignées n'était pas aberrant ou pathologique. En effet, quand des cellules 3T3-L1 ou Ob117 sont injectées dans des souris nude, les cellules se développent en un dépôt adipeux non distinguable du TA d'origine des animaux (Vannier et al., 1985).

La valeur de ces lignées préadipocytaires murines comme modèles expérimentaux est ainsi incontestable. Cependant, la biologie de l'adipocyte présente quand même quelques différences entre les rongeurs et l'humain. Par exemple, la distribution régionale des dépôts adipeux, leur composition cellulaire (TA blanc vs brun, infiltration par des macrophages), et la régulation de la résistine, de l'adipsine et des récepteurs adrénergiques sont différents chez l'homme et chez le rongeur (Ben-Jonathan et al., 2008). Un autre exemple des différences intrinsèques entre les espèces se retrouve dans la suppression de l'expression de l'adiponectine dans les cellules 3T3-L1 par l'insuline versus son augmentation en réponse à l'insuline dans du TA humain isolé (Whitehead et al., 2006). De même, les préadipocytes et les adipocytes matures humains sécrètent de la prolactine, mais l'expression de cette prolactine n'est pas détectable dans le TA de rats, de souris, ou dans les cellules 3T3-L1 ou 3T3-F442A (Ben-Jonathan et al., 2008).

Des lignées de préadipocytes humains ont été développées ces dernières années (Wabitsch et al., 2001) (Hugo et al., 2006). Hugo et al. ont par exemple développé une lignée cellulaire de préadipocytes humains spontanément immortalisée, appelée LS14, issue d'un patient avec un liposarcome métastatique. Les cellules LS14 sont capables de se différencier *in vitro* en adipocytes et deviennent des adipocytes matures capables de stocker des TG et de libérer des adipokines. Ces modèles restent cependant pour l'instant très peu utilisés.

II.7.2 Les préadipocytes en culture primaire

Le niveau de différenciation et le lignage des lignées de préadipocytes n'étant pas toujours bien établi, les cultures primaires peuvent être très utiles pour valider les résultats obtenus dans les lignées. Des cultures primaires de préadipocytes ont été cultivées avec succès à partir d'un grand nombre d'espèces dont l'homme et possèdent quelques avantages par rapport aux lignées (Gregoire et al., 1991) (Hausman et al., 1992) (Deslex et al., 1987). Les cellules primaires sont diploïdes et reflètent ainsi certainement mieux le contexte *in vivo* que les lignées cellulaires aneuploïdes. Deuxièmement, elles peuvent être obtenues à partir de

différentes espèces, à divers stades de développement, et de divers dépôts adipeux (Tableau II-2). Pour ces cultures primaires, la capacité de différenciation est clairement donneur dépendante et diminue significativement avec l'âge (Kirkland et al., 1990).

Les protocoles de différenciation *in vitro* sont globalement similaires entre lignées et préadipocytes primaires. Les cellules sont maintenues et multipliées à l'état de préadipocytes. Elles commencent à se différencier peu après avoir atteint la confluence et leur taux de prolifération diminue. La différenciation des cellules primaires et des lignées est communément améliorée en traitant les cellules post-confluentes avec un cocktail de différenciation, une combinaison d'insuline, isobutylmethylxanthine (IBMX) et dexamethasone, un régime qui impacte trois voies de transduction du signal distinctes. Les cellules sont généralement traitées avec ce cocktail hormonal pendant quelques jours puis maintenues dans un milieu plus standard jusqu'à leur différenciation totale, 8 à 10 jours plus tard. La réponse des cultures primaires et des lignées à ces agents différenciant varie considérablement. L'insuline par exemple, augmente le taux de remplissage lipidique des lignées, mais augmente le pourcentage de cellules qui se différencient dans les cultures primaires.

II.7.3 Les adipocytes isolés

Les fonctions du TA sont régulées par des mécanismes de court et de long terme. Les adaptations à long terme à des facteurs hormonaux, nutritionnels et développementaux peuvent se faire sur des durées de quelques heures à quelques jours. Par exemple, des altérations chroniques du milieu hormonal ont des effets à long-terme sur les capacités lipogéniques et lipolytiques des adipocytes. Pour comprendre ces mécanismes adaptatifs de long terme, il faut posséder des modèles qui maintiennent la fonction du TA *ex vivo* au moins pendant une semaine. Il existe deux principales méthodes permettant l'étude des régulations à long terme du métabolisme adipocytaire : les explants de TA (voir paragraphe suivant), et les cultures primaires d'adipocytes isolés par digestion à la collagénase de TA.

Les cultures d'adipocytes isolés sont faites par maintien en culture primaire d'adipocytes isolés de différents dépôts adipeux par digestion du tissu à la collagénase. Un des avantages de cette méthode, par rapport aux explants, c'est que ces cultures ne contiennent que des adipocytes. La culture primaire d'adipocytes matures isolés est différente des cultures primaires de cellules nouvellement différenciées dérivées de précurseurs de la fraction stroma-vasculaire. Ces dernières restent en général multiloculaires (multiples gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme) en culture monocouche, et il est possible que ces cellules ne soient pas tout à fait différenciées. Ainsi, l'avantage majeur des cultures primaires d'adipocytes matures isolés est la possibilité d'étudier des adipocytes complètement différenciés, uniloculaires, provenant de dépôts adipeux animaux ou humains.

II.7.4 Les explants de TA

Les explants de TA sont des fragments intacts de TA placés dans un milieu de culture complet qui contient des nutriments et des électrolytes (glucose, acides aminés, vitamines, minéraux), tamponné à pH 7.4.

Le TA contient de nombreux types cellulaires, dont les adipocytes, des cellules endothéliales, des préadipocytes et des fibroblastes. La culture d'explants de TA permet de préserver les interactions paracrines entre ces différentes cellules, qui peuvent influencer le métabolisme adipocytaire. Cependant, la complexité du système rend aussi les interprétations mécanistiques difficiles. La présence de types cellulaires multiples complique l'interprétation des données. Par exemple, il est difficile de conclure à l'aide d'explants de TA si les effets observés après l'ajout d'hormones ou de substrats dans le milieu sont directement dus à un effet sur les adipocytes, ou s'ils sont médiés par les autres types cellulaires. En plus des actions paracrines, il est possible que la matrice extracellulaire présente dans le TA soit aussi indispensable pour maintenir la structure et la fonction des adipocytes à long terme, ce que permet la culture d'explants.

Ce modèle d'étude du TA est utilisé comme modèle *in vitro* de TA depuis presque un siècle, avec de nombreux succès comme le fait que des adipocytes isolés d'explants en culture

Table II-3 : Principales différences entre les TA de souris, de rat et d'homme (adapté de (Casteilla et al.))

	Rats et souris	Homme
Localisation des dépôts adipeux:		
Interscapulaire	+	-
Péri-ovarien	+	-
Epididymal	+	-
Persistance du TA brun chez l'adulte	+++	+/-
Conversion		
TA brun=>TA blanc	+	+++
TA blanc=>TA brun	+++	?
Site principal de lipogenèse	TA	Foie
Sensibilité à l'insuline du transport de glucose	+++	+
Lipolyse stimulée par les catécholamines	β1, β2, β3	β1, β2, α2

restent sensibles à des stimulations hormonales. Plus récemment, des cultures d'explants à plus court terme ont été extensivement utilisées pour caractériser le métabolisme adipocytaire. Les explants de TA sont généralement considérés comme étant représentatif du TA *in vivo*, car ils conservent l'architecture du tissu. Cependant, pour obtenir des résultats cohérents, les explants doivent être lavés et préincubés précautionneusement. Le temps pendant lequel un explant peut être incubé avant de commencer à subir des changements dans ses fonctions métaboliques est une question fréquente. Il est maintenant admis que les préparations incubées plus de quelques heures commencent à subir des dommages irréversibles si le tissu n'est pas maintenu dans milieu enrichi. Cependant, même dans de bonnes conditions de culture, il n'est pas certain que les explants soient stables sur de très longues durées. Des adipocytes issus d'explants de TA humain sous-cutané sur-expriment rapidement le tumor necrosis factor-α (TNFα) et le hypoxia-induced factor-1α (HIF-1α) et sous-expriment des gènes spécifiques des fonctions adipocytaires comme la LHS, la LPL, et PPARγ, indiquant une réponse catabolique même après une préparation simple et soigneuse des explants (Gesta et al., 2003).

II.7.5 Le TA *in vivo*

Les modèles de rongeurs sont des modèles valables et pratiques dans beaucoup de cas, sauf pour l'étude du métabolisme et du développement du TA humain. En effet, de trop nombreuses différences existent entre les TA de souris ou de rats, et le TA humain (Tableau II-3). En terme de métabolisme, il ne semble pas y avoir de différence majeure entre les adipocytes des primates humains et non humains (Lafontan et al., 1995), c'est pourquoi les primates semble un bon modèle physiologique d'étude du TA. En ce qui concerne les études de développement, les lapins semblent présenter les mêmes caractéristiques métaboliques que les humains, au moins jusqu'au sevrage (Cambon et al., 1998).

CHAPITRE III : TISSU ADIPEUX ET XENOBIOTIQUES

70% de la masse du TA est formée par des lipides, faisant ainsi de ce tissu le plus grand réservoir de contaminants lipophiles de l'organisme. La plupart d'entre eux sont des polluants organiques persistants (POPs) qui s'accumulent dans les niveaux les plus élevés de la chaîne alimentaire. L'alimentation, particulièrement *via* les poissons gras, la viande et les produits laitiers, est ainsi la source principale de l'exposition humaine aux POPs. D'autres polluants moins persistants, mais provenant de produits d'utilisation quotidienne comme les cosmétiques, sont aussi soupçonnés d'être une source de contamination pour le TA humain.

Le but de ce chapitre est d'abord de présenter rapidement les différents polluants pouvant interagir avec le TA humain. Nous regarderons ensuite si le TA possède les armes nécessaires pour les combattre, i.e. si les enzymes du métabolisme des xénobiotiques sont présentes dans ce tissu. La finalité de cette thèse n'étant pas de comprendre les effets des polluants sur la santé humaine en général, mais de se concentrer sur les effets directs de ces composés sur le fonctionnement du TA, nous conclurons ce chapitre par une revue des études publiées dans la littérature qui se sont intéressées aux conséquences directes pour le TA de son exposition à des xénobiotiques d'origine environnementale.

III.1 Exposition du TA aux polluants environnementaux

III.1.1 Polluants organiques persistants (POPs)

Les POPs sont des composés organiques qui résistent aux dégradations photolytiques, chimiques et biologiques. Ces composés chimiques très stables servent comme pesticides ou sont employés dans l'industrie, mais ils apparaissent aussi involontairement, comme sous-produit de la combustion ou des procédés industriels. Les POPs sont souvent halogénés et le plus souvent chlorés. Le lien chlore-carbone est très stable face à l'hydrolyse, et un chlore attaché à un noyau aromatique (benzène) est plus stable qu'un chlore attaché à une structure aliphatique. Ainsi, les POPs chlorés sont typiquement des noyaux aromatiques ou des structures en branche. Plus le nombre de substitutions chlorées et/ou de groupes fonctionnels est

important, plus le composé est résistant à la dégradation biologique et photolytique. Grace à leur haut degré d'halogénation, les POPs sont très peu solubles dans l'eau, et très lipophiles, ce qui leur confère la propriété de passer facilement au travers des phospholipides des membranes biologiques, de s'accumuler dans les dépôts adipeux et de s'accumuler tout au long de la chaine alimentaire. Les POPs sont de plus des composés semi-volatiles, ce qui leur permet de parcourir de longues distances dans l'atmosphère avant de se déposer (Ritter L., 2007).

En mai 1995, le conseil d'administration du Programme des Nations Unies pour l'Environnement a, par décision 18/32, demandé de mettre en route un processus international d'évaluation scientifique sur les douze premiers POPs, connus sous le nom des « dirty dozen »: les pesticides, aldrine, chlordane, dichlorodiphenyltrichloroéthane (DDT), dieldrine, endrine, heptachlore, hexachlorobenzène (HCB), mirex, toxaphène ; les produits chimiques industriels, les polychlorobiphényles (PCBs) ; et les sous produits: dioxine et furane. Le 22 mai 2001, la convention de Stockholm sur les POPs, accord international visant à interdire certains produits polluants, est signée par 151 pays. Cette convention vise à restreindre fortement l'utilisation du DDT, à prévenir et réduire les émissions de dioxines et de furanes, et à interdire les autres membres des « dirty dozen ». Depuis lors, la liste des POPs a été élargie à d'autres substances comme les HAPs, certains retardateurs de flammes bromés (RFBs), ainsi qu'à certains composés organométalliques comme la tributyline (TBT).

III.1.2 Autres composés

III.1.2.a Bisphénol A (BPA)

Le bisphénol A (BPA) est utilisé comme monomère pour la fabrication industrielle par polymérisation des plastiques de type polycarbonate et de résines époxy. Il est également utilisé comme antioxydant dans les plastifiants et le chlorure de polyvinyle (PVC), et comme inhibiteur de polymérisation dans le PVC. Les polycarbonates sont très largement utilisés dans des produits de consommation courants depuis les lunettes de soleil et les CDs jusqu'aux récipients

pour l'eau et la nourriture. Au Canada en 2008, ils sont présents dans 90% des biberons (Polyzou et al., 2008). Le BPA est connu pour s'extraire des plastiques spontanément à très faible dose et plus significativement s'il est nettoyé avec des détergents puissants ou utilisé pour contenir des acides, ou des liquides à hautes températures. Des études du Center for Disease Control and Prevention (CDCP) ont trouvé des niveaux quantifiables de BPA dans 95% des échantillons d'urine collectés auprès d'adultes américains (Calafat et al., 2005). Le BPA n'est pas considéré comme persistent et il est généralement admis dans la littérature que la présence de BPA dans les échantillons humains résulte d'une exposition constante à ce composé, principalement par l'alimentation, et qu'il est ensuite éliminé rapidement et complètement de l'organisme. Cependant, Stahlhut et al. ont montré que les niveaux de BPA dans l'urine d'hommes adultes ne diminuaient pas en période de jeûne, suggérant soit une exposition au BPA indépendante de l'alimentation, soit une accumulation du BPA dans les tissus comme le TA, soit les deux (Stahlhut et al., 2009).

III.1.2.b Phthalates

Les phthaltes sont des esters de l'acide phthalique utilisés principalement comme plastifiants, notamment dans les produits en PVC. Les phthalates entrent dans la composition de nombreux produits dont des colles, des adjuvants agricoles, des matériaux de construction, de nombreux cosmétiques, du matériel médical, des détergents, des emballages, des jouets, des médicaments… Les phthalates les plus utilisés sont le di-2-ethyl hexyl phthalate (DEHP), le diisodecyl phthalate et le diisononyl phthalate. En 2006, la production mondiale annuelle de phthalates atteignait les 2 millions de tonnes, largement dominée par le DEHP (OFSP, 2006). Les phthalates n'étant pas chimiquement liés au PVC, ils peuvent facilement s'infiltrer dans la nourriture ou l'atmosphère. L'alimentation est ainsi considérée comme la source d'exposition majoritaire au DEHP et aux autres phthalates dans la population générale. Les enfants sont de plus considérés comme étant plus exposés aux phthalates que les adultes, d'une part à cause des nombreux objets qu'ils portent à leur bouche, et d'autre part via l'utilisation de cosmétiques. La population générale est ainsi constamment exposée aux phthalates et plus de

Table III-1 : Caractéristiques des xénobiotiques environnementaux pouvant avoir un effet direct sur le TA humain

Compound	Origins and uses	Effects on human health	Levels in human adipose tissue	Reference
Organochlorine pesticides				
DDT	Widely used insecticide since 1945	Epidemiological evidence for pancreatic cancer, adverse birth outcomes, neuropsycological disorders	from 0.4 to 17.4 µg/g lipids	(Beard, 2006) (Li et al., 2006)
DDE	Main metabolite of DDT			
HCB	Fungicide	Acute exposure causes liver disease, dermatologic, neurologic and orthopedic symptoms in human	18.3 (women) - 6.8 ng/g (men)	(Arrebola et al., 2009) (Gocmen et al., 1989)
Dioxins, furans and PCBs				
PCDDs	Unintentional by-products of combustion and chemical processes (waste incinerators)	TCDD causes chloracné, lymphatic and hematopoietic tissue neoplasms, and breast cancer	from 0.14 to 49 ng/g lipids	(Pesatori et al., 2009) (Li et al., 2006) (Guo et al., 2004)
PCDFs		Prenatal exposure causes retarded growth, behavioral problems and reproductive disorders		
PCBs	Widely used as coolants and lubricants in electrical components and paint additives Banned in the 1970s by most developed nations	Epidemiological evidences for thyroid hormone levels pertubations in adults Prenatal exposure causes impaired immune system development	from 35 to 3000 ng/g lipids	(Salay and Garabrant, 2009) (Hertz-Picciotto et al., 2008) (Li et al., 2006)
Brominated flame retardants				
PBDEs	Flame retardants used in platics, textiles, electronic circuitry and other materials to supress combustion	Animal studied show neurobehavioral and reproductive system development impairment, thyroid hormone level perturbations	from 3.7 to 85.7 ng/g lipids	(Talsness, 2008) (Li et al., 2006)
Organometallic compounds				
TBT	Widely used as biocide in naval painting	High level exposure cause hepatic, neural and immunotoxicity in animal studies	from 0 to 155 ng/mL in blood	(Antizar-Ladislao, 2008) (Boyer, 1989)
Other compounds				
Bisphenol A	Key monomer in production of epoxy resins and in the most common form of polycarbonate plastic.	Epidemiological evidences that BPA is significantly associated with heart disease, diabetes, and abnormally high levels of certain liver enzymes	0.3 to 5 ng/mL (1 to 20nM) in plasma, urine, breast milk	(Welshons et al., 2006) (Lang et al., 2008)
Phthalates	Used as plastizicers in PVC	Endocrine disruptor : human phthalate exposure during pregnancy resulted in decreased anogenital distance among baby boys	ND-2.19 mg/kg	(Zhang et al., 2003) (Swan et al., 2005)

75% des américains testés par le CDCP avaient des métabolites de nombreux phthalates dans leur urine (Silva et al., 2004). La métabolisation et l'élimination de ces composés étant considérées comme rapides, ces données suggèrent une exposition constante.

III.1.3 Classification des xénobiotiques

Ainsi, les xénobiotiques qui nous intéressent peuvent être regroupés en 2 grandes catégories :

1. Ceux qui s'accumulent dans le TA humain, les POPs, constitués des :

- Pesticides organochlorés comme le DDT et le HCB
- Dioxines (polychlorodibenzo-p-dioxines (PCDDs) et polychlorodibenzo-furanes (PCDFs))
- PCBs (dioxin ou non-dioxin like)
- RFBs (par exemple les polybromodiphényléthers (PBDEs))
- Organotines (par exemple la TBT)

2. Ceux qui peuvent atteindre le TA du fait de l'exposition constante des organismes

- Le BPA
- Les phthalates

Le Tableau III-1 présente certaines caractéristiques de ces xénobiotiques environnementaux, ainsi que leurs niveaux d'accumulation dans le TA humain.

III.2 Enzymes du métabolisme des xénobiotiques et TA

Divers composés environnementaux peuvent ainsi atteindre le TA humain et potentiellement s'y stocker. Une des première questions que l'on peut alors se poser est l'existence d'une capacité métabolique *in situ* de ces composés, i.e. l'existence ou non des diverses EMX présentées dans le chapitre I de ce manuscrit au sein du TA humain.

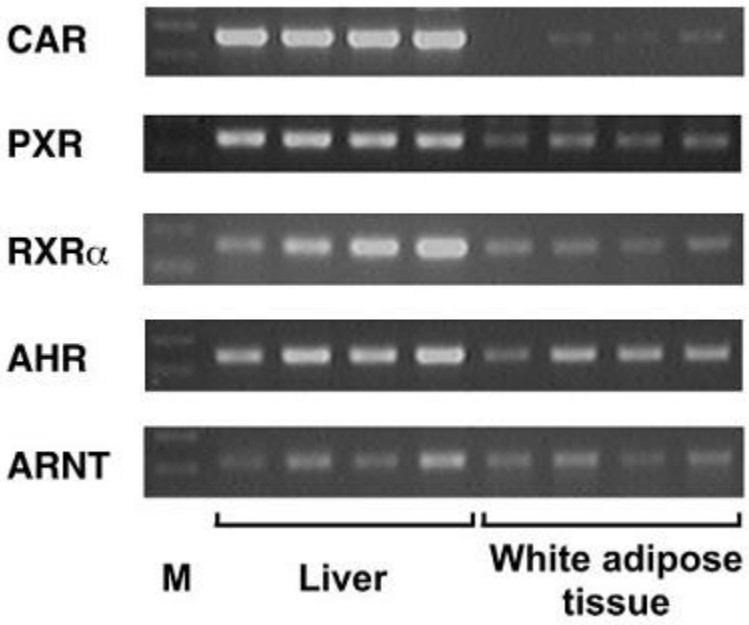
Table III-2 : Niveaux relatifs d'ARNm de P450s dans le foie et le TA de rat (d'après (Yoshinari et al., 2004))

Gene	Relative mRNA Level		
	Liver	WAT	WAT/Liver Ratio
CYP1A1	0.068 ± 0.007	0.029 ± 0.002	0.43
CYP1A2	198 ± 23	0.095 ± 0.074	0.00048
CYP1B1	0.016 ± 0.002	1.22 ± 0.18	76
CYP2B1	2.6 ± 0.8	0.26 ± 0.06	0.10
CYP2B2	78 ± 13	0.093 ± 0.077	0.0012
CYP2E1	150 ± 16	0.30 ± 0.21	0.0020
CYP3A1	2280 ± 140	4.9 ± 4.6	0.0021
CYP3A2	1320 ± 330	0.64 ± 0.56	0.00048
OR	58 ± 4	98 ± 25	1.7

WAT, white adipose tissue.

Les niveaux d'ARNm ont été déterminés par RT PCR en temps réel, calculés en divisant le niveau d'ARNm de P450 par le niveau d'ARNm de RPS9 et sont donnés en unité arbitraire.

Figure III-1 : Niveaux relatifs d'ARNm des principaux facteurs de transcription impliqués dans les mécanismes d'induction des P450s dans le foie et le TA de rat (d'après (Yoshinari et al., 2004))



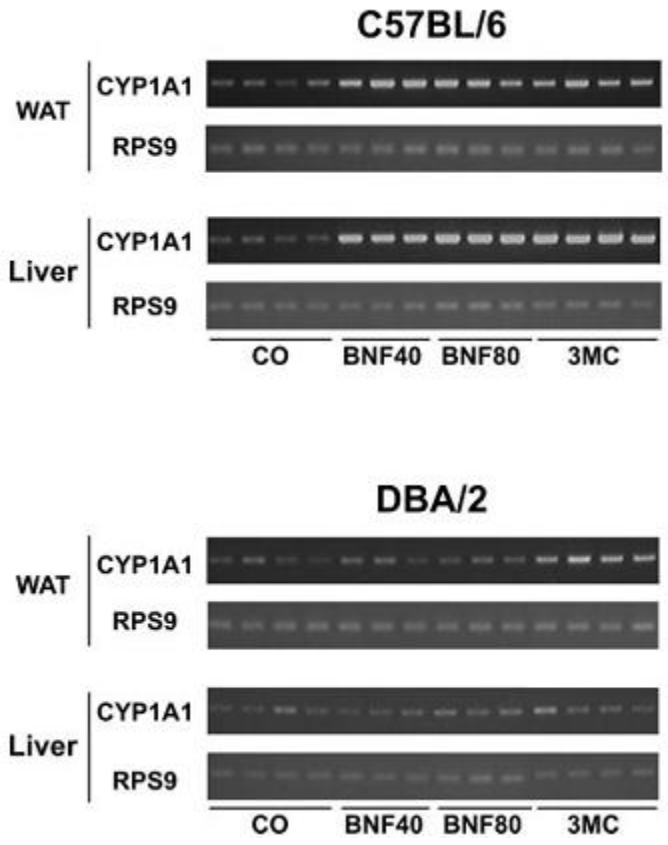
III.2.1 EMX de phase 1

Une première étude conduite chez le rat (Yoshinari et al., 2004) a montré la présence de certaines isoformes de P450s dans le TA blanc des animaux. Les niveaux d'expression de différentes isoformes de P450s ont été comparés à ceux du foie et les résultats ont montré des niveaux comparables d'ARNm entre le foie et le TA pour les CYP1A1 et 2B1, et une expression beaucoup plus importante du CYP1B1 dans le TA que dans le foie. Pour toutes les autres isoformes testées, le ratio AT/foie était inférieur à 0.001 (Table III-2). Les animaux ont ensuite été traités pendant trois jours avec des inducteurs classiques de P450s : le phenobarbital, la dexamethazone et la β-naphtoflavone (BNF), qui induisent respectivement les CYP2B, CYP3A et les CYP1. Les niveaux d'expression des P450s ont tous été augmentés après traitement avec les inducteurs, tant dans le foie quand dans le TA, avec d'importantes variations interindividuelles pour les CYP2B et 3A dans le TA. Enfin, les auteurs ont montré l'existence des ARNm de CAR, PXR, RXRα, AhR et Arnt, avec le ratio TA/foie le plus important pour AhR (Figure III-1).

Dans une deuxième étude (Yoshinari et al., 2006), les mêmes auteurs se sont concentrés sur la voie d'induction dépendante d'AhR. Des rats ont été traités pendant 24h avec de la BNF et les niveaux d'induction des CYP1A1 et CYP1B1 ont été comparés dans divers dépôts de TA. Les résultats montrent l'induction des CYP1 est beaucoup plus importante dans les TA viscéraux (épididymal, périrénal ou mésenterique) que dans le TA sous-cutané. De même, la comparaison des facteurs d'induction entre les adipocytes et les cellules de la fraction stoma-vasculaire au sein du TA épididymal montre que les adipocytes sont beaucoup plus sensibles à la BNF que les autres cellules du TA. Enfin, en utilisant une souche de souris ne répondant pas aux inducteurs d'AhR (DBA/2), les auteurs ont démontré que l'induction du CYP1A1 par la BNF dans le TA était médiée par AhR (Figure III-2).

Ces études ont ainsi montré pour la première fois dans le TA de rats et de souris l'existence de certaines isoformes de P450s des familles 1 à 3, ainsi que l'existence et la fonctionnalité des voies classiques d'induction de ces enzymes dans ce tissu.

Figure III-2 : Induction du CYP1A1 par la BNF chez des souris sensibles (C57BL/6) ou non (DBA/2) aux inducteurs de AhR (d'après (Yoshinari et al., 2006))



Les souris ont été traitées avec de l'huile de maïs (corn oil CO, vehicle), 40 ou 80 mg/kg de BNF (BNF40 ou BNF80), ou 40 mg/kg de 3 methylcholanthrene (3MC) 24h avant leur sacrifice. Les TA épididymaux et les foies ont été extraits pour une analyse par RT PCR. Chaque dépôt représente une souris différente.

III.2.2 EMX de phase 2

Tchernof et al. se sont intéressés au lien entre l'obésité et le métabolisme local des androgènes dans le TA humain (Tchernof et al., 1999). Ils ont ainsi recherché la présence des UGT2B15 et 2B17 dans le TA humain sous-cutané et viscéral. Les niveaux d'ARNm de l'isoforme UGT2B17 n'étaient quasiment pas détectables par PCR en temps réel (RT PCR), alors que ceux de l'UGT2B15 étaient élevés dans les deux types de TA, à des niveaux inférieurs à ceux trouvés dans le foie ou le poumon, mais comparables à ceux de la prostate, des testicules ou des glandes mammaires. Bien que leur intérêt premier fût le métabolisme local des androgènes, l'UGT2B15 possède aussi une activité de glucuronidation envers de nombreux xénobiotiques (Green et al., 1994), et cette étude permet donc de s'interroger sur le rôle de cette isoforme au sein du TA humain.

Barbier et al. ont recherché les mécanismes de régulation de l'UGT1A9, qui catalyse la glucuronidation de certains activateurs de PPAR comme le gemfibrozil, le fenofibrate et la troglitazone (Barbier et al., 2003). Ils ont montré, dans les cellules murines 3T3-L1 différenciées, l'induction de l'ARNm de l'UGT1A9 par la rosiglitazone, et la présence de peroxisome proliferator response elements (PPRE) dans le promoteur de cette enzyme. Ainsi, l'UGT1A9 semble être régulée au niveau transcriptionnel par PPARγ dans les adipocytes.
Enfin, plus récemment, la présence de l'UGT2A3 a été démontrée dans le TA humain, à des niveaux d'expression comparables à ceux du foie (Court et al., 2008). Celle des protéines de GSTM1, GSTP1/2 et de la GSTA4 a été démontrée dans des cellules 3T3-L1 différenciées ou non, et celle de la GSTA3, uniquement dans les cellules différenciées (Jowsey et al., 2003).

III.2.3 Etude globale

Dans une étude plus générale, Forner et al. ont comparé par spectrométrie de masse les protéomes mitochondriaux des TA blancs et bruns chez la souris (Forner et al., 2009). Etonnamment, une étude d'enrichissement de termes (Gene Ontology) en utilisant les protéines

mitochondriales les plus exprimées dans le TA blanc fait ressortir la voie métabolique « métabolisme des xénobiotiques et systèmes redox » parmi les voies les plus significatives. Les auteurs ont identifié des EMX de différentes phases dans ce TA blanc : le CYP2E1, des amines oxydases comme la FMO1, MAO-A et MAO-B, la carbonyl reductase, la quinone oxidoreductase, des esterases comme la triacylglycerol hydrolase, quelques GSTs (GST-1, GST-3, et GSTK1-1), ainsi que des isoformes de la famille des aldéhydes dehydrogénases. Ils concluent que les adipocytes blancs, comme les hépatocytes, pourraient avoir un rôle important dans la transformation des xénobiotiques et que les mitochondries joueraient un rôle dans cette nouvelle fonction des adipocytes.

Il semble ainsi exister au sein du TA quelques enzymes possédant des capacités de métabolisation des xénobiotiques. Cependant, cette capacité de métabolisation *in situ* des xénobiotiques a été peu étudiée, et seules deux études se sont, jusqu'à présent, directement intéressées au TA humain (Tchernof et al., 1999) (Court et al., 2008).

III.3 Toxicité directe des xénobiotiques environnementaux sur le TA

Les conséquences de l'exposition aux xénobiotiques environnementaux ont été étudiées principalement en lien avec des maladies comme le cancer, la neurotoxicité, les anomalies de développement de l'appareil reproducteur… Comme annoncé dans l'avant-propos de cette thèse, certains auteurs ont récemment énoncé des hypothèses liant les xénobiotiques et diverses maladies métaboliques liées au TA, comme l'obésité. L'obésité, le diabète ou d'autres perturbations métaboliques ne sont pas uniquement causés par des perturbations du fonctionnement du TA, mais ces perturbations existent et contribuent au développement de chacune de ces maladies. Ainsi, comprendre comment les xénobiotiques peuvent perturber directement le fonctionnement du TA est essentiel pour comprendre leur rôle potentiel dans le développement de ces pathologies. La suite de ce chapitre est une revue, la plus exhaustive

possible, des différentes études qui se sont intéressées au lien direct entre exposition aux xénobiotiques environnementaux et fonctionnement du TA.

III.3.1 Effet des xénobiotiques sur le poids corporel

De nombreuses revues posent aujourd'hui la question de la relation entre polluants environnementaux et obésité, essayant de comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels différents polluants pourraient influer sur le développement ou l'expansion du TA (Grun and Blumberg, 2006) (Grun and Blumberg, 2009) (Rubin and Soto, 2009). Nous allons chercher à décrire, dans un premier temps, quels sont les xénobiotiques qui ont effectivement montré une capacité à influer sur le poids corporel ou sur celui du TA, d'abord chez l'Homme, puis dans des études animales.

III.3.1.1 Etudes épidémiologiques

Les études épidémiologiques menées ces dernières années se sont souvent concentrées sur les liens entre l'exposition des populations à des polluants et les maladies du syndrome métabolique en général (diabète, hypertension, maladies cardiovasculaires, hyperlipidémies…). Certaines cependant, ont fait un lien entre l'exposition à un xénobiotique en particulier et l'indice de masse corporelle (IMC) ou d'autres indicateurs d'une perturbation de la masse adipeuse d'un individu.

Stahlhut RW et al. ont par exemple montré une corrélation significative entre les concentrations urinaires de métabolites de différents phthalates et le tour de taille chez des hommes participant à la National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) aux Etats-Unis entre 1999 et 2002 (Stahlhut et al., 2007). Une association similaire a été démontrée entre les concentrations plasmatiques de pesticides organochlorés, et celles de PCBs, et le tour de taille dans une population d'adultes américains non diabétiques ayant participé à la même étude (Lee et al., 2007). De même, si la plupart de études épidémiologiques menées sur la TCDD

s'intéressent à ses effets diabétogènes (pour revue voir (Remillard and Bunce, 2002)), certaines ont montré une corrélation significative entre l'IMC et les concentrations plasmatiques de TCDD (Henriksen et al., 1997) (Longnecker and Michalek, 2000).

Enfin, d'autres études montrent clairement le lien de cause à effet entre l'exposition *in utero* des individus et les risques accrus de surpoids. Par exemple, Smink et al. ont mesuré les concentrations en HCB dans le cordon ombilical de 482 enfants et montré qu'à 6 ans, les enfants les plus exposés au HCB *in utero* avaient un IMC plus important et un risque accru de surpoids et d'obésité, indépendamment du poids de leur mère (Smink et al., 2008).

III.3.1.2 Etudes sur les animaux

a. Ligands de AhR

L'exposition à la TCDD induit dans de nombreux modèles animaux (rats, souris, cochons d'inde) un syndrome de cachexie (« wasting syndrome »), c'est-à-dire une perte de poids importante, ainsi qu'une réduction de la prise alimentaire (hypophagie), du temps de repos et de la consommation totale en oxygène. On a d'abord pensé que la sous-alimentation était responsable de la perte de poids observée chez les animaux (Kelling et al., 1985), mais il est maintenant admis qu'elle est une conséquence et non pas la cause de la toxicité de la TCDD (Seefeld et al., 1984a). Cette perte de poids s'accompagne d'une perte importante de la masse adipeuse, et l'hypothèse qui domine aujourd'hui est que la TCDD agit sur le métabolisme et le transport du glucose au niveau de plusieurs organes (tissu adipeux, pancréas, cerveau, foie) (Enan et al., 1992a) (Viluksela et al., 1999).

Des souris C57BL/6, des souris AhR-/- et des souris ApoE-/- ont été traitées avec un congénère coplanaire de PCB : le PCB77, un ligand d'AhR (Arsenescu et al., 2008). Chez les souris sauvages, mais pas chez les AhR-/-, le PCB77 a induit une augmentation du gain de poids. Chez les souris hypercholesterolémiques ApoE-/-, le PCB77 a induit de même une augmentation du gain de poids, associée à une hypertrophie des adipocytes épididymaux, une expansion des TA

épididymaux et retropéritonéaux, et des dépôts adipeux ectopiques. Les résultats de cette étude semblent montrer que l'exposition au PCB77 est capable d'induire le gain de poids et une augmentation de la masse adipeuse chez les souris, et que cet effet est médié par AhR. Au contraire, dans une autre étude, les même souris C57BL/6 traitées avec le même congénère dilué dans la nourriture pendant 16 semaines ont montré une réduction de leur poids (Goodwill et al., 2007).

Ces résultats contradictoires peuvent peut être s'expliquer par la différence dans les doses de PCB administrées aux souris dans les deux cas. Goodwill et al. ont donné aux souris 30 mg/kg/jour dans la nourriture pendant 16 semaines, alors qu'Arsenescu et al. ont injecté par voie intrapéritonéale, 4 fois 49 mg/kg sur 6 semaines. La dose injectée dans l'étude d'Arsenescu et al. est plus importante dans l'absolu, mais bien moins cumulative, et rapportée aux temps respectifs des deux études, on peut considérer que ces auteurs ont étudié des doses plus faibles que leurs collègues.

De ces 2 études, on peut donc conclure que les doses d'exposition étudiées sont de la plus grande importance dans ces études de gain de poids ou de modulation de la masse adipeuse. Dans le cas du PCB77, il semble que contrairement à des fortes doses qui semblent induire une perte de poids rappelant le syndrome de cachexie induit par une forte exposition à la TCDD, de plus faibles doses induisent un effet contraire en augmentant le poids des animaux, via le récepteur AhR.

b. Tributyline (TBT)

Des souris mâles exposées à de faibles doses de TBT (0.5, 5 et 50 mug/kg) pendant 45 jours ont montré une augmentation de leur gain de poids (Zuo Z 2009). Dans une autre étude, lorsque des souris C57BL/6 enceintes sont exposées au TBT à des doses comparables (0.05 et 0.5 mg/kg ; injection intra-péritonéale) quotidiennement à partir du 12e jour de gestation jusqu'à leur accouchement, le poids des nouveau-nés à la naissance et dans les 10 semaines suivant la naissance n'est pas différent de celui de leurs homologues non traités au TBT. Par

contre, on observe une augmentation du poids des dépôts adipeux épididymaux chez ces animaux. L'exposition *in utero* des grenouilles Xenopus Leavis montre des perturbations similaires, puisque les auteurs rapportent une augmentation dose dépendante des tissus adipeux à l'intérieur et autour des gonades chez les deux sexes. Ainsi, les conclusions de cette deuxième étude sont que le TBT est capable d'augmenter l'adiposité des vertébrés, sans changement de poids (Grun et al., 2006).

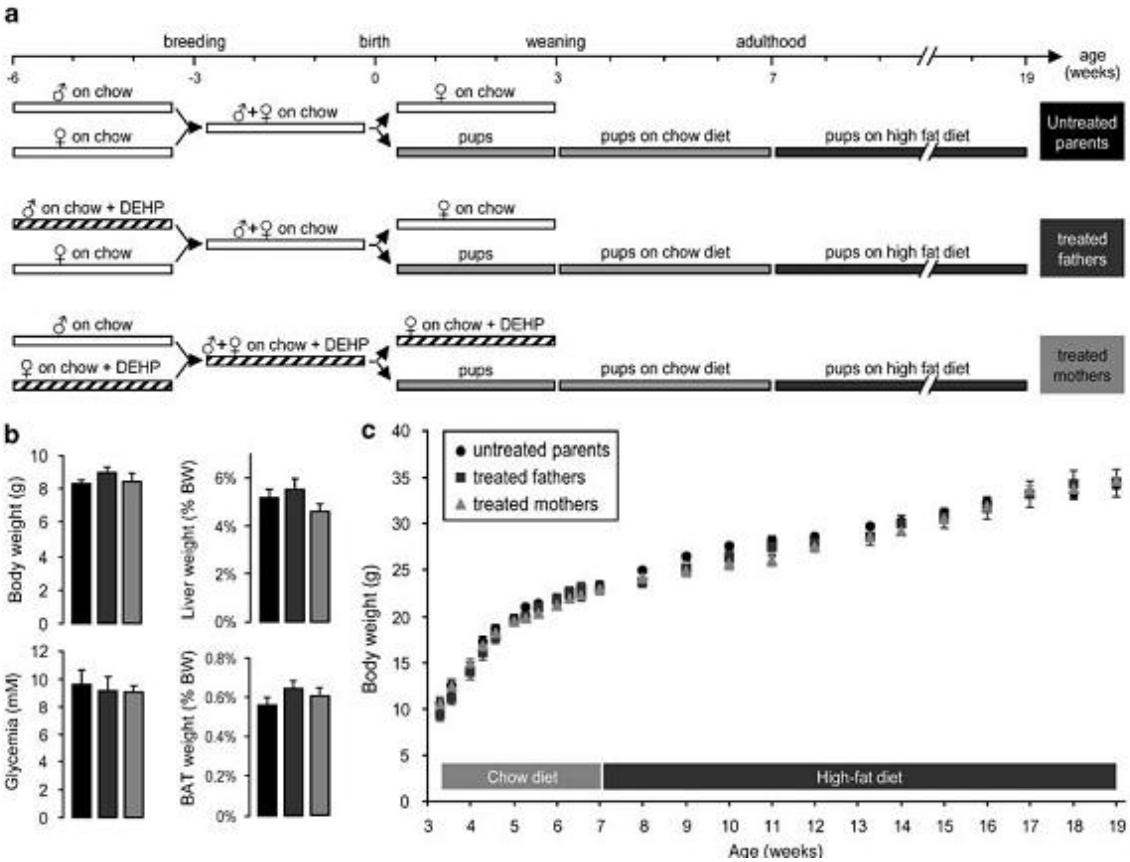
Le mécanisme supposé d'action du TBT est différent de celui du PCB77, puisque le TBT est un ligand commun de PPARγ et de RXR. Cependant, il reste possible que, comme dans le cas du PCB77, les différences de résultats entre les 2 études (gain de poids dans le 1e cas, gain de tissu adipeux sans changement de poids dans l'autre), soient dues aux différences de doses utilisées. En effet, les doses utilisées sont bien plus faibles dans le 2e cas que dans le 1e, et l'exposition *in utero* est difficilement comparable à celle de souris déjà adultes.

Une exposition prolongée au TBT semble induire une augmentation du tissu adipeux chez les animaux.

c. 2-Diethylhexyl phthalate (DEHP)

Des souris C57BL/6 mâles adultes ont été traitées pendant 10 jours avec 2% (g/g) de DEHP dissout dans la nourriture des animaux (Xie et al., 2002). Cela correspond à une dose de 3200 mg/kg/jour de DEHP. Les souris traitées au DEHP ont, après 10 jours, un poids inférieur de plus de 30% par rapport aux souris témoins (18.3 g vs 27 g). Ce phénomène s'accompagne d'une disparition totale des dépôts adipeux épididymaux et rétropéritonéaux chez ces souris. Ces phénomènes semblent médiés par le récepteur PPARα, puisqu'aucune différence de poids n'est observé chez les animaux PPARα-/- traités au DEHP. Par analogie avec les autres proliférateurs de peroxisomes avec lesquels les animaux ont été traités et pour lesquels les dépôts adipeux n'ont pas complètement disparus, les auteurs, en mesurant le contenu en ADN constant dans

Figure III-3 : Effets de l'exposition trans-générationnelle et *in utero* au DEHP sur l'homéostasie métabolique (d'après (Casals-Casas et al., 2008))



(**a**) Protocole expérimental : Des souris C57Bl6/J mâles et femelles ont été nourries pendant 3 semaines avec un régime standard, supplémenté soit avec de l'huile de tournesol (vehicle), soit avec du DEHP à une concentration moyenne de 200 mg/kg/jour. Ces animaux ont ensuite été « bred » pour donner naissance à des souriceaux chez lesquels l'effet trans-générationnel et in utero du DEHP a pu être évalué. Dans la portée contrôle, les males et les femelles n'ont pas été traités et ont donné naissances aux individus nommés « untreated parents ». 2 autres groupes ont résulté de l'accouplement entre des femelles non traitées et des mâles traités au MEHP avant l'accouplement (« treated fathers ») ou de celui de mâles non traités et de femelles traitées avant l'accouplement (« treated mothers »). Les animaux nouveau-nés ont été nourri sous régime standard pendant 4 semaines, du sevrage jusqu'à l'âge adulte, puis avec un régime hyperlipidique pendant 12 semaines. (**b**) Des paramètres métaboliques ont été analysés chez les animaux de 3 semaines, « untreated parents » en noir, « treated fathers » en gris foncé, « treated mothers » en gris clair, (n=8 par groupe). (**c**) Courbes de croissance des animaux sous régime standard et hyperlipidique (n=8 par groupe).

ces dépôts, concluent que cette atrophie du tissu adipeux est due à une perte des TG dans les adipocytes plutôt qu'à une diminution du nombre d'adipocytes. Les auteurs ont de plus remarqué une augmentation de l'activité de HSL et une diminution de celle de LPL dans le TA des animaux traités.

Sur cette même souche de souris, les conséquences métaboliques du mono-2-éthylhexyl-phthalate (MEHP), principal métabolite du DEHP, ont été testées avec un protocole très complet sur plusieurs générations décrit sur la Figure III-3 (Casals-Casas et al., 2008). Le gain de poids a été surveillé, de la naissance à l'âge adulte, chez les nouveau-nés issus de mâles traités au MEHP avant la conception, ou de femelles traitées au MEHP pendant la gestation et la lactation, à la dose de 200 mg/kg/jour (dans la nourriture). Ces animaux ont ensuite été soumis à un régime hyper lipidique pour induire l'obésité. Les résultats de cette étude n'ont montré aucune différence entre les animaux nés de pères ou de mères traités et les animaux contrôles, ni dans la phase de croissance normale de animaux, ni lors du développement de l'obésité. D'autres paramètres comme le poids des TA blanc ou brun ou le niveau de glucose sanguin n'ont pas été affectés non plus par le traitement. Ainsi, bien que l'exposition *in utero* des animaux aux phthalates puisse causer des perturbations sexuelles ou dans le développement, les auteurs concluent qu'il est peut probable que cette même exposition résulte en des perturbations métaboliques à l'âge adulte.

Des rats Sprague-Dawley (SD) mâles pré pubères (âgés de 3 semaines) ont été traités avec 1% de DEHP dans la nourriture (correspondant à une dose de 900 mg/kg/jour) pendant 7 ou 14 jours (Suna et al., 2007). A la fin du traitement, les rats traités étaient plus légers que les contrôles, avec une différence de poids de 11%.

Ge et al. (Ge et al., 2007) ont traité des rats Long-Evans pré pubères pendant 28 jours par gavage avec des doses de DEHP de 10, 500 ou 750 mg/kg/jour. L'exposition de ces rats prépubères à la plus haute dose confirme les résultats précédents : les rats traités avec 750 mg/kg/jour de DEHP sont en effet plus légers de 15% par rapport aux rats contrôles. Par contre, les rats traités avec la plus faible dose (10 mg) présentent eux une légère augmentation de leur poids (+8%). C'est la première étude qui laisse à penser que les relations entre l'exposition au DEHP et le poids pourraient suivre une courbe dose-réponse non monotone, une faible dose

entrainant un gain de poids alors que les fortes doses entraineraient une diminution du poids. Cette courbe en U a été observée par les auteurs pour d'autres paramètres (délai pour atteindre la puberté, sécrétion hormonale…).

Chez Supornsilchai et al. (Supornsilchai et al., 2007), des rats SD âgés de 16, 36 ou 56 jours ont été gavés avec 750 mg/kg/jour de DEHP pendant seulement 4 jours et aucune influence sur le poids n'a été observée. Mais peut être que la durée de l'étude ne convenait pas à l'observation d'un tel phénomène.

Cependant, chez Kamijo Y. (Kamijo et al., 2007), des souris SV/129 mâles adultes, sauvages ou PPARα-/- ont été exposées au DEHP (10 mg/kg/jour ou 50 mg/kg/jour dissout dans la nourriture) pendant 22 mois. Sur une durée bien plus longue que lors de l'étude précédente, les auteurs n'observent pas non plus de différence significative sur le poids des animaux après 6, 12 et 22 mois de traitement.

Il est possible que les différences observées dans toutes ces études résultent des différences dans les espèces utilisées. En effet, Isenberg et al. (Isenberg et al., 2000) ont montré que les liens entre l'exposition au DEHP et le poids pouvaient fortement varier d'une espèce à l'autre. Ils ont traité des adultes mâles rats (Fisher 344), souris (B6C3F1) et hamsters (Syrian Golden) avec des doses de 6000 et 20000 ppm pour les rats, 500 et 6000 ppm pour les souris et 1000 et 6000 ppm pour les hamsters dans la nourriture pendant 2 ou 4 semaines. Les résultats montrent pour les rats à la plus haute dose une diminution significative du gain de poids. Pour les souris, une augmentation significative de ce gain de poids, pour la faible dose mais pas la forte dose, et pour les hamsters, une augmentation du gain de poids pour la faible dose aussi, mais seulement après 2 semaines.

L'exposition au DEHP peut ainsi induire parfois une diminution, parfois un gain de poids chez les animaux traités. Certaines études montrent que de grandes différences inter-espèces existent dans l'influence du DEHP sur le poids total, ainsi que des différences importantes entre les faibles et les fortes doses.

d. Bisphénol A (BPA)

En ce qui concerne les expositions post-natales au BPA et le poids, une première étude effectuée sur des nouveau-nés rats mâles qui ont reçu une injection de 50 µg/kg/jour pendant 4 jours juste après leur naissance a montré que les animaux traités étaient significativement plus lourds que les contrôles 68 jours après leur naissance (Patisaul and Bateman, 2008). Dans une autre étude, des femelles souris CD-1 ont été traitées entre le 1e et le 5e jour après leur naissance avec 10 µg/kg/jour (injection sous-cutanée). A 18 mois, le poids de ces animaux était supérieur de 11% par rapport aux contrôles, mais cette différence n'était pas significative (Newbold et al., 2007). Enfin, dans une autre étude, des souris ICR enceintes nourries avec un régime hyperlipidique ont été exposées au BPA à partir de leur 10e jour de gestation et pendant toute leur période de lactation (BPA dilué dans l'eau, 0.26 ou 2.7 mg/kg/jour). Après la naissance, les animaux ont continué à être exposés. Le poids total et celui des tissus adipeux étaient plus élevés 31 jours après la naissance, à la fois chez les mâles et les femelles (Miyawaki et al., 2007). Cette étude fait apparaître d'importantes différences intersexes dans la réponse au BPA, ainsi que des différences entre la haute et la faible dose. En ce qui concerne le poids total des animaux par exemple, le gain de poids était de 13% et 11% chez les femelles pour la faible et la haute dose, et respectivement non significatif et + 22% chez les mâles. Encore plus frappant, chez les femelles, le poids du TA était très fortement augmenté à la faible dose (+ 137%) et pas à la forte dose, et chez les mâles au contraire, on observe un augmentation de 59% du poids du TA pour la forte dose et rien dans la faible dose.

Des résultats similaires se retrouvent chez les animaux exposés *in utero* au BPA. Rubin et al. ont exposé des femelles rats SD enceintes au BPA (faible dose 0.1 mg/kg/jour, forte dose 1.2 mg/kg/jour, dilué dans l'eau), du 6e jour de gestation jusqu'à la fin de la période de lactation (Rubin et al., 2001). Le poids des jeunes animaux a été suivi de leur naissance jusqu'à leur 110e jour. Les mâles comme les femelles exposés avaient un poids plus élevé que les contrôles, et cet écart de poids était plus persistant chez les femelles. De plus, chez les femelles, cet effet était dose dépendant, la faible dose entrainant un gain de poids important et pas la forte dose. Cette

courbe dose-réponse non monotone se retrouve encore chez des souris femelles CD-1 nées de mères traitées avec 0.5 ou 10 mg de BPA/kg/jour entre les jours 15 et 18 de gestation (injection sous-cutanées) (Nikaido et al., 2004). Des accroissements de poids non significatifs ont été observés chez les souris exposées *in utero* à 4 ou 8 semaines, qui étaient très évidents à 12 et 16 semaines. Encore une fois, les femelles nées de mères exposées à la plus faible dose de BPA étaient plus lourdes que celles nées de mères exposées à la forte dose.

D'autres études confirment ce lien entre exposition prénatale au BPA et gain de poids. Des souris CD-1 exposées à 2 µg/kg/jour entre les jours 11 et 17 de gestation (dans la nourriture) présentent une différence de poids en faveur du groupe de souriceaux nés de mères exposées au moment du sevrage, alors qu'aucune différence n'était visible au moment de la naissance (Howdeshell et al., 1999).

Enfin, Tyl et al. ont effectué une étude de la reprotoxicité du BPA sur 3 générations de rats SD, en utilisant des doses de BPA de 0.001, 0.02, 0.3, 50 et 500 mg/kg/jour administrées oralement (v*ia* l'alimentation) pendant une période de 10 semaines avant la reproduction et jusqu'à la fin de la lactation (Tyl et al., 2002). Pour toutes les générations, et pour les deux sexes, ils ont observés chez les adultes une diminution du poids et du gain de poids dans les groupes traités avec 50 et 500 mg de BPA. Chez les nouveau-nés, du 7e jour après la naissance jusqu'au sevrage, le poids corporel des animaux traités avec 500 mg de BPA était aussi réduit.

L'exposition d'animaux au BPA montre la plupart du temps une corrélation positive entre l'exposition et une augmentation du gain de poids, que l'exposition ait lieu *in utero* ou après la naissance, avec de fortes variation inter-sexes et une courbe dose-réponse potentiellement non monotone.

Ainsi, si l'on effectue une revue des études publiées sur les effets de ces différents xénobiotiques sur le poids, on voit que pour la plupart d'entre eux, il est difficile de conclure à leur effet obésogène ou au contraire amaigrissant, tant les différences interespèces, intersexes et entre les faibles et les fortes doses semblent importantes. Une autre façon de s'intéresser à

cette question est de déterminer si ces polluants sont capables d'induire la différenciation adipocytaire.

III.3.2 Effet des xénobiotiques sur l'adipogenèse

Pour étudier l'effet des xénobiotiques sur l'adipogénèse, la plupart des auteurs ont utilisé des modèles de différenciation adipocytaire *in vitro*, principalement la lignée murine 3T3-L1.

a. 2,3,7,8-Tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD)

Philipps et al. ont été les premiers à démontrer l'action antiadipogénique de la TCDD. Ils ont montré que le traitement de cellules 3T3-L1 avec de la TCDD (10nM) lors de l'induction de la différentiation (i.e. lors du traitement avec de l'IBMX et de la dexa) entrainait une diminution drastique du nombre de colonies lipidiques dans les cellules, et que ce phénomène était dépendant de AhR (Phillips et al., 1995). Un traitement plus tardif des cellules à la TCDD, i.e. après la phase initiale de différenciation n'a aucune influence sur la différenciation adipocytaire. De façon remarquable, ces résultats semblent dépendre de la lignée cellulaire utilisée, puisque les mêmes auteurs rapportent que dans les cellules 3T3-F442A le traitement à la TCDD ralentit le processus de différenciation sans pour autant l'empêcher complètement.
D'autres études (Chen CL 1997, Alexander DL 1998, Hanlen PR 2002) ont confirmé cette action anti-adipogénique de la TCDD sur d'autres lignées (C3H10T1/2), toujours avec la même condition de traitement à la TCDD avant l'induction de la différentiation adipocytaire (Alexander et al., 1998) (Hanlon et al., 2003). Ces résultats sont enfin cohérents avec une étude originale dans laquelle des rats SD mâles ont été intubés avec 175 µg/kg de TCDD pendant 2 à 8 jours (Brodie et al., 1996). Les dépôts adipeux épididymaires ont ensuite été récoltés et la fraction stoma-vasculaire des dépôts mise en culture primaire. Après 7 jours de culture, les cellules issues d'animaux traités présentaient moins de gouttelettes lipidiques et une activité réduite de la glycerol-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH).

b. Endrine

D'autres pesticides ont démontré une capacité similaire à inhiber la différentiation adipocytaire. Ainsi, le pesticide endrine est capable lui aussi d'inhiber l'adipogénèse dans les cellules 3T3-L1, s'il est ajouté au milieu de culture avant ou pendant le traitement des cellules avec leur milieu de différenciation, il est inefficace ajouté après cette phase de différenciation (Moreno-Aliaga and Matsumura, 1999). Cette inhibition de la différenciation est très certainement liée au fait que l'endrine est capable de diminuer la liaison de C/EPBα à l'ADN.

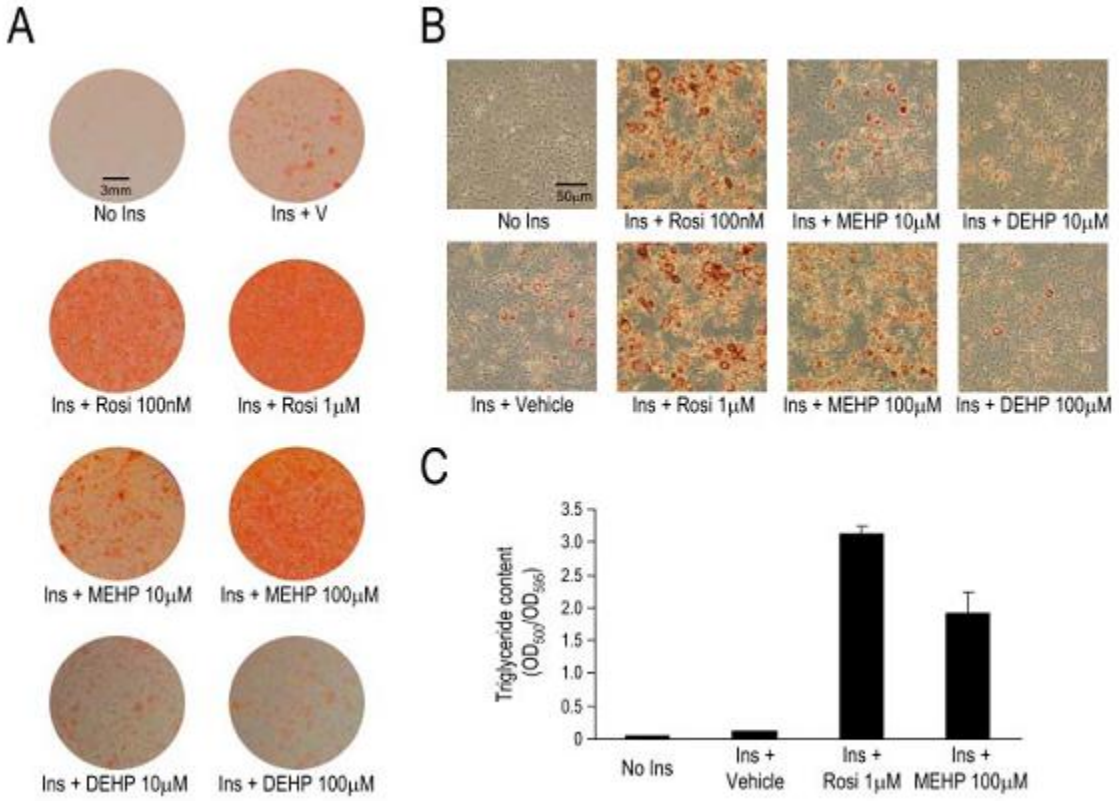
c. Dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT)

Au contraire, le DDT est capable lui d'induire la différenciation adipocytaire des cellules 3T3-L1, de façon concentration-dépendante (Moreno-Aliaga and Matsumura, 2002). Le traitement des cellules au DDT induit l'expression de C/EBPα et la liaison de ce dernier à l'ADN, phénomène suffisant à lui seul pour induire la différenciation adipocytaire, ainsi que l'expression de PPARγ. Cependant, ces effets semblent dépendant du modèle cellulaire, puisque le traitement des cellules 3T3-F442A au DDT à une concentration qui induisait la différenciation dans les 3T3-L1, entraine une diminution de la quantité de lipides dans les cellules, ainsi qu'une diminution de C/EBPα.

d. Polychlorobiphényls (PCB)

Le PCB77, ligand de AhR, montre lui des effets dose-dépendant sur la différenciation des cellules 3T3-L1 (Arsenescu et al., 2008). A faible dose (3.4 µM), le traitement des 3T3-L1 un jour avant l'induction de la différenciation jusqu'à 8 jours après entraine une augmentation de l'adipogénèse. Au contraire, des doses plus importantes (34 ou 68 µM) entrainent des effets comparables à ceux de la TCDD en inhibant cette différenciation cellulaire.

Figure III-4 : Le MEHP induit l'adipogenèse dans les cellules 3T3-L1 (d'après (Feige et al., 2007))



Des cellules 3T3-L1, 2 jours après confluence, ont été traitées pendant 10 jours sans insuline (Ins) ou avec 10µg/ml d'insuline avec le solvant (Vehicle Me_2SO, 1%), ou les ligands rosiglitazone (Rosi) ou MEHP aux concentations indiquées. Après une coloration au Red Oil O, les puits en entier (A) ou des zones représentatives (B) ont été photographiées. Le contenu en triglycérides à été déterminé sur les lysats cellulaires par un dosage colorimétrique (500 nm) et normalisé par rapport à la quantité totale de protéines mesuré par la méthode de Bradford (595 nm) (C).

e. Tributyline (TBT)

Le traitement des 3T3-L1 avec la TBT (10 nM pendant 48 h en même temps que l'induction de la différenciation) est capable d'augmenter l'adipogénèse dans ces cellules, même en absence d'IBMX. Cet effet est indépendant de PPARγ puisqu'un co-traitement des cellules avec un antagoniste de PPARγ ne change pas cette induction de la différenciation (Inadera and Shimomura, 2005). Une autre étude confirme que le traitement des 3T3 L1 avec le TBT augmente la différenciation adipocytaire, mais ces auteurs montrent aussi par des essais *in vitro* que le TBT est un ligand de PPARγ et de RXR et concluent que cette induction de la différenciation se fait très probablement par la liaison du TBT à PPARγ (Kanayama et al., 2005).

f. Mono-2-éthyl-hexyl-phthalate (MEHP)

Le MEHP présente des caractéristiques similaires au TBT. Il a tout d'abord été décrit comme un activateur de PPARα et PPARγ *in vitro* (Maloney and Waxman, 1999), puis comme un activateur sélectif de PPARγ dans des 3T3-L1 (Feige et al., 2007). Enfin, le traitement des 3T3-L1 avec le MEHP induit la différenciation adipocytaire, cet effet étant médié par PPARγ (Figure III-4).

g. Bisphenol A (BPA)

Enfin, plusieurs études concordent sur l'effet adipogénique du BPA capable d'induire le processus de différenciation des cellules 3T3-L1 et d'accélérer leur conversion en adipocytes (Masuno et al., 2002) (Masuno et al., 2005). Le BPA n'est pas capable de se lier à PPARγ (Wright et al., 2000) et son effet adipogénique semble plutôt passer par l'activation de la voie PI3 kinase-Akt (Masuno et al., 2005).

Il semble ainsi que la TCDD et un autre pesticide organocholoré, l'endrine, soit capable d'inhiber la différenciation adipocytaire, au moins au tout début du processus. Pour le DDT, les résultats semblent plus mitigés, et très dépendant de la lignée cellulaire utilisée. De même pour le PCB77, un ligand d'AhR, les résultats sont discordants entre des faibles doses, induisant la différenciation adipocytaire, et des fortes doses, l'inhibant. Enfin, les études menées sur le TBT, le MEHP et le BPA semblent montrer leur capacité à induire la différenciation des cellules 3T3-L1. Il est intéressant de noter que pour les rares composés pour lesquels cela a été testé, des différences significatives ont été observées entre les différentes lignées cellulaires testées (TCDD et endrine), ainsi que d'importantes différentes entre les faibles et les fortes doses (PCB77).

III.3.3 Autres effets sur le TA

Enfin, indépendamment des constatations directes des effets des xénobiotiques sur la différenciation adipocytaire ou le gain de poids, quelques études se sont intéressées aux mécanismes de toxicité et à la perturbation des fonctions métaboliques et sécrétrices du TA.

a. 2,3,7,8-Tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD)

Un des effets de l'exposition à la TCDD est dans de nombreuses espèces, l'apparition d'un syndrome de cachexie. Les animaux exposés à la TCDD présentent une perte de poids prolongée due à la perte à la fois de masse maigre et de TA, dont le mécanisme n'est pas encore bien compris. Parmi les changements biochimiques observés dans le TA de ces animaux lors de cette cachexie, on trouve : une activité réduite de la LPL accompagnée d'une hyperlipidémie plasmatique (Brewster and Matsumura, 1984), une captation réduite de glucose, certainement due à des effets sur la quantité et/ou l'activité du transporteur GLUT4 (Enan et al., 1992b) (Olsen et al., 1994), des changements dans la phosphorylation de protéines (Enan and Matsumura, 1993) et une induction de la peroxydation lipidique (Ashida et al., 1996). Certains de ces phénomènes sont liés à la liaison de la TCDD au récepteur Ah, comme la captation de

glucose (Olsen et al., 1994) ou la diminution de l'activité de la LPL (Olsen et al., 1998), et d'autres en sont clairement indépendants, comme la peroxydation lipidique.

Beaucoup de ces observations ont été effectuées sur des cochons d'Inde mâles (Brewster and Matsumura, 1984) (Enan and Matsumura, 1993) (Ashida et al., 1996) ou les cellules 3T3-L1 (Olsen et al., 1994; Olsen et al., 1998). Cependant, il est important de noter que des différences inter espèces ont été observées pour certains de ces effets (diminution de l'activité de la LPL et augmentation des triglycérides plasmatiques (Brewster and Matsumura, 1989), captation du glucose (Enan et al., 1996)), ainsi que d'importantes différences inter sexes à la fois dans les effets dus à l'exposition du TA à la TCDD mais aussi certainement dans les mécanismes déclenchés lors de cette exposition (Enan et al., 1996).

Enfin, le traitement de cellules 3T3-F442A différenciées avec de la TCDD induit la sécrétion de TNFα (Kern et al., 2002). Sous certaines conditions, la TCDD peut induire une réponse lipolytique dans des cellules 3T3-L1 différenciées, potentialisée par un co-traitement avec du TNFα (Li et al., 2007).

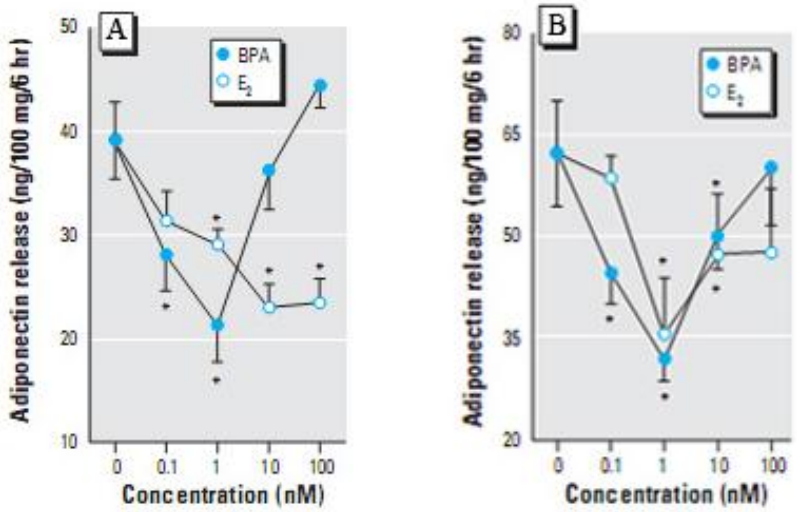
b. Polybromodiphényléthers (PBDE)

Le traitement de rats SD mâles adultes avec une mixture de penta-BDE par gavage montre que ces composés sont capables d'altérer la sensibilité hormonale des adipocytes. En effet, les adipocytes isolés des rats traités au PBDE, stimulés par un agoniste β, ont un taux de lipolyse plus élevé que les adipocytes des rats contrôles, et un taux plus faible d'oxydation du glucose stimulée par l'insuline (Hoppe and Carey, 2007).

c. Bisphénol A (BPA)

Une étude récente a montré que le BPA était capable d'inhiber la sécrétion d'adiponectine par le TA humain, à la fois dans des explants et des adipocytes isolés (Hugo et al., 2008). Cet effet est beaucoup plus marqué à des doses très faibles de BPA (0.1 nM), qu'à des doses plus fortes (aucun effet à 100 nM), rappelant la courbe dose-réponse en U déjà obtenue

Figure III-5 : Le BPA inhibe la sécrétion d'adiponectine dans des explants de TA humain (d'après (Hugo et al., 2008))



Courbe dose-réponse typique de la sécrétion d'adiponectine dans des explants de TA de sein (A) ou de TA sous-cutané abdominal (B) pour une patiente, après traitement avec du bisphénol A (BPA) ou de l'œstradiol (E_2).

pour le BPA dans certaines études de gain de poids (Figure III-5) Cette étude souligne ainsi que ce composé est très actif à des doses d'exposition environnementale.

d. Polychlorobiphényls (PCB)

Le PCB-77 et la TCDD diminuent eux-aussi la sécrétion d'adiponectine par les cellules 3T3-L1 lors de la différenciation des cellules en adipocytes. La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, KC-1 ou MCP-1 est, elle, augmentée par des faibles doses de PCB-77, et diminuée à plus forte dose (Arsenescu et al., 2008).

e. Phthalates

Le diisobutylphthalate (DiBP) est capable lui aussi d'altérer la sécrétion d'adipokines *in vivo* (Boberg et al., 2008). Des rats Wistar femelles enceintes ont été gavées avec 600 mg/kg/jour de DiBP ou 1 mg/kg/jour de rosiglitazone, pendant 14 jours (du 7e au 21e jour après la reproduction). L'exposition *in utero* au DiBP a entrainé chez les fœtus mâles et femelles une très légère baisse de poids (-10% par rapport aux contrôles), et une diminution des niveaux plasmatiques de leptine et d'insuline pour les 2 composés, suggérant un mécanisme d'action commun par leur interaction avec les récepteurs PPAR. Cette étude montre ainsi pour la première fois que la période prénatale peut être une période sensible pour la mise en œuvre des perturbations métaboliques liées à l'exposition aux phthalates.

III.3.4 Conclusion

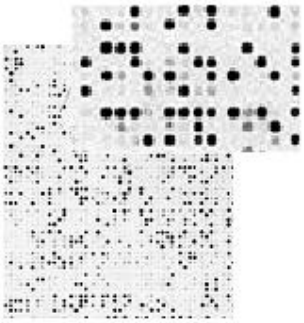
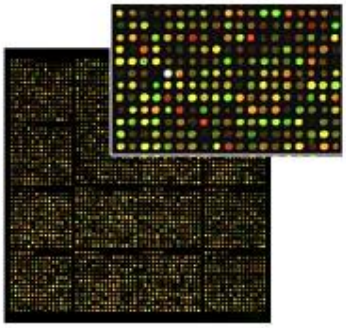
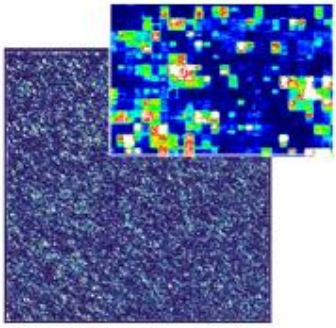
Les effets directs des xénobiotiques sur le TA humain peuvent être nombreux : induction ou inhibition de la différenciation adipocytaire, perturbations des fonctions métaboliques (lipolyse, captation du glucose…) et sécrétoires (leptine, TNFα, adiponectine…) des adipocytes. Cependant, ces effets semblent souvent dépendre des doses d'exposition utilisées, des modèles utilisés et parfois même du sexe. Les mécanismes par lesquels ces xénobiotiques interagissent avec le TA sont ainsi la plupart du temps peu clairs. L'utilisation d'outils permettant d'amener à une vision plus globale de ces toxicités, non biaisée par des connaissances *a priori* des mécanismes de toxicité de ces composés dans d'autres modèles ou d'autres conditions, pourrait peut être permettre d'améliorer notre compréhension des interactions entre xénobiotiques et TA. Ces outils « globaux » et « sans *a priori* » sont présentés dans le chapitre suivant.

CHAPITRE IV : LES TECHNIQUES – OMIQUES, ET LEURS APPLICATIONS EN TOXICOLOGIE

Le terme « omique » désigne les techniques capables de générer un jeu de données complet de ce qu'elles cherchent à mesurer : que ce soit les transcripts (transcriptomique), les protéines (protéomique) ou les métabolites (métabonomique). Une première question que l'on peut se poser est «quand la mesure de quelques paramètres dans une famille moléculaire devient-elle une omique» ? La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) des biofluides par exemple, existe depuis aussi longtemps que la RMN elle-même (Matthews et al., 1982). La différence se situe dans la connaissance des paramètres mesurés et l'attente quant aux résultats qui vont être obtenus. L'analyse RMN des biofluides est typiquement conduite avec une connaissance *a priori* des paramètres à mesurer et de ce qu'ils reflètent. Elle confirme l'hypothèse que la mesure d'un ou la combinaison de plusieurs paramètres révèlent quelque chose sur une cible définie. Dans une approche « omique », l'hypothèse est que le profil de réponse de nombreux analytes reflète un changement dans la physiologie, indicatif de l'efficacité, la toxicité, la maladie ou d'un autre changement, et que la nature complète du jeu de données permet une évaluation *in toto* de la réponse systémique. Ce profil peut être examiné pour la recherche d'un analyte en particulier pour donner des informations mécanistiques par exemple, mais le profil en lui-même est considéré comme intéressant. En d'autres termes, les « omiques » sont des outils qui cherchent à étudier et à comprendre la biologie dans sa version systémique.

La réponse systémique d'un organisme est impossible à décoder de la mesure d'un seul paramètre. Ces distinctions sont importantes pour le chercheur qui cherche à comprendre ce que ces techniques « omiques » peuvent apporter à son travail. S'il a déjà une idée du paramètre qu'il cherche à mesurer, ou de l'organe cible qu'il veut étudier, les « omiques » ne sont probablement pas les techniques les plus appropriées. Par contre, si la découverte de biomarqueurs (pas forcément leur validation) ou la génération d'hypothèses sont les objectifs de son travail, elles peuvent se révéler d'excellents alliés.

Table IV-1 : Principaux types de puces à ADN

« Macroarray »	« Microarray spottée »	« GeneChips » de Affymetrix
		
- support : membrane de nylon - taille des spots : 0,5-1mm - densité : quelques centaines de spots/cm^2 - sondes : produits de PCR - cibles : ADNc avec marquage radioactif au ^{32}P - principales applications : analyse de l'expression des gènes	- support : lame de verre à revêtement chimique - taille des spots : ~100µm - densité : 1000-10000 spots/cm^2 - sondes : produits de PCR ou oligonucléotides longs (30-70mers) - cibles : ADNc ou produits de PCR avec marquage fluorescent au Cy3 et Cy5 - principales applications : analyse de l'expression, ChIP-on-Chip, CGH-array	- support : lame de verre à revêtement chimique - taille des spots : ~20µm - densité : jusque 250000 spots/cm^2 - sondes : oligonucléotides courts (20-25 mers) synthétisés *in situ* - cibles : ARNc ou produits de PCR avec marquage fluorescent à la biotine-streptavidine - principales applications : analyse de l'expression, détection de marqueurs moléculaires

IV.1 Présentation technique

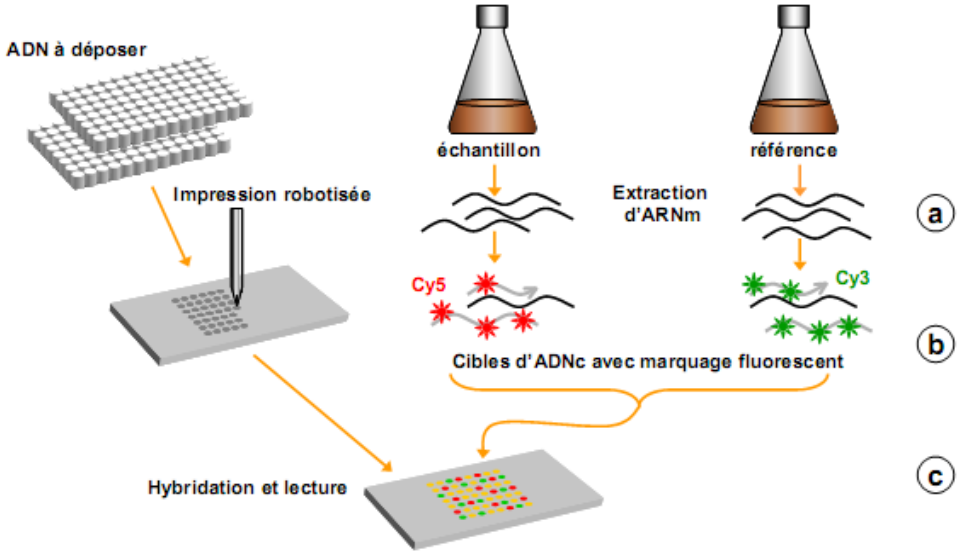
IV.1.1 La transcriptomique

Au premier plan de ces technologies émergentes se trouve l'analyse des perturbations moléculaires mesurées au niveau de l'ARNm par des puces à ADN. La transcriptomique permet la mesure fiable et simultanée des niveaux d'expression des gènes d'un système à un moment donné à travers la quantification de ses ARNm (= transcriptome).

IV.1.1.1 Présentation technologique

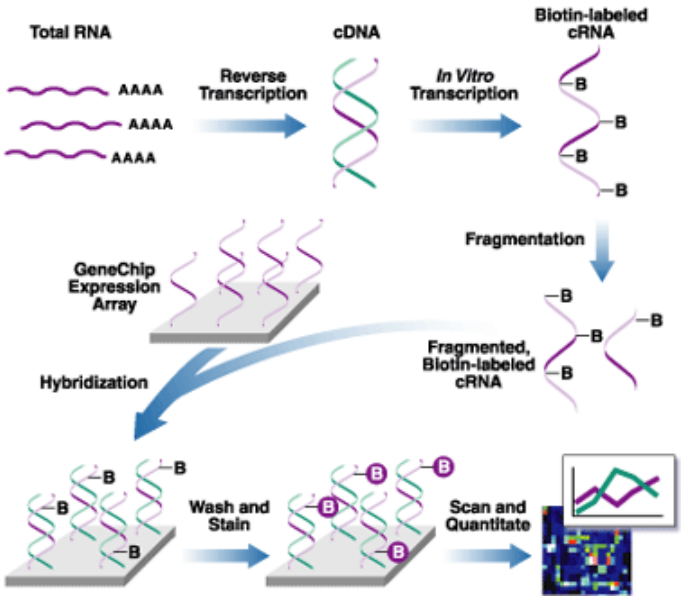
Une puce à ADN, aujourd'hui communément appelée « microarray » en anglais, est constituée de fragments d'ADN immobilisés sur un support solide selon une disposition ordonnée. Son fonctionnement repose sur le même principe que des technologies telles que le Southern blot ou le Northern blot, qui sont couramment utilisées pour détecter et quantifier la présence d'une séquence nucléique spécifique au sein d'un échantillon biologique complexe, par hybridation à une sonde de séquence complémentaire portant un marquage radioactif. La confection des puces à ADN a permis d'étendre ce principe à la détection simultanée de milliers de séquences en parallèle. Une puce comporte quelques centaines à plusieurs dizaines de milliers d'unités d'hybridation appelées sondes, chacune étant constituée d'un dépôt de fragment d'ADN complémentaire ou d'oligonucléotide. L'hybridation de la puce avec un échantillon biologique, marqué par un radioélément ou par une molécule fluorescente, permet de détecter et de quantifier l'ensemble des cibles qu'il contient en une seule expérience.
On fabrique aujourd'hui des puces comportant une très haute densité de sondes, susceptibles de recouvrir l'intégralité du génome d'un organisme sur une simple lame de microscope. On distingue plusieurs types de puces selon la densité des spots, le mode de fabrication, la nature des fragments fixés à la surface et les méthodes d'hybridation. Les caractéristiques des puces les plus courantes sont résumées dans le Tableau IV-1.

Figure IV-1 : Principe général de l'analyse de l'expression transcriptionnelle sur une puce de type « spottée »



(a) L'ensemble des ARNm sont extraits des prélèvements à analyser. (b) Une transcription reverse est réalisée en présence de nucléotides modifiés permettant de coupler un marqueur fluorescent. Des cibles d'ADN complémentaires (ADNc) représentatives de l'ensemble des gènes exprimés pour chaque culture sont ainsi obtenues. (c) Les deux échantillons sont marqués par des fluorochromes à spectres d'émission distincts (les plus couramment utilisées sont les carbocyanines Cy3 et Cy5) et hybridées simultanément sur une même puce. Au contact de la puce, les brins d'ADNc marqués s'apparient avec les sondes de séquence complémentaire sur la lame. La mesure de l'intensité du signal fluorescent émis sur chaque spot permet ainsi d'estimer le taux d'expression différentiel du gène correspondant.

Figure IV- 2 : Principe général de l'analyse de l'expression transcriptionnelle sur une puce de type Affymetrix



IV.1.1.2 Application à l'analyse de l'expression transcriptionnelle

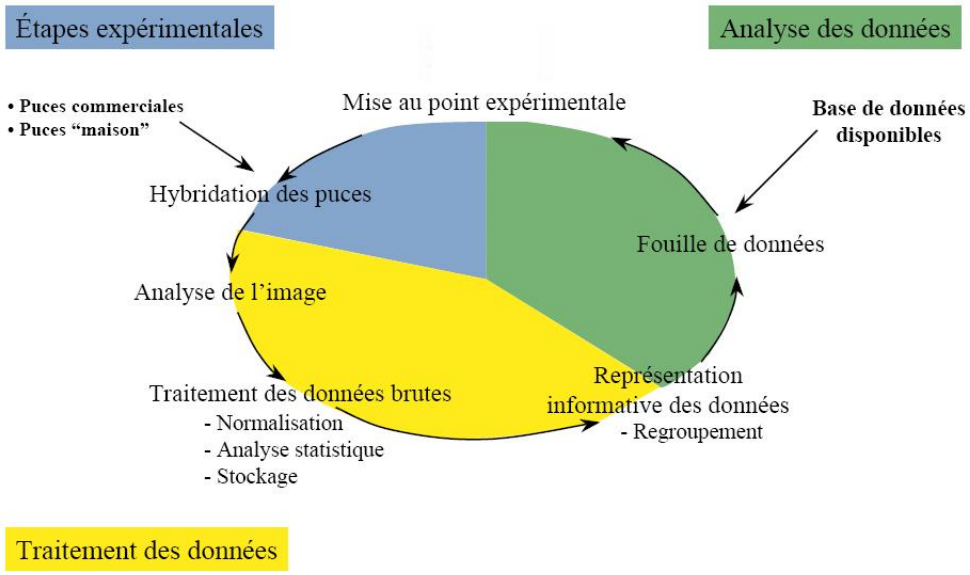
L'analyse de l'expression transcriptionnelle des gènes a été la première application pour laquelle la technologie des puces à ADN a été développée avec succès. C'est encore l'application largement dominante aujourd'hui. L'hybridation d'un échantillon biologique sur une puce à ADN permet d'identifier et de mesurer l'abondance des espèces d'ARNm qu'il contient.
L'utilisation des puces « spottées » permet d'acquérir une mesure relative du niveau d'expression des gènes dans un échantillon cellulaire par rapport à un témoin de référence, par exemple une souche mutée comparée à une souche sauvage, ou des cellules cultivées dans deux conditions différentes. Le principe expérimental est résumé dans la Figure IV-1.

L'utilisation de puces à oligonucléotides de type Affymetrix permet de quantifier en théorie l'abondance absolue de chaque ARNm transcrit. Les ARNm de l'échantillon à analyser sont amplifiés, fragmentés et marqués par un système de couplage biotine-streptavidine pour l'hybridation sur la puce. Chaque gène est représenté sur la puce par une quinzaine de sondes constituées d'oligonucléotides courts de 20-25 bases couvrant différentes portions spécifiques du gène. Une estimation directe du niveau d'expression de chaque gène est obtenue en calculant le signal moyen sur l'ensemble des sondes représentant le gène. Le principe expérimental est résumé dans la Figure IV-2.

Quelque soit le type de puce utilisé, une analyse transcriptomique complète fait appel à de nombreuses étapes, décrites dans la Figure IV-3 :

- Expérimentales : plan d'expérimentation, étapes précédant l'hybridation des puces présentées ci-dessus, et enfin, hybridation des puces.
- De traitement des données : analyse de l'image à la sortie du scanner, normalisation des données, sélection des gènes différentiellement exprimés entre deux conditions par l'utilisation de tests statistiques.

Figure IV-3 : Les différentes étapes d'une expérience utilisant des puces à ADN



- D’analyse des données : représentation informative des données, recherche dans les bases de données pour donner un sens biologique aux différences d’expression observées.

IV.1.2 La protéomique

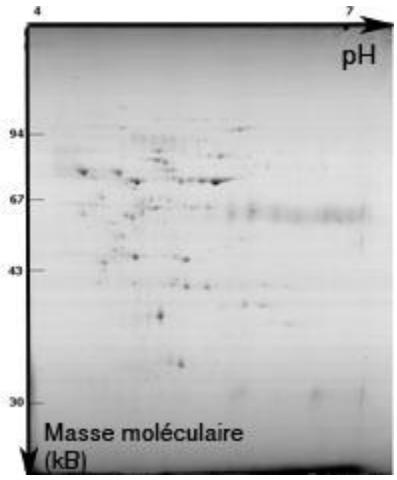
La protéomique désigne la science qui étudie les protéomes, c'est-à-dire l'ensemble des protéines d'une cellule, organite, tissu, organe ou organisme à un moment donné et sous des conditions données. Dans la pratique, la protéomique s'attache à identifier les protéines extraites d'une culture cellulaire, d'un tissu ou d'un fluide biologique, leur localisation dans les compartiments cellulaires, leurs modifications post-traductionnelles ainsi que leur quantité.

IV.1.2.1 Pourquoi la protéomique ?

Prenant en compte l’existence de la formidable somme d'informations issues de l’analyse génomique, on peut se demander pourquoi des projets d’analyse protéomique, souvent difficiles à mettre en œuvre et coûteux, doivent s'y surajouter et quelles informations spécifiques en attendre. On peut cependant avancer une série de raisons plaidant en faveur du développement de l'analyse protéomique :

- L’abondance des protéines à l'intérieur de la cellule n'est pas seulement régulée à un niveau transcriptionnel, mais également aux niveaux traductionnels et post-traductionnels, de telle sorte qu'aucune relation simple ne peut être établie entre taux d'ARNm et de protéines. Par ailleurs, certaines protéines ont une durée de vie longue, c’est-à-dire que même synthétisées à faible vitesse elles peuvent s’accumuler dans la cellule en demeurant fonctionnelles, alors que d’autres à durée de vie brève sont rapidement éliminées. Donc, même si leur synthèse est rapide, elles se retrouveront à un faible taux.

Figure IV-4 : Gel d'électrophorèse bidimensionnel, coloré au bleu de Coomassie



- Une même protéine pourra selon l'état cellulaire se retrouver dans un compartiment donné (cytoplasme, noyau, mitochondrie) ou être secrétée par la cellule. Sans l'analyse du protéome, une modification de localisation de la protéine nécessaire à son activité biologique passera inaperçue.
- La plupart des protéines ne parviennent à leur forme biologiquement active qu'à la suite d'étapes de maturation co- et post-traductionnelles telles que glycosylation, phosphorylation, déamination... Ces modifications confèrent souvent à la protéine sa fonctionnalité. Elles sont également les indicateurs de l'état de la machinerie cellulaire.

IV.1.2.2 Présentation technologique

Les protéines sont d'abord extraites d'une population cellulaire ou d'un tissu, puis séparées avant d'être identifiées.

a. L'extraction

La première étape consiste généralement à extraire les protéines d'un échantillon biologique. Cette étape est cruciale : une mauvaise extraction peut produire la dégradation des protéines et compliquer, voir rendre impossible, l'identification des protéines. Pour simplifier l'analyse, l'extraction est souvent réalisée en éliminant les modifications post-traductionnelles. Seule la structure primaire des protéines, c'est-à-dire leur séquence, est conservée.

b. La séparation

La seconde étape permet de séparer les protéines en fonction de leurs caractéristiques physiques ou chimiques, ou en fonction de leur affinité pour un ligand. L'électrophorèse sépare les protéines dans un gel polyacrylamide en fonction de leur taille lorsqu'elles sont soumises à un champ électrique. La méthode d'électrophorèse de référence pour la protéomique est l'électrophorèse bidimensionnelle (Figure IV-4). Elle permet à partir de mélanges protéiques

complexes de séparer et visualiser des centaines voire des milliers de protéines sous forme de taches ou « spots ». La résolution obtenue est suffisante pour mettre en évidence la présence d'isoformes. Son principe consiste à effectuer dans un premier temps une séparation des protéines en fonction de leur charge, suivie d'une séparation orthogonale, en fonction de la taille. La résolution de la première dimension est de l'ordre de 0.01 unités pH. Les gels obtenus sont ensuite colorés à l'aide de colorants organiques comme le bleu de Coomassie ou de métaux comme le nitrate d'argent puis numérisés. Le résultat est une semi-quantification. On recherche les protéines d'intérêt par analyse d'image, reposant sur la numérisation de l'image du gel après coloration. Au cours de cette étape le logiciel découpe l'image en pixels pour la transmission et le stockage des données. Chaque pixel de l'image est enregistrée à une position en x et en y associée à une valeur de densité optique proportionnelle à l'intensité du signal enregistré par la caméra ou le scanner. La multiplication des gels 2D nécessaire à l'obtention d'une quantification différentielle statistiquement fiable est cependant un handicap aux analyses à haut débit. Quelle que soit la méthode de séparation utilisée, les spots d'intérêt une fois détectés sont excisés du gel afin d'être identifiés par des méthodes spectrométriques.

c. L'identification

Les différents aspects de l'identification des protéines permettent d'identifier, de caractériser et de quantifier les protéines. L'identification par spectrométrie de masse (SM) repose sur une mesure précise de la masse des peptides ionisés. D'une façon très générale les protéines sont digérées par une endopeptidase (le plus souvent la trypsine) et, ensuite, analysées par SM. Une des approches utilisée est l'établissement de cartes peptidiques massiques. La masse des peptides obtenus après digestion protéasique est comparée aux cartes de masses théoriques des protéines répertoriées dans les banques de données. Différents algorithmes ont été développés afin d'effectuer cette recherche. Les logiciels d'analyse de données de SM vont rechercher une série de protéines dans une base de données de séquences et générer pour chacune un spectre théorique pour voir lequel se rapproche le plus du spectre expérimental. Selon des logiques différentes pour chaque algorithme, ils établiront un score

pour chaque séquence analysée *in silico* qui conduira à un classement des protéines candidates. Une façon de contourner les problèmes rencontrés lors de l'analyse des cartes peptidiques massiques est de séquencer partiellement les protéines par spectrométrie de masse tandem (MS/MS). Dans ce cas, certains fragments peptidiques analysés lors d'une première SM sont choisis et fragmentés. Les pics de masse obtenus constituent une représentation de la séquence protéique, dans laquelle deux pics adjacents diffèrent par la masse d'un acide aminé perdu lors de la fragmentation du peptide analysé. La courte séquence protéique obtenue peut être utilisée pour faire une recherche d'analogie dans les banques de données.

IV.1.3 La métabonomique

La métabonomique, ou profilage métabolique (metabolic profiling) est la mesure à un instant donné, dans un système biologique, des concentrations des métabolites de faibles poids moléculaires (regroupés sous le terme « métabolome »). Dans la batterie des nouvelles technologies « omiques », la métabonomique est typiquement concernée par la détection d'analytes de relativement faibles poids moléculaires (< 1000 Da), et pas par celle de protéines beaucoup plus lourdes, ou de nucléotides qui sont les préoccupations de la protéomique et de la transcriptomique. Ce pool de petits analytes métaboliques détectables inclut les acides aminés, les oligopeptides, les sucres, les acides gras simples, et les intermédiaires de nombreuses voies biochimiques comme le cycle de l'acide tricarboxylique ou la glycolyse.

La métabonomique implique la génération de bases de données métaboliques basées sur des échantillons de tissu ou de biofluides, permettant l'acquisition simultanée de multiples paramètres biochimiques sur des échantillons biologiques. La métabonomique est généralement conduite sur des biofluides, qui peuvent être obtenus de façon non-invasive (urine) ou relativement facilement (sang), mais d'autres fluides plus exotiques comme le fluide cérébro-spinal, la bile ou le fluide séminal peuvent aussi être utilisés. Il est aussi possible d'utiliser des surnageants de culture, des extraits tissulaires et parfois même des biopsies de tissu.

IV.1.3.1 Pourquoi la métabonomique ?

Il est important de réaliser que des facteurs autres que les changements dans l'expression des gènes ou les polymorphismes génétiques peuvent affecter la biologie systémique de l'organisme. Des facteurs environnementaux tels que l'alimentation, l'âge, l'ethnicité, le mode de vie et la flore intestinale ont aussi une large influence et ces différents facteurs doivent être pris en compte. Seule en fin de chaîne, intégratrice de tous les signaux précédents, la métabonomique peut ainsi être considérée comme la seule des « omiques » qui puisse donner des indications sur les modifications biologiques réelles. La métabonomique est une approche prometteuse car la maladie, les médicaments ou les toxiques perturbent les concentrations et les flux de métabolites endogènes impliqués dans les processus cellulaires clefs. Par exemple, la réponse d'une cellule à un toxique ou à un autre facteur de stress résulte généralement en un ajustement de son environnement intra- et/ou extracellulaire afin de maintenir son homéostasie. Cet ajustement métabolique est ainsi exprimé comme une empreinte des perturbations biochimiques qui est caractéristique de la nature ou du site de la toxicité. L'urine en particulier présente souvent des changements dans son profil métabolique en réponse au stress, parce que les cellules cherchent à maintenir leur homéostasie et éliminent certaines substances, modifiant ainsi la composition urinaire. Ainsi, même lorsque l'homéostasie cellulaire est maintenue, des réponses subtiles peuvent être exprimées dans la composition des différents biofluides de l'organisme.

IV.1.3.2 Métabonomique ou métabolomique ?

Le terme métabonomique provient de la racine grecque « meta », changement, et « nomos », les lois, et il décrit originellement la génération de modèles de reconnaissance de formes (pattern recognition) permettant de classifier les changements dans le métabolisme (Lindon et al., 2004). En parallèle, la métabolomique s'est développée (Raamsdonk et al., 2001). Cette 2e discipline est similaire à la 1e mais ne couvre qu'une partie des sujets impliqués dans la métabonomique. La métabolomique est basée sur le métabolome, l'analogie métabolique du

génome ou du protéome, qui est donc défini comme la composition métabolique d'une cellule. En métabonomique, non seulement on s'intéresse aux concentrations statiques cellulaires et dans les biofluides des métabolites endogènes, mais aussi aux cinétiques de fluctuation de ces métabolites, à leur déplacement spatial et aux métabolites exogènes. Ainsi, la métabonomique peut être considérée comme une approche complète de biologie des systèmes, dans le sens où dans l'étude d'un organisme entier avec des organes séparés et plusieurs types cellulaires, les effets peuvent être déplacés dans le temps, mais aussi dans l'espace (d'un organe à l'autre) et que ces effets doivent être intégrés dans une vue holistique. En pratique, dans la littérature, les termes « métabolomique » ou « métabonomique » sont parfois utilisés avec de subtiles différences, mais le plus souvent, ils sont interchangeables.

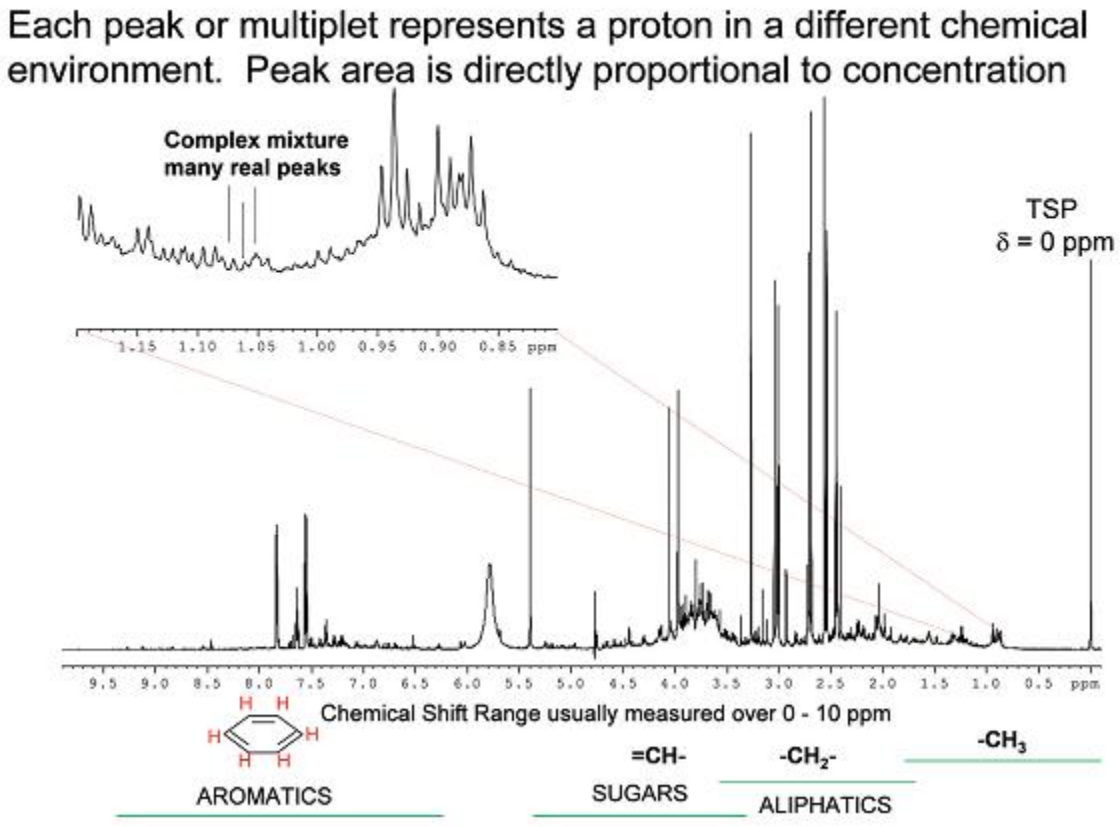
IV.1.3.3 Présentation technologique

Les principales technologies utilisées pour détecter les métabolites sont basées sur la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la spectrométrie de masse (SM). Ces deux techniques peuvent être utilisées de façon « ouverte », i.e. de façon à donner un profil complet des métabolites d'un échantillon et à générer un spectre dont l'étude plus précise fournit des informations sur les métabolites qui le composent. Cependant, la SM peut s'adapter à une utilisation plus « fermée », en recherchant spécifiquement certaines entités biochimiques connues comme les lipides ou les acides aminés. La sélection entre l'approche « ouverte » ou « fermée » du profil métabolique dépend de la connaissance a *priori* des voies métaboliques associées avec la problématique de recherche. Un autre moyen de définir ces deux approches est de considérer que la problématique de recherche est génératrice d'hypothèses (« ouverte ») ou basée sur des hypothèses (« fermée »).

a. La RMN

La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire exploite une particularité de certains noyaux atomiques : un spin non nul. Toute particule possède en effet un spin dont l'effet est

Figure IV-5 : Un spectre RMN typique (d'après (Clarke and Haselden, 2008))



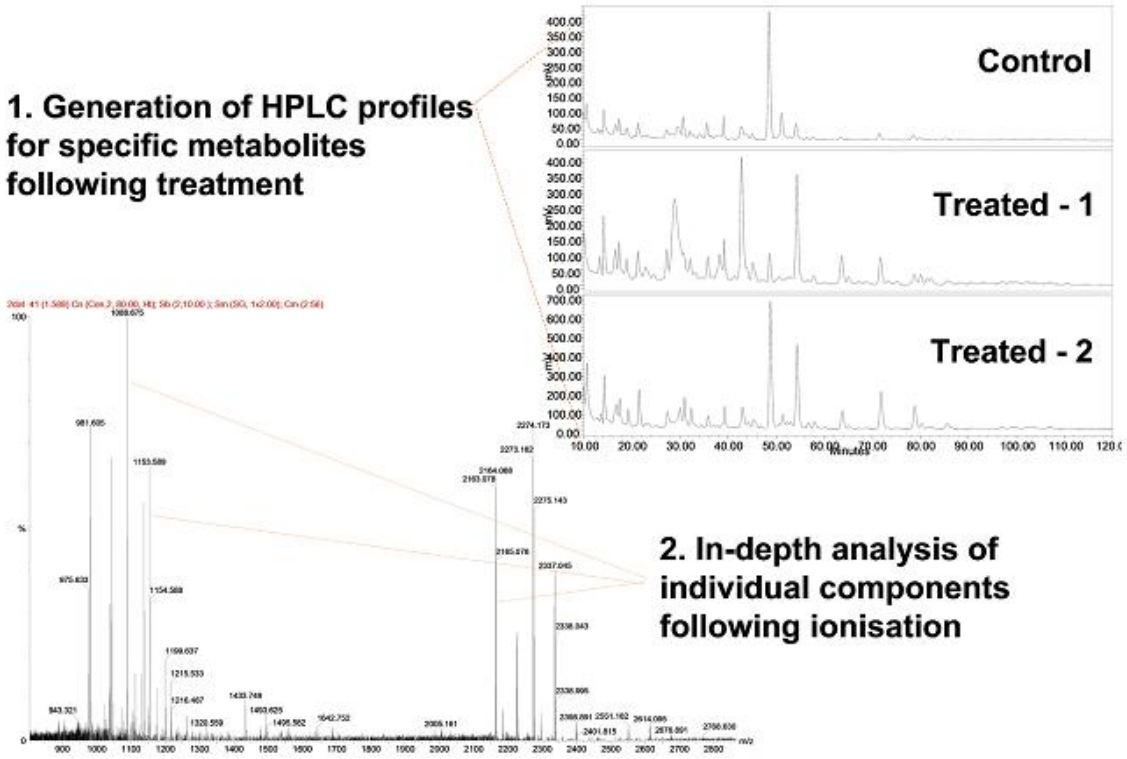
Chaque pic, ou multiplet, représente un proton dans un environnement chimique différent. L'aire sous les pics est proportionnelle à la concentration. Le TSP est un standard interne permettant de calibrer le spectre (δ=0ppm).

similaire à celui d'un moment magnétique (ie une sorte de petit aimant), capable d'intéragir avec un champ magnétique extèrieur. La spectroscopie par RMN consiste à modifier le moment magnétique nucléaire, autrement dit à faire passer le noyau d'un niveau d'énergie à un autre, en appliquant des champs magnétiques à l'échantillon qu'on veut étudier. La transition du spin vers son retour à l'équilibre (la relaxation) entraîne l'émission d'une onde électromagnétique qui peut être détectée par un capteur. Le noyau de l'hydrogène possède par exemple un moment magnétique nucléaire égal à ½ et peut donc être utilisé en RMN.

Lorsque l'atome d'hydrogène est engagé dans une liaison, le champ magnétique régnant au niveau du noyau est différent du champ magnétique appliqué. On peut, en effet, considérer que les électrons de liaison forment un écran autour du noyau, écran qui se manifeste par l'apparition d'un champ magnétique local opposé au champ magnétique appliqué. Cet écran est fonction de l'environnement chimique du noyau. Il résulte de ce phénomène que, placés dans un champ magnétique, les divers protons d'une molécule organique absorberont l'énergie à des fréquences différentes qui seront fonction des constantes d'écran correspondantes, donc de l'environnement électronique, c'est-à-dire de la nature chimique des protons présents. L'analyse de ce « déplacement chimique » des fréquences d'absorption fournira des renseignements précieux sur la structure des molécules organiques. Ce déplacement chimique est noté δ, il est mesuré relativement à un composé de référence, l'acide 3-trimethylsilyl propionique (TSP) dans cette thèse, et est donné en partie par millions (ppm).

La spectroscopie ^{1}H-RMN produit ainsi le spectre de résonance du proton d'un échantillon, et bien que quantitative, elle est relativement peu sensible (seuil de détection à $\pm 10^{-5}$M). Les avantages de la RMN sont de donner des informations structurelles sur les constituants de l'échantillon, d'être très reproductible, non destructive et relativement rapide, le spectre ^{1}H-RMN d'un échantillon biologique pouvant être généré en 10 min environ. Le spectre ^{1}H-RMN d'un échantillon biologique peut contenir des milliers de pics, chacun d'eux représentant un proton dans un environnement chimique différent, et l'aire sous chaque pic étant directement proportionnelle à la concentration du proton en question (Figure IV-5).

Figure IV-6 : Un spectre LC-MS typique (d'après (Clarke and Haselden, 2008))



Les 3 spectres en haut à droite représentent les spectres obtenus par chromatographie liquide de haute performance (HPLC) d'urine d'animaux traités par différents composés. Les fractions sont séparées en fonction de leur temps de rétention sur la colonne.

Le graphe le plus en bas est le spectre de masse d'une des fractions de l'HPLC, qui donne une information détaillée sur les masses des composés présents dans cette fraction.

L'étendue du spectre RMN est basée sur les résonances des liens C-H, avec les structures les plus stables comme les cycles aromatiques se positionnant à la gauche du spectre, et les structures plus flexibles, comme les groupements méthyl à droite. La complexité biochimique d'un échantillon génère typiquement un spectre avec de très nombreux pics chevauchant, mais des parties spécifiques du spectre peuvent être analysées plus en détail ou observées à plus haute résolution pour aider à l'identification des composés individuels.

b. La SM

La spectrométrie de masse est généralement utilisée en tandem avec des techniques de séparation comme la chromatographie liquide ou la chromatographie en phase gazeuse. L'efficacité de la séparation chromatographique dépend du type de colonnes (hydrophobes ou hydrophiles), des systèmes de solvants, et de la pression de la colonne. Une méthode de routine de chromatographie liquide ultra-performante utilise typiquement une colonne C18 qui sépare les composants polaires dans le premier front de solvant, et les composants les plus hydrophobes à la fin de la procédure. Les fractions d'intérêt, séparées sur la base de leur temps de rétention sur la colonne, sont ensuite ionisées et envoyées dans le spectromètre de masse. La SM permet une lecture extrêmement sensible des masses, basée sur la capacité du composé à être ionisé et donc à « voler » dans le spectromètre, avec des limites de détection de l'ordre de 10^{-12}M. La SM est ainsi beaucoup plus sensible que la RMN. Il faut typiquement 20 à 30 min pour générer le spectre LC-MS d'un échantillon (Figure IV-6).

IV.1.3.4 Application à l'analyse du métabolome

Nous allons décrire dans ce paragraphe les différentes étapes d'une analyse métabonomique par ^{1}H-NMR en nous appuyant sur des exemples concrets tirés de la littérature.

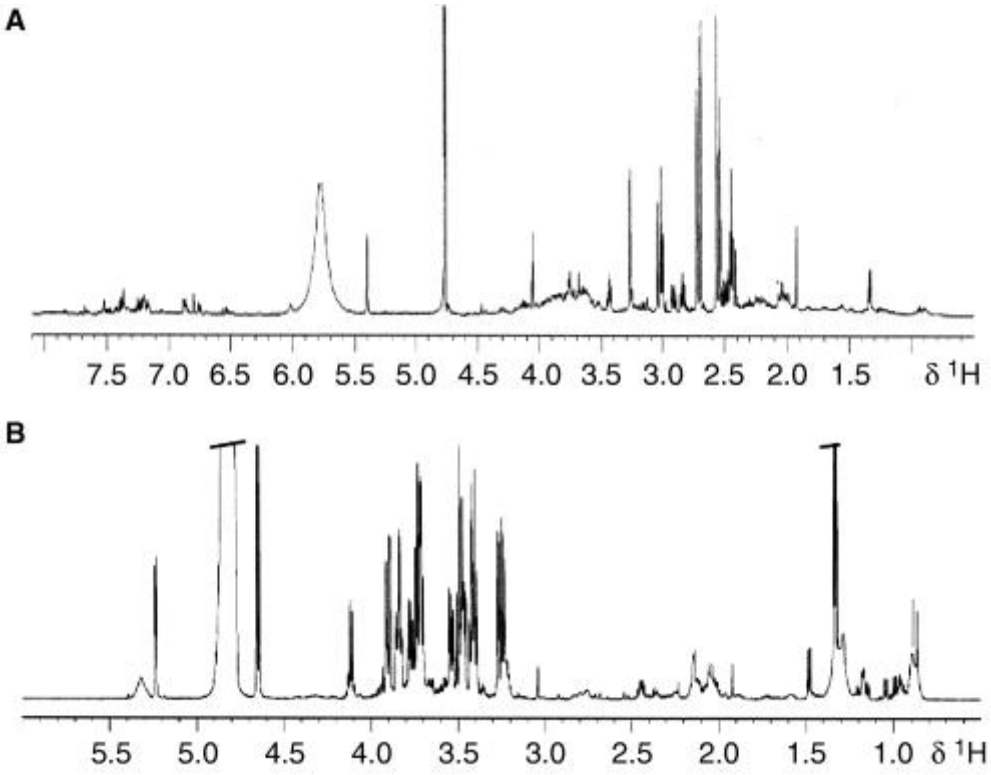
a. Préparation des échantillons

La première étape d'une analyse métabolomique est la préparation des échantillons. Comme souligné plus haut, la métabolomique par RMN peut s'appliquer à de nombreux biofluides, le plus souvent urine ou plasma, à des extraits tissulaires ou cellulaires, ou même à des biopsies intactes. Les échantillons d'urine ou de plasma ou d'autres biofluides requièrent une préparation minimale. Ils sont simplement transférés dans des tubes conventionnels pour RMN (5 mm de diamètre), en ajoutant parfois un tampon phosphate (pH 7.4) pour éviter les différences de pH trop importantes entre les échantillons, qui induisent des différences dans les déplacements chimiques des métabolites. Pour les extraits tissulaires ou cellulaires, plusieurs techniques peuvent être employées, comme une extraction méthanol/chloroforme/eau en plusieurs étapes, qui permet l'extraction simultanée des métabolites polaires et lipophiles. Les deux phases ainsi obtenues peuvent être transférées dans deux tubes RMN standards. Une présentation des protocoles de préparation des échantillons peut être trouvée dans (Beckonert et al., 2007).

b. Acquisition des spectres RMN

Chaque tube RMN est ensuite inséré dans un spectromètre RMN, permettant l'acquisition d'un spectre par individu. Un spectre ^{1}H-RMN typique d'urine contient des milliers de pics très étroits provenant majoritairement de métabolites de faible poids moléculaire. Le plasma et le sérum contiennent à la fois des composés de hauts et de faibles poids moléculaires, ce qui

Figure IV-7 : Spectres ^{1}H-RMN de biofluides (d'après (Lindon et al., 2007))



(A) Spectre ^{1}H-RMN à 600 MHz d'urine de rat, acquis avec une séquence standard avec suppression du solvent. (B) Spectre 1H-RMN à 600 MHz de plasma de rat, acquis avec une séquence Carr–Purcell–Meiboom-Gill (CPMG) pour éliminer les résonances des lipoprotéines.

donne une large gamme d'épaisseurs de signaux : des bandes larges de protéines et de lipoprotéines contribuent largement au spectre ^{1}H-RMN, avec des pics étroits de petites molécules s'y surimposant (Figure IV-7). De même, les spectres ^{1}H-RMN des métabolites polaires d'extraits tissulaires sont composés d'une multitude de signaux étroits, alors que les spectres des extraits lipophiles sont composés de quelques signaux très larges. Le signal de l'eau, très large et interférant, peut être partiellement éliminé du spectre en utilisant des séquences RMN de suppression. De plus, diverses séquences de pulsation peuvent être utilisées pour éliminer les résonances des lipoprotéines ou autres molécules pouvant interférer avec la qualité des spectres (pour revue sur les séquences RMN les plus utilisées en métabonomique, voir (Beckonert et al., 2007)). Un composé de référence, servant à la calibration de tous les spectres, est ajouté dans les échantillons : c'est souvent l'acide 3-trimethylsilylpropionique (TSP).

c. Prétraitement des données de RMN

Les spectres RMN sont d'abord digitalisés, en utilisant soit une résolution complète, soit une division en pas de 0.04 ou 0.01 ppm, et l'aire sous la courbe est intégrée en chaque point ou pour chaque pas pour représenter une variable statistique. Puis, on enlève la région de résonance de l'eau (généralement entre 4.6 et 4.8 ppm) et chaque spectre est normalisé. La plus commune des normalisations est la normalisation par rapport à l'aire totale qui a l'avantage d'éliminer les différences de concentration initiale totale entre les échantillons. La matrice de données X_{ij} ainsi obtenue possède la structure suivante : en ligne on a les individus, et en colonne les concentrations de métabolites. Ainsi, la donnée x_{ij} de cette matrice représente l'aire sous la courbe sous le pas j (représentant par exemple le pas 3.5-3.51 ppm) pour l'individu i. Pour une étude portant sur 30 individus, en utilisant une résolution complète du spectre, on obtient ainsi une matrice 30*33600. La structure inhérente de ces données, où le nombre d'individus est bien plus faible que le nombre des variables mesurées, est parfaitement adaptée à l'utilisation des analyses statistiques multivariées.

d. Analyse statistique

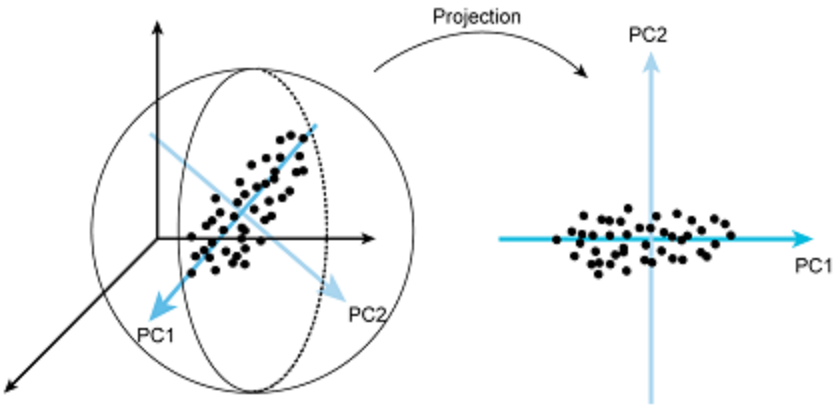
L'interprétation des données métabonomiques passe par la détermination de changements significatifs dans un large ensemble de données spectrales, provenant d'échantillons soumis à de nombreuses sources de variabilité comme des variations physiologiques normales qui peuvent obscurcir l'effet recherché. Pour cela, on utilise donc des statistiques multivariées. En chimie, le terme chimiométrie est généralement employé pour décrire ces méthodes. Le but de ces méthodes chimiométriques est de classifier un objet, ou de prédire son origine à partir de l'identification de signatures inhérentes présentes dans un jeu de mesures expérimentales. Les méthodes chimiométriques peuvent aussi être utilisées pour réduire la dimension d'un jeu de données complexe, facilitant ainsi la visualisation des signatures inhérentes.

Les méthodes chimiométriques peuvent être divisées en deux catégories : « non supervisées » et « supervisées ». Les techniques non supervisées sont utilisées pour établir s'il existe des ressemblances et des rassemblements intrinsèques dans le jeu de données et incluent des méthodes qui représentent les échantillons selon les mesures effectuées sans connaissance *a priori* de leur appartenance à telle ou telle classe. Les méthodes non supervisées les plus connues sont l'Analyse en Composantes Principales (ACP) et l'analyse en cluster hiérarchique. Les méthodes supervisées utilisent l'information d'appartenance à une classe donnée pour une partie des échantillons (training set) et optimisent la séparation entre les classes. Elles ont ensuite besoin d'un second set d'échantillons indépendants (test set) pour tester ou valider les prédictions de classe effectuées grâce au training set. Ces techniques incluent la Projection sur les Structures Latentes (PLS).

- **L'analyse en composantes principales (ACP)**

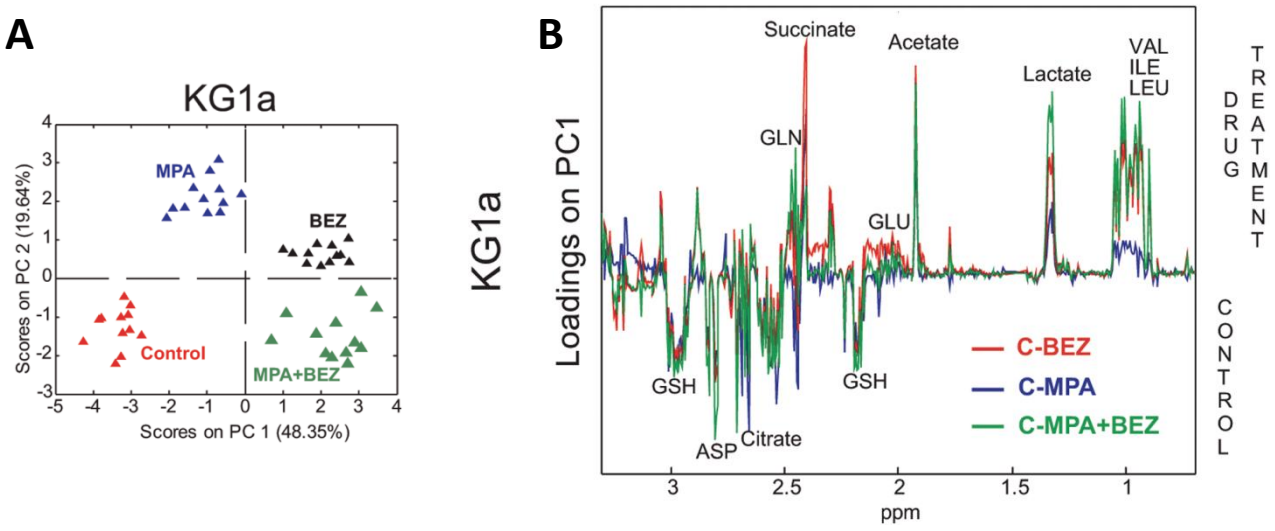
L'ACP permet la visualisation des sources principales de variation dans un jeu de données multidimensionnel. Cette méthode est basée sur une transformation linéaire qui

Figure IV-8 : Représentation graphique de la projection d'un nuage de point sur les 2 premiers axes d'une ACP



L'ACP est basée sur une transformation linéaire qui projette les données dans un nouveau système de coordonnées (les composantes principales PCs), dans lequel la variance entre tous les échantillons est maximisée.

Figure IV-9 : Résultat d'une analyse par ACP (d'après (Tiziani et al., 2009))



Scores (A) et loadings (B) d'une ACP conduite sur les spectres 1H-RMN des métabolites aqueux extraits des lignées de cellules myéloïdes humaines KG1 exposées au bezafibrate (BEZ), à l'acétate de medroxyprogesterone (MPA) ou à une combinaison des deux (MPA+BEZ).

projette les données dans un nouveau système de coordonnées (les composantes principales PCs), dans lequel la variance entre tous les échantillons est maximisée (Figure IV-8). Les PCs sont calculées telles que chaque PC est une combinaison linéaire des variables initiales, chaque PC explique le maximum de variance possible non expliqué par les PCs précédentes, chaque PC est orthogonale et donc indépendante des autres PCs. Les résultats de cette méthode sont deux matrices connues sous le nom des scores et des loadings. Les loadings représentent la manière dont les anciennes variables se sont combinées linéairement pour former les PCs, et indiquent donc quelles variables apportent le plus de poids dans la construction des PCs. Les scores représentent les coordonnées des points (=individus) dans le nouveau système de variables formé par les PCs.

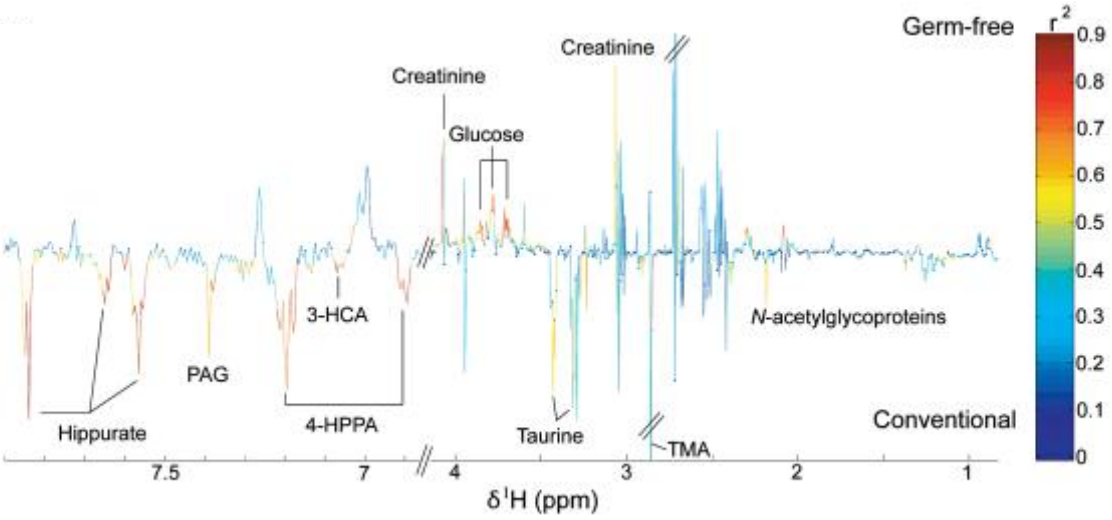
La Figure IV-9 présente les résultats d'une ACP provenant d'une analyse de spectres de métabolites extraits de cellules myéloïdes humaines traitées avec le solvant (contrôles), ou avec du bezafibrate (BEZ), de l'acétate de medroxyprogestérone (MPA) ou une combinaison des deux (MPA+BEZ). La Figure IV-9A montre une représentation des scores sur les 2 premières PCs (PC1 vs PC2), chaque point correspondant à une culture cellulaire. On y voit clairement le regroupement des échantillons des cellules contrôles d'un coté de la PC1, et des cellules traitées avec du BEZ et du MPA+BEZ de l'autre. La PC2 permet de séparer les cellules traitées au MPA des cellules contrôles. Les toxines forment des clusters séparés car elles ont des mécanismes d'action différents et induisent des perturbations chimiques différentes. L'analyse des scores permet ainsi de déterminer l'existence de regroupements intrinsèques entre les échantillons. La Figure IV-9B présente les loadings correspondant à l'axe 1, chaque point représentant cette fois une région spécifique du spectre RMN. L'examen de ces loadings permet d'identifier les variables les plus discriminantes dans les séparations entre les échantillons mises en évidence lors de l'examen des scores. Par exemple, l'axe 1 était très impliqué dans la séparation des groupes contrôles vs BEZ et MPA+BEZ. Dans les loadings correspondants, on voit que pour ces deux groupes de cellules traitées, les signaux de l'acétate, du succinate et du lactate sont très impliqués dans la construction de l'axe 1 et sont donc des marqueurs responsables de la séparation entre ces classes.

La séparation entre les classes n'est pas toujours aussi évidente que dans l'exemple présenté ci-dessus, et l'ACP pas toujours suffisante pour déterminer les composés les plus discriminants. On peut alors utiliser des méthodes d'analyse supervisées.

- **La Projection sur les Structures Latentes (PLS)**

La PLS est une technique supervisée développée par Wold et al. dans les années 1980 dans l'intention de comprendre les relations entre les variables sortant d'un système (output) et les variables d'entrée (input) (Wold, 1984). Cette technique généralise le principe de l'ACP et un modèle de régression multivariée linéaire pour prédire la réponse Y (output) à partir d'un jeu de variables X (input). Comme pour l'ACP, les loadings des composantes latentes sont des combinaisons linéaires des variables d'entrée, mais elles possèdent un poids *via* un coefficient de régression calculé entre chaque variable d'entrée et la réponse Y. C'est donc une méthode appropriée pour extraire de l'information sur les variables discriminantes entre les classes d'intérêt. La PLS-DA (PLS-Discriminante Analysis) est un cas particulier de l'analyse PLS dans laquelle la réponse ne contient que 2 classes (par exemple traité ou non). L'O-PLS (Orthogonal-PLS) est une méthode reliée à la PLS, qui intègre une Correction Orthogonale du Signal. L'O-PLS enlève toute variation de X qui n'est pas corrélée à Y, ie en termes mathématiques, toute variation systémique dans X qui est orthogonale à Y (Trigg J. and S., 2002). L'O-PLS-DA a été implémentée dans le but de tirer avantage des propriétés de covariance et de corrélation présentes dans les données. En effet, si on applique ces modèles multivariés aux données de spectres RMN, les loadings sont difficiles à mettre en relation avec la structure initiale du spectre. Pour faciliter l'interprétation des variables impliquées dans la discrimination entre classe, il est intéressant de retrouver l'aspect original du spectre. Ainsi, avec l'O-PLS-DA, le poids de chaque variable est représenté dans une reconstitution du spectre RMN original, le signe du coefficient étant conservé, et les poids des variables pouvant être comparés entre eux grâce à un code couleur où le r^2 correspond au carré des coefficients de l'O-PLS (Cloarec et al., 2005a).

Figure IV-10 : Résultat d'une analyse d'O-PLS-DA (d'après (Claus et al., 2008))



L'analyse O-PLS-DA a été effectuée sur les spectres ^{1}H-RMN d'urines de souris axéniques (sans flore intestinale, « germ free ») vs des souris contrôles (« conventional »).

La qualité des modèles PLS peut être évaluée grâce à plusieurs paramètres, dont le R^2X, qui est un indicateur du pourcentage de la matrice X qui a été utilisé pour prédire la matrice Y, et le Q^2Y, qui est un indicateur du pourcentage de la matrice Y qui est prédit par le modèle.

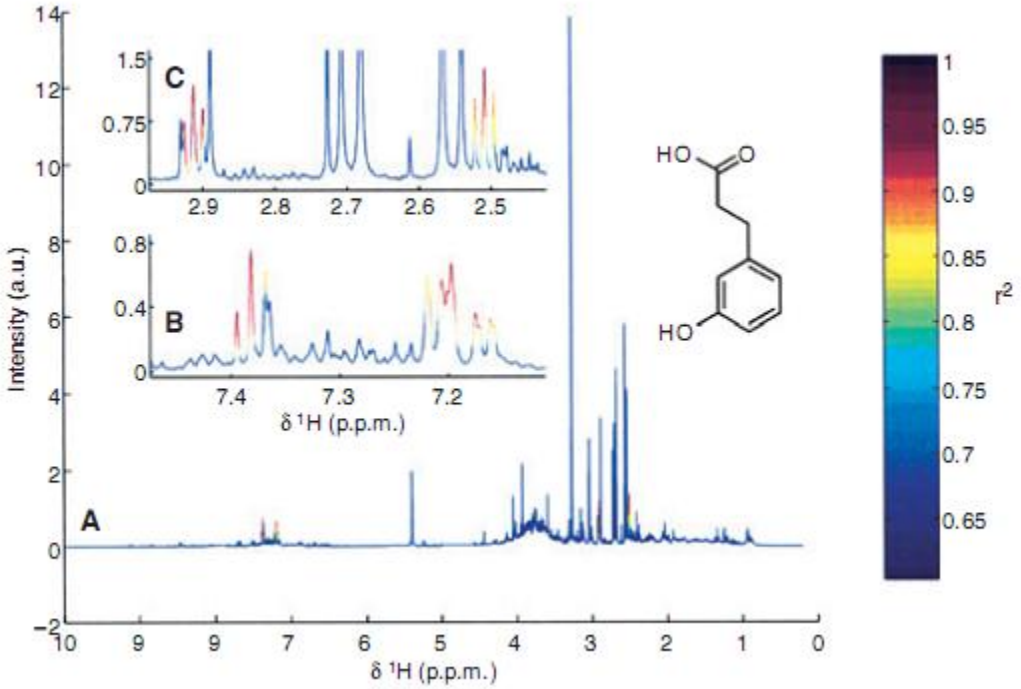
La Figure IV-10 montre les résultats d'une analyse par O-PLS-DA entre les spectres d'urine de souris axéniques (sans flore intestinale, « germ-free ») et de souris normales (« conventional »). Les résultats de cette analyse se lisent de la façon suivante : plus les composés sont colorés en rouge, plus ils sont importants dans la discrimination entre les 2 classes; et ils ont des niveaux plus élevés dans la classe vers laquelle ils pointent. Par exemple, les souris axéniques (« germ-free ») possèdent des niveaux urinaires de glucose plus importants que les souris conventionnelles, et des niveaux d'hippurate plus faibles.

e. Identification des variables discriminantes

Une fois que les modèles statistiques ont été appliqués à la matrice de données, il faut identifier les variables discriminantes, c'est-à-dire attribuer de façon certaine le nom du composé chimique à qui appartient le pic qu'on a identifié. Pour cela, il existe trois outils principaux, complémentaires.

Tout d'abord, des informations sur la structure de la molécule peuvent être données par la spectroscopie RMN en 2 dimensions (2D-RMN). Ces méthodes, incluant les méthodes de spectroscopie par corrélation (COSY) ou la spectroscopie de totale corrélation (TOCSY), donnent des informations sur quels hydrogènes de la molécule appartiennent à des carbones proches.
Des méthodes de spectroscopie statistiques peuvent aussi fournir des informations utiles à l'identification des composés. La spectroscopie de corrélation totale statistique (STOCSY) est basée sur l'analyse de la matrice de corrélation de tous les spectres RMN du jeu de données. Le principe est le suivant : « La matrice de corrélation d'un ensemble de spectres contenant différentes quantités de la même molécule présente des coefficients de corrélation très importants entre les variables correspondant aux résonances de la même molécule »

Figure IV-11 : Analyse STOCSY à une dimension (d'après (Lindon et al., 2007))



Cette analyse a été effectuée pour identifier les pics du spectre RMN corrélés à celui à 2.51 ppm (driver pic). Le degré de corrélation entre les spectres a été codé selon un code couleur et projeté sur un des spectres d'origine. (A): Spectre entier. (B): Agrandissement du spectre entre 7.1 et 7.5 ppm. (C): Agrandissement du spectre entre 2.4 et 3 ppm. Cette procédure STOCSY a permis l'assignement de ces pics au métabolite acide 3-hydroxyphenylpropionique.

(Cloarec et al., 2005a). Il est possible de mettre en évidence toutes les résonances fortement corrélées à un pic d'origine (driver pic), avec un code couleur qui aide à l'identification du composé (Figure IV-11). En comparaison avec les méthodes 2D-RMN comme le TOCSY qui permettent la visualisation des pics entre des protons séparés au maximum par 4 liens C-C, cette méthode statistique ne possède pas de limitation physique pour trouver les corrélations entre les résonances.

Les deux méthodes précédentes permettent ainsi de donner des informations sur les pics discriminants qui appartiennent à la même molécule, avec parfois des informations de structure plus précises venant de la RMN 2D. On en déduit une liste de pics appartenant à la même molécule. La dernière étape pour identifier cette molécule est la recherche dans les bases de données. Il en existe plusieurs, disponibles en ligne, dont the Human Metabolome Database (http://www.hmdb.ca/), qui permettent l'entrée d'une liste de résonance RMN et en ressortent une liste de composés possibles. Pour être tout à fait certain de son assignement, on peut finir par ajouter des quantités croissantes d'une solution standard du composé suspecté dans l'échantillon de départ et observer les pics qui augmentent (expériences de « spike in »).

Ces diverses étapes aboutissent finalement à une liste de métabolites différentiellement exprimés dans les biofluides ou les extraits tissulaires entre les différentes conditions testées.

IV.2 Applications en toxicologie

Le plus important challenge de la toxicologie est la possibilité d'extrapoler le risque de systèmes expérimentaux vers les populations humaines. Les rongeurs sont les modèles les plus utilisés pour les tests de toxicité *in vivo*, mais il existe souvent des différences majeures dans la clairance, les activités enzymatiques et d'autres facteurs clefs entre les espèces. Pourtant, les tests humains n'étant la plupart du temps pas une option possible, la réponse à ce problème est d'essayer de développer des biomarqueurs de toxicité sub-cliniques et qui peuvent être observés sur des tissus non-invasifs. La promesse de la toxicogénomique (on regroupe sous

cette terminologie l'ensemble des technologies « omiques » appliquées à la toxicologie) est d'identifier des signatures indicatrices d'un effet toxique, même à faible dose.

Pour le moment, les techniques « omiques » ont connu leur plus grand impact dans le domaine de la toxicologie, particulièrement en toxicologie préclinique. Ce n'est pas très surprenant. Les études de toxicité génèrent typiquement des résultats clairement définis (mesure de la mortalité, signes cliniques, anormalités histopathologiques…), qui sont mesurables rapidement (7 jours ou moins). Cela les rend idéales pour un travail corrélatif qui cherche à associer des métabolites (ou des gènes ou des protéines) avec ces résultats sans équivoques. De ces corrélations, des hypothèses peuvent être générées, et parfois testées.

IV.2.1 La transcriptomique

IV.2.1.1 Amélioration de l'analyse de risque

La transcriptomique est devenue un outil majeur dans la caractérisation des toxicités en permettant la détermination rapide et complète des changements d'expression de gènes associés à une pathologie. Un défi majeur de la transcriptomique est de déterminer des signatures d'expression de gènes prédictives d'une réponse toxicologique avant l'apparition des premiers effets morphologiquement observables. Confirmant la faisabilité de cette approche, Heinloth et al. ont démontré que certaines perturbations d'expression de gènes observées dans le foie à des doses sub-toxiques d'acétaminophène chez le rat pouvaient être indicatrices de toxicités cellulaires subtiles qui n'étaient pas détectables en histopathologie ou par d'autres méthodes biochimiques (Heinloth et al., 2004). Aux doses toxiques, les perturbations d'expression dans les mêmes sous-groupes de gènes, associés avec une dysfonction mitochondriale et un stress oxydant, étaient plus prononcées, et confirmées par des perturbations d'expression d'autres gènes associés à ces mêmes fonctions. Ces données indiquent que l'analyse transcriptomique a le potentiel pour identifier de subtils marqueurs de toxicité cellulaire, prédictifs d'une future toxicité d'organe.

IV.2.1.2 Identification de biomarqueurs de toxicité chez l'Homme

Des biomarqueurs transcriptomiques de toxicité peuvent ainsi être détectés par l'utilisation des puces à ADN et ont été récemment identifiés pour de nombreux composés toxiques, comme des agents néphrotoxiques (Wang et al., 2008a), ou inhibiteurs de la prolifération des kératinocytes (Ridd et al., 2006). La majorité des études qui utilisent les puces à ADN s'intéressent à la toxicité dans un organe cible ou dans des cellules en culture. Ce type d'étude donne cependant peu d'information pour le suivi de la toxicité chez l'Homme, où il faut utiliser des moyens moins invasifs. Pour répondre à ces limitations, Bushel et al. ont regardé les signatures transcriptomiques dans les cellules sanguines comme indicatrices précoces des changements pathologiques apparaissant dans le foie à la suite de l'administration de diverses doses d'acetaminophène (Bushel et al., 2007). Un algorithme de prédiction a été utilisé pour discriminer les doses toxiques et non toxiques, et le pouvoir prédictif des profils transcriptomiques des cellules sanguines était meilleur que celui de la biochimie clinique, de l'hématologie, ou de l'histopathologie, prouvant que les profils transcriptomiques obtenus à partir de cellules sanguines pouvaient être de bons marqueurs d'une toxicité d'organe spécifique.

Dans le domaine de l'épidémiologie moléculaire environnementale, des études similaires ont été menées. Van Leeuwen et al. ont par exemple étudié les signatures transcriptomiques des cellules sanguines dans une population d'enfants issus d'une zone minière très polluée de République Tchèque (van Leeuwen et al., 2006). Ils ont trouvé un nombre considérable de gènes dont l'expression était différente entre les enfants exposés à des doses relativement faibles de polluants atmosphériques et les enfants témoins. Ils ont aussi identifié un sous-groupe de gènes dont l'expression montrait une corrélation significative avec la fréquence des micronuclei lymphocytaires chez les enfants, marqueur établi des effets génotoxiques des polluants. Cette étude pose la question de la faisabilité de générer des profils transcriptomiques discriminant à des faibles niveaux d'exposition à des carcinogènes environnementaux. Cependant, elle ne permet pas de conclure quant au pouvoir prédictif de ces profils, ni quant à la sensibilité de la méthode, comparée aux autres marqueurs d'exposition plus classiques.

IV.2.1.3 Tests de toxicité des composés chimiques en haut débit

La transcriptomique peut aussi être utile pour classifier les composés chimiques, en partant du principe que les composés toxiques qui entrainent des pathologies similaires induisent des changements d'expression de gènes similaires. Des études récentes, dont le but était de prédire la toxicité de certains composés en fonction des signatures transcriptomiques, ont montré avec succès la possibilité de distinguer entre les toxiques hépatiques carcinogéniques génotoxiques et non-génotoxiques (Eun et al., 2008), entre les toxiques rénaux et hépatiques (Bartosiewicz et al., 2001), et ont même permis la classification entre des toxiques hépatiques activateurs de macrophages, proliférateurs de peroxisomes ou inducteurs de stress oxydant (McMillian et al., 2004). Toutes ces études sont basées sur des modèles *in vivo* dans lesquels une toxicité d'organe bien définie était toujours présente. Ces approches *in vivo* sont assez peu commodes dans une optique de tests de toxicité rapides et bon marché et l'existence d'alternatives *in vitro* serait très attractive.

Il a déjà été montré que les signatures transcriptomiques étaient capables de distinguer les composés toxiques et ceux non-toxiques dans des cellules HepG2 (Harries et al., 2001). De même, des expériences utilisant des tranches de foie de rat traitées avec de l'acétaminophène, des lipopolysaccharides et du tétrachlorure de carbone ont montré un bon pouvoir de prédiction des données issues des puces à ADN des tranches de foie sur la toxicité *in vivo* des composés et ces données étaient de plus très corrélées aux profils transcriptomiques obtenus sur les foies *in vivo* (Elferink et al., 2008). Cependant, Newton et al., dans une communication résumant les travaux de recherche d'un très gros groupe de travail sur la génotoxicité regroupant des industries et des groupes de recherche académiques, concluent que les techniques de puces à ADN ne sont pas encore utilisables en tant qu'outils de screening de la génotoxicité à haut-débit (Newton et al., 2004). Le traitement des données est encore très compliqué et peu standardisé, les sources de variabilité sont très nombreuses, la sensibilité de la méthode semble inférieure à celle des mesures standards de génotoxicité, et les puces coutent encore cher. Une des équipes de ce groupe de travail a, par exemple, trouvé que des concentrations plus élevées de cisplatine étaient nécessaires pour observer des changements

fiables dans l'expression des gènes, comparées aux concentrations induisant des micronuclei *in vitro*. Par contre, les changements d'expression de gènes semblent très performants pour discriminer les classes de composés génotoxiques qui opèrent *via* des modes d'action distincts. Ainsi, les auteurs concluent qu'une des valeurs ajoutées de la transcriptomique serait plutôt son potentiel à fournir des hypothèses mécanistiques sur les modes d'action toxiques des composés.

IV.2.1.4 Aide à la compréhension des mécanismes toxiques

Un des moyens de fournir des hypothèses mécanistiques cohérentes à partir des expériences de puces à ADN est l'analyse des voies transcriptionnelles perturbées. Différentes bases de données sont disponibles pour aider à l'annotation et à l'interprétation des données d'expression de gènes en termes de processus cellulaires, fonctions biologiques et voies métaboliques. Des outils bioinformatiques et statistiques sont utilisés pour associer un groupe de gènes différentiellement exprimés dans une condition avec une voie métabolique ou une fonction biologique particulière dans le but d'identifier les modes d'actions clefs des composés testés. Ainsi, le but de ces outils est d'aider à donner du sens biologique aux données d'expression de gènes issues des expériences de puces à ADN. DAVID (the database for annotation, visualization, and integrated discovery), GoMiner ou Ingenuity sont des exemples très utilisés de ces outils bioinformatiques. Ce type d'analyse a été très utilisé en toxicologie et en toxicologie de l'environnement et a prouvé son utilité pour mieux comprendre la réaction des organismes face aux xénobiotiques, *in vivo* et *in vitro*. Seules quelques études choisies à titre d'exemple sont présentées ci-dessous.

Dakeshita et al. ont comparé les signatures transcriptomiques de cellules sanguines périphériques dans une population de femmes japonaises exposées au cadmium par rapport à une population contrôle (Dakeshita et al., 2009). Ils ont montré l'existence d'un cluster de gènes dont l'expression était significativement modulée dans la population exposée et en utilisant Ingenuity ont montré que ces gènes étaient associés au stress oxydant et à l'apoptose mitochondriale.

Bakshi et al. se sont aussi intéressés à la toxicité du cadmium dans une lignée cellulaire épithéliale de prostate humaine (NprEC) et ont montré que l'exposition de ces cellules au cadmium entrainait l'augmentation de l'expression de 48 gènes, 35 d'entre eux étant fonctionnellement liés au TNF d'après Ingenuity (Bakshi et al., 2008). L'ajout d'un anticorps anti-TNF a en effet bloqué l'induction de ces gènes, démontrant ainsi le rôle central de cette cytokine dans la carcinogenèse de la prostate induite par le cadmium.

Shi et al. ont comparé les profils transcriptomiques de cerveaux de rats en développement, traités ou non avec de la ketamine, toxine associée avec une accélération de l'apoptose neuronale (Shi et al.). L'analyse avec Ingenuity a révélé la perturbation de la voie de signalisation des récepteurs N-méthyl-D-aspartate, ce que les auteurs ont ensuite vérifié par hybridation *in situ*, confirmant ainsi l'hypothèse que l'exposition prolongée à la kétamine entraine une augmentation des récepteurs N-méthyl-D-aspartate et une stimulation du système glutamatergique.

IV.2.2 La métabonomique

IV.2.2.1 Amélioration de l'analyse de risque et screening à haut débit

Les premiers essais d'utilisation des modèles statistiques multivariés sur des données spectrales de RMN pour classifier des échantillons datent des années 1990. De nombreux auteurs ont utilisé des spectres RMN issus d'urine ou de sérum d'animaux traités par différentes toxines et ont été capables de classifier correctement ces toxines en fonction de leurs organes cibles (Gartland et al., 1990) (Holmes et al., 1992). Ces études ont prouvé l'utilité de la métabonomique par RMN dans l'analyse de risque préclinique des médicaments, et en tant qu'outil de screening pour de potentielles nouvelles molécules.

Aujourd'hui, les possibilités de la métabonomique par RMN pour l'évaluation des effets toxiques des xénobiotiques ont été explorées en profondeur par le projet COMET (Consortium for Metabonomic Toxicology), un projet réalisé par 5 firmes pharmaceutiques et l'Imperial College à Londres. Le but de ce projet était de développer des méthodes pour l'acquisition de

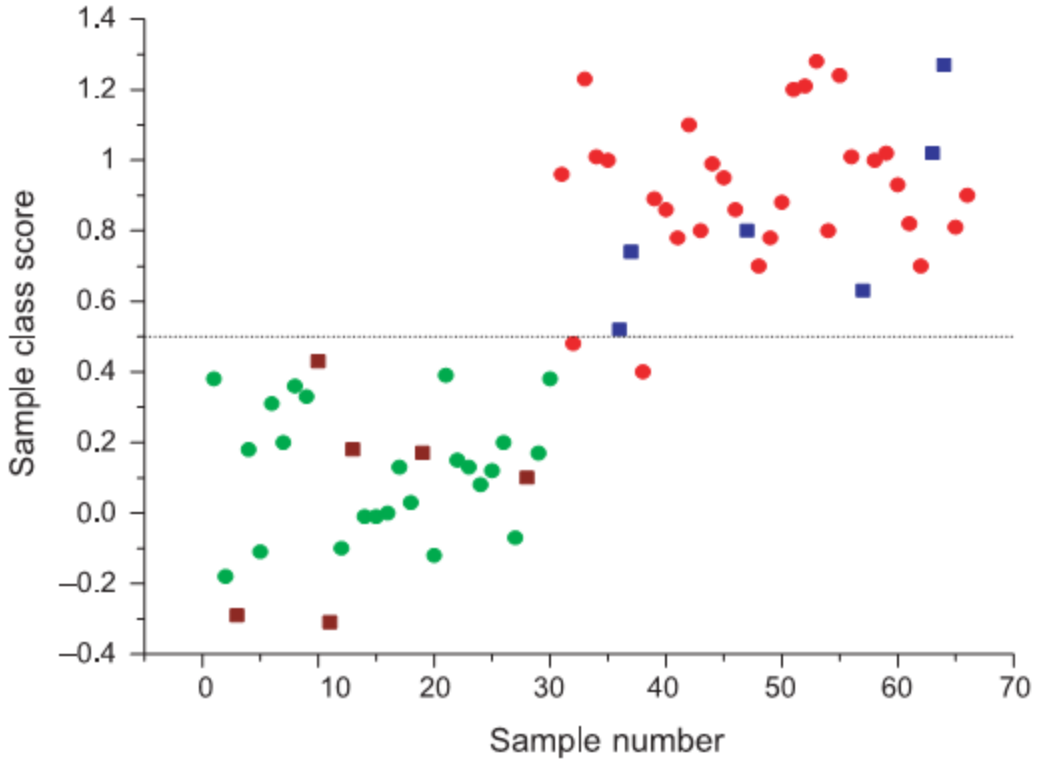
données métabonomiques par RMN dans les biofluides (sérum et urine) de rats et de souris afin d'effectuer un screening toxicologique préclinique de molécules candidates, de construire des bases de données de spectres et de développer un système permettant la prédiction des cibles et des toxicités d'organe. Les efforts se sont concentrés sur les toxicités rénales et hépatiques chez le rat et la souris. Ebbels et al. ont construit un modèle statistique en utilisant une partie des données spectrales de ce projet (80 toxines, 12 935 spectres d'urine provenant de 1 652 rats) (Ebbels et al., 2007). Ils ont été capables de prédire l'appartenance de deux « toxines aveugles » à la bonne catégorie de toxines (toxiques pour le foie ou pour le rein), même à des doses sub-toxiques. De plus, un algorithme de « leave one out » conduit sur leur modèle a réussi à classer les composés dans la bonne catégorie dans 92% des cas. Cette étude est, à l'heure actuelle, la plus grande validation de l'approche métabonomique comme outil d'analyse de risque toxicologique pré-clinique.

Des approches *in vitro* peuvent aussi avoir leur intérêt dans ces étapes préliminaires de screening, et l'utilisation de la métabonomique sur des cultures primaires de neurones a été identifiée comme un outil prometteur pour le screening de molécules potentiellement neurotoxiques lors du développement (Bal-Price et al., 2009) (van Vliet et al., 2008). De même, l'industrie du tabac s'intéresse à l'application de la métabonomique comme outil de compréhension des effets des différents composants de la cigarette sur les cellules pulmonaires, très certainement en vue de son utilisation comme outil de screening (Vulimiri et al., 2009).

IV.2.2.2 Identification de biomarqueurs de toxicité chez l'Homme

Un des autres enjeux de l'industrie pharmaceutique est la création d'une « médecine personnalisée », capable d'adapter les traitements médicamenteux pour maximiser leur efficacité et/ou éviter leurs effets secondaires. La pharmacogénomique s'intéresse aux variations génétiques des individus et à leurs liens avec ces problématiques. Très récemment, une approche alternative pour comprendre ces variations inter-individuelles dans la réponse aux médicaments a été développée en utilisant la métabonomique, et utilisée pour prédire le métabolisme et la toxicité d'un médicament, sur la seule base de l'analyse et de la modélisation

Figure IV-12 : Prédiction du statut de l'artère coronaire basée sur un modèle de PLS-DA utilisant les spectres RMN de sérum de patients (d'après (Brindle et al., 2002)).



Les cercles verts et rouges représentent les échantillons du jeu de données utilisé pour construire le modèle de sujets avec des artères coronaires normales (ACN) et avec une maladie sur trois vaisseaux (MTV) respectivement. Les carrés bordeaux et bleus correspondent aux échantillons du jeu de données de test de patients ACN et MTV respectivement.

d'un profil métabolique en pré-dose. Cette approche, nommée « pharmacométabonomique » intègre à la fois les facteurs génétiques, mais aussi environnementaux qui déterminent l'empreinte métabolique d'un individu (nutrition, flore intestinale, âge…). Cette nouvelle approche a été illustrée par l'étude de la toxicité et du métabolisme de composés avec différents modes d'action chez le rat (Clayton et al., 2006).

De nombreux exemples dans la littérature existent sur l'utilisation de la métabonomique en clinique, pour aider au diagnostique, comme la recherche de diabète en utilisant le plasma et l'urine, de maladies neurologiques comme la maladie d'Alzheimer en utilisant le fluide cérébrospinal, l'arthrose en utilisant le fluide synovial et l'infertilité masculine en utilisant le fluide séminal (pour revue voir (Lindon et al., 2004)). Un des exemples les plus probants dans ce domaine est celui des maladies coronariennes pour lesquelles il n'existe actuellement pas de méthode sûre et non invasive de diagnostique. L'analyse des profils métaboliques des sérums de patients a permis la construction d'un modèle prédictif de la maladie, avec un taux de réussite de plus de 90% (Brindle et al., 2002) (Figure IV-12). Pour aller plus loin, les auteurs ont même montré la possibilité de classifier le degré de sévérité de la maladie en utilisant les mêmes spectres de sérum. Un essai clinique est en cours de route pour évaluer le potentiel de l'approche par métabonomique dans le diagnostic de cette maladie.

Ainsi, la métabonomique est capable de détecter des différences très subtiles dans les différents biofluides *in vivo*. Elle peut même déterminer l'influence sur les profils métaboliques de rats et de souris de processus physiologiques tout à fait normaux, comme le vieillissement, l'alimentation, le cycle de menstruations ou les cycles lumière/nuit (pour revue voir (Lindon et al., 2004)). Des études épidémiologiques à grande échelle ont même décrit des différences dans les profils métaboliques d'hommes et de femmes provenant de 3 régions du monde différentes, Japon, Chine et Etats-Unis (Dumas et al., 2006). Il est fort probable que des études sur l'humain à des niveaux d'exposition faibles soient soumises à des variations physiologiques similaires, sinon plus importantes encore. Il reste donc encore à prouver que les approches

métabonomiques puissent être utiles dans des études touchant aux humains exposés à des niveaux de contaminants faibles, environnementaux.

IV.2.2.3 Aide à la compréhension des mécanismes toxiques

Comme pour la transcriptomique, l'application principale de la métabonomique est la génération d'hypothèses mécanistiques. La plupart des travaux mécanistiques métabonomiques se sont concentrés sur les toxiques hépatiques et rénaux, associant souvent des corrélations temporelles biochimiques dans les biofluides avec des marqueurs de toxicité. Dans la plupart des cas, ces données étaient accompagnées d'inférences spéculatives quant à la signification biologique de ces changements métaboliques. Quelques études remarquables ont cependant été plus loin dans la recherche de mécanismes de toxicité. Nicholls et al. ont par exemple lié mécanistiquement les effets neurotoxiques de l'hydrazine à des niveaux urinaires plus élevés de 2-aminoadipate qui est connu pour affecter les niveaux d'acide kynurénique dans le cerveau, donnant pour la première fois une hypothèse plausible sur les effets neurotoxiques de ce composé ((Nicholls et al., 2001). Slim et al. ont montré que les changements métaboliques urinaires induits par les inhibiteurs de phosphodiestérases de type 4 n'étaient pas le résultat indirect d'une inflammation concomitante mais étaient directement associés avec une pathologie vasculaire (Slim et al., 2002).

IV.2.2.4 Identification de marqueurs d'exposition à des xénobiotiques

Dans le domaine de la toxicologie environnementale, Viant et al. ont montré la supériorité de sensibilité de la métabonomique sur d'autres indicateurs plus classiques lors de tests de toxicité développementale sur des embryons de poissons (Viant et al., 2006). Alors que l'indicateur de toxicité embryonnaire le plus sensible, l'éclosion, conduit à une dose sans aucun effet de 164 mg/mL de trichloroéthylène, des perturbations métaboliques significatives étaient déjà détectées à 9 mg/mL dans les extraits d'œufs par RMN.

Plus récemment, les mêmes auteurs ont montré que la métabonomique pouvait aussi s'utiliser comme outil de détection de l'exposition d'échantillons environnementaux à des toxiques chimiques (Viant et al., 2009). En utilisant des échantillons d'extraits de foie de poissons, ils ont été capables de classer les animaux provenant de sites contaminés ou non, les données étant comparables d'un laboratoire à l'autre, et l'analyse très robuste aux différentes sources de variabilité.

IV.2.2.5 Autre application rigolote

Tang et al. ont décrit une application originale de la métabonomique *in vitro* : la recherche de substrats endogènes des cytochromes P450 dans des extraits de tissus (Tang et al., 2009). La stratégie utilisée est la suivante : 1) Le P450 d'intérêt est incubé avec des co-facteurs et un extrait tissulaire en présence d'une mixture de $^{18}O_2$: $^{16}O_2$ (1 : 1). 2) Une analyse de l'extrait organique de la solution de réaction est effectuée par LC/MS. 3) Les produits ayant incorporé des isotopes marqués apparaissent comme M/M + 2 doublets et peuvent être identifiés. 4) La caractérisation des candidats potentiels est ensuite effectuée. Cette technique a permis l'identification de 7 acides gras comme substrats des CYP1A2, 2C8 et 2C9 et la caractérisation de leurs produits et semble prometteuse pour l'identification de substrats endogènes des P450s orphelins.

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

L'exposition des populations à des contaminants chimiques de plus en plus nombreux pose ainsi des questions majeures quant aux conséquences de cette exposition pour la santé humaine. L'incidence croissante de maladies en lien avec le TA humain comme l'obésité, le diabète ou d'autres anomalies métaboliques laissent à penser que l'exposition de ce tissu à de nombreux xénobiotiques lipophiles environnementaux n'est pas sans conséquence pour la physiologie de ce tissu. Certains auteurs ont posé la question de la relation entre l'exposition à certains polluants et l'obésité, qui pourrait s'expliquer par des mécanismes aussi variés que la perturbation des systèmes hormonaux endocriniens ou celle de l'axe central hypothalamo-pituitaire-adrénal (Grun and Blumberg, 2009). Certains polluants pourraient aussi agir directement sur la physiologie du TA, et les études résumées dans l'introduction de ce manuscrit ont montré que des composés chimiques pouvaient perturber la différenciation des préadipocytes en adipocytes, mais aussi des fonctions majeures de l'adipocyte mature. Cette revue de la littérature montre aussi l'existence de différences majeures entre les composés, les espèces, les modèles *in vitro* et les doses utilisés, mettant en évidence la complexité et la diversité des mécanismes qui peuvent être enclenchés lors de ces expositions.

Les techniques globales « omiques », en donnant la vue la plus large possible des paramètres biologiques qu'elles permettent de mesurer, offrent l'avantage de donner une vision non ciblée des phénomènes. Une des grandes forces de ces technologies est la génération d'hypothèses mécanistiques. L'application de ces techniques à un problème comme l'exposition du TA humain aux polluants pourrait peut être permettre de générer des hypothèses originales quant aux mécanismes de toxicité mis en jeu.

Le but de ma thèse a donc été de répondre aux questions suivantes :

- Le TA humain a-t-il les systèmes enzymatiques nécessaires pour détoxifier les xénobiotiques qui l'atteignent ?

Pour répondre à cette première question, nous avons effectué une cartographie des P450s présents dans différents modèles de TA humain, ainsi que des mécanismes transcriptionnels de régulation de leur expression.

- Quels sont les mécanismes mis en jeu lors de l'exposition du TA humain à des xénobiotiques d'origine environnementaux : focus sur 2 polluants particuliers, la TCDD et le MEHP ?

Pour répondre à cette question, nous avons utilisé deux approches « omiques »: la transcriptomique et la métabonomique par ^{1}H-RMN sur des préadipocytes primaires humains différenciés *in vitro*.

CHAPITRE V : EXPRESSION ET INDUCTION DES CYTOCHROMES P450 DANS LE TISSU ADIPEUX HUMAIN

Pour connaître les capacités de métabolisation *in situ* des xénobiotiques qui atteignent le TA, nous avons cartographié les isoformes de P450s impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques dans des biopsies de TA humain, ainsi que dans différents modèles *in vitro*. Nous avons comparé cette distribution avec celle du foie. Nous avons ensuite déterminé si l'exposition aux xénobiotiques pouvait modifier cette distribution d'expression en comparant les mécanismes transcriptionnels de régulation de l'expression des P450s avec ceux existant dans le foie.

L'expression des 23 isoformes des P450s des familles 1 à 3 a ainsi été déterminée par RT PCR dans des biopsies de TA humains, des explants de TA cultivés pendant 48h et des cultures primaires de préadipocytes différenciés *in vitro* en adipocytes, et comparée avec l'expression des P450s dans des biopsies de foie humain. L'expression des P450s les plus exprimés au niveau ARNm a ensuite été vérifiée par Western-Blot.

Les modèles *in vitro* de TA humain (explants, cultures primaires d'adipocytes) et un modèle *in vitro* de foie humain (culture primaire d'hépatocytes) ont ensuite été traités avec des inducteurs classiques de P450s (rifampicine, inducteur du CYP3A4 par la voie PXR, phénobarbital, inducteur du CYP2B6 par la voie CAR, et TCDD, inducteur du CYP1A1 par la voie AhR), et des xénobiotiques environnementaux lipophiles dont des résidus ont été trouvés dans les TA de diverses populations (lindane, prochloraz, chlorpyrifos). L'expression des récepteurs PXR, CAR et AhR a aussi été vérifiée par RT PCR.

Les résultats de cette étude montrent que l'expression des ARNm des P450s dans le TA est très inférieure quantitativement à celle du foie, sauf pour 2 isoformes : les CYP1B1 et 2U1. L'expression de ces 2 isoformes dans le TA humain a été confirmée par Western-Blot. De façon surprenante, notre étude a mis en évidence des inductions dans l'expression des différentes isoformes de la famille 1 lors des différents protocoles de mise en culture des modèles de TA. Ainsi, la culture des explants pendant 48h induit fortement l'expression du CYP1A1, et la culture des préadipocytes et leur différenciation *in vitro* induit fortement celle du CYP1B1. D'autre part, notre étude montre la présence du récepteur AhR dans le TA humain, à des niveaux

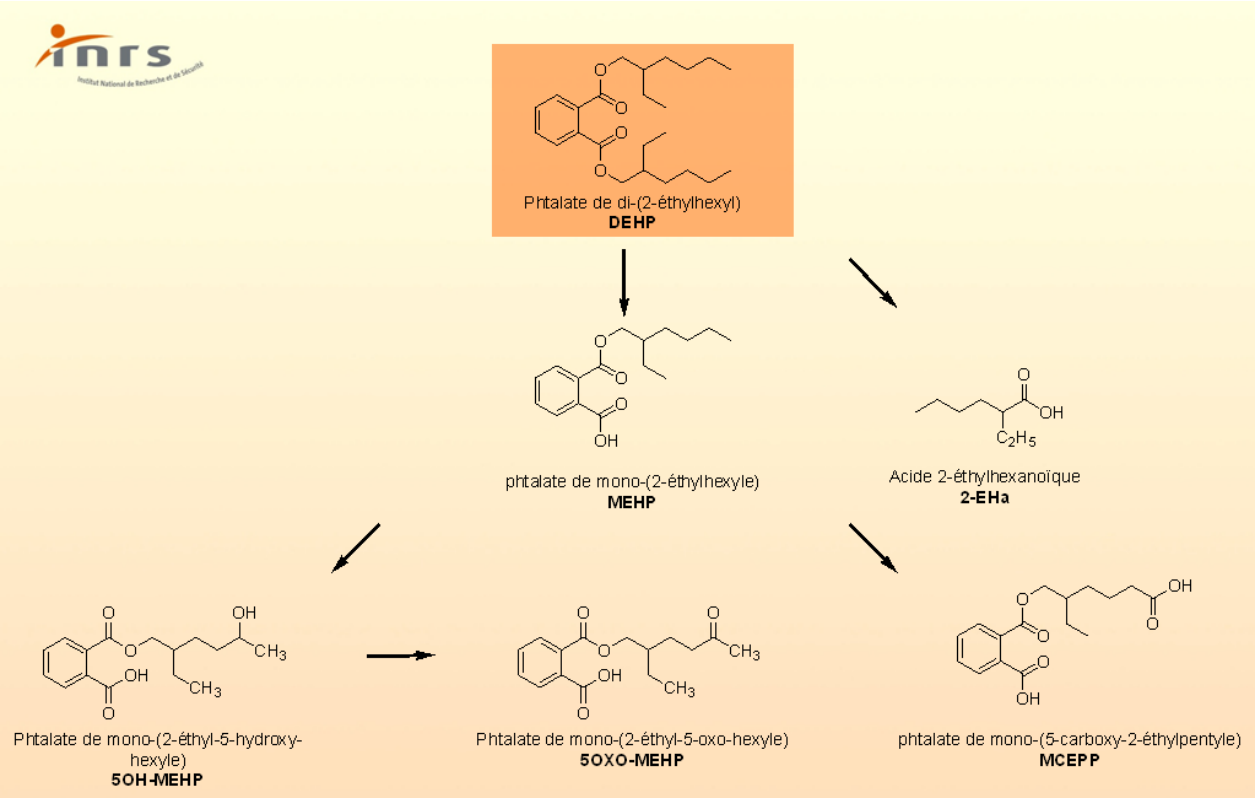
comparables à ceux du foie, mais pas celle des récepteurs CAR ou PXR. En cohérence avec ces résultats, l'exposition des modèles de TA aux inducteurs des P450s des familles 2 et 3, phénobarbital et rifampicine, n'augmente pas l'expression des P450s dans le TA humain alors qu'elle l'induit dans les hépatocytes. L'exposition du TA aux ligands de AhR, TCDD et prochloraz, induit elle, l'expression des CYP1A1 et 1B1, au niveau ARNm et protéine.

Notre étude montre ainsi pour la première fois l'expression de certaines isoformes de P450 dans le TA humain. Les isoformes majoritaires sont les CYP1B1 et 2U1, leur rôle au sein du TA est discuté dans l'article. Nous montrons aussi l'existence et la fonctionnalité de la voie d'induction AhR dans ce tissu, et l'absence des voies d'induction CAR et PXR, en contradiction avec les résultats publiés chez le rat (Yoshinari K 2004). Ces résultats montrent de plus la capacité des xénobiotiques ligands de AhR de modifier l'expression des P450s dans ce tissu.

Cette étude a fait l'objet d'une publication dans *Drug Metabolism and Disposition,* disponible en annexe de ce manuscrit.

CHAPITRE VI : ETUDE NON CIBLEE DES EFFETS DU MEHP ET DE LA TCDD SUR LES ADIPOCYTES HUMAINS

Figure VI-1 : Métabolisme simplifié du DEHP



VI.1 Introduction

Dans cette deuxième partie de la thèse, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'effet de 2 polluants : le mono-2-éthylhexyl-phthalate (MEHP) et la 2,3,7,8-tétrachorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD), sur des préadipocytes humains en culture primaire différenciés *in vitro*. Les résultats de notre étude précédente ont montré la pertinence de ce modèle, qui répond de façon similaire aux explants de TA aux inducteurs de P450s, tout en étant plus facile d'interprétation (un seul type cellulaire).

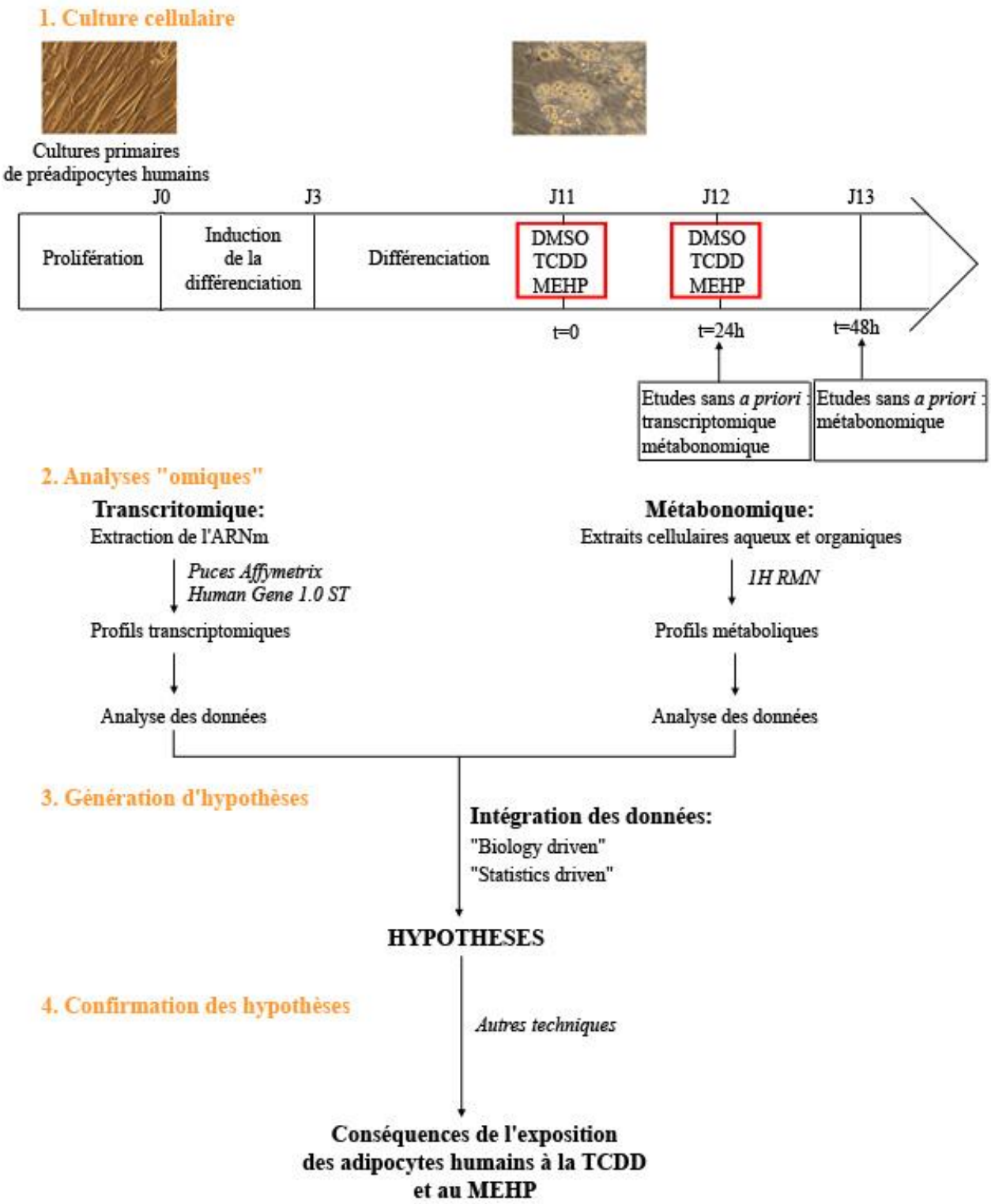
Les phthalates sont des produits chimiques industriels largement utilisés qui servent principalement de plastifiants dans les produits en PVC. On les trouve aussi dans certains produits cosmétiques, des parfums, des médicaments, ainsi que dans des peintures industrielles et des solvants. Le DEHP est le plus utilisé des esters de phthalates. Le DEHP est incorporé de façon non covalente dans les plastiques flexibles utilisés dans une large variété de produits quotidiens dont les emballages alimentaires, et sa propension à s'en détacher peut amener les populations à de fortes doses d'exposition (Kavlock, 2000). Après ingestion, des lipases pancréatiques présentes dans l'intestin transforme le DEHP en son équivalent monoester, le MEHP, qui est absorbé préférentiellement (Huber et al., 1996) (Figure VI-1). De plus, le MEHP peut aussi être produit par des lipases plasmatiques et hépatiques, qui transforment le DEHP atteignant directement le sang après absorption ou contamination médicale. Ce métabolite est capable d'activer *in vitro* les 3 isoformes des récepteurs PPAR (Hurst and Waxman, 2003). Les PPARs appartiennent à la superfamille des récepteurs aux stéroïdes/thyroïdes/rétinoïdes et sont des récepteurs nucléaires activables par les lipides, qui contrôlent une large variété de gènes impliqués dans de nombreuses voies du métabolisme lipidique, dont le transport, la captation, la liaison et l'activation intracellulaires des acides gras, ainsi que leur catabolisme et leur stockage (Desvergne and Wahli, 1999). Dans le TA humain, l'isoforme majoritairement exprimée est PPARγ, qui régule le stockage des lipides, induit la différenciation adipocytaire et la survie des adipocytes, et joue aussi un rôle majeur dans le contrôle de la sensibilité à l'insuline. L'activation de ce récepteur par des composés environnementaux pourrait avoir d'importantes

conséquences métaboliques, notamment en lien avec certains dysfonctionnements du TA et avec l'obésité en particulier. Il a été montré par exemple que les concentrations urinaires de MEHP étaient positivement corrélées avec le tour de taille chez des hommes adultes non diabétiques (Stahlhut et al., 2007).

La TCDD est le sous-produit non intentionnel de certaines combustions industrielles. Les propriétés chimiques de la TCDD la rendent résistante à la fois à la dégradation environnementale et à la dégradation biologique. Elle s'accumule ainsi dans le TA des animaux exposés, dont celui des humains avec une durée de vie estimée à 7.6 ans (Michalek et al., 1992). L'exposition accidentelle aigue à la TCDD est associée avec l'augmentation de diverses pathologies incluant des dysfonctions du système immunitaire, des pathologies neurologiques, des anomalies de développement, du diabète et de la carcinogénèse (White and Birnbaum, 2009). Il est communément admis que la toxicité de la TCDD passe par sa liaison à AhR. Notre étude précédente a montré la présence de ce récepteur et la fonctionnalité de cette voie de régulation de la transcription au sein du TA humain (Ellero et al., 2009). Chez l'animal, un syndrome de cachexie incluant une perte de masse adipeuse est une conséquence majeure de l'exposition aigue à la TCDD, et des perturbations du métabolisme du glucose ont été rapportées qui pourraient expliquer ce phénomène (Seefeld et al., 1984b) (Enan et al., 1992a). Chez l'Homme, des études épidémiologiques ont soulevé la possibilité d'un lien entre les composés de type dioxine et l'incidence du diabète (Remillard and Bunce, 2002).

La plupart des études mécanistiques liant ces composés et le TA ont été effectuées *in vivo* chez l'animal, ou *in vitro* sur des lignées cellulaires comme les cellules murines 3T3-L1. Cependant, les études sur les activateurs des récepteurs PPAR sont difficilement transposables de l'animal à l'homme, le phénomène d'hépatocarcinogenèse médié par PPARα chez les rongeurs n'étant pas observé chez l'homme par exemple (Roberts, 1999). De même, la revue bibliographique menée au chapitre III de l'introduction de ce manuscrit a mis en évidence les

Figure VI-2 : Plan d'expérience pour l'évaluation non ciblée de l'effet de la TCDD et du MEHP sur les adipocytes humains



fortes variations inter espèces dans l'effet du DEHP sur le poids des animaux. Enfin, des différences inter-espèces importantes ont aussi été décrites directement sur le TA avec un autre inducteur de PPARγ, la pioglitazone. Ce médicament de la famille des thiazolidinediones (TZD) est utilisé dans le traitement du diabète de type II. Un des effets spécifiques des TZDs sur le TA, observé principalement dans des études chez les rongeurs, est la stimulation de la différenciation adipocytaire et l'apoptose des adipocytes les plus gros, résultant en une population plus importante de petits adipocytes, plus sensibles à l'insuline. Chez l'humain au contraire, l'amélioration de la sensibilité à l'insuline induite par le traitement à la pioglitazone, s'accompagne d'un accroissement de la surface des adipocytes sous-cutanés (Koenen et al., 2009). De même, certaines études comparatives des effets métaboliques de la TCDD ont montré de fortes différences inter-espèces, certains de ces effets étant directement lié au métabolisme du TA (Enan et al., 1996) (Brewster and Matsumura, 1989). Ses importantes différences inter-espèces dans les mécanismes d'action des polluants sur le TA montrent l'importance de confirmer les résultats trouvés *in vivo* sur les TA animaux avec des modèles de cellules humaines.

Ici, nous avons choisi de travailler sur des cultures primaires de préadipocytes humains, différenciés *in vitro* en adipocytes pendant 11 jours, et d'adopter une démarche non ciblée pour évaluer les effets de ces deux polluants sur ces cellules. Nous avons ainsi regardé les perturbations au niveau transcriptomique après 24h de traitement, et au niveau métabolique après 24 et 48h de traitement. Ces données ont ensuite été analysées séparément, puis dans leur ensemble et des hypothèses biologiques ont été formulées, puis vérifiées. Le plan expérimental choisi pour cette étude est décrit dans la Figure VI-2.

VI.2 Matériels et méthodes

VI.2.1 Culture cellulaire

Les cultures de préadipocytes ont été fournies par Promocell (www.promocell.com) et proviennent des tissus adipeux sous-cutanés de 5 femmes saines, ne possédant aucune maladie métabolique et ne prenant pas de médicaments connus pour interférer avec le métabolisme du TA. Ces femmes étaient âgées de 36±5 ans et avaient toutes un IMC inférieur à 28. La culture des préadipocytes et leur différenciation *in vitro* en adipocytes ont été effectuées selon les recommandations du fournisseur. Brièvement, les préadipocytes ont été multipliés et cultivés dans un milieu contenant 5% de sérum de veau fétal (SVF), 1 µg/ml d'hydrocortisone, 10 ng/ml de facteur de croissance épidermal humain recombinant et 4 µl/ml d'héparine, jusqu'à confluence (Jour 0). La différenciation en adipocytes a ensuite été induite en utilisant un milieu de différenciation contenant 3 µg/ml de ciglitazone, 8 µg/ml de biotine, 400 ng/ml de dexaméthasone, 44 µg/ml d'IBMX, 0.5 µg/ml d'insuline et 9 ng/ml de thyroxine pendant 3 jours. Les cellules sont ensuite cultivées dans un milieu de nutrition contenant 3% de SVF, 8 µg/ml de biotine, 400 ng/ml de dexaméthazone et 0.5 µg/ml d'insuline pendant 8 jours, puis traitées avec 100 µM de MEHP (Interchim, Montluçon, France) ou 10 nM de TCDD (Cerilliant Corporation, Round Rock, TX, USA) dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) (concentration finale 0.1%) pendant 24 ou 48h. Pour les cellules traitées 48h, le milieu a été renouvelé après 24h avec des produits chimiques frais. Les doses utilisées ont été choisies en se basant sur des travaux précédents montrant qu'elles entrainaient une activation maximale des récepteurs AhR et PPARγ humains (Riddick et al., 1994) (Hurst and Waxman, 2003).

VI.2.2 Transcriptomique-analyse de données

Après 24h de traitement, les ARN totaux ont été extraits des cellules en utilisant le TriPure Isolation Reagent (Roche Applied Science, Meylan, France), puis soumis à un traitement à la DNase et purifié avec le RNeasy MinElute Cleanup kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France). La

qualité des ARN a été vérifiée à l'aide du Bioanalyseur 2100 d'Agilent. L'hybridation, le lavage et le scanner des puces ont été effectués selon les instructions du fournisseur (Affymetrix, Inc. http://www.affymetrix.com/) sur la plate-forme de génomique de l'Institut Cochin. Nous avons utilisé les puces pangénomique Human Gene 1.0 ST d'Affymetrix. Les données ont été normalisées en utilisant le Robust Multi-Array Average expression measure (RMA) Bioconductor (www.bioconductor.org) implémenté sous R. Le fichier des données normalisées en log2 a été analysé par ACP et avec le test Significance Analysis of Microarray (SAM) apparié dans R (http://www-stat.stanford.edu/,tibs/SAM/) (Tusher et al., 2001). SAM donne une liste de gènes « significatifs » et cherche à estimer le taux de faux positifs (False Discovery Rate, FDR). Pour les données présentées dans le manuscrit, le FDR a été limité à 5%.

Nous avons ensuite utilisé l'outil bioinformatique DAVID (http://david.abcc.ncifcrf.gov:8080/), pour rechercher les voies métaboliques et les fonctions biologiques régulées dans nos cellules après les différents traitements. DAVID est une base de données générée grâce aux publications scientifiques, qui vise à aider à l'interprétation biologique de longues listes de gènes. La stratégie adoptée est d'associer systématiquement les gènes de la liste à leurs annotations biologiques (Gene Ontology) et de mettre en évidence les fonctions biologiques les plus significatives statistiquement, i.e. les plus sur-représentées. Nous avons utilisé ici l'outil d'annotation fonctionnelle de DAVID. Cet outil permet une analyse d'enrichissement de termes typique. Elle mesure de plus les relations entre les termes d'annotations des gènes pour les regrouper en cluster, permettant une réduction du nombre de termes associés avec des processus biologiques similaires et facilitant l'interprétation des données. Un score d'enrichissement est associé à chacun de ces clusters. Les données présentées ici correspondent à des clusters enrichis plus de 2 fois. Nous avons aussi utilisé le lien de DAVID vers la base de données métabolique KEGG (http://www.genome.jp/kegg/pathway.html), et sélectionné les voies métaboliques les plus enrichies en prenant comme critère une p-value <0.05. Pour plus de détails sur DAVID voir (Huang da et al., 2009).

VI.2.3 Métabonomique par ^{1}H-RMN-analyse de données

VI.2.3.1 Prélèvement des échantillons

2 ml de milieu de culture ont été prélevés après 24 ou 48h de traitement. Les milieux des cellules traitées 48h ayant été renouvelés après 24h, les milieux ont été au contact des cellules pendant seulement 24h, même pour ceux labellisés « 48h ». Ils ont ensuite été congelés à -80°C jusqu'à utilisation.

Après 24 ou 48h de traitement, les cellules ont été trypsinées à température ambiante et les culots cellulaires lavés 2 fois au PBS avant congélation à -80°C.

VI.2.3.2 Préparation des milieux de culture

Les milieux ont été lyophilisés toute la nuit et dissous dans 1 ml de tampon phosphate 0.2 M (pH 7.4) dans du D_2O, plus 0.001% de TSP avant leur transfert en tubes capillaires pour analyse par ^{1}H-RMN.

VI.2.3.3 Préparation des extraits cellulaires

Les culots cellulaires ont été homogénéisés et extraits avec un mélange chloroforme/méthanol/eau (2 : 1 : 3) selon un protocole en 2 étapes décrit dans (Beckonert et al., 2007). Le surnageant contenant la phase aqueuse a été prélevé, lyophilisé, dissous dans 50 µl de tampon phosphate 0.2 M (pH 7.4) dans du D_2O, plus 0.001% de TSP et transféré dans des microtubes capillaires pour l'analyse par ^{1}H-RMN. La phase inférieure chloroformique a été prélevée, séchée sous hotte chimique, dissoute dans 100 µL de $CDCl_3$ plus 0.01% TSP et transférée dans des microtubes capillaires.

VI.2.3.4 Spectroscopie ^{1}H-RMN

Tous les spectres ^{1}H ont été acquis sur un spectromètre Bruker Avance 600MHz (Bruker Analytische GmbH, Rheinstetten, Germany) opérant à 600.13MHz. Pour les milieux de culture, les spectres ont été acquis avec une séquence standard 1D [délai de relaxation (relaxation delay (RD))-90°-*t1*-90°-*tm*-90°- signal de précession libre (aquire free induction decay (FID))], avec une suppression de l'eau appliquée pendant un RD de 2 s et un mixing time (tm) de 100 ms et une longueur de pulsation à 90° de 9 µs, en utilisant 128 scans sur 64 000 points. Pour les phases aqueuses, les spectres ont été acquis avec une séquence standard 1D similaire avec suppression de l'eau, une longueur de pulsation à 90° de 10 µs, en utilisant 512 scans. Pour les phases organiques, les spectres ont été acquis avec une séquence standard 1D, sans présaturation du signal de l'eau, avec un RD de 3 s et une longueur de pulsation à 90° de 3 µs, en utilisant 16 scans sur 32 000 points. Tous les spectres ont été acquis avec une largeur spectrale de 12 000 Hz. Les FIDs ont été multipliées par une fonction exponentielle correspondant à 0.3 Hz d'amplification. Ils ont été phasés, leur ligne de base corrigée, et calibrés sur le TSP (δ0.00) manuellement. Les métabolites ont été assignés en utilisant les données de la littérature (Claus et al., 2008), (Zancanaro et al., 1994) et à l'aide d'expériences additionnelles de RMN en 2D sur certains échantillons.

VI.2.3.5 Analyse de données

Pour éliminer la variabilité due à la présaturation de l'eau, la zone comprise entre 4.66 et 4.88 ppm a été enlevée de tous les spectres avant l'analyse statistique. Comme décrit précédemment (Cloarec et al., 2005b), toutes les données ont été analysées en pleine résolution (33 600 données) et normalisées par rapport à l'aire totale pour les milieux de culture et les extraits aqueux. Pour les extraits organiques, cette normalisation s'est avérée peu adaptée et nous avons choisi d'intégrer l'aire sous la courbe pour chaque signal du spectre. Tous ont ensuite été normalisés par rapport à la somme des signaux du cholestérol (δ0.9 et 1.1). Malgré l'utilisation de tampons de pH contrôlés, des différences subtiles dans les déplacements

chimiques dues à des différences de pH étaient présentes dans les spectres aqueux et ceux des milieux de culture. Ces différences ont été corrigées par l'utilisation d'une fonction d'alignement décrite dans (Veselkov et al., 2009).

Les modèles ont été construits en utilisant l'ACP et l'O-PLS-DA sur SIMCA P+11 et Matlab 7.0.1 (The MathWorks Inc.). Pour faciliter l'interprétation, les coefficients de l'O-PLS ont été dessinés sur un domaine spectral en utilisant la méthode de back-scaling (Cloarec et al., 2005b). En utilisant cette méthode, la covariance de chaque variable est affichée et la forme du spectre RMN et le signe des coefficients sont préservés, la corrélation de la variable est ensuite affichée sur ce domaine spectral selon un code couleur. Une description plus précise de tous les outils statistiques utilisés dans ce travail se trouve dans le chapitre IV de cette thèse.

VI.2.3.6 Intégration statistique des données de métabonomique et de transcriptomique

L'intégration des analyses métabonomique et transcriptomique est basée sur la création de modèles prédictifs O-PLS où la matrice contenant les spectres RMN est régressée sur chacun des gènes sélectionné individuellement. Un modèle d'O-PLS a ainsi été calculé pour chacun des gènes différentiellement exprimés entre les cellules traitées au MEHP et les cellules contrôles selon le test SAM. Chaque modèle a été calculé avec une composante prédictive et sans faire intervenir de composante orthogonale.

VI.2.3.7 Dosage des triglycérides intracellulaires

Les cellules ont été trypsinées et les culots cellulaires lavés au PBS à J0, J3, J6, J8, J11 de différenciation et après 24 et 48h de traitement au MEHP et à la TCDD. Les culots ont ensuite été repris dans 100 µL de PBS et congelés à -80°C jusqu'à utilisation. La suspension cellulaire a été soumise à 3 cycles de congélation/décongélation pour casser les cellules. Les TG ont ensuite été dosés à l'aide du kit « triglycérides enzymatique PAP 150 » (Biomérieux, Marcy l'Etoile,

Table VI-1 : Amorces utilisées pour la RT-PCR

NM	Nom gène		Amorces 5'-3'	
NM_138712	PPARγ	Peroxisome proliferation receptor gamma	Re	AGGTCAGCGGACTCTGGATTC
			Fw	AGTGGGGATGTCTCATAATGC
NM_001122	ADFP	Adipose differentiation-related protein	Re	CAGGGATCCCAGTCTAAC
			Fw	ACACAGTCTTGGGGAGTC
NM_004104	FAS	Fatty acid synthase	Re	TCCACAGGTGGGAACAAG
			Fw	GAAGAAGGATCACAGGGAC
NM_001442	FABP4	Fatty acid binding protein 4	Re	GGTTATGGTGCTATTCAC
			Fw	GCATGGCCAAACCTAACATGA
NM_001001548	FAT/CD36	Fatty acid transport	Re	AACTGGAGAGGCAAAGGC
			Fw	TGGTACAGATGCAGCCTC
NM_000237	LPL	Lipoprotein lipase	Re	GGCACCCAACTCTCATAC
			Fw	AGCTGAGGACACTTGCCA
NM_001170	AQP7	Aquaporin 7	Re	GCGCACAGTTAGCAAAGG
			Fw	GATGGTATTCGGCCTTGG
NM_000167	GlyK	Glycerol kinase	Re	CTTGTCCCAGACTACAGTG
			Fw	TCCCAAGAGAAGGATGGG
NM_002612	PDK4	Pyruvate dehydrogenase kinase 4	Re	ACACCAGTCATCAGCCTC
			Fw	GTTTTGGTTACGGCTTGCC
NM_002591	PCK1	Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1	Re	TGCTCTTGGGTGACGATAAC
			Fw	GCTCTGAGGAGGAGAATGG
NM_020376	ATGL	Adipose triglyceride lipase	Re	AAGCTCATAGAGTGGCAGG
			Fw	TGTCAGACGGCGAGAATG
NM_005357	HSL	Lipase, hormone-sensitive	Re	GGGCTTTCTGGTCTGAGTT
			Fw	CAACAGGGGAACGAATCTG
NM_001876	CPT1	Carnitine palmitoyltransferase 1A	Re	AACCTCTTGACATTCCCCC
			Fw	TCCATTGACAGCCTCCAG
NM_012423	RPL13A	Ribosomal protein L13a	Re	TCCGGTAGTGGATCTTGG
			Fw	GCGTCTGAAGCCTACAAG

Re : Reverse, Fw : Forward

France) et normalisés par rapport aux protéines déterminées par la méthode de l'acide bicinchonique (BCA) à l'aide d'un kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL).

VI.2.4 RT PCR

Les cellules ont été traitées pendant 4, 8 et 24h avec ou sans MEHP 100 µM. L'extraction des ARN totaux a été effectuée comme pour l'étude transcriptomique. La transcription inverse, la RT PCR et le traitement des données ont ensuite été conduits comme décrit précédemment (Ellero et al., 2009), en utilisant les amorces décrites dans le Tableau VI-1, et le gène RPL13A comme gène de référence.

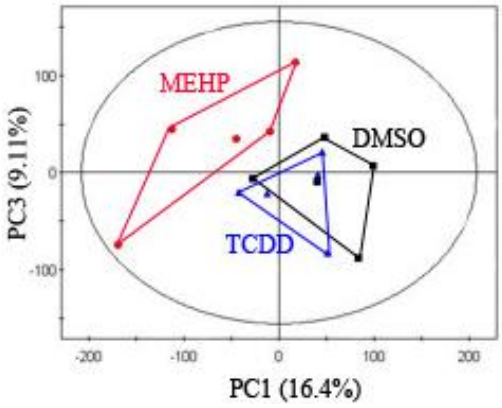
VI.2.5 Western-Blot

Les cellules ont été traitées pendant 18h avec ou sans MEHP 100 µM, puis grattées dans du RIPA (Santa-Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) selon les instructions du fournisseur pour extraire les protéines totales. Le cytosol a ensuite été récupéré en centrifugeant le lysat cellulaire 15 min-14 000 g-4°C et conservé à -80°C jusqu'à utilisation. Le Western-Blot anti-PEPCK a ensuite été conduit selon les conditions décrites dans (Ellero et al., 2009), en utilisant l'actine comme témoin de la quantité de protéines déposée.

VI.2.6 Mesure d'un indice glycéronéogénique : acides gras non estérifiés libérés dans le milieu de culture

Les cellules ont été traitées pendant 18h avec du MEHP 100 µM. Puis, elles ont été mises à jeun pendant 3h dans un milieu DMEM sans glucose contenant 3% (w/v) d'albumine de sérum de bœuf sans acides gras, puis transférées dans un milieu KRB contenant du pyruvate 5mM pendant 2h. Ce milieu a ensuite été récupéré et les acides gras libres y ont été dosés en utilisant une méthode colorimétrique à l'aide du kit « free fatty acids, half micro test » (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Allemagne).

Figure VI-3: Résultats de l'ACP conduite sur l'ensemble des données des puces d'expression Affymetrix



Des cultures primaires de préadipocytes sous-cutanés (n=5) ont été différenciées *in vitro* pendant 11 jours puis traitées pendant 24h avec 100 µM de MEHP (rouge), 10 nM de TCDD (bleu) ou 0.1% de DMSO (noir), utilisé comme solvant. Les changements transcriptomiques ont ensuite été évalués à l'aide de puces pangénomiques Affymetrix HumanGene ST 1.0 comme décrit dans la section Matériel et Méthodes. L'ACP a été menée sur l'intégralité des données d'expression mesurée sur les puces (32321 sondes).

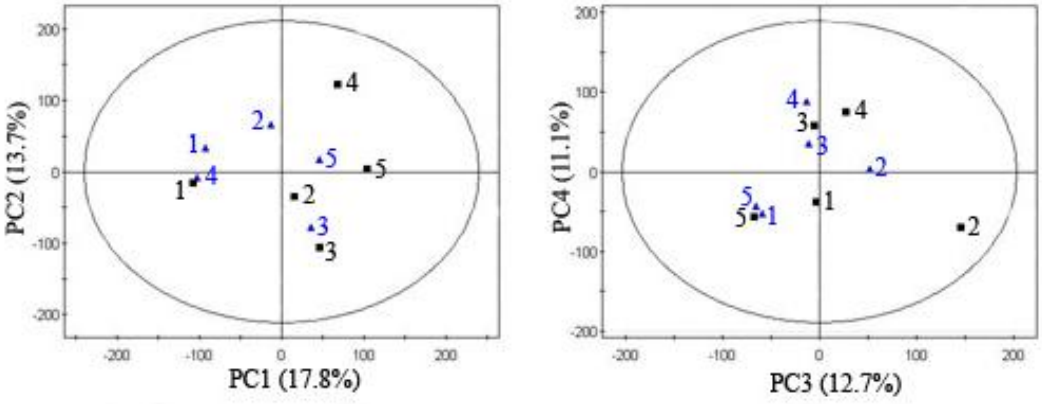
VI.3 Résultats

VI.3.1 Effets transcriptomiques de l'exposition des adipocytes humains à la TCDD et au MEHP

Cinq cultures primaires de préadipocytes, provenant du TA sous-cutané abdominal de femmes adultes saines, ont été différenciées *in vitro* en adipocytes pendant 11 jours. Ils ont ensuite été traités avec du DMSO (contrôle, 0.1%), de la TCDD (10 nM) ou du MEHP (100 µM) pendant 24h, avant extraction des ARN totaux. Une étude transcriptomique pan-génomique a été effectuée sur ces ARNm en utilisant des puces HumanGene 1.0 ST d'Affymetrix, en collaboration avec la plate-forme de génomique de l'Institut Cochin. Ces puces à ADN permettent la quantification de l'ensemble du transcriptome humain, et possèdent 32321 sondes d'oligonucléotides.

Dans un premier temps, une analyse en composantes principales (ACP) a été effectuée sur l'ensemble de ces données d'expression (Figure VI-3). Cette ACP montre qu'il est possible de discriminer, sans aucune présélection des gènes, les cellules traitées au MEHP des 2 autres groupes, cellules témoins et cellules traitées au TCDD. Au contraire, aucun axe de l'ACP ne semble séparer les cellules traitées au TCDD des 2 autres groupes.

Figure VI-4 Résultats de l'ACP conduite sur l'ensemble des données des puces d'expression Affymetrix (TCDD vs DMSO)



Des cultures primaires de préadipocytes humains ont été cultivées et traitées comme décrit dans la légende de la Figure VI-3. L'ACP a ici été menée seulement sur les cellules traitées à la TCDD (bleu) et les cellules contrôles (DMSO, noir). Les numéros représentent les numéros des individus.

VI.3.1.1 Effets transcriptomiques de l'exposition des adipocytes humains à la TCDD

L'ACP conduite sur les 2 seuls groupes DMSO et TCDD, et toujours sur l'ensemble des gènes présents sur la puce, est présentée sur la Figure VI-4. Elle ne permet pas de discriminer les cellules traitées à la TCDD des cellules contrôles. Elle met de plus en évidence le fait que la source de variation principale dans le jeu de données est la variation inter-individuelle.

Des tests statistiques univariés permettent cependant de mettre en évidence des gènes différentiellement exprimés entre les 2 conditions. Ici, nous avons utilisé le test SAM apparié pour connaître les gènes significativement sur- et sous-exprimés dans les cellules traitées à la TCDD par rapport aux cellules contrôles. Le critère de sélection des gènes a été fixé à un FDR de 5%. Le Tableau VI-2 donne cette liste de gènes. Nous avons ainsi trouvé 33 gènes significativement sur-exprimés dans les cellules traitées à la TCDD et 5 gènes sous-exprimés.

Nous avons ensuite utilisé des outils bioinformatiques afin de déterminer les voies métaboliques ou les fonctions biologiques statistiquement sur-représentées dans cette liste de gènes modulés par le traitement à la TCDD (voir la section « Matériels et Méthodes » pour plus de détails sur les outils de DAVID utilisés).

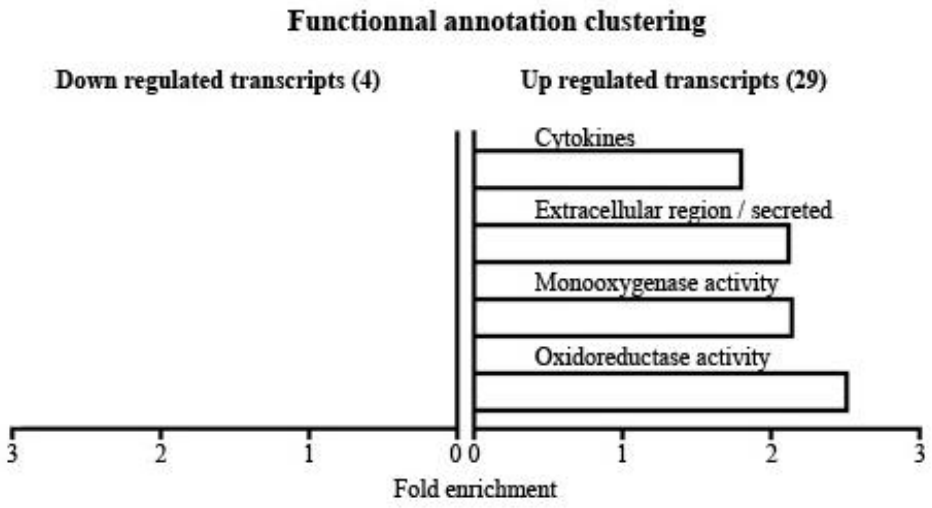
Les analyses ont été conduites indépendamment sur la liste de gènes sur-exprimés seulement (33 gènes, 29 seulement reconnus par DAVID), puis sur celle des gènes sous-exprimés (5 gènes, 4 reconnus par DAVID), ainsi que sur l'ensemble de la liste (38 gènes, 33 reconnus par DAVID).

Le premier outil que nous avons utilisé sur DAVID est le lien vers la base de données KEGG, qui permet de déterminer les voies métaboliques statistiquement perturbées. Dans les 3 analyses menées (gènes sur-exprimés seulement, gènes sous-exprimés seulement, gènes sur et sous-exprimés), aucune voie métabolique présente dans la base de données KEGG n'était significativement perturbée.

Table VI-2: Gènes différentiellement exprimés lors du traitement des adipocytes humains à la TCDD

Affymetrix ID	Accession	Fold change	Gene symbol	Gene name
Oxydative metabolism				
8051583	NM_000104	5.0	CYP1B1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1
7990391	NM_000499	2.2	CYP1A1	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1
7948565	NM_153611	1.7	CYBASC3	cytochrome b, ascorbate dependent 3
8018754	NM_134268	1.5	CYGB	cytoglobin
8066925	NM_000961	1.4	PTGIS	prostaglandin I2 synthase
Secreted proteins				
Cytokines				
8019486	NM_003004	2.4	SECTM1	secreted and transmembrane 1
8006433	NM_002982	2.4	CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2
7933194	NM_000609	2.3	CXCL12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12
7985364	NM_172217	1.3	IL16	interleukin 16
Cell proliferation/differentiation				
8157487	NM_002581	1.3	PAPPA	pregnancy-associated plasma protein A, pappalysin 1
8129562	NM_001901	-1.7	CTGF	connective tissue growth factor
7980316	NM_003239	-2.0	TGFB3	transforming growth factor, beta 3
Others				
8033818	NM_058164	1.6	OLFM2	olfactomedin 2
Cell structural factor				
Extracellular matrix				
7945232	NM_139055	1.9	ADAMTS15	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 15
8088560	NM_182920	1.7	ADAMTS9	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 9
7950906	NM_001814	1.5	CTSC	cathepsin C
Proteoglycans				
7958202	NM_018413	1.9	CHST11	carbohydrate sulfotransferase 11
8083569	NM_015508	1.8	TIPARP	TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase
8078155	NM_054110	1.4	GALNTL2	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 2
Cell shape				
7903227	NM_017734	1.8	PALMD	palmdelphin
7912692	NM_014424	1.7	HSPB7	heat shock 27kDa protein family, member 7
7952526	NM_016952	1.7	CDON	Cdon homolog
7999387	NM_001424	1.5	EMP2	epithelial membrane protein 2
Signaling proteins				
Nuclear signaling				
8057744	NM_007315	1.5	STAT1	signal transducer and activator of transcription 1
8131614	NM_001621	-1.4	AHR	aryl hydrocarbon receptor
7934979	NM_014391	-2.0	ANKRD1	ankyrin repeat domain 1
Kinases				
7964660	NM_000706	1.5	AVPR1A	arginine vasopressin receptor 1A
7905606	NM_000906	1.4	NPR1	natriuretic peptide receptor A/guanylate cyclase A
Others				
7950743	NM_014488	1.3	RAB30	RAB30, member RAS oncogene family
Others				
8084891	NM_153690	1.9	FAM43A	family with sequence similarity 43, member A
8104930	NM_004172	1.8	SLC1A3	solute carrier family 1 member 3
8020141	NM_153000	1.8	APCDD1	adenomatosis polyposis coli down-regulated 1
8020384	AK293321	1.6	KIAA1772	KIAA1772
7968883	NM_153218	1.6	C13ORF31	chromosome 13 open reading frame 31
7930498	NM_016234	1.4	ACSL5	acyl-CoA synthetase long-chain family member 5
8120967	NM_002526	-1.7	NT5E	5'-nucleotidase, ecto (CD73)

Figure VI-5 : Résultats de l'analyse d'ontologie de gènes pour les gènes différentiellement exprimés lors du traitement des adipocytes humains à la TCDD

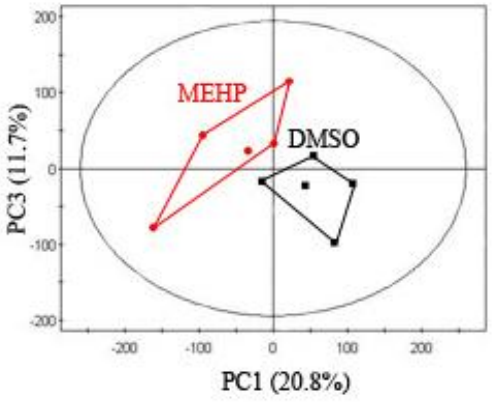


Des cultures primaires de préadipocytes humains ont été cultivées et traitées à la TCDD comme décrit dans la légende de la Figure VI-4. Le test SAM a été utilisé pour déterminer les gènes différentiellement exprimés dans les cellules traitées à la TCDD. Les termes biologiques significativement enrichis dans cette liste de gènes ont ensuite été recherchés *via* l'outil informatique DAVID.

Dans un deuxième temps, nous avons utilisé l'outil « Functionnal Annotation Clustering », qui permet une synthèse non redondante des diverses ontologies géniques trouvées sur les différentes bases de données accessibles depuis DAVID. Les résultats de cette analyse sont présentés sur la Figure VI-5. Pour cette analyse, le critère de sélection d'un cluster significatif a été baissé à un enrichissement supérieur à 1.8, car aucun cluster n'était enrichi avec un seuil supérieur à 2.

On voit sur cette figure que les gènes significativement sur-exprimés lors du traitement à la TCDD sont associés aux termes « activité monooxygénase » et « activité oxydo-réductase », ainsi que « sécrétion » et « cytokines ».

Figure VI-6: Résultats de l'ACP conduite sur l'ensemble des données des puces d'expression Affymetrix (MEHP vs DMSO)



Des cultures primaires de préadipocytes humains ont été cultivées et traitées comme décrit dans la légende de la Figure VI-3. L'ACP a ici été menée seulement sur les cellules traitées au MEHP (rouge) et les cellules contrôles (DMSO, noir).

VI.3.1.2 Effets transcriptomiques de l'exposition des adipocytes humains au MEHP

L'ACP conduite sur les 2 seuls groupes DMSO et MEHP, et sur l'ensemble des gènes présents sur la puce, permet de discriminer les cellules traitées au MEHP des cellules contrôles (Figure VI-6). Elle met ainsi en évidence le fait que le traitement au MEHP est une source de variation importante dans le jeu de données.

L'utilisation du test SAM apparié, avec un FDR de 5%, confirme ce résultat, puisqu'il permet d'identifier 227 gènes différentiellement exprimés dans les cellules traitées au MEHP (142 sur-exprimés, 85 sous-exprimés). Le Tableau VI-3 donne cette liste de gènes.

Table VI-3 : Gènes différentiellement exprimés lors du traitement des adipocytes humains au MEHP

Affymetrix ID	Accession	Fold change	Gene symbol	Gene name
Lipid metabolism				
FA synthesis				
7926334	NM_018324	1.98	OLAH	oleoyl-ACP hydrolase
7958466	NM_001093	1.94	ACACB	acetyl-Coenzyme A carboxylase beta
8008321	NM_025149	1.86	ACSF2	acyl-CoA synthetase family member 2
7948612	NM_013402	1.7	FADS1	fatty acid desaturase 1
8019392	NM_004104	1.62	FASN	Fatty acid synthase
7948630	NM_021727	1.39	FADS3	fatty acid desaturase 3
7929816	NM_005063	1.39	SCD	stearoyl-CoA desaturase
FA activation				
7930498	NM_016234	1.69	ACSL5	acyl-CoA synthetase long-chain family member 5
8048733	NM_004457	1.54	ACSL3	acyl-CoA synthetase long-chain family member 3
FA uptake and transport				
8151532	NM_001442	3.83	FABP4	fatty acid binding protein 4
8147049	NM_001444	3.15	FABP5	fatty acid binding protein 5
7914342	NM_004102	2.16	FABP3	fatty acid binding protein 3
8144917	NM_000237	1.95	LPL	lipoprotein lipase
8133876	NM_001001548	1.72	CD36	CD36 molecule
Beta oxidation				
8087224	NM_000387	1.75	SLC25A20	solute carrier family 25 member 20
8036602	NM_001398	1.72	ECH1	enoyl Coenzyme A hydratase 1, peroxisomal
8107532	NM_000414	1.47	HSD17B4	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4
8050908	NM_000182	1.44	HADHA	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, alpha subunit
8040639	NM_000183	1.44	HADHB	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, beta subunit
Lipolysis				
8037186	NM_005357	1.90	HSL	lipase, hormone-sensitive
8079153	NM_016006	1.55	ABHD5	abhydrolase domain containing 5
Lipid droplet formation				
8032829	NM_001080400	2.91	KIAA1881	KIAA1881
8085244	NM_022094	1.96	CIDEC	cell death-inducing DFFA-like effector c
8160297	NM_001122	1.88	ADFP	adipose differentiation-related protein
Lipid transport				
7905664	NM_024330	2.01	SLC27A3	solute carrier family 27 member 3
8072710	NM_030641	1.83	APOL6	apolipoprotein L, 6
7986214	NM_013272	1.37	SLCO3A1	solute carrier organic anion transporter family, member 3A1
8017927	NM_080283	-2.00	ABCA9	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 9
Phospholipid metabolism				
7960730	NM_005768	2.12	LPCAT3	lysophosphatidylcholine acyltransferase 3
8025672	NM_020428	1.63	SLC44A2	solute carrier family 44, member 2
8013120	NM_148172	1.44	PEMT	phosphatidylethanolamine N-methyltransferase
7913216	NM_000300	-1.59	PLA2G2A	phospholipase A2, group IIA
8092169	NM_003810	-1.59	TNFSF10	tumor necrosis factor superfamily, member 10
Glycerol transport				
8160663	NM_001170	2.54	AQP7	aquaporin 7
Steroid metabolism				
7909446	NM_005525	2.67	HSD11B1	hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1
7931832	NM_001354	2.55	AKR1C2	aldo-keto reductase family 1, member C2
8162940	NM_005502	2.29	ABCA1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1
7953100	NM_002014	1.96	FKBP4	FK506 binding protein 4, 59kDa
8137526	NM_198336	1.82	INSIG1	insulin induced gene 1
7939298	NM_001752	1.81	CAT	catalase
8133670	NM_000941	1.77	POR	P450 (cytochrome) oxidoreductase
8051583	NM_000104	1.70	CYP1B1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1

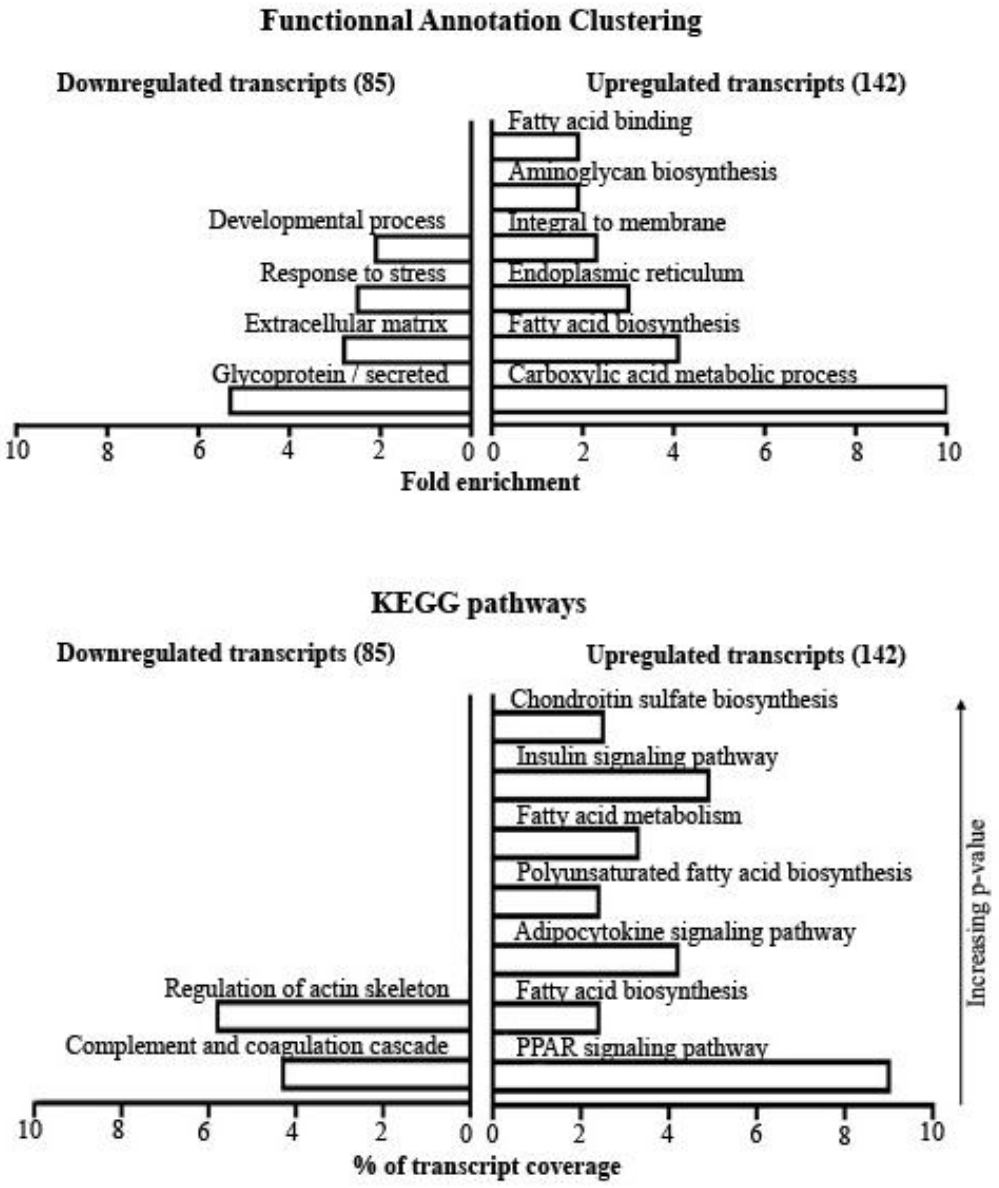
7925929	NM_003739	1.69	AKR1C3	aldo-keto reductase family 1, member C3
8025828	NM_000527	1.65	LDLR	low density lipoprotein receptor
7986446	NM_000693	1.57	ALDH1A3	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3
7982366	NM_003020	-1.47	SCG5	secretogranin V
Prostaglandin metabolism				
8100541	NM_001553	-1.33	IGFBP7	insulin-like growth factor binding protein 7
7902527	NM_001039585	-1.54	PTGFR	prostaglandin F receptor
Other				
8084710	NM_004797	2.15	ADIPOQ	Adiponectin
7939751	NM_005693	1.94	NR1H3	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3 (LXRa)
8127145	NM_021814	1.41	ELOVL5	ELOVL family member 5, elongation of long chain fatty acids
Carbohydrate metabolism				
7989501	NM_001218	1.35	CA12	carbonic anhydrase XII
Pentose phosphate pathway				
7897620	NM_002631	1.63	PGD	phosphogluconate dehydrogenase
Glycerol metabolism				
8141094	NM_002612	3.03	PDK4	pyruvate dehydrogenase kinase 4
7955348	NM_005276	2.57	G3PDH	glycerol-3-phosphate dehydrogenase
8063590	NM_002591	2.93	PEPCK	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1
Insulin signaling				
7938629	NM_000922	2.96	PDE3B	phosphodiesterase 3B, cGMP-inhibited
7955943	NM_000924	2.67	PDE1B	phosphodiesterase 1B, calmodulin-dependent
8135378	NM_002736	2.47	PRKAR2B	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, beta
8056327	NM_004490	2.04	GRB14	growth factor receptor-bound protein 14
Amino acid metabolism				
7963590	NM_015989	2.29	CSAD	cysteine sulfinic acid decarboxylase
8003814	NM_000049	2.07	ASPA	aspartoacylase
8104930	NM_004172	1.48	SLC1A3	solute carrier family 1 member 3
8158671	NM_000050	1.42	ASS1	argininosuccinate synthetase 1
Biosynthetic pathways				
NAD synthesis				
8142120	NM_005746	1.80	NAMPT	nicotinamide phosphoribosyltransferase
Pyrimidine synthesis				
8040843	NM_004341	1.44	CAD	carbamoyl-phosphate synthetase 2
Polyamine synthesis				
8050240	NM_002539	1.47	ODC1	ornithine decarboxylase 1
Cell structural factors				
ECM components				
8174389	NM_033641	1.35	COL4A6	collagen, type IV, alpha 6
8128991	NM_001105206	1.33	LAMA4	laminin, alpha 4
7980152	NM_000428	-1.33	LTBP2	latent transforming growth factor beta binding protein 2
8081235	NM_001850	-1.56	COL8A1	collagen, type VIII, alpha 1
7908204	NM_031935	-1.89	HMCN1	hemicentin 1
ECM processing				
8088560	NM_182920	2.48	ADAMTS9	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 9
7945232	NM_139055	1.90	ADAMTS15	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 15
8055606	NM_001006636	1.41	GTDC1	glycosyltransferase-like domain containing 1
8072626	NM_000362	-1.39	TIMP3	TIMP metallopeptidase inhibitor 3
7965941	NM_031302	-1.59	GLT8D2	glycosyltransferase 8 domain containing 2
7922807	NM_015101	-1.64	GLT25D2	glycosyltransferase 25 domain containing 2
8147777	NM_138455	-1.67	CTHRC1	collagen triple helix repeat containing 1
8171172	NM_015419	-1.72	MWRA5	matrix-remodelling associated 5
8155930	NM_001490	-1.82	GCNT1	glucosaminyl (N-acetyl) transferase 1
Cell/ECM interaction				
8077270	NM_006614	1.85	CHL1	cell adhesion molecule with homology to L1CAM
7999387	NM_001424	1.78	EMP2	epithelial membrane protein 2
7984019	NM_015059	1.47	TLN2	talin 2
8117020	NM_013262	1.45	MYLIP	myosin regulatory light chain interacting protein
7926545	NM_032812	-1.75	PLXDC2	plexin domain containing 2
7908924	NM_002725	-2.00	PRELP	proline/arginine-rich end leucine-rich repeat protein

Glycosaminoglycan synthesis				
8152617	NM_005328	2.37	HAS2	hyaluronan synthase 2
7931977	NM_030569	2.27	ITIH5	inter-alpha (globulin) inhibitor H5
7999754	NM_022166	1.68	XYLT1	xylosyltransferase I
7945110	NM_006278	1.64	ST3GAL4	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 4
7958202	NM_018413	1.57	CHST11	carbohydrate (chondroitin 4) sulfotransferase 11
7928291	NM_004273	1.45	CHST3	carbohydrate (chondroitin 6) sulfotransferase 3
8153021	NM_003033	1.42	ST3GAL1	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 1
Regulation of cell adhesion				
8129562	NM_001901	-1.72	CTGF	connective tissue growth factor
8001800	NM_001797	-1.69	CDH11	cadherin 11, type 2, OB-cadherin
7938231	NM_003621	-1.41	PPFIBP2	PTPRF interacting protein, binding protein 2
Actin cytoskelton				
7903227	NM_017734	2.78	PALMD	palmdelphin
8175393	NM_004840	1.60	ARHGEF6	Rac/Cdc42 guanine nucleotide exchange factor 6
7951351	NM_025208	-1.45	PDGFD	platelet derived growth factor D
7928444	NM_014000	-1.49	VCL	vinculin
8136347	NM_033138	-1.59	CALD1	caldesmon 1
8012475	NM_005964	-1.72	MYH10	myosin, heavy chain 10, non-muscle
7983630	NM_002009	-1.78	FGF7	fibroblast growth factor 7
7904761	NM_003637	-1.79	ITGA10	integrin, alpha 10
7984079	NM_000366	-1.79	TPM1	tropomyosin 1
Signaling molecules				
Calcium signaling				
8093906	NM_006005	1.49	WFS1	Wolfram syndrome 1
8057554	AF057356	1.43	CACYBP	calcyclin binding protein
Other signaling molecules				
7965335	NM_001946	2.17	DUSP6	dual specificity phosphatase 6
7974341	NM_053064	1.96	GNG2	guanine nucleotide binding protein, gamma 2
7967325	NM_032554	1.93	GPR81	G protein-coupled receptor 81
7991296	NM_198525	1.87	KIF7	kinesin family member 7
7972157	NM_001122659	1.83	EDNRB	endothelin receptor type B
8160040	NM_002839	1.82	PTPRD	protein tyrosine phosphatase, receptor type, D
7940160	NM_015177	1.64	DTX4	deltex 4 homolog
7962274	NM_017641	1.60	KIF21A	kinesin family member 21A
8139131	NM_001635	1.56	AMPH	amphiphysin
8112327	NM_001826	1.53	CKS1B	CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B
8105121	NM_000163	1.48	GHR	growth hormone receptor
8050302	NM_004850	1.33	ROCK2	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 2
8158183	NM_004408	-1.44	DNM1	dynamin 1
8140319	NM_005338	-1.53	HIP1	huntingtin interacting protein 1
8057803	NM_016192	-1.57	TMEFF2	transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 2
8129677	NM_005627	-1.61	SGK1	serum/glucocorticoid regulated kinase 1
8041820	NM_014011	-1.66	SOCS5	suppressor of cytokine signaling 5
7937335	NM_003641	-1.75	IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1
8147766	NM_003506	-1.89	FZD6	frizzled homolog 6
8146863	NM_001128205	-1.99	SULF1	sulfatase 1
Cell cycle				
Cell cycle				
7909441	NM_015714	2.47	G0S2	G0/G1switch 2
7938366	BX641032	-2.00	WEE1	WEE1 homolog
Apoptosis				
7940762	NM_033101	1.78	LGALS12	lectin, galactoside-binding, soluble, 12
7934101	NM_032797	1.66	AIFM2	apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated, 2
7958455	NM_003362	1.39	UNG	uracil-DNA glycosylase
8112202	NM_006622	-2.31	PLK2	polo-like kinase 2
7934979	NM_014391	-2.52	ANKRD1	ankyrin repeat domain 1
Other biological functions				
Vascular function				

8025402	NM_139314	3.42	ANGPTL4	angiopoietin-like 4
7964660	NM_000706	2.04	AVPR1A	arginine vasopressin receptor 1A
7946589	NM_130385	-1.41	MRVI1	murine retrovirus integration site 1 homolog
7953291	NM_001769	-1.64	CD9	CD9 molecule
8021623	NM_003784	-1.67	SERPINB7	serpin peptidase inhibitor, clade B, member 7
8104746	NM_000908	-1.72	NPR3	natriuretic peptide receptor C/guanylate cyclase C
Complement and coagulation cascade				
8022045	NM_003803	-1.53	MYOM1	myomesin 1, 185kDa
8092661	NM_001879	-1.62	MASP1	mannan-binding lectin serine peptidase 1
7928429	NM_002658	-1.64	PLAU	plasminogen activator, urokinase
8150509	NM_000930	-2.21	PLAT	plasminogen activator, tissue
Inflammation/immunity				
8113250	NM_001040458	1.42	ERAP1	endoplasmic reticulum aminopeptidase 1
8083594	NM_002852	-1.47	PTX3	pentraxin-related gene
8131803	NM_000600	-1.67	IL6	interleukin 6
8157524	NM_138554	-1.96	TLR4	toll-like receptor 4
Transport (other than lipid transport)				
8059538	NM_025243	2.62	SLC19A3	solute carrier family 19, member 3
7917741	NM_016040	1.38	TMED5	transmembrane emp24 protein transport domain containing 5
7933750	NM_194298	1.57	SLC16A9	solute carrier family 16, member 9
8111101	NM_054027	-1.43	ANKH	ankylosis, progressive homolog
8057677	NM_014585	-1.49	SLC40A1	solute carrier family 40, member 1
Trancription factor				
8055624	NM_014795	1.65	ZEB2	zinc finger E-box binding homeobox 2
8040211	NM_003597	1.29	KLF11	Kruppel-like factor 11
8147000	NM_024721	-1.54	ZFHX4	zinc finger homeobox 4
8147573	NM_053001	-1.61	OSR2	odd-skipped related 2
Secreted proteins				
7957221	NM_013381	2.28	TRHDE	thyrotropin-releasing hormone degrading enzyme
7928695	NM_032333	1.48	C10ORF58	chromosome 10 open reading frame 58
8132250	NM_133468	1.62	BMPER	BMP binding endothelial regulator
8031047	NM_001020818	-1.52	MYADM	myeloid-associated differentiation marker
8118890	NM_152753	-1.63	SCUBE3	signal peptide, CUB domain, EGF-like 3
8144802	NM_006207	-1.72	PDGFRL	platelet-derived growth factor receptor-like
8155754	NM_153267	-1.74	MAMDC2	MAM domain containing 2
7938225	NM_198474	-1.76	OLFML1	olfactomedin-like 1
7942957	NM_007173	-2.22	PRSS23	protease, serine, 23
Others				
8097335	NM_014278	2.63	HSPA4L	heat shock 70kDa protein 4-like
8175666	NM_021990	2.17	GABRE	gamma-aminobutyric acid A receptor, epsilon
8115907	AF151875	1.31	HSPC111	hypothetical protein HSPC111
8078405	NM_138410	1.32	CMTM7	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 7
8155268	NM_022490	1.34	POLR1E	polymerase (RNA) I polypeptide E, 53kDa
8088550	NM_198859	1.36	PRICKLE2	prickle homolog 2
8045889	NM_033394	1.37	TANC1	tetratricopeptide repeat, ankyrin repeat and coiled-coil containing 1
8107814	NM_016048	1.41	ISOC1	isochorismatase domain containing 1
7924603	NM_002296	1.43	LBR	lamin B receptor
8011293	NM_015229	1.44	KIAA0664	KIAA0664
7970864	NM_006644	1.45	HSPH1	heat shock 105kDa/110kDa protein 1
8080762	NM_020676	1.46	ABHD6	abhydrolase domain containing 6
7958211	NM_152318	1.46	C12ORF45	chromosome 12 open reading frame 45
8135915	NM_013332	1.50	HIG2	hypoxia-inducible protein 2
8053379	AK296608	1.53	LOC129293	hypothetical protein LOC129293
7961798	NM_152989	1.57	SOX5	SRY (sex determining region Y)-box 5
8116247	NM_005649	1.59	ZNF354A	zinc finger protein 354A
7981142	NM_024734	1.61	CLMN	calmin
8115261	NM_015621	1.62	CCDC69	coiled-coil domain containing 69
8161377	AK097152	1.69	LOC286297	hypothetical protein LOC286297
8121277	NM_001624	1.72	AIM1	absent in melanoma 1
7928705	NM_030927	1.73	TSPAN14	tetraspanin 14

8016832	NM_012329	1.75	MMD	monocyte to macrophage differentiation-associated
7943349	AK057372	1.79	FLJ32810	hypothetical protein FLJ32810
7948987	NM_007069	1.81	HRASLS3	HRAS-like suppressor 3
7943369	NM_032021	1.82	TMEM133	transmembrane protein 133
7942964	NM_022918	1.90	TMEM135	transmembrane protein 135
8069178	NM_001033049	-1.44	ADARB1	adenosine deaminase, RNA-specific, B1
7927681	NM_001080512	-1.54	BICC1	bicaudal C homolog 1
7924996	BC066649	-1.56	C1ORF198	chromosome 1 open reading frame 198
7923043	NM_198503	-1.65	KCNT2	potassium channel, subfamily T, member 2
8050160	NM_138799	-1.71	MBOAT2	membrane bound O-acyltransferase domain containing 2
8156571	AF043897	-1.80	C9ORF3	chromosome 9 open reading frame 3
8014241	NM_018042	-1.87	SLFN12	schlafen family member 12
7909730	NM_001017425	-2.20	KCNK2	potassium channel, subfamily K, member 2
8140840	NM_024636	-2.27	STEAP4	STEAP family member 4
7985317	NM_018689	-3.85	KIAA1199	KIAA1199

Figure VI-7 : Résultats de l'analyse d'ontologie de gènes pour les gènes différentiellement exprimés lors du traitement des adipocytes humains au MEHP



Des cultures primaires de préadipocytes humains ont été cultivées et traitées comme décrit dans la légende de la Figure VI-3. Le test SAM a été utilisé pour déterminer les gènes différentiellement exprimés dans les cellules traitées au MEHP. Les termes biologiques significativement enrichis dans cette liste de gènes ont ensuite été recherchés via l'outil informatique DAVID.

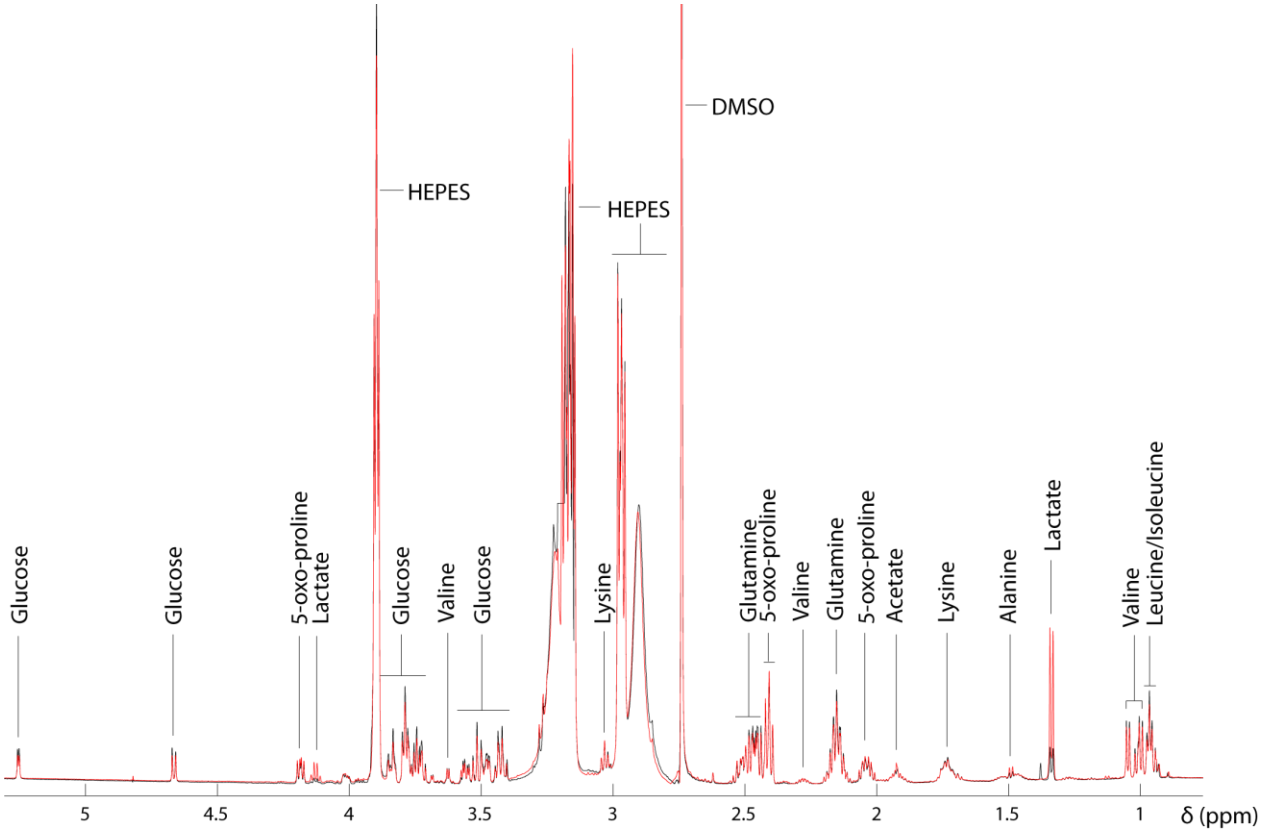
De même que pour le traitement à la TCDD, nous avons utilisé cette liste de gènes discriminants entre les cellules traitées au MEHP et les cellules contrôles pour effectuer des analyses bioinformatiques d'ontologie de gènes en utilisant DAVID. Les résultats de ces analyses sont donnés sur la Figure VI-7.

Les analyses ont d'abord été effectuées sur les gènes surexprimés dans les cellules traitées au MEHP (142 gènes, 125 reconnus par DAVID). Cette première analyse montre que le traitement au MEHP perturbe fortement les voies métaboliques des adipocytes humains, plus particulièrement celles liées au métabolisme lipidique. La voie métabolique la plus significativement perturbée sur KEGG est en effet la voie de signalisation PPARγ, récepteur nucléaire fortement impliqué dans la régulation de l'homéostasie lipidique ainsi que dans la différenciation adipocytaire. Les gènes appartenant aux voies métaboliques comme la synthèse et le métabolisme des acides gras, ou les voies de signalisation de l'insuline et des adipokines sont aussi surexprimés. Le deuxième outil utilisé sous DAVID confirme ces résultats et montre que les gènes surexprimés sont associés aux processus métaboliques des acides carboxyliques, à la biosynthèse et la liaison des acides gras, ainsi qu'à la biosynthèse des glycosaminoglycanes.

L'analyse des gènes sous-exprimés (85 dont 71 reconnus par DAVID) montre des perturbations très différentes, qui concernent plutôt l'extérieur de la cellule, sa structure et les relations avec la matrice extracellulaire. En effet, les seules voies métaboliques significativement perturbées dans KEGG sont la cascade du complément et la régulation du cytosquelette d'actine et ces gènes sous-exprimés sont associés aux termes suivants : glycoprotéines sécrétées, matrice extracellulaire, réponse au stress et processus de développement.

L'analyse de la liste complète des gènes régulés (227 gènes, 191 reconnus par DAVID) confirme les résultats des deux analyses précédentes et ne donne pas d'information supplémentaire. Elle n'est donc pas discutée.

Figure VI-8 : Spectres ^{1}H RMN 600 MHz des milieux de culture



Les spectres ^{1}H-RMN des milieux de culture des cellules ont été acquis à t=0 (noir) et après 24h de culture (rouge). DMSO : Diméthylsulfoxide, HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique.

VI.3.2 Etude métabonomique par ^{1}H-RMN des effets de l'exposition des adipocytes humains à la TCDD et au MEHP

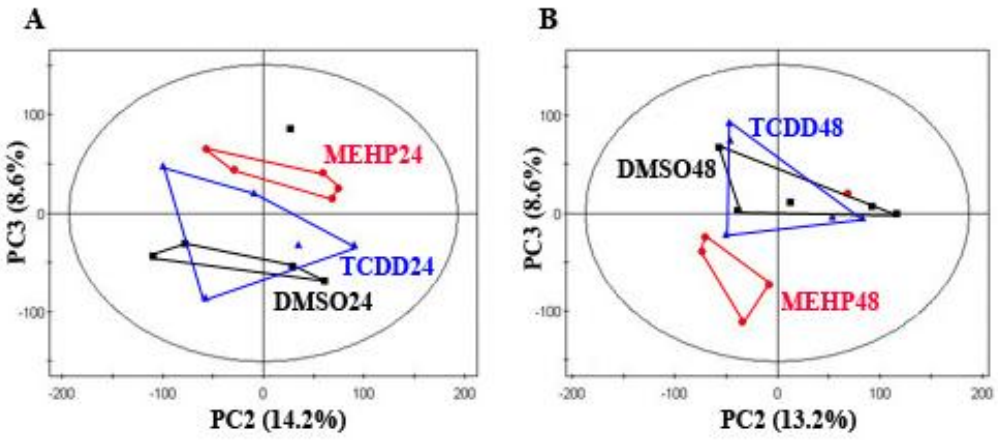
Afin de minimiser les variations expérimentales, les mêmes préadipocytes ont été cultivés en parallèle de ceux utilisés pour les analyses transcriptomiques et utilisés pour l'étude non ciblée des perturbations métaboliques. Ces cellules ont été traitées au même moment que les précédentes, pendant 24 et 48h, et utilisées pour une analyse métabonomique complète par ^{1}H-RMN. Les analyses métabonomiques ont été réalisées lors de différents séjours au sein de l'équipe du Pr. J. Nicholson à l'Imperial College de Londres, en collaboration avec le Dr. Sandrine Claus.

VI.3.2.1 Analyse des milieux de culture par ^{1}H-RMN : « metabonomic footprinting »

La métabonomique des milieux de culture est appelée «metabolic footprinting ». Cette méthode ne s'appuie pas sur la mesure directe des métabolites intracellulaires (une technique généralement appelée « metabolic fingerprinting »), mais sur la mesure des métabolites consommés et sécrétés dans le milieu de culture (Kell et al., 2005). Cette approche a déjà été utilisée pour détecter les métabolites excrétés dans des études de mode d'action dans lesquelles les métabolites excrétés lorsque des levures étaient soumises à des concentrations sub-létales d'inhibiteurs de croissance permettaient de discriminer le site ou le mode d'action de ces inhibiteurs.

Ici, nous avons voulu voir si la métabonomique par ^{1}H-RMN permettait d'évaluer les différences de consommation en nutriments de nos adipocytes en fonction des traitements. Nous avons donc effectué une analyse des milieux de culture par ^{1}H-RMN à 600 MHz. La Figure VI-8 montre deux spectres typiques de nos milieux de culture, celui d'un milieu de culture qui n'a jamais été en contact avec les cellules (noir) et celui d'un milieu après 24h de culture (rouge).

Figure VI-9 : ACP conduite sur les spectres RMN des milieux de culture des adipocytes

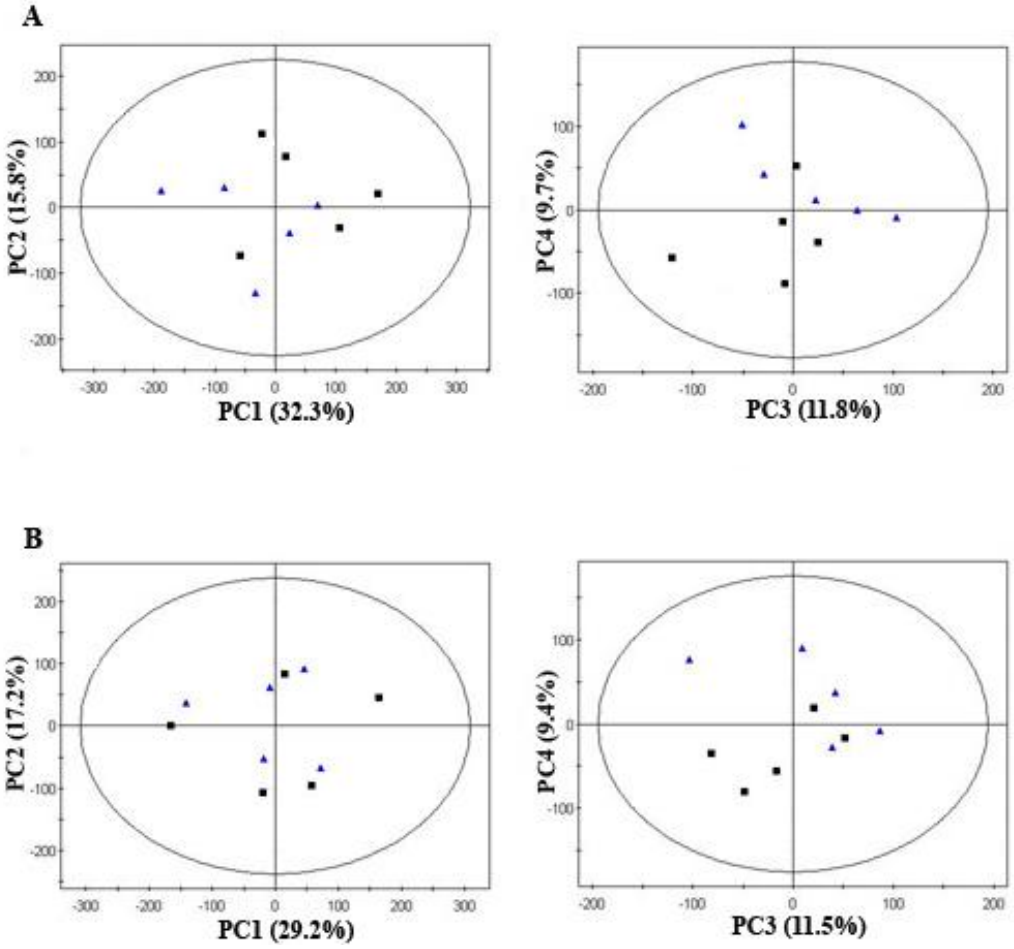


Les spectres ^{1}H-RMN 600MHz des milieux de culture des adipocytes ont été acquis après 24h (A) et 48h (B) de traitement avec de la TCDD (10 nM, bleu), du MEHP (100 µM, rouge) ou du DMSO (0.1%, noir), utilisé comme solvant.

De façon attendue, les spectres obtenus montrent la présence dans le milieu de culture cellulaire de nombreux acides aminés. Certains sont très visibles et quantifiables, comme les acides aminés branchés (valine, leucine, isoleucine). Les forts signaux de l'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES), utilisé comme tampon, cachent de nombreux autres signaux d'intérêt. Ainsi, pour ce genre d'analyse, il serait plus judicieux d'utiliser des milieux de culture contenant d'autres solutions tampons, comme le KH_2PO_4. Malgré ces difficultés, nos spectres permettent de quantifier un grand nombre de composés nutritifs dans nos diverses conditions. On voit par exemple, dans la figure 5, des différences importantes dans la composition du milieu de culture après 24h au contact des cellules : apparition de lactate (déplacement chimique (δ) 1.33ppm), de 5 oxo-proline (produit de dégradation spontané de la glutamine, δ 2.4), d'acétate (δ 1.91) et d'alanine (δ 1.46), consommation de glucose (δ 3.4-3.55 par exemple).

Des spectres similaires ont été acquis pour les milieux de culture de chaque échantillon de l'étude, i.e. pour les cellules traitées au DMSO, TCDD ou MEHP, après 24 ou 48h de traitement. La Figure VI-9 donne le résultat de l'ACP conduite sur l'ensemble des échantillons de l'étude et montre la différence entre les profils métaboliques des échantillons traités au MEHP et ceux des deux autres groupes.

Figure VI-10: ACP conduite sur les spectres RMN des milieux de culture des adipocytes (TCDD vs DMSO)



Les spectres RMN 600 MHz des milieux de culture des adipocytes ont été acquis après 24h (A) et 48h (B) de traitement avec de la TCDD (10 nM, bleu) ou du DMSO (0.1%, noir), utilisé comme solvant.

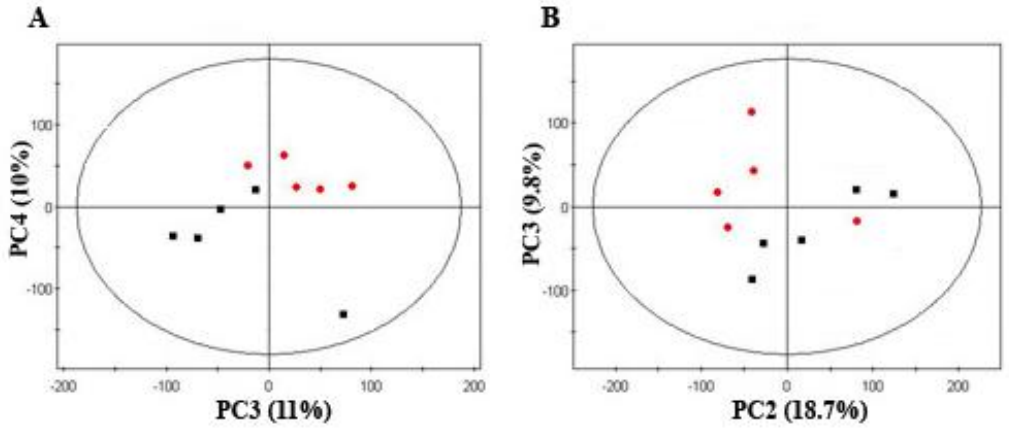
VI.3.2.1.1 Effet de la TCDD

La même analyse a été conduite sur les 2 seuls groupes TCDD et DMSO (Figure VI-10). Il n'est pas possible de séparer les cellules traitées à la TCDD des cellules contrôles dans cette ACP. Ces résultats indiquent que les variations dans les profils métaboliques des cellules induites par le traitement à la TCDD ne sont pas prédominantes par rapport à d'autres sources de variations.

Pour aller plus loin dans cette analyse, des analyses statistiques supervisées (Orthogonal-Projection sur les Structures Latentes-Analyse Discriminante, O-PLS-DA, voir chapitre IV) ont été conduites entre les spectres RMN des milieux de culture des cellules traitées à la TCDD et ceux des cellules contrôles. Aucune de ces analyses n'était statistiquement significative ($Q^2Y<0$), confirmant ainsi l'analyse par ACP et le peu de différence entre les profils métaboliques des milieux de culture des adipocytes traités à la TCDD et ceux des adipocytes contrôles.

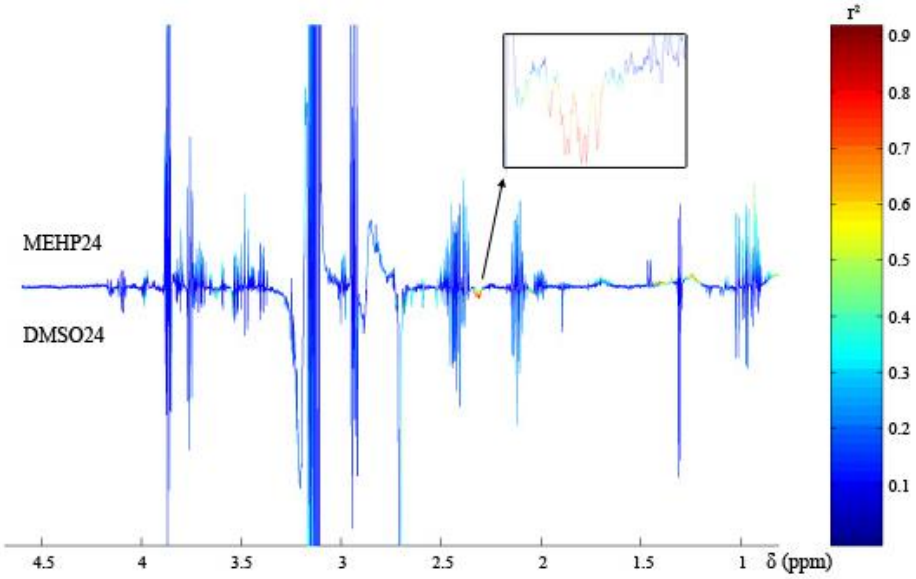
Ainsi, en utilisant la métabonomique par ^{1}H-RMN, nous n'avons pas mis en évidence de différences significatives dans les profils métaboliques des milieux de culture des adipocytes traités à la TCDD par rapport aux profils métaboliques des cellules contrôles.

Figure VI-11 : ACP conduite sur les spectres RMN des milieux de culture des adipocytes (MEHP vs DMSO



Les spectres RMN 600MHz des milieux de culture des adipocytes ont été acquis après 24h (A) et 48h (B) de traitement avec du MEHP (100 µM, rouge) ou du DMSO (0.1%, noir), utilisé comme solvant.

Figure VI-12 : Résultats de l'O-PLS-DA conduite sur les milieux de culture des cellules traitées au MEHP pendant 24h (MEHP24) et les cellules contrôles (DMSO24)



L'O-PLS-DA a été conduite entre les spectres RMN des milieux de culture des cellules traitées au MEHP pendant 24h (MEHP24) et les cellules contrôles (DMSO24). Paramètres du modèle : Q^2Y=0.41, R^2X=0.38, 1 composante orthogonale.

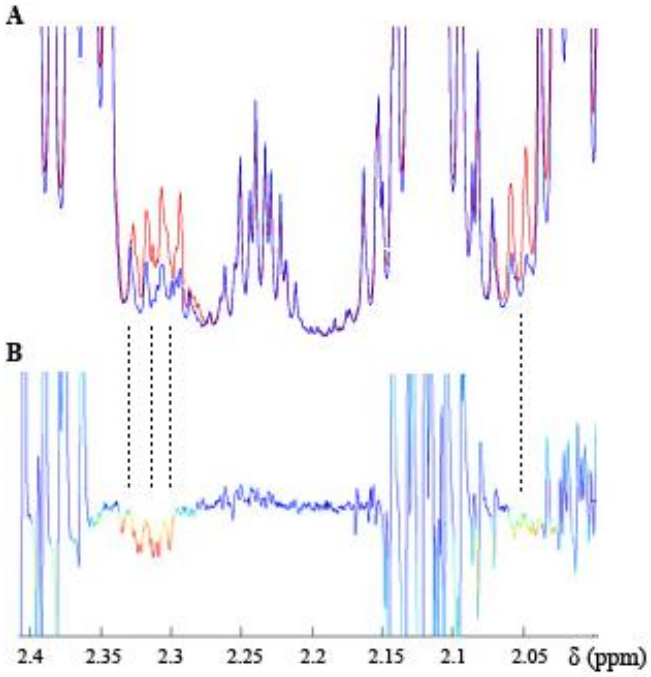
VI.3.2.1.2 Effet du MEHP

L'ACP a ensuite été conduite sur les 2 seuls groupes MEHP et DMSO (Figure VI-11). Au vu des résultats de cette analyse, il semble possible de discriminer les profils des milieux de culture des cellules traitées au MEHP de ceux des cellules contrôles, et ce dès 24h de traitement. Il semble pourtant y avoir 1 individu « outlyer » dans le groupe MEHP 48h (individu 3).

Afin de déterminer les métabolites responsables de cette séparation, des modèles d'O-PLS-DA ont été conduits sur ces spectres. Le modèle entre les cellules traitées au MEHP pendant 48h et leur contrôles est moins significatif que le modèle à 24h, à cause notamment du même individu outlyer observé lors de l'analyse ACP et n'est donc pas présenté ci-dessous (Q^2Y=0.19, R^2X=0.47, 1 composante orthogonale). La Figure VI-12 présente les résultats du modèle entre les cellules traitées au MEHP 24h et leurs contrôles (DMSO 24h).

Ce modèle montre qu'un composé résonnant avec un multiplet complexe à δ2.33 est le principal responsable de la séparation entre les cellules traitées au MEHP et les cellules contrôles. Ce signal est diminué dans les milieux de culture des cellules traitées, signalant soit que les cellules traités au MEHP en consomment plus que les cellules contrôles, soit qu'elles en sécrètent moins.

Figure VI-13 : Expérience de spike in de la proline pour l'identification du composé à δ2.33



A : Spectre ^{1}H-RMN 600 MHz d'un milieu de culture avant (bleu) et après (rouge) ajout de proline pure. B : Correspondance avec le modèle d'O-PLS-DA entre les cellules traitées au MEHP et les cellules contrôles présenté sur la figure VI-12.

Afin d'identifier ce composé, différentes stratégies ont été adoptées. Les recherches dans les bases de données, ainsi que des expériences de RMN 2D (non montrées), nous ont indiqué que le candidat le plus probable était la proline. Des expériences de « spike in », consistant à ajouter progressivement une solution de composé pur dans l'échantillon et à vérifier l'augmentation des signaux à identifier ont confirmé ce résultat (Figure VI-13).

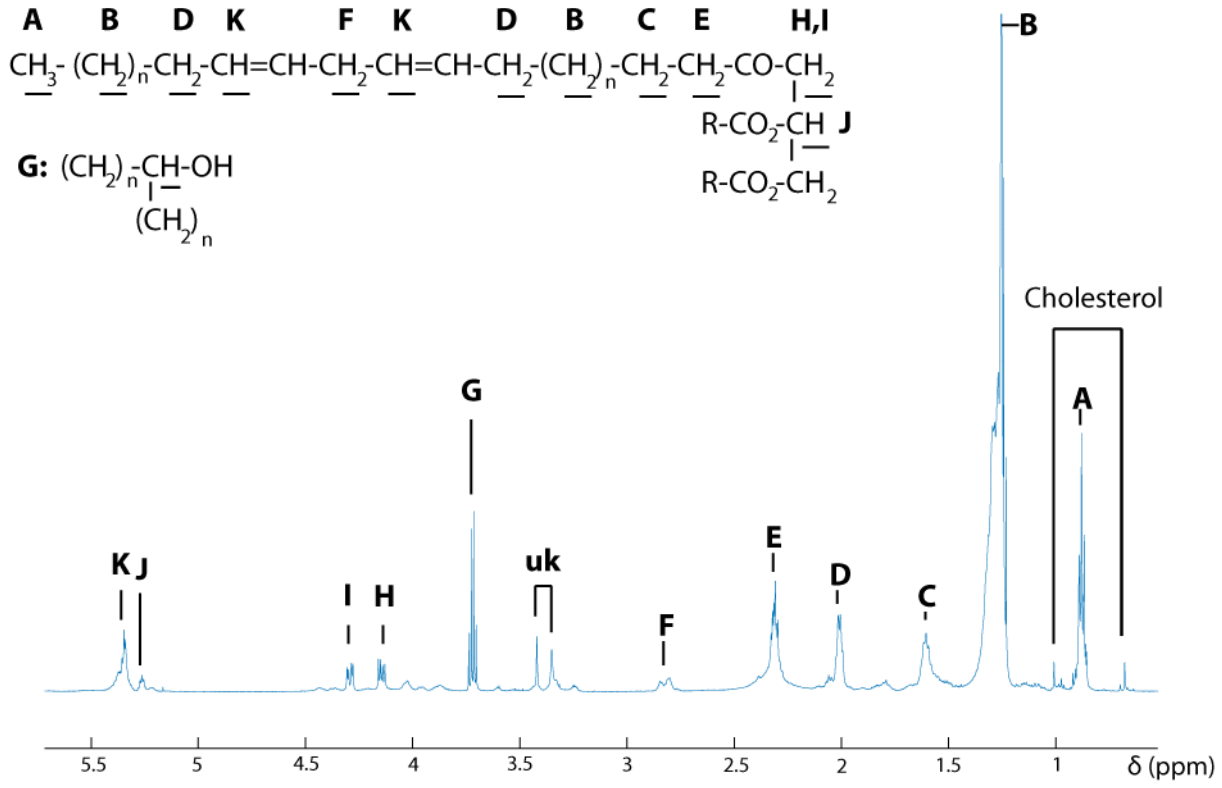
Ainsi, en utilisant la métabonomique par ^{1}H-RMN, nous avons mis en évidence une différence significative dans les profils métaboliques des milieux de culture des adipocytes traités au MEHP par rapport aux profils métaboliques des cellules contrôles : une diminution de la concentration de proline.

VI.3.2.1.3 Conclusion

Cette analyse métabonomique des milieux de culture n'a pas permis de mettre en évidence des différences significatives entre les adipocytes traités à la TCDD et les adipocytes contrôles.

Pour les adipocytes traités au MEHP, nous avons trouvé une diminution significative de la quantité de proline dans le milieu de culture extracellulaire, par rapport aux adipocytes non traités. L'intégration de l'aire sous la courbe pour le multiplet à δ2.33 montre que cette diminution est de l'ordre de 10%, et qu'elle est significative à la fois entre 0 et 24h de traitement, mais aussi entre 24 et 48h (données non montrées). Il s'agit maintenant de déterminer si ces données sont reproductibles, et quel est le sens biologique de cette diminution.

Figure VI-14 : Spectre ^{1}H-RMN 600 MHz d'un extrait organique d'adipocytes humains



Les culots d'adipocytes humains congelés ont été soumis à un protocole d'extraction des métabolites aqueux et lipophiles. La phase chloroformique, constituée des métabolites lipophiles, a été examinée par ^{1}H-RMN à 600 MHz. Les résonances sont assignées aux protons des chaînes des acides gras et au glycérol et identifiées par des lettres. uk : unknown compound.

VI.3.2.2 Analyse des extraits cellulaires organiques par ^{1}H-RMN

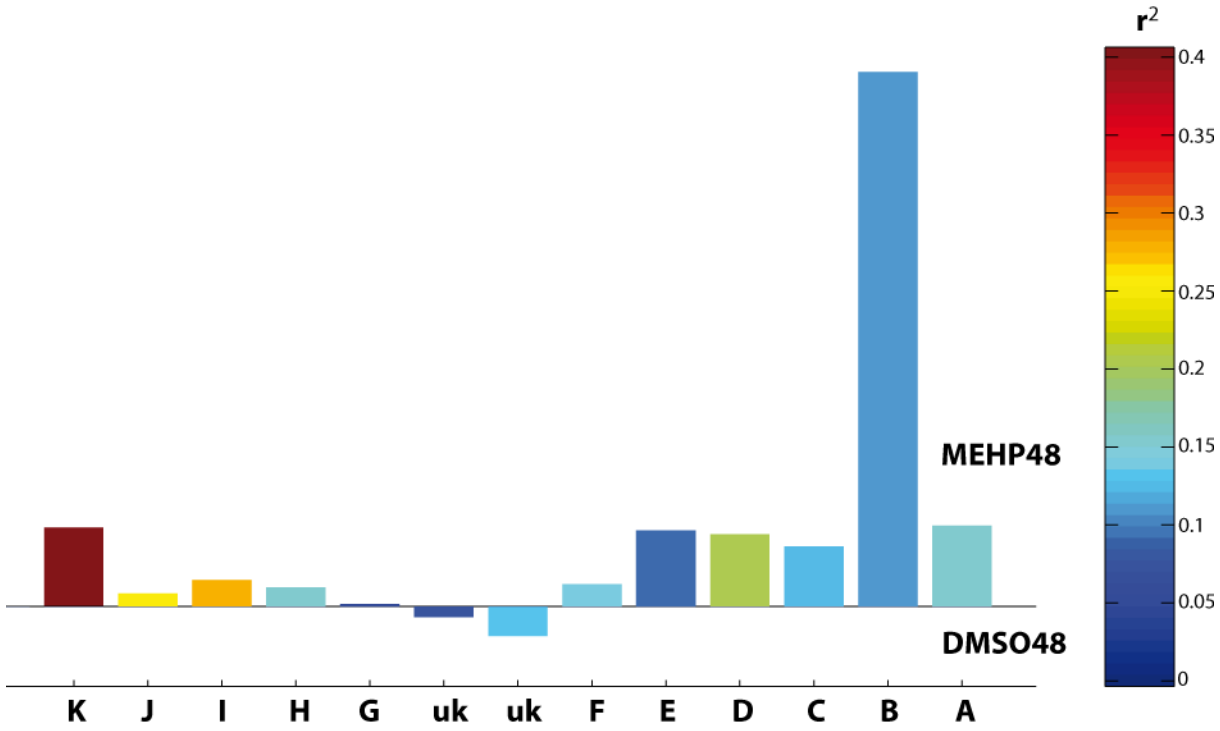
Une analyse métabonomique se réalise plus classiquement sur les métabolites intra-cellulaires (« metabolic fingerprinting »). Ici, après avoir testé différents protocoles, nous avons choisi de faire des extraits aqueux et organiques de nos culots cellulaires congelés, en utilisant une technique d'extraction chloroforme, eau, méthanol, en deux temps, qui permet une bonne séparation des métabolites lipophiles et hydrophiles.

Les résultats présentés dans cette section concernent les composés récupérés dans la phase chloroformique des extraits, i.e. les composés lipophiles. La Figure VI-14 présente un spectre ^{1}H-RMN typique obtenu pour ces phases organiques.

Ces spectres permettent la mesure de signaux émanant de différentes molécules lipophiles. Les assignements des différents signaux ont été faits en comparant les spectres obtenus à ceux obtenus dans la littérature (Zancanaro et al., 1994). On mesure ainsi dans ces spectres des signaux émanant du cholestérol, du glycérol (lié aux phospholipides et aux triglycérides), des acides gras.

Les techniques statistiques multivariées classiques d'analyse de spectres qui ont été utilisées plus haut pour l'analyse des milieux de culture (ACP, O-PLS-DA) n'ont pas donné de résultats significatifs, ni pour l'analyse des modèles TCDD vs DMSO, ni pour celle des modèles MEHP vs DMSO. Il est possible que ce manque de résultats significatifs soit dû à un problème de normalisation des spectres. La technique classique de normalisation des spectres RMN est la « normalisation par rapport à l'aire totale », i.e. chaque point du spectre est divisé par l'aire totale sous la courbe de ce même spectre. Cette technique de normalisation permet de corriger les effets de dilution entre les échantillons. Cependant, pour des spectres comme ceux présentés ici dans les phases organiques, qui possèdent un nombre réduit de larges signaux, cette technique de normalisation est peut-être mal adaptée (voir (van den Berg et al., 2006) et (Craig et al., 2006) pour une discussion sur les différentes méthodes de prétraitement des

Figure VI-15 : O-PLS-DA menées sur les spectres des phases organiques des adipocytes traités au MEHP pendant 48h et les cellules contrôles



L'O-PLS-DA a été conduite entre les spectres RMN des extraits organiques des cellules traitées au MEHP pendant 48h (MEHP48) et les cellules contrôles (DMSO48). Chaque signal des spectres des extraits organiques a été intégré et normalisé par rapport aux signaux du cholestérol et est identifié par la même lettre que dans la figure 13. Paramètres du modèle : Q^2Y=0.25, R^2X=0.85, 1 composante orthogonale. uk : unknown compound.

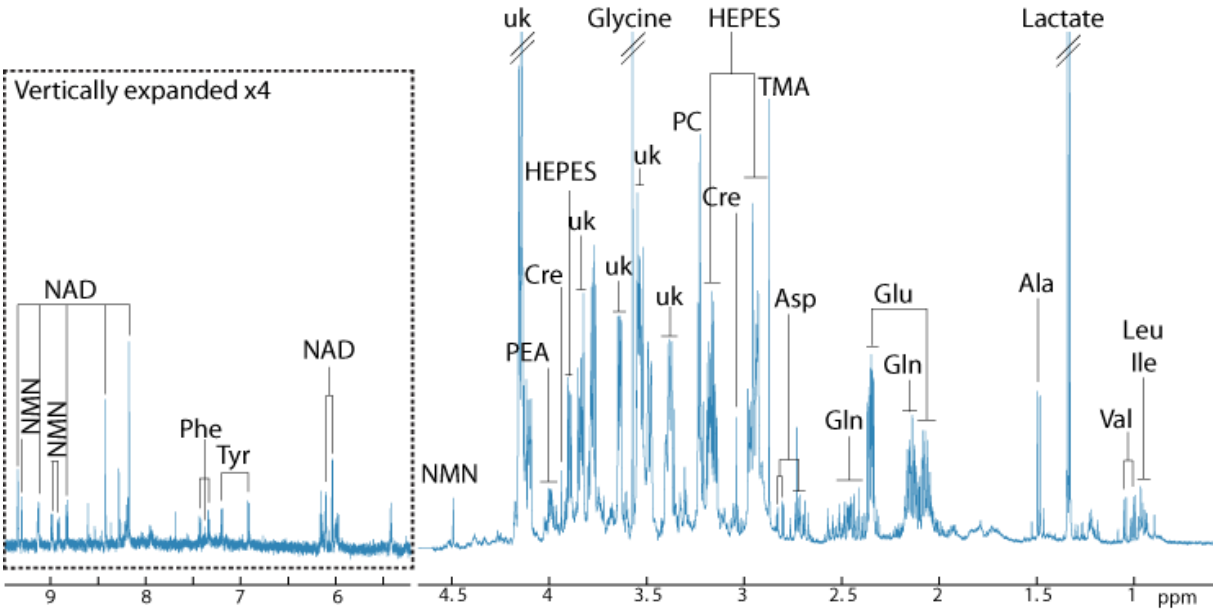
spectres ^{1}H-RMN en métabonomique). Pour le traitement au MEHP par exemple, nous avons vu dans l'étude du transcriptome qu'il perturbait fortement des gènes du métabolisme lipidique. Il est donc probable que ces perturbations transcriptomiques se reflètent sur le contenu lipidique intracellulaire des cellules. Supposons par exemple que ces perturbations se reflètent par une augmentation de la concentration intracellulaire de tous les lipides résonnant dans le spectre. Un tel phénomène a déjà été observé dans des cellules trophoblastiques de rat (Xu et al., 2006) traitées au MEHP et ne pourrait pas être visible sur nos spectres car il serait effacé par la technique de normalisation sous l'aire totale appliquée.

Ainsi, pour contourner cette difficulté, les spectres RMN ont été normalisés par rapport aux signaux du cholestérol (δ 0.68 et δ 1.01). Ces signaux sont en effet les seuls dont on peut affirmer avec certitude qu'ils n'appartiennent pas à la chaine carbonée d'un acide gras. Ainsi, tous les signaux présents dans les spectres ont été intégrés (calcul de l'aire sous la courbe), et normalisés par rapport à la somme de ces 2 signaux. Les modèles d'O-PLS-DA ont ensuite été effectués sur ces données. Ces modèles ne sont pas significatifs lors du traitement à la TCDD. Pour le traitement au MEHP, les modèles à 24h ne sont pas significatifs non plus. Par contre, après 48h de traitement, certains signaux semblent significativement perturbés, dont ceux des fonctions CH=CH des acides gras (δ5.35, signal K), ainsi que 2 signaux appartenant au glycérol lié aux phospholipides et/ou aux triglycérides (δ5.28, signal J et δ4.33, signal I) (Figure VI-15).

L'analyse des extraits organiques des adipocytes humains n'a pas montré de différences significatives entre les profils métaboliques des cellules traitées à la TCDD et ceux des cellules contrôles.

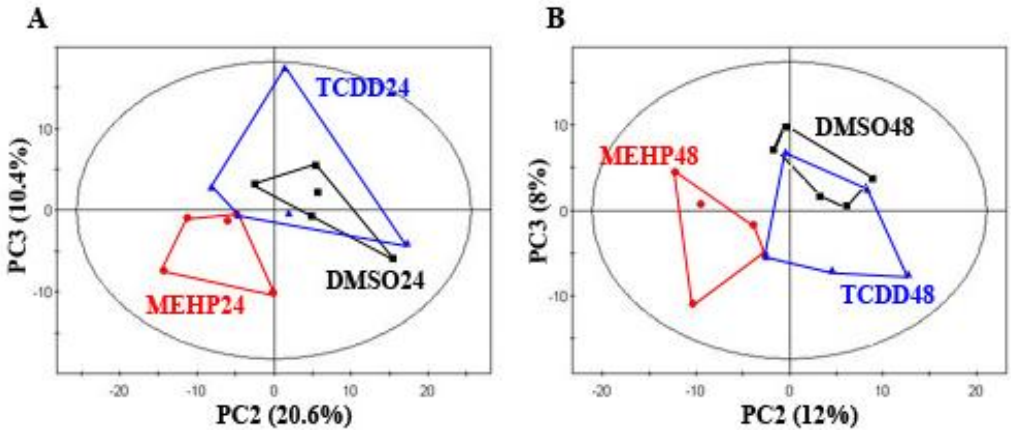
Pour les cellules traitées 48h au MEHP, cette analyse semble montrer une augmentation des signaux appartenant aux fonctions CH=CH et des signaux appartenant au glycérol lié aux triglycérides et/ou aux phospholipides.

Figure VI-16 : Spectre ^{1}H-RMN 600 MHz d'un extrait aqueux d'adipocytes humains



Les culots d'adipocytes humains congelés ont été soumis à un protocole d'extraction des métabolites aqueux et lipophiles. La phase aqueuse, constituée des métabolites polaires, a été examinée par ^{1}H-RMN à 600MHz. Leu : Leucine ; Ile : Isoleucine ; Val : Valine ; Glu : Glutamate ; Gln : Glutamine ; Asp : Aspartate ; TMA : Triméthylamine ; Cre : Créatine ; PC : Phosphocholine ; uk : unknown compound ; PEA : Phosphoéthanolamine ; NMN : N-Méthylnicotinamide ; NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide ; Tyr : Tyrosine ; Phe : Phenylalanine.

Figure VI-17: ACP conduite sur les spectres RMN des extraits cellulaires aqueux des adipocytes



Les spectres RMN 600MHz des extraits cellulaires aqueux des adipocytes ont été acquis après 24h (A) et 48h (B) de traitement avec de la TCDD (10 nM, bleu), du MEHP (100 µM, rouge) ou du DMSO (0.1%, noir), utilisé comme solvant.

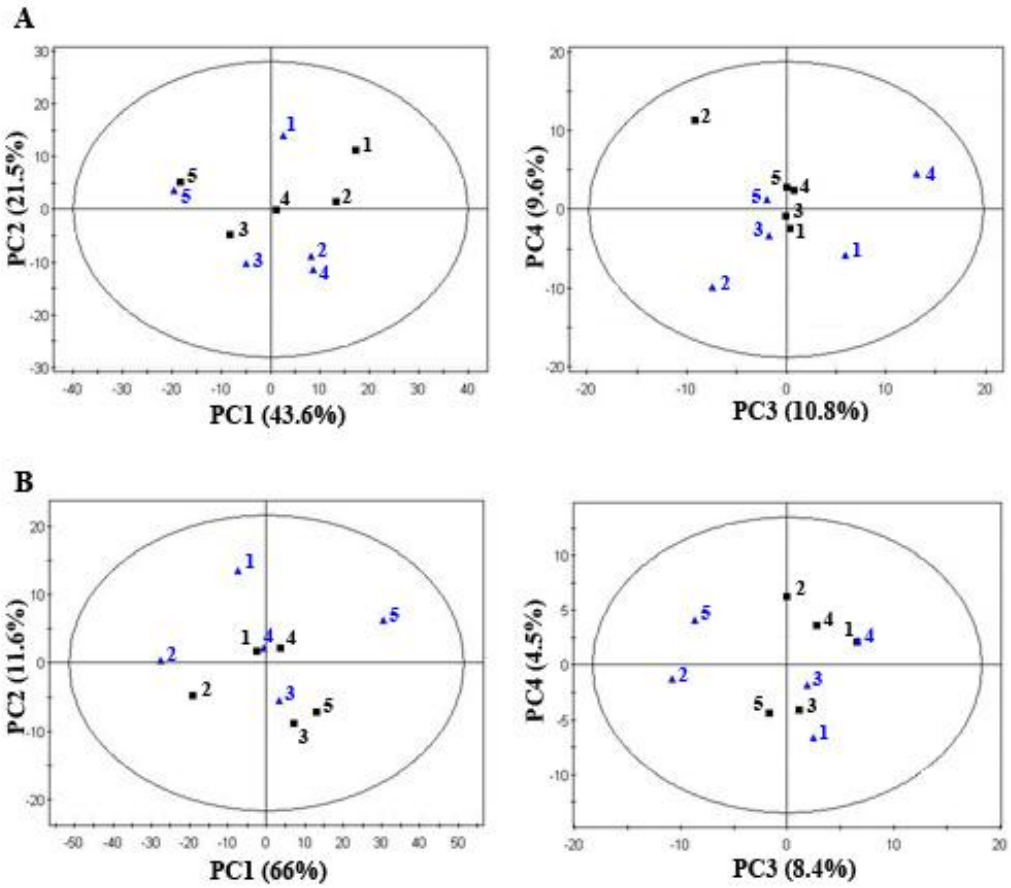
VI.3.2.3 Analyse des extraits cellulaires aqueux par ^{1}H-RMN

Nous avons ensuite conduit les mêmes analyses sur les phases aqueuses des extraits cellulaires, contenant les métabolites polaires. La Figure VI-16 montre un exemple d'un spectre ^{1}H-RMN 600 MHz de phase aqueuse.

L'identification des différents composés présents dans ces spectres a été effectuée en utilisant diverses bases de données, en passant certains échantillons en RMN 2D et en utilisant des outils statistiques de corrélation des différents pics de résonance (STOCSY), (données non montrées).

La Figure VI-17 présente les résultats de l'ACP conduite sur les spectres de ces extraits aqueux. Cette ACP montre que, parallèlement aux résultats obtenus en transcriptomique et en métabonomique sur les milieux de culture, l'analyse des spectres ^{1}H-RMN des métabolites polaires des adipocytes permet de discriminer les profils métaboliques des cellules traitées au MEHP de ceux des cellules contrôles, dès 24h de traitement. Au contraire, les profils métaboliques cellules traitées à la TCDD semblent encore une fois indiscernables de ceux des cellules contrôles, même après 48h de traitement.

Figure VI-18 : ACP conduite sur les spectres RMN des extraits cellulaires aqueux des adipocytes humains (TCDD vs DMSO)



Les spectres RMN 600MHz des extraits cellulaires aqueux des adipocytes ont été acquis après 24h (A) et 48h (B) de traitement avec de la TCDD (10 nM, bleu) ou du DMSO (0.1%, noir), utilisé comme solvant. Les numéros à coté des points représentent les numéros des individus.

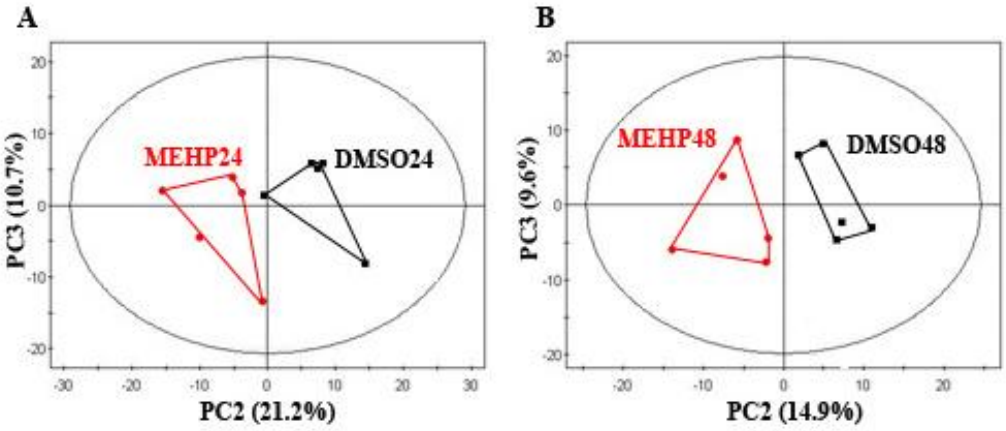
VI.3.2.3.1 Effet de la TCDD

L'ACP a été conduite sur les 2 seuls groupes TCDD et DMSO (Figure VI-18). Elle montre que les profils métaboliques aqueux des adipocytes traités à la TCDD ne présentent pas de modifications significatives par rapport aux profils des cellules contrôles. Ces résultats sont confirmés par des analyses O-PLS-DA puisqu'aucun des modèles testés n'est statistiquement significatif ($Q^2Y<0$ pour les 3 modèles : DMSO (n=10) vs TCDD (n=10) ; DMSO 24h (n=5) vs TCDD 24h (n=5) ; DMSO 48h (n=5) vs TCDD 48h (n=5)).

Cette ACP montre aussi que les variations inter-individuelles sont les variations les plus importantes dans ce jeu de données.

Ainsi, en utilisant la métabonomique par ^{1}H-RMN, nous n'avons pas mis en évidence de différences significatives dans les profils métaboliques des extraits cellulaires aqueux des adipocytes traités à la TCDD par rapport aux profils métaboliques des cellules contrôles.

Figure VI-19 : ACP conduite sur les spectres RMN des extraits cellulaires aqueux des adipocytes humains (MEHP vs DMSO)



Les spectres RMN 600MHz des extraits cellulaires aqueux des adipocytes ont été acquis après 24h (A) et 48h (B) de traitement avec du MEHP (100 µM, rouge) ou du DMSO (0.1%, noir), utilisé comme solvant.

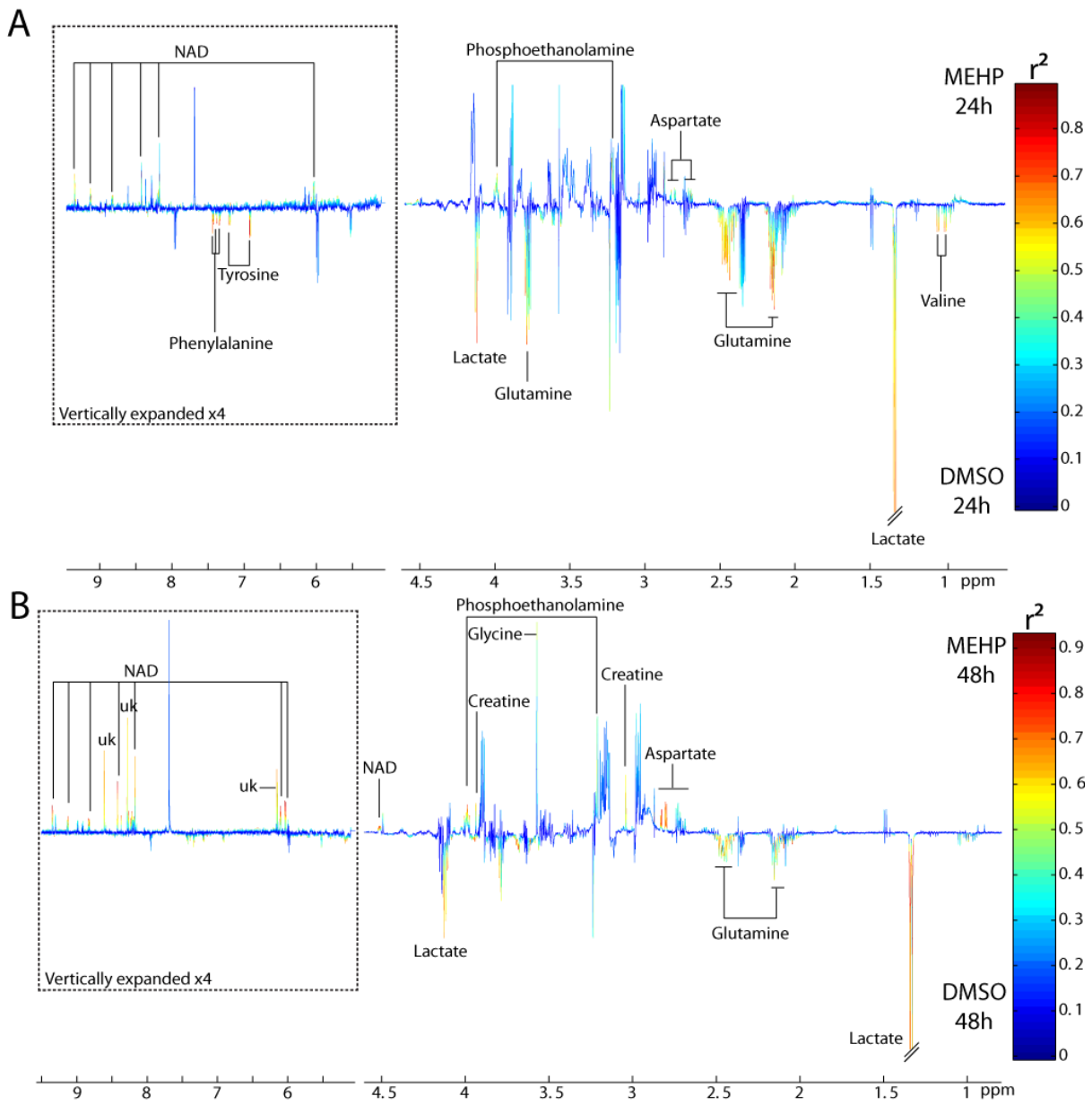
VI.3.2.3.2 Effet du MEHP

L'ACP a été conduite pour les groupes MEHP vs DMSO (Figure VI-19). Les résultats de cette ACP montrent qu'il semble possible de discriminer les profils métaboliques aqueux des cellules traitées au MEHP de ceux des cellules contrôles, et ce dès 24h de traitement.

Les modèles d'O-PLS-DA, très significatifs, confirment ces résultats et permettent d'identifier les composés responsables de cette séparation. Après 24h de traitement, les adipocytes traités au MEHP possèdent moins de lactate que les cellules contrôles, ainsi que des concentrations plus faibles de certains acides aminés dont la glutamine, la valine, la tyrosine, la phénylalanine, et de glycérophosphocholine (Figure VI-20A). Après 48h de traitement, ces résultats se confirment, le lactate étant toujours le composé le plus diminué dans les cellules traitées au MEHP, et la concentration de glutamine étant toujours plus faible dans ces cellules. Les concentrations d'aspartate, de NAD, de phosphoéthanolamine, de créatine, de choline et de glycine sont elles plus importantes dans les cellules traitées au MEHP (Figure VI-20B).

Ainsi, en utilisant la métabonomique par ^{1}H-RMN, nous avons mis en évidence des différences significatives dans les profils métaboliques des extraits cellulaires aqueux des adipocytes traités au MEHP par rapport aux profils métaboliques des cellules contrôles, et ce dès 24h de traitement.

Figure VI-20 : O-PLS-DA conduite sur les spectres ^{1}H RMN 600MHz des extraits aqueux des adipocytes traités au MEHP et les cellules contrôles



L'O-PLS-DA a été conduite entre les spectres RMN des extraits aqueux des cellules contrôles et celles traitées au MEHP pendant 24h (A) ou 48h (B). uk : unknown compound.

Paramètres du modèle à 24h : Q^2Y=0.70, R^2X=0.63, 1 composante orthogonale.

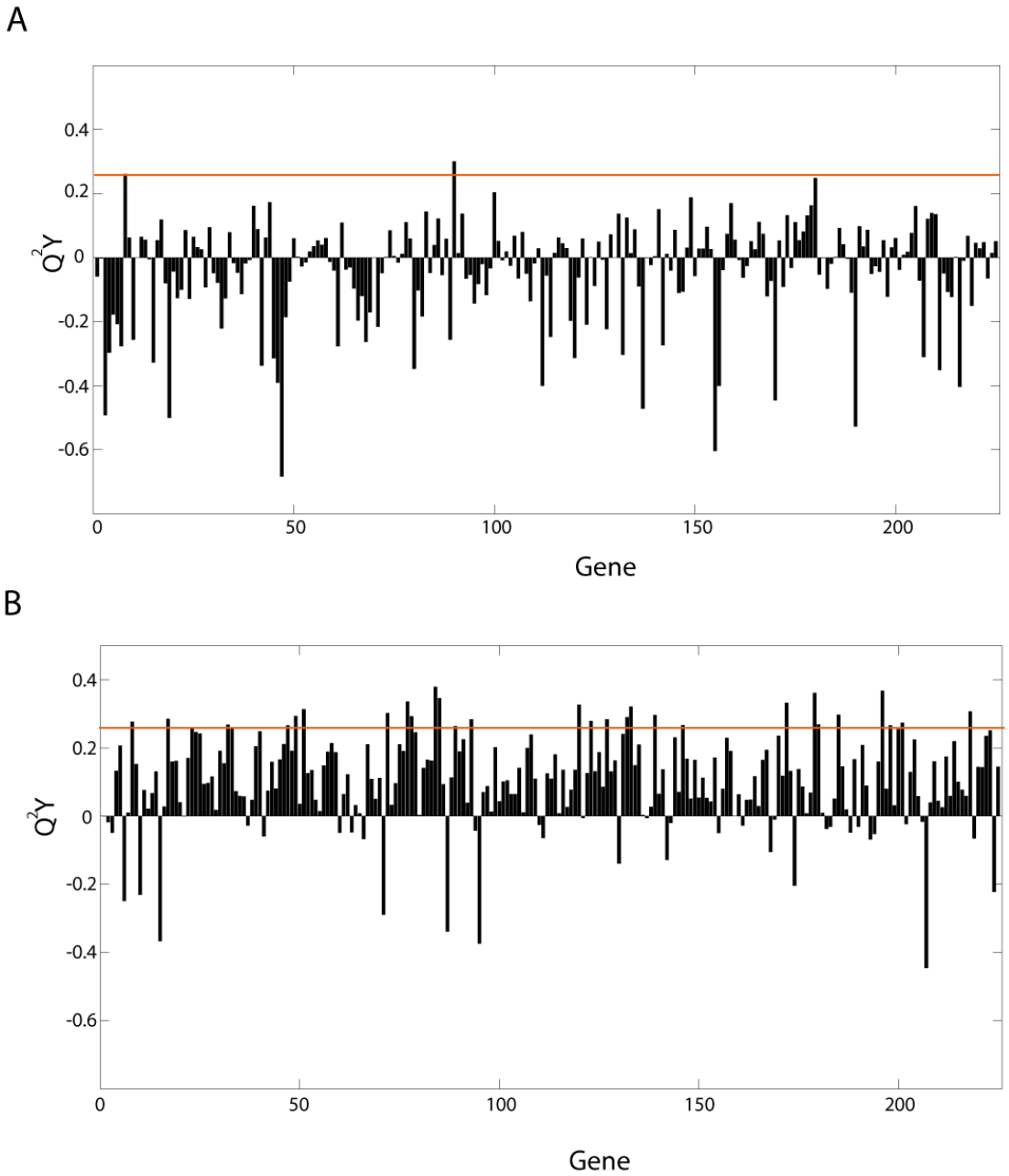
Paramètres du modèle à 48h : Q^2Y=0.83, R^2X=0.65, 1 composante orthogonale.

VI.3.2.3.3 Conclusion

Les profils ^{1}H RMN des métabolites intracellulaires aqueux des adipocytes permettent la quantification simultanée d'un grand nombre de composés appartenant à des familles chimiques diverses : acides aminés, sucres, acides organiques, amines…

L'analyse de ces profils n'a, une fois encore, pas permis de discriminer les adipocytes traités à la TCDD des cellules contrôles, alors que les profils des cellules traitées au MEHP sont très perturbés, dès 24h de traitement. Le lactate, très diminué dans ces cellules (-50%), est le composé le plus discriminant dans les modèles statistiques entre les cellules traitées au MEHP et les cellules contrôles. Des acides aminés (valine, glutamine, glutamate, tyrosine, phénylalanine) sont très diminués dans ces cellules, d'autres (aspartate, glycine) sont augmentés. Le métabolisme des phospholipides semble perturbé aussi lors de ce traitement : augmentation de la concentration de phosphoéthanolamine et de choline, diminution de celle de glycérophosphocholine. Enfin, ces cellules possèdent une concentration plus importante de NAD, surtout après 48h de traitement.

Figure VI-21 : O-PLS : intégration des données transcriptomiques et métabonomiques



Chaque barre représente le Q^2Y d'un modèle O-PLS qui a comme matrice X l'intégralité des données de spectre ^{1}H-RMN des extraits aqueux après 24h (A) et 48h (B) de traitement et comme matrice Y les données d'expression de chacun des 226 gènes différentiellement exprimés lors du traitement au MEHP trouvés par le test SAM.

VI.3.2 Intégration des données transcriptomiques et métabonomiques

Nous avons essayé d'intégrer de façon statistique les données obtenues sur les spectres RMN des extraits aqueux et les données transcriptomiques. Pour cela, des modèles PLS ont été testés, qui cherchent à prédire les données de transcriptomique à partir des données de métabonomique. De façon simplifiée, 226 modèles PLS ont été construits, un modèle pour chaque gène considéré comme différentiellement exprimé par le test SAM (Table VI-3). Chaque modèle essaie de prédire les valeurs d'expression d'un gène, obtenues grâce aux puces à ADN des cellules traitées au MEHP et des cellules contrôles, à partir des données des spectres RMN des extraits aqueux des mêmes cellules. Les Q^2Y de ces modèles, indicateurs de la capacité de prédiction entre ces deux jeux de données, sont présentés sur la Figure VI-21.

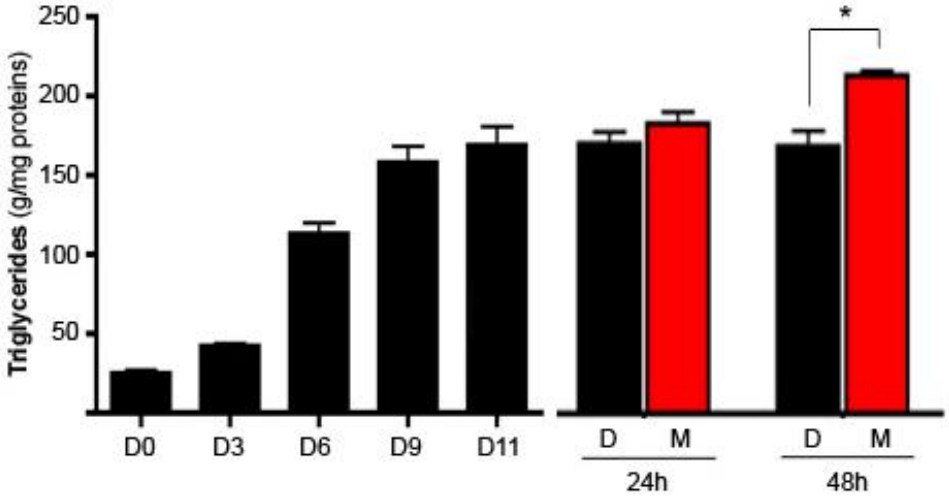
On voit qu'après 24h de traitement (Figure VI-21A), la plupart des Q^2Y sont négatifs et qu'un seul de ces modèles dépasse le seuil de $Q^2Y>0.25$, traduisant une faible prédiction des données transcriptomiques à partir des données métabonomiques à 24h.

Au contraire, après 48h de traitement, la plupart de ces Q^2Y sont positifs, et beaucoup d'entre eux dépasse le seuil de 0.25 (Figure VI-21B). Cela signifie qu'il existe une meilleure capacité de prédiction entre les données de transcriptomique, et les données de métabonomiques obtenues à 48h qu'entre les données de transcriptomique et les spectres à 24h.

Ainsi, les perturbations obtenues au niveau du transcriptome s'interpréteront plus facilement en lien avec les perturbations métaboliques à 48h qu'avec les perturbations métaboliques plus précoces observées à 24h.

L'intégration statistique des données de transcriptomique et de métabonomique montre une bonne capacité de prédiction entre les données transcriptomiques à 24h et les données métaboliques à 48h.

Figure VI-22 : Quantification de la quantité de triglycérides intracellulaires dans les adipocytes humains



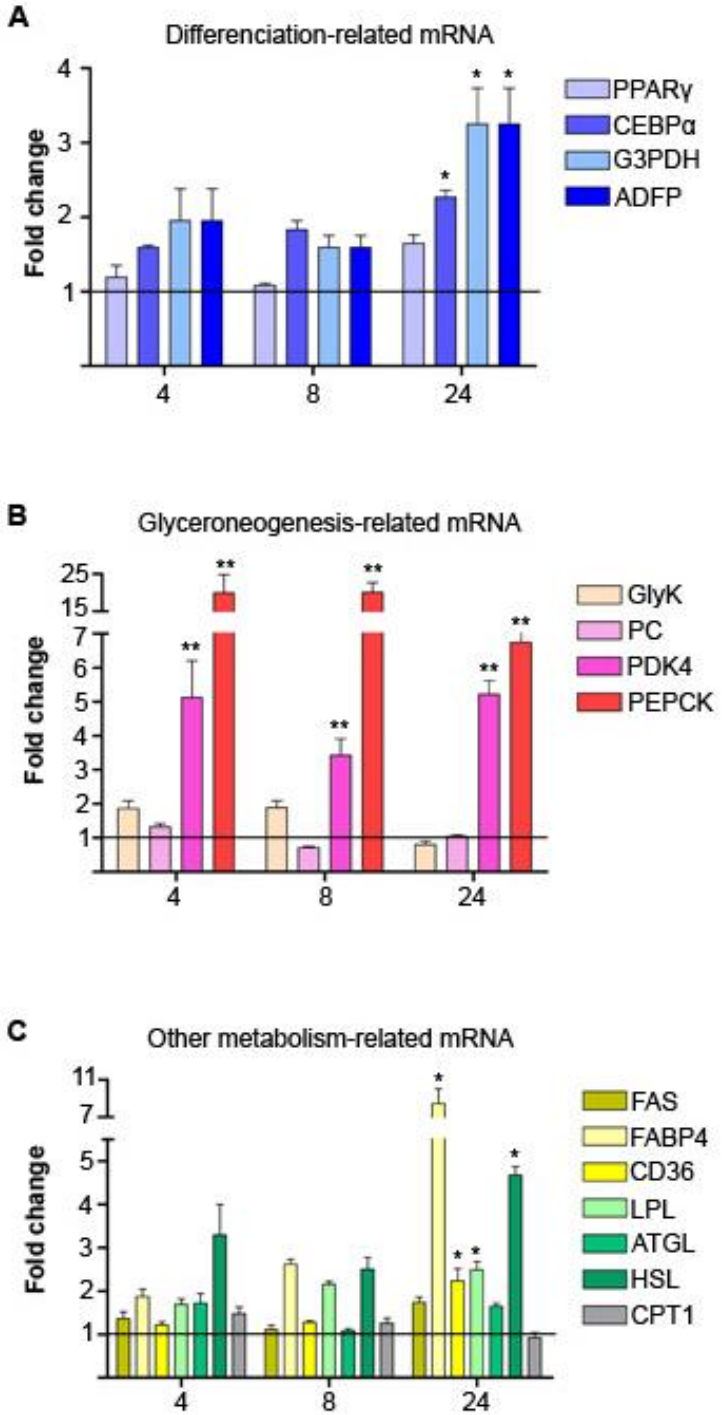
La quantité de triglycérides intracellulaires a été mesurée tout au long de la différenciation des préadipocytes humains (n=5) (DO à D11) et après 24 et 48h de traitement avec du MEHP (M, 100 µM, rouge) ou du DMSO (D, 0.1%, noir), utilisé comme solvant. * : $p<0.05$, évalué par un test de Wilcoxon apparié.

VI.3.3 Effet du MEHP sur les adipocytes humains au cours du temps

Afin de confirmer les résultats obtenus dans les spectres des phases organiques, notamment l'augmentation de la quantité de glycérol lié aux TG lors du traitement au MEHP, nous avons quantifié les TG intracellulaires pendant toute la durée de différenciation des cellules et après 24 et 48h de traitement avec le MEHP. Les résultats de ces mesures sont donnés dans la Figure VI-22. Le contenu intracellulaire en TG augmente régulièrement tout au long du processus de différenciation jusqu'au jour 11 après induction de la différenciation, où les cellules atteignent un seuil d'accumulation de TG. C'est à ce moment là qu'elles sont traitées avec le MEHP. Après 24h de traitement, le contenu intracellulaire en TG n'est pas significativement différent entre les cellules traitées et les cellules contrôles, alors qu'après 48h de traitement, le contenu en triglycérides est statistiquement plus important dans les cellules traitées au MEHP que dans les cellules contrôles (+27% en moyenne). Ces résultats confirment ainsi les résultats des extraits organiques des adipocytes traités au MEHP, dans lesquels les signaux du glycérol augmentaient après 48h de traitement au MEHP. Les changements métaboliques observés dans les profils ^{1}H-RMN des extraits aqueux des cellules traitées 48h au MEHP pourraient de plus s'expliquer en lien avec cette augmentation de la quantité de TG dans les cellules. Cependant, d'importantes perturbations métaboliques sont visibles dès 24h dans ces extraits aqueux, alors que la quantité intracellulaire de TG n'est pas encore modifiée. Ces résultats laissent penser à l'activation précoce de voies métaboliques dans les adipocytes traités au MEHP.

Pour approfondir cette hypothèse, nous avons effectué des cinétiques d'expression des ARNm de gènes impliqués dans diverses voies du métabolisme adipocytaire. L'expression de gènes marqueurs classiques de la différenciation adipocytaire (PPARγ, CEBPα, G3PDH et Adipose Differentiation related Protein (ADFP)) a été quantifiée après 4, 8 et 24h de traitement au MEHP, de même que l'expression de gènes impliqués dans diverses voies du métabolisme adipocytaire : glycéronéogenèse et métabolisme du glycérol (Glycerol kinase (GlyK), pyruvate carboxylase (PC), Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4 (PDK4), PEPCK), synthèse

Figure VI-23 : Cinétique d'induction des gènes impliqués dans différentes voies du métabolisme lipidique après traitement des adipocytes humains au MEHP

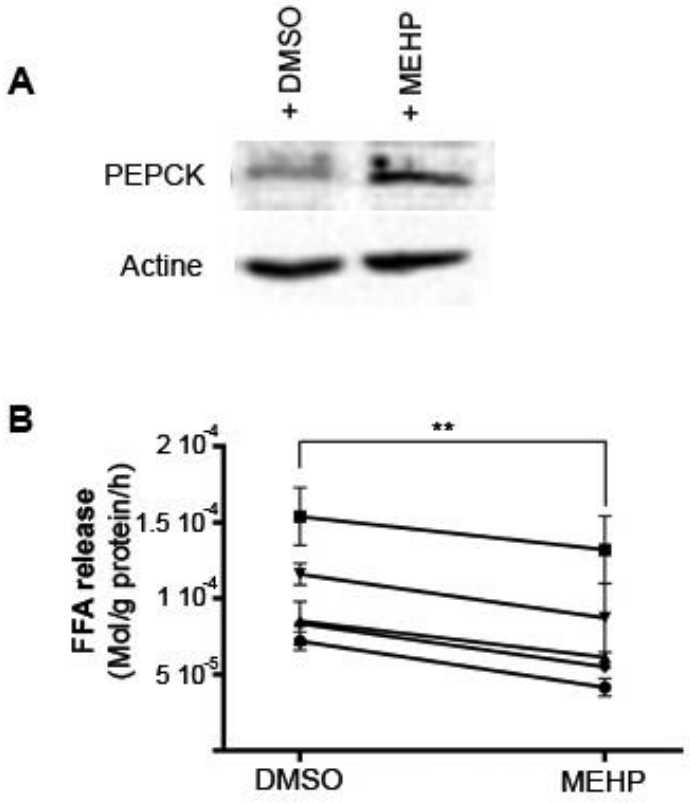


Les adipocytes humains ont été traités 4, 8 ou 24h avec du MEHP 100 µM ou du DMSO 0.1% utilisé comme solvant. L'induction de gènes impliqués dans des voies métaboliques diverses a été vérifiée par RT PCR. (A) Gènes marqueurs de la différenciation adipocytaire. (B) Gènes impliqués dans la voie de glycéronéogenèse. (C) Gènes impliqués dans d'autres voies du métabolisme lipidique. Les données sont les facteurs d'induction comparés aux cellules traitées au DMSO (moyennes ± écart-type, n=5 individus). * : $p<0.05$, ** : $p<0.01$, évalué par le test de Wilcoxon apparié.

des AG (Fatty Acid Synthase (FAS)), transport des AG (FABP4, CD36), lipolyse (LPL, ATGL, HSL) et β-oxydation (Carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1)). Les résultats de cette cinétique sont donnés sur la Figure VI-23. Après 24h de traitement, l'expression de presque tous les gènes testés est significativement induite, dont celle de 3 des 4 gènes marqueurs de la différenciation adipocytaire, confirmant notamment les résultats de notre étude transcriptomique. A des temps très précoces (dès 4h de traitement), les deux seuls gènes activés sont PEPCK et PDK4, deux gènes impliqués dans la voie de la glycéronéogenèse.

Pour confirmer l'induction précoce de cette voie métabolique, l'expression de la protéine PEPCK et la sortie des acides gras libres en conditions lipolytiques ont été choisis comme indices du flux glycéronéogenique et mesurés après 18h de traitement au MEHP (Figure VI-24). Le traitement au MEHP entraine une augmentation de la quantité de protéine PEPCK dans les cellules (Figure VI-24A), ainsi qu'une diminution de la sortie des acides gras non estérifiés de 29% en moyenne en conditions lipolytiques (Figure VI-24B). Ce dernier résultat indique qu'une plus grande partie des acides gras libérés par l'hydrolyse des triglycérides est recyclé dans les adipocytes traités au MEHP. Ces 2 résultats concordent pour indiquer que la voie de la glycéronéogenèse est augmentée par le traitement au MEHP.

Figure VI-24 : Induction de la glycéronéogenèse dans les adipocytes humains traités au MEHP



Les adipocytes humains ont été traités 18h avec du MEHP 100µM ou du DMSO 0.1% utilisé comme solvant. L'expression de la protéine PEPCK a été mesurée par western-blot (A). La glycéronéogénèse et la lipolyse ont ensuite été induites en laissant les cellules 3h à jeun dans un milieu sans glucose comme décrit dans la section Matériel et Méthodes. Puis, la sortie des acides gras a été mesurée pendant 2h dans un milieu contenant du pyruvate 5 mM (B). Les résultats sont la moyenne ± écart type pour 3 réplicats par individus (n=5 individus). ** : $p<0.05$ en utilisant le test de Wilcoxon apparié.

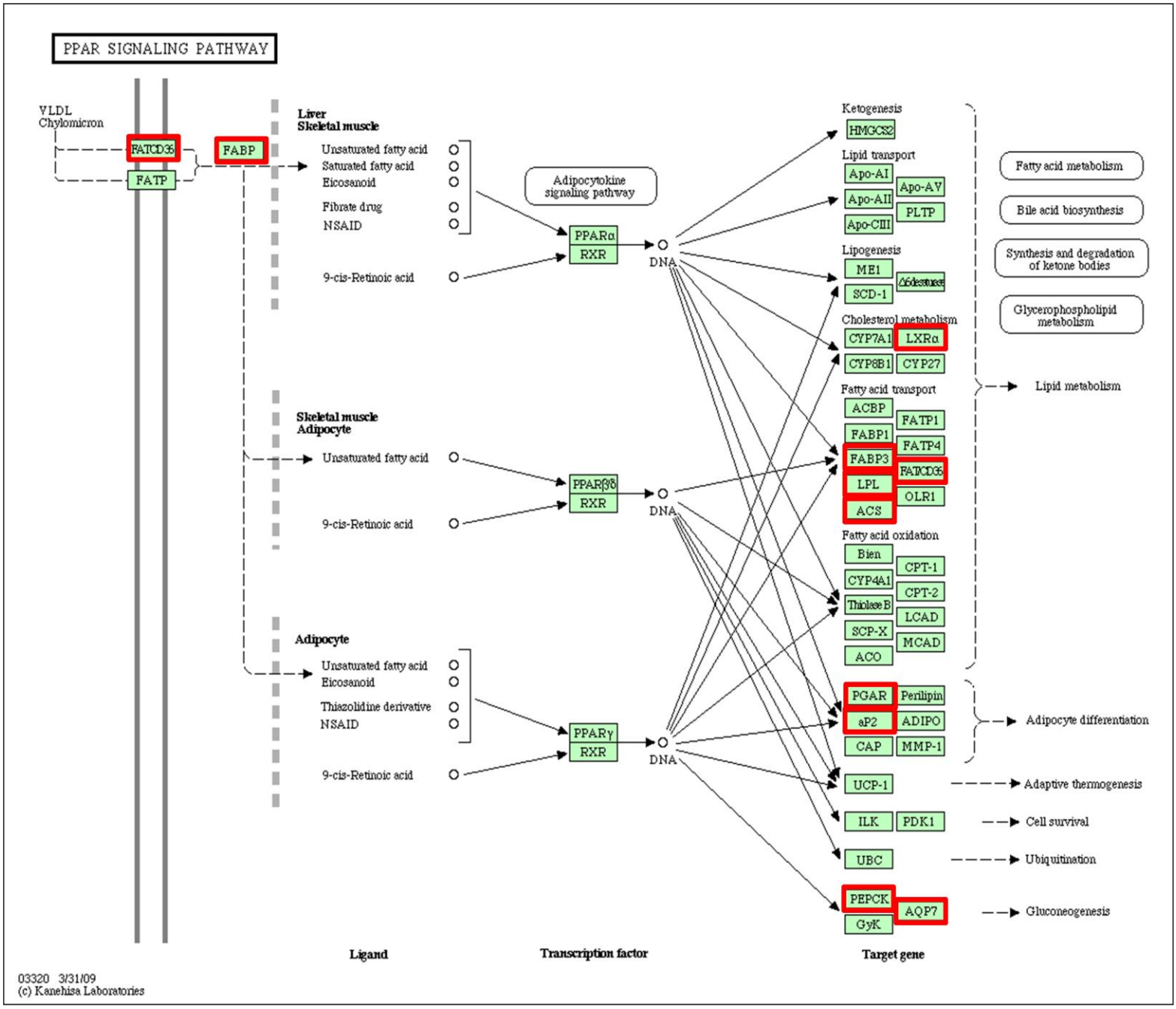
VI.4 Discussion

VI.4.1 Le MEHP est un activateur des gènes cibles de PPARγ dans les adipocytes humains

Notre étude transcriptomique a permis de mettre en évidence l'effet direct du MEHP sur de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme lipidique dans des adipocytes humains. L'analyse des voies métaboliques menée sur les gènes sur-exprimés lors du traitement au MEHP donne comme résultat le plus significatif (p value=3 10^{-7}) l'activation de la voie PPAR comprenant 11 gènes de notre liste (Figure VI-25). Dans la famille des récepteurs PPAR, l'isoforme majoritairement exprimée dans le TA est PPARγ. Au niveau moléculaire, l'action de PPARγ est liée à son hétérodimérisation avec RXR, et à la fixation de l'hétérodimère sur des éléments de réponses spécifiques (PPRE) situés dans le promoteur des gènes cibles. Parmi les 11 gènes de notre liste appartenant à la voie de signalisation PPAR, 5 d'entre eux sont régulés plus de 2.5 fois après 24h de traitement au MEHP dans les adipocytes humains (FABP4, FABP5, AQP7, PEPCK et ANGPTL4, Table VI-3), et cette activation a été confirmée par des réplicas techniques (par RT PCR) pour 3 d'entre eux (FABP4, PEPCK, AQP7, Figure VI-23). D'autres gènes régulés par le traitement au MEHP possèdent des séquences PPRE dans leur promoteur et sont des gènes cibles bien connus de PPARγ, dont ceux codant pour PDK4 (Sears et al., 2007), LPL, CD36, ACS, adiponectine (Desvergne and Wahli, 1999).

Des essais de trans-activation *in vitro* dans les cellules COS-1 ont montré la capacité du MEHP à activer les formes murines et humaines de PPARγ (Hurst and Waxman, 2003). Feige et al. (Feige et al., 2007) ont confirmé ces résultats et montré que l'activation de PPARγ par le MEHP était dépendante du type cellulaire. L'activation par le MEHP du récepteur PPARγ de la souris est par exemple très faible dans les cellules HeLa humaines, et beaucoup plus forte dans les cellules C2C12 murines, mais reste, dans les deux types cellulaires, très infèrieure à l'activation induite par un agoniste total de PPARγ, la rosiglitazone. Ces résultats montrent que

Figure VI-25 : Voie de signalisation des récepteurs PPAR (KEGG pathway)



L'analyse des voies métaboliques significativement surrégulées lors du traitement des adipocytes humains au MEHP montre que la voie la plus significative est la voie de signalisation des récepteurs PPAR (p value=3 10^{-7}). En rouge, les gènes présents dans notre liste présentée dans le Tableau VI-3.

le MEHP est un agoniste partiel de PPARγ, avec une affinité et une efficacité réduite par rapport aux agonistes totaux. De plus, les mêmes auteurs montrent que, dans les cellules 3T3-L1, le traitement au MEHP entraine le recrutement sélectif de cofacteurs de transcription par PPARγ et l'induction d'un sous-groupe réduit de gènes cibles de PPARγ par rapport au traitement avec la rosiglitazone. Le traitement des cellules 3T3-L1 au MEHP entraine par exemple l'induction de l'expression des gènes FABP4, adipoQ, CD36, ACS1, LPL, CEPBα et LXRα, mais pas celle de GlyK ni de Olr1, pourtant induite par le traitement à la rosiglitazone, indiquant que l'efficacité de l'induction de l'expression des gènes par le MEHP dépend du contexte du promoteur. Dans nos adipocytes humains, le traitement au MEHP induit de même l'expression de FABP4, CEPBα, CD36, ACS1, LPL et LXRα, mais pas celle de GlyK (Tableau VI-3 et Figure VI-23B). Nos résultats semblent ainsi confirmer ceux trouvés dans les cellules 3T3-L1 et montrer, pour la première fois dans des adipocytes humains, que le MEHP est un activateur sélectif de PPARγ.

VI.4.2 Le MEHP a-t-il un effet pro-différenciant sur les adipocytes humains ?

La caractéristique la plus frappante de PPARγ au moment de sa découverte était son niveau d'expression très élevé dans le TA (Dreyer et al., 1992). Un rôle direct de PPARγ sur l'adipogénèse a été suggéré grâce au fait que le niveau d'expression de PPARγ était extrêmement faible dans les lignées préadipocytaires 3T3-L1 et 3T3-F442A, et que son apparition au cours de la différenciation adipocytaire précédait celle de nombreux autres marqueurs de différentiation terminale comme aP2, PEPCK ou C/EBPα. De plus, les activateurs de PPARγ comme le Wy-14643 et les TZDs sont capables d'induire la conversion de préadipocytes en adipocytes (Desvergne and Wahli, 1999). Le MEHP, ligand de PPARγ dans les cellules murines 3T3-L1, est capable, lui aussi, d'induire leur différenciation en adipocytes (Feige et al., 2007).

Ici, nous avons travaillé sur des préadipocytes humains différenciés *in vitro* en adipocytes pendant 11 jours. La quantité intracellulaire de TG augmente de façon linéaire pendant tout le processus de différenciation des cellules, jusqu'au jour 11 où elle atteint un

plateau (Figure VI-22). Un comptage visuel du ratio de cellules remplies de TG/cellules vides de TG nous a permis d'évaluer le pourcentage de cellules différenciées (i.e ayant accumulé des TG dans leur cytoplasme) à environ 70% au moment du traitement. Les conséquences métaboliques de l'exposition des adipocytes humains au MEHP ont été évaluées par métabonomique en utilisant la ^{1}H RMN. Les perturbations du métabolisme lipidique ont été recherchées dans les extraits cellulaires organiques. Après 24h de traitement au MEHP, les profils ^{1}H-RMN de ces extraits organiques n'étaient pas significativement différents entre les cellules traitées et les cellules contrôles. Après 48h, les analyses O-PLS-DA montrent une augmentation des résonances de 2 signaux du glycérol sur les 3 présents dans les spectres dans les cellules traitées au MEHP (Figure VI-15). Ces résultats suggèrent une perturbation du métabolisme lipidique incluant une augmentation de la quantité de glycérol lié aux TG et/ou aux phospholipides. Afin de confirmer ces résultats, la quantité de TG intracellulaires a été mesurée après 24 et 48h de traitement au MEHP (Figure VI-22). Après 24h de traitement au MEHP, la concentration de TG n'est pas différente entre les cellules traitées ou non. Par contre après 48h de traitement, une augmentation de 27% en moyenne de la quantité intracellulaire de TG a été observée dans les cellules traitées au MEHP. Le traitement au MEHP entraine ainsi une reprise de l'accumulation intracellulaire de TG dans nos cellules, pouvant faire penser à une reprise du phénomène de différenciation.

La différenciation adipocytaire est un phénomène très complexe dont la finalité est la transformation des préadipocytes de phénotype fibroblastique en adipocytes matures. La plupart des changements liés à la différenciation adipocytaire sont des changements d'expression de gènes. De nombreux rapports ont essayé de schématiser les étapes de la différenciation adipocytaire en une simple hiérarchie d'évènements moléculaires et de classer les gènes régulés lors de l'adipogenèse en marqueurs précoces, intermédiaires et tardifs de la différenciation (Gregoire et al., 1998). Il reste cependant très difficile d'obtenir une chronologie complète des évènements moléculaires qui s'enchaînent lors de l'adipogenèse, l'acquisition progressive du phénotype adipocytaire étant associée avec la modulation de l'expression de

plus de 2000 gènes (Guo and Liao, 2000). Dans notre étude transcriptomique, nous avons observé que le MEHP régulait l'expression de gènes impliqués dans toutes les voies métaboliques impliquées dans la synthèse des TG et leur stockage dans les adipocytes humains. Les deux sources métaboliques majeures utilisées par les adipocytes pour la synthèse de TG sont le glucose et les AG. Ici, nous avons montré que le MEHP augmentait significativement la transcription des gènes impliqués dans le captage et le transport des acides gras, comme LPL (*1.95), CD36 (*1.76) et FABP3 ,4 et 5 (*2.6, *3.83 et *3.15 resp.). Pour la synthèse des TG, le squelette du glycérol et les acides gras sont transformés en G3P et en esters d'acides gras-CoA. L'activité glycérol kinase étant négligeable dans les adipocytes en condition physiologique, le glycérol-3P est produit à partir d'un intermédiaire de la glycolyse *via* la G3PDH (*2.79), et par la glycéronéogenèse *via* PEPCK1 (*2.93). Les esters d'acides gras-CoA sont synthétisés par les enzymes acyl-CoA synthetase (ACSF2 *1.86, ACSL5 *1.69, ACSL3 *1.54). Une petite partie des acides gras utilisés pour la synthèse des TG provient de la synthèse *de novo* d'acides gras à partir du glucose. Les voies métaboliques les plus augmentées par le traitement au MEHP sont celles de la biosynthèse des acides gras et des acides gras insaturés (p value=2 10^{-3} et 1.8 10^{-2} resp.) incluant des enzymes comme l'acetyl-Coenzyme A carboxylase beta (*1.94), la fatty acid synthase (*1.62) et l'oleoyl-ACP hydrolase (*1.98). En accord avec une augmentation de la synthèse des acides gras dans nos cellules, la phosphogluconate dehydrogenase (PGD *1.63), enzyme clef de la voie des pentoses phosphates qui fournit du NADPH comme agent réducteur pour cette synthèse, est surexprimée lors du traitement au MEHP.

De plus, lors de leur différenciation, les adipocytes acquièrent leur sensibilité à l'insuline. Ici, le MEHP a induit la transcription d'un certain nombre de gènes impliqués dans la voie de signalisation à l'insuline (p value = 2.7 10^{-2}), dont les phosphodiesterases 1B et 3B (*2.67 et *2.96 resp.).

Enfin, lors de la différenciation adipocytaire, les cellules passent d'une forme allongée fibroblastique, à une forme sphérique et des changements drastiques apparaissent dans la morphologie cellulaire, les composants du cytosquelette et le niveau et le type de composants

de la matrice extracellulaire. Ici, les gènes les plus sous-exprimés lors du traitement au MEHP sont significativement associés aux termes « régulation du cytosquelette d'actine », « glycoprotéines sécrétées » et « matrice extra cellulaire » (Figure VI-7). Par exemple, les gènes du collagène sont régulés par le traitement au MEHP, avec le gène codant pour le collagène 4A6 qui est surexprimé (*1.35), alors que le gène du collagène 8A6 est sous-exprimé (*-1.56). Un switch dans l'expression des gènes du collagène est un évènement bien connu de la différenciation adipocytaire (Gregoire et al., 1998). De même, une augmentation de la production de chondroïtines sulfates protéoglycanes solubles et associés aux cellules a été observée lors de la différenciation des 3T3-L1 (Calvo et al., 1991). Notre étude montre que la voie métabolique « biosynthèse des chondroïtines sulfates» est significativement augmenté lors du traitement au MEHP dans nos cellules (p value = $3.2\ 10^{-2}$), avec l'augmentation de la transcription des gènes codant pour les carbohydrates sulfotransferases 3 et 11 (*1.45 et *1.57 resp.) entre autres.

Ainsi, de nombreux gènes impliqués dans la différenciation adipocytaire sont modifiés après 24h de traitement au MEHP. Des effets métaboliques sur l'augmentation de la quantité intracellulaire de TG sont visibles un peu plus tard, après 48h de traitement. Ces résultats semblent ainsi indiquer un effet pro-différenciateur du MEHP sur les adipocytes humains.

VI.4.3 Effets métaboliques liés au MEHP : génération d'hypothèses

VI.4.3.1 Analyse des profils des extraits organiques : augmentation des insaturations des acides gras, perturbation des phospholipides et modulation de la sensibilité à l'insuline

L'analyse de profils métaboliques organiques des cellules traitées au MEHP a montré, en plus de l'augmentation des signaux du glycérol, celle des signaux des fonctions CH=CH, laissant supposer une augmentation de la quantité d'acides gras insaturés dans ces cellules. Ces perturbations ne sont significatives qu'après 48h de traitement. Cependant, dès 24h, le chemin métabolique « biosynthèse des AG polyinsaturés » est significativement augmenté (p value = $1.8\ 10^{-2}$), avec l'induction de l'expression des gènes codant pour des acides gras désaturases (FADS1 *1.7, FADS3 *1.39), et la stearoyl-CoA désaturase (SCD *1.39).

La SCD est une Δ9 désaturase, et l'enzyme limitante de la biosynthèse des AG monoinsaturés. Son expression est fortement augmentée lors de la différenciation des cellules 3T3-L1 (Jessen and Stevens, 2002). Il a déjà été observé une forte augmentation dans la quantité de TG contenant des chaînes aliphatiques insaturées lors de la différenciation des cellules 3T3-L1 (>95% de TG avec au moins une insaturation dans les 3T3-L1 différenciées (Su et al., 2004)). Les chaînes aliphatiques qui entrent dans le pool de TG étant largement dérivées des AG saturés présents dans le milieu de culture, et des AG saturés venant de la lipogénèse *de novo*, il est clair que la désaturation des AG est un processus important pour fournir les AG insaturés nécessaires à la synthèse des TG dans les cellules 3T3-L1. Nos résultats montrent la possibilité d'un phénomène similaire dans les adipocytes humains, la désaturation des AG étant aussi augmentée dans les adipocytes humains soumis au MEHP.

Le lien entre la SCD et la sensibilité à l'insuline est de plus en plus étudié. Les souris présentant un déficit dans le gène codant pour la SCD1 (homologue de la SCD humaine) présentent en effet une dépense énergétique plus forte, une diminution de leur adiposité, une

résistance à l'obésité induite par un régime riche en graisses et une meilleure sensibilité à l'insuline (voir (Dobrzyn et al., 2010) pour revue). Chez l'humain, des polymorphismes dans le gène codant pour la SCD ont été associés avec la sensibilité à l'insuline (Warensjo et al., 2007), et l'expression du gène est augmentée par 2 lors du traitement avec la pioglitazone (Yao-Borengasser et al., 2008). Un des mécanismes par lequel la SCD pourrait influer sur la sensibilité à l'insuline est par l'altération des propriétés des membranes plasmiques. L'oléate (Δ^9-18 :1) est l'acide gras monoinsaturé le plus présent dans les phospholipides membranaires, et le ratio d'acides gras saturés/monoinsaturés est important pour la fluidité membranaire. Il a été proposé que la diminution des AG monoinsaturés des phospholipidides membranaires observée chez les souris SCD1-/- est compensée par des AG polyinsaturés, la présence de plus de doubles liaisons dans les chaines des acyl gras entrainant une augmentation de la fluidité membranaire. Le degré d'insulino-résistance est en effet inversement corrélé à la quantité d'AG polyinsaturés dans les phospholipides des muscles squelettiques chez les rongeurs et chez l'Homme (Borkman et al., 1993). La fluidité membranaire ainsi augmentée permettrait l'agrégation des récepteurs à l'insuline, augmentant leur phosphorylation après la liaison de l'insuline. Au sein du TA, Collins et al. ont montré que l'élongation et la désaturation des AG étaient augmentée de façon concomitante à la lipogenèse *de novo* dans des adipocytes humains différenciés en présence de palmitate, et que ces phénomènes étaient couplés fonctionnellement (Collins et al., 2010). L'inhibition de la SCD dans ces cellules entraine une diminution de la lipogenèse *de novo*, une augmentation du ratio AG saturés/monoinsaturés, une diminution de la fluidité membranaire et une diminution de la sensibilité à l'insuline. Nos résultats montrent de même une augmentation concomitante de la lipogenèse *de novo* et des phénomènes d'élongation (ELOVL5 *1.41) et d'insaturation des AG dans les cellules traitées au MEHP. L'analyse des profils ^{1}H-RMN aqueux des mêmes cellules montre de plus une perturbation du métabolisme des phospholipides, les cellules traitées au MEHP ayant une plus grande concentration de choline et de phosphoéthanolamine que les cellules contrôles. Enfin, une autre voie métabolique significativement augmentée dans les cellules traitées au MEHP est la « voie de signalisation de l'insuline ». L'intégration de tous ces résultats nous permet de soulever l'hypothèse que le MEHP, en perturbant la composition intracellulaire en acides gras des adipocytes humains

(augmentation des insaturations), perturbe aussi la composition et la fluidité membranaire de ces adipocytes, contribuant ainsi à l'amélioration de leur sensibilité à l'insuline.

VI.4.3.2 Analyse des profils des extraits aqueux : perturbations du métabolisme lipido-glucidique

L'analyse des profils métaboliques ^{1}H-RMN des extraits aqueux des adipocytes a permis de mettre en évidence des différences importantes dans les profils des cellules traitées au MEHP par rapport à ceux des cellules contrôles. Après 48h de traitement au MEHP, la perturbation métabolique la plus significative est la diminution de la concentration intracellulaire de lactate. Une analyse de flux métabolique a été appliquée récemment sur les cellules 3T3-L1 en différenciation et a montré que l'accumulation intracellulaire de TG était corrélée avec une redistribution significative du flux du pyruvate de la fermentation lactique vers le cycle de Krebs (Si et al., 2007). Ainsi, la diminution de lactate observée dans nos cellules traitées au MEHP pourrait-elle s'expliquer par l'utilisation accrue du pyruvate intracellulaire comme substrat pour la lipogenèse *de novo*. De même après 48h de traitement au MEHP, la concentration intracellulaire de glutamine est fortement diminuée, pouvant aussi s'expliquer par une augmentation de l'utilisation de la glutamine comme substrat pour la synthèse d'AG. Dans une lignée d'adipocytes bruns, Yoo H et al. (Yoo et al., 2004) ont en effet déjà montré que la glutamine était une source importante de carbone pour la lipogenèse *de novo*. Enfin, ces profils métaboliques montrent après 48h de traitement au MEHP, une augmentation importante des concentrations intracellulaires de NAD. Les niveaux de nucléotides pyridines (NAD et NADP) augmentent lors de la différenciation adipocytaire des cellules 3T3-L1 (Fukuwatari et al., 2001), mais le mécanisme de cette augmentation n'est pas encore connu. Ici, les signaux de résonnance du NADP ne sont pas visibles dans les profils ^{1}H-RMN des cellules. Ceux du NAD le sont et augmentent significativement lors du traitement au MEHP, ainsi que l'ARNm de la nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT *1.8), qui est l'enzyme limitante de la synthèse du NAD chez les mammifères (Revollo et al., 2004). Il semble ainsi probable que

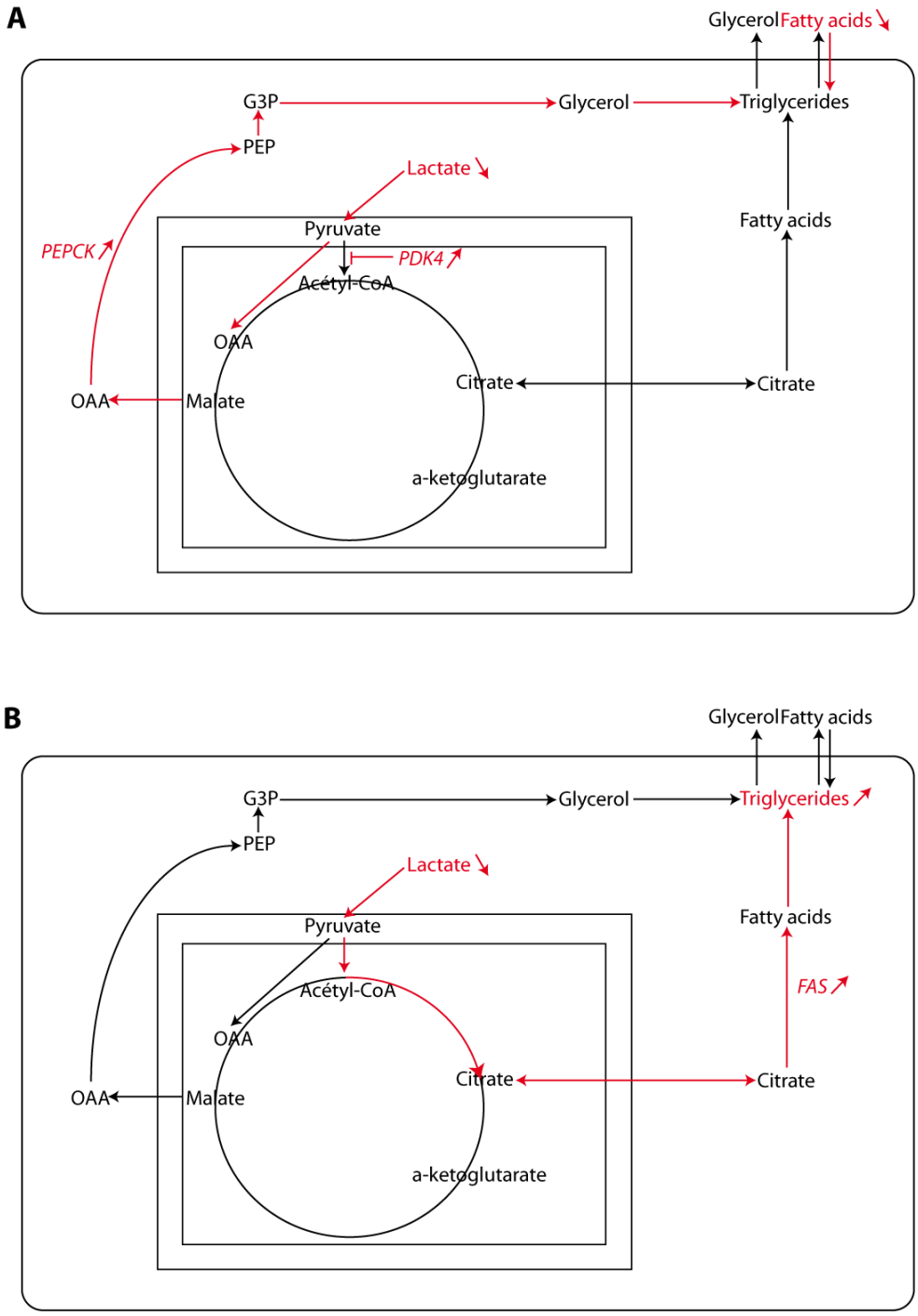
le MEHP augmente la synthèse de NAD dans les adipocytes humains, via la régulation transcriptionnelle de certaines enzymes de la synthèse du NAD, dont la NAMPT.

Les perturbations métaboliques observées après 48h de traitement au MEHP peuvent ainsi s'expliquer par une augmentation de la synthèse *de novo* de triglycérides dans les adipocytes humains. Après 24h de traitement cependant, nous n'avons pas observé de perturbations significatives dans les spectres ^{1}H-RMN des extraits cellulaires organiques, ni dans la quantité intracellulaire de TG. Pourtant, des différences importantes sont déjà visibles dans les spectres ^{1}H-RMN des extraits aqueux. La concentration intracellulaire de lactate par exemple est déjà fortement diminuée dans les cellules traitées. Cette diminution, si elle ne s'explique pas par une consommation accrue de pyruvate pour synthétiser des AG, doit s'expliquer par l'activation précoce d'une autre voie métabolique consommatrice de lactate et/ou de pyruvate. Les autres différences observées dans ces profils métaboliques suggèrent de plus l'activation d'une voie consommatrice en acides aminés, les concentrations intracellulaires de valine, glutamine, tyrosine et phénylalanine étant aussi fortement diminuée.

VI.4.4 Le MEHP est un activateur précoce de la glycéronéogenèse dans les adipocytes humains

Afin de confirmer l'hypothèse d'une voie métabolique consommatrice de lactate activée précocement dans nos cellules lors du traitement au MEHP, une cinétique d'expression de gènes codant pour des enzymes clefs du métabolisme adipocytaire a été effectuée à 4, 8 et 24h de traitement avec le MEHP (Figure VI-23). Les résultats de cette étude cinétique montrent l'activation précoce et ciblée de 2 gènes: PEPCK et PDK4. L'activation de ces 2 gènes est maximale après 4h de traitement, alors que celle des autres gènes n'est significative qu'après 24h. PEPCK est l'enzyme limitante de la voie de glycéronéogenèse. La glycéronéogenèse est la voie métabolique par laquelle des précurseurs glucogéniques comme le pyruvate sont convertis en G3P utilisé pour la synthèse des TG. Cette voie importante dans le TA est très augmentée en période de jeûne (Beale et al., 2002), et participe notamment à la régulation de la libération des

Figure VI-26 : Résumé des effets métaboliques induits par le traitement au MEHP dans les adipocytes humains



A : Le MEHP induit précocement la glycéronéogenèse et la réestérification des acides gras dans les adipocytes humains. B : Le MEHP induit plus tardivement la différenciation des préadipocytes humains et la synthèse de triglycérides.

AG libres dans le sang en augmentant la proportion d'AG réestérifiés par le TA. PEPCK et PDK4 sont régulées au niveau transcriptionnel par les activateurs de PPARγ (Cadoudal et al., 2008). PDK4 contrôle négativement l'activité du complexe pyruvate dehydrogenase qui contribue à transformer le pyruvate en acetyl-CoA. L'activation de PDK4 par le MEHP pourrait ainsi conduire à une redistribution du flux du pyruvate vers la glycéronéogenèse.

L'hypothèse de l'augmentation de la glycéronéogenèse a été testée dans des adipocytes traités 18h au MEHP. Après 18h de traitement, l'activation de la protéine PEPCK a été vérifiée par Western-Blot (Figure VI-24A), et les concentrations d'AG non estérifiés libérés dans le milieu ont ensuite été mesurées en conditions lipolytiques (Figure VI-24B). Le traitement au MEHP diminue de presque 30% la libération des AG non estérifiés. La libération des AG non estérifiés par le TA représente une balance entre les AG libérés par la lipolyse, et ceux réestérifiés avant leur sortie. Le MEHP n'ayant aucun effet sur la lipolyse de nos cellules (données non montrées), la diminution de la sortie des AG lors du traitement au MEHP est le résultat d'une augmentation de la quantité d'AG réestérifiés, pour lesquels le squelette de glycérol est fourni par l'augmentation simultanée de la glycéronéogénèse. Cette hypothèse métabolique ainsi que les résultats de notre expérience sont résumés sur la Figure VI-26.

Nous avons ainsi montré que le MEHP était capable d'induire la glycéronéogénèse et la réestérification des AG très précocement dans les adipocytes humains, conduisant à la diminution de la quantité d'AG libérés par les adipocytes en conditions lipolytiques. Ce phénomène a déjà été étudié pour d'autres activateurs de PPARγ, la rosiglitazone, une TZD, dans des cellules 3T3-F442 *in vitro*, des explants de TA murins et humains et chez l'homme *in vivo* (Cadoudal et al., 2008) et participe probablement à l'amélioration de l'homéostasie lipidique de l'organisme et aux propriétés antidiabétiques de ces médicaments.

VI.4.5 Perturbations du TA et conséquences attendues de l'exposition humaine au MEHP

Des études précédentes avaient montré que le MEHP était un agoniste partiel du récepteur PPARγ, induisant le recrutement sélectif de cofacteurs de transcription et induisant l'expression d'un sous-groupe restreint de gènes cibles de PPARγ dans les cellules 3T3-L1 par rapport à un agoniste total, la rosiglitazone. Le MEHP était aussi capable, comme la rosiglitazone, d'induire la différenciation des préadipocytes 3T3-L1 en adipocytes, et cette propriété est dépendante de PPARγ, puisque l'inhibition de l'expression de ce récepteur *via* un siRNA bloque complètement l'effet pro-différenciateur du MEHP (Feige et al., 2007). Nos résultats montrent l'activation d'un très grand nombre de gènes cibles de PPARγ lors du traitement avec du MEHP de préadipocytes humains différenciés *in vitro,* suggèrant que ce mécanisme d'activation sélectif de PPARγ est aussi présent chez l'Homme. De plus, les perturbations transcriptomiques et métaboliques engendrées par le traitement au MEHP suggèrent que cette molécule pourrait aussi avoir un effet pro-différenciant sur les adipocytes humains. Nos résultats montrent de plus que le MEHP est capable d'activer la glycéronéogenèse dans les adipocytes humains. Cette voie métabolique est aussi activée lors du traitement aux TZDs d'adipocytes 3T3-F442A différenciés *in vitro*, d'explants de souris et d'humains.

Les TZDs sont des médicaments qui améliorent la sensibilité à l'insuline et sont utilisés dans le traitement du diabète de type 2. Ils entrainent une diminution du TA viscéral, augmentent l'action de l'insuline et améliorent l'homéostasie glucidique, tout en augmentant la taille des dépôts adipeux sous-cutanés (Yang and Smith, 2007). Un des effets principaux des TZDs sur le TA, décrit principalement chez les rongeurs, est la stimulation de la différenciation adipocytaire et l'apoptose des gros adipocytes, résultant en une population de petits adipocytes plus sensibles à l'insuline (Okuno et al., 1998). Les TZDs induisent aussi la glycéronéogenèse dans le TA humain *in vitro* et *in vivo*. En augmentant la quantité d'AG réestérifiés par le TA en situation lipolytique et en diminuant ainsi la quantité d'AG libérés dans la circulation sanguine, ce mécanisme participe aussi probablement à l'amélioration de l'homéostasie lipidique induite

par ces médicaments (Cadoudal et al., 2007). Un des effets secondaires des traitements aux TZDs est une prise de poids modérée dont le mécanisme reste controversé (Koenen et al., 2009) (Hollenberg, 2003).

Le MEHP, agoniste partiel de PPARγ dans les 3T3-L1 et probablement chez l'Homme semble ainsi partager deux propriétés avec les TZDs, agonistes totaux de PPARγ : une action pro-différenciatrice sur les préadipocytes et une capacité d'induction de la glycéronéogenèse. Ces 2 propriétés contribuent certainement à l'amélioration de l'homéostasie glucido-lipidique de l'organisme lors des traitements aux TZDs, et on peut penser qu'il en est de même lors de l'exposition au MEHP. Cependant, ces mécanismes aboutissent aussi à l'augmentation de la quantité intracellulaire de TG dans les dépôts adipeux, et sont soupçonnés d'être, au moins partiellement, responsables de la prise de poids observée lors du traitement aux TZDs. Ils pourraient ainsi potentiellement participer à un effet obésogène du MEHP, et partiellement expliquer la corrélation positive entre les concentrations urinaires de MEHP et le tour de taille montrées dans (Stahlhut et al., 2007).

Cependant, il est intéressant de noter que le MEHP est un ligand de PPARγ beaucoup moins efficace que les TZDs, et de se demander dans quelle mesure les effets observés *in vitro* sont pertinents *in vivo*. Les essais de trans-activation du récepteur $PPARγ_2$ humain *in vitro* montrent qu'il faut traiter les cellules avec 200 µM de MEHP pour obtenir une activation comparable à celle obtenue avec 1 µM de rosiglitazone. De même, pour induire la différenciation des 3T3-L1, 100 µM de MEHP induisent une augmentation de la quantité de TG intracellulaire correspondant à environ 60% de celle obtenue avec 1 µM de rosiglitazone (Feige et al., 2007). Dans les adipocytes humains, nous avons ici montré que le MEHP à 100 µM induisait une diminution de 30% de la quantité d'AG libres en conditions lipolytiques. Dans les mêmes conditions expérimentales, Cadoudal et al. obtiennent une diminution de plus de 70% de la quantité d'AG libérés en traitant des cellules 3T3-F442A avec 1 µM de rosiglitazone (Cadoudal et al., 2008). On voit ainsi que pour ces deux effets dépendants de PPARγ, il existe 2 ordres de grandeur de différence dans l'efficacité du MEHP comparé à la rosiglitazone. Le

traitement de patients diabétiques à la rosiglitazone induit une prise de poids de l'ordre de 2-3 kg pour 12 semaines de traitement, à 8 mg/jour (soit 115 µg/kg/jour pour un adulte de 70 kg) (Tan et al., 2005). En comparaison, la valeur de référence pour l'absorption journalière de DEHP (Tolerable Daily Intake) préconisée par l'EFSA (European Food Standard Agency) est de 50 µg/kg/jour, et diverses équipes ont évalué la dose journalière absorbée de DEHP entre 0.6-2.2 µg/kg/jour et 25 µg/kg/jour à partir des concentrations urinaires de métabolites du DEHP (Lorber et al.) (Koch et al., 2006). Les populations les plus exposées sont les enfants prématurés en soins intensifs pour lesquels la dose journalière de DEHP peut atteindre les 42-1780 µg/kg/jour. Ainsi, dans les populations les plus exposées, les ordres de grandeur d'absorption du DEHP sont comparables aux doses ingérées de TZDs. Sans tenir compte des effets d'absorption et de métabolisation potentiellement différents entre les 2 types de composés, et en considérant qu'il existe 2 ordres de grandeur de différence dans l'activation du récepteur PPARγ, il semble que les doses ingérées de DEHP soient trop faibles pour induire sur le TA *in vivo* des effets comparables à ceux observés avec les TZDs.

Au niveau plasmatique cependant, les concentrations de DEHP peuvent atteindre les 38 mg/L, ce qui correspond à une concentration d'environ 100 µM chez des adultes chinois (Zhang et al., 2003), et celles de MEHP sont aux alentours de 3 µg/mL (± 9 µM) chez des jeunes adultes atteints de gynécomastie (Durmaz et al., 2010). De plus, l'utilisation quotidienne de 4 produits cosmétiques augmente la concentration urinaire de métabolites du MEHP de 4 fois chez les femmes enceintes (Berman et al., 2009), les enfants entre 3 et 14 ans possèdent des concentrations urinaires 5 fois supérieures à celle des adultes (Becker et al., 2009), celle des bébés prématurés en soins intensifs est 14 fois supérieure à celle de bébés sans soins (Weuve et al., 2006) et leur absorption quotidienne de DEHP peut atteindre 1780 µg/kg/jour (soit plus de 70 fois celle des enfants contrôles) (Koch et al., 2006). L'intégration de ces données suggère qu'il n'est pas impossible que les concentrations circulantes de MEHP s'approchent, dans les populations les plus exposées, de celles utilisées *in vitro* sur les adipocytes et qui aboutissent à l'activation du récepteur PPARγ. Enfin, il a toujours été considéré que le MEHP ne s'accumulait pas dans les dépôts adipeux et que les concentrations de métabolites circulantes étaient le

reflet d'une exposition constante. Cependant, Zhang et al. ont mesuré des concentrations de DEHP pouvant atteindre les 2.19 mg/kg dans les TA d'adultes chinois, montrant que ce composé atteint quand même le TA et suggérant sa potentielle accumulation dans ce tissu (Zhang et al., 2003).

VI.4.6 La TCDD a-t-elle des effets sur les adipocytes humains ?

AhR réside dans le cytoplasme, associé à un complexe multiprotéique. La liaison de la TCDD au domaine de liaison du ligand de AhR résulte en la dissociation de ce complexe multiprotéique et la localisation nucléaire du récepteur, qui va alors former un hétérodimère avec Arnt et fonctionner comme un activateur transcriptionnel en se liant à des éléments séquences spécifiques d'ADN dans la région 5' des gènes cibles nommés éléments de réponse aux xénobiotiques (XRE: 5′-GCGTG-3′). Etant donné le rôle de AhR dans la médiation des signaux provenant des contaminants environnementaux, il n'est pas étonnant que les premiers gènes cibles identifiés pour cette voie aient été les gènes du métabolisme des xénobiotiques, dont des membres de la famille des P450s et des enzymes de phase II. Ainsi, l'augmentation de l'expression du CYP1A1 est souvent utilisée comme un indicateur de l'activation de la voie AhR. Ici, les voies métaboliques activées le plus significativement par le traitement des adipocytes humains à la TCDD sont celles associées aux termes « activité oxydoréductase » et « activité monooxygénase », correspondant à la surexpression des gènes codant notamment pour les CYP1A1 (*2.2) et 1B1 (*5). L'activation de la transcription de ces gènes confirme ainsi l'activation de la voie AhR dans ces cellules.

Les résultats des puces à ADN montrent de plus l'induction de gènes associés avec les termes « région extracellulaire/sécrété », ainsi que la surexpression de gènes impliqués dans les éléments cellulaires structurels, comme la composition de la matrice extra-cellulaire, la communication avec cette matrice et la structure cellulaire (Tableau VI-2). La fonction endogène du récepteur AhR est encore mal connue, mais le KO de AhR chez la souris entraine des maladies cardio-vasculaires, des fibroses hépatiques, des réductions de la taille du foie, des déficiences des cellules T, des fibroses dermales et une réduction de l'espérance de vie (voir (Barouki et al., 2007) pour revue), démontrant que ce récepteur possède des fonctions biologiques autres que la détoxification des xénobiotiques. De nombreux résultats obtenus chez l'animal ou dans différentes lignées cellulaires suggèrent par exemple que la voie AhR pourrait avoir un rôle endogène dans le métabolisme de la matrice extra-cellulaire (pour revue voir (Kung et al., 2009)), certains gènes identifiés comme cibles de AhR étant impliqués dans la

régulation du remodelage de la matrice extra-cellulaire. Les résultats de notre étude transcriptomique suggèrent que cette fonction endogène de la voie AhR pourrait exister aussi au sein des adipocytes humains, et qu'elle pourrait être perturbée par l'exposition du TA à la TCDD.

Les conséquences de l'exposition du TA à la TCDD ont été souvent étudiées dans des modèles animaux. Ainsi*, in vivo*, l'exposition des animaux à la TCDD entraine une diminution de leur masse adipeuse. Des études ont montré des perturbations métaboliques au sein des TA des animaux exposés, pouvant expliquer cette perte de TA. Ces perturbations incluent, entre autres, une diminution de l'activité de la LPL (Brewster and Matsumura, 1989) et une réduction du transport du glucose (Enan et al., 1992b), ces deux mécanismes étant dépendants de AhR, ainsi qu'une augmentation de la peroxidation lipidique (Ashida et al., 1996), indépendante de AhR. *In vitro*, la TCDD est capable d'inhiber la différenciation adipocytaire des cellules 3T3-L1, seulement si l'exposition se déroule dans les premiers jours du traitement des cellules avec le cocktail hormonal utilisé pour induire la différenciation, ce phénomène étant lui aussi dépendant du récepteur Ah (Phillips et al., 1995), (Chen et al., 1997). L'exposition plus tardive des adipocytes 3T3-L1 à la TCDD est sans effet sur la différenciation des cellules. Ici l'étude des profils métaboliques organiques n'a pas montré de différences significatives entre les adipocytes traités à la TCDD et les contrôles, suggérant ainsi l'absence d'effet de la TCDD sur la différenciation adipocytaire lorsque l'exposition est tardive (après différenciation des cellules) dans des cellules humaines. Une des hypothèses avancée pour expliquer ces résultats est que cette inhibition de la différenciation est corrélée avec le niveau d'expression d'AhR dans les cellules. L'expression de AhR est en effet négativement régulée lors de la différenciation adipocytaire, et l'hypothèse a été soulevée que la perte de l'expression de AhR dans les adipocytes matures serait responsable de leur manque de sensibilité à la TCDD (Shimba et al., 1998). Notre étude précédente (Ellero et al., 2009) a pourtant montré que le niveau d'expression de AhR dans des adipocytes humains différenciés *in vitro* était comparable à celui dans des explants de TA, et que l'activation de la voie AhR avait bien lieu dans ces cellules (induction de l'ARNm et de la protéine des CYP1A1 et 1B1). Les niveaux d'expression de AhR

dans les différents modèles *in vitro* de TA peuvent peut-être expliquer cette absence d'effet anti-adipogénique de la TCDD, mais ils correspondent à la réalité des niveaux d'expression dans le TA humain. Il est ainsi peu probable que l'effet anti-adipogénique de la TCDD, invisible sur des cellules différenciées animales et humaines, soit pertinent dans l'analyse des risques liés à l'exposition des populations aux dioxines.

Nous n'avons pas non plus trouvé de différences dans les profils métaboliques aqueux et les profils des milieux de culture des adipocytes traités à la TCDD. La métabonomique par ^{1}H-RMN a pourtant permis la détection d'un grand nombre de métabolites intra et extracellulaires (lactate, acides aminés, glucose…). Cette absence de résultats peut peut-être s'expliquer par des différences inter-individuelles très importantes et/ou par le manque de puissance statistique de notre plan d'expérience (n=5 dans chaque groupe). Cependant, l'utilisation simultanée du MEHP prouve la sensibilité de la méthode et la capacité de la métabonomique par ^{1}H-RMN à détecter des différences subtiles dans les profils métaboliques (détection de la diminution de proline de 10% dans le milieu extracellulaire par exemple). Donc, sans écarter complètement la possibilité que notre plan d'expérience soit trop faible pour détecter des variations métaboliques induites par le traitement des adipocytes humains à la TCDD, il est possible que ces variations métaboliques touchent des voies métaboliques auxquelles la métabonomique par ^{1}H-RMN a peu d'accès (les lipides par exemple, qui sont bien plus faciles à étudier par spectrométrie de masse que par RMN), ou que ces variations métaboliques soient extrêmement faibles, voir quasi-inexistantes.

CHAPITRE VII : DISCUSSION GENERALE, PERSPECTIVES

VII.1 Forces et faiblesses des modèles *in vitro* utilisés dans cette thèse

Comme souligné dans l'introduction de cette thèse et du chapitre VI, il existe d'importantes différences inter-espèces lors de l'exposition aux xénobiotiques environnementaux, et particulièrement en ce qui concerne les effets sur le TA. C'est pourquoi nous avons décidé dans cette thèse de travailler sur des modèles *in vitro* de TA humain.

Notre première étude sur la distribution et la régulation de l'expression de P450s dans le TA humain a démontré la pertinence de cette approche. Nous avons en effet montré que l'expression des P450s et des récepteurs impliqués dans leur régulation était conservée entre les modèles *in vitro* et des biopsies de TA humain. Nous avons de plus montré que le TA humain ne répondait pas aux inducteurs des P450s des familles 2 et 3, alors que des études précédentes avaient montré le contraire dans le TA de rat. Cependant, cette étude nous a aussi permis de mettre en évidence d'importantes régulations d'expression des P450s inhérentes aux processus de mise en culture des modèles *in vitro* de TA, comme l'induction forte du CYP1B1 lors de la différenciation des préadipocytes *in vitro*, certainement due au cocktail hormonal utilisé pour la différenciation.

Dans notre 2e étude, nous avons travaillé sur un seul de ces modèles: des cultures primaires de préadipocytes différenciés *in vitro*. Le but de notre travail était d'étudier les conséquences de l'exposition au MEHP et à la TCDD sur des adipocytes matures humains. Cependant, comme souligné précédemment (Chapitre II), les préadipocytes humains ne sont jamais totalement différenciés *in vitro*. Au niveau morphologique, les préadipocytes sont des cellules allongées, de phénotype fibroblastique, et les adipocytes sont de grosses cellules rondes, qui accumulent des TG au sein de leur cytoplasme. Le protocole de différenciation *in vitro* des préadipocytes humains aboutit à ces changements morphologiques pour seulement un certain pourcentage de cellules. L'accumulation intracellulaire de TG peut être considérée comme un indicateur biochimique du stade de différenciation des cellules et elle a été mesurée dans notre modèle cellulaire. Comme attendu, elle augmente régulièrement tout au long du

processus de différenciation et atteint un plateau après 11 jours de culture, montrant que les cellules atteignent leur maximum de différenciation à ce moment là. Un comptage visuel sous cellule de Malassez du nombre de cellules remplies de TG/cellules vides de TG après 11 jours de différenciation donne une estimation de la proportion de cellules différenciées à environ 70%. De plus, même les cellules les plus différenciées restent multi-loculaires (plusieurs gouttelettes lipidiques dans leur cytoplasme), alors que les adipocytes matures *in vivo* sont uni-loculaires, ce qui peut laisser penser que le processus de différenciation n'est pas complet, même dans ces cellules. Les cellules ont ainsi été traitées après 11 jours de différenciation, ce qui correspond au stade maximal de leur différenciation *in vitro*. Le traitement au MEHP induit des perturbations transcriptomiques et métaboliques faisant penser à une reprise du phénomène de différenciation. Ce phénomène peut aussi bien toucher les 30% de préadipocytes restant dans les cultures, que les 70% de cellules totalement ou partiellement différenciées. Il est ainsi difficile dans un tel modèle de faire la part des choses entre le phénomène de différenciation qui est extrêmement complexe et touche toutes les voies métaboliques de la cellule, et les conséquences métaboliques du traitement sur l'adipocyte mature.

In vivo cependant, le TA humain n'est pas constitué uniquement d'adipocytes matures. Le ratio fibroblastes/adipocytes a été déterminé dans différents sites adipeux et atteint 0.08 dans le TA sous-cutané (Rink J.D 1996). Une autre étude montre que le ratio adipocytes/cellules de la fraction stoma-vasculaire est constant chez tous les individus testés et ne dépend pas de l'IMC, et que ce ratio se situe autours de 5 (Van Harmelen V 2003). Ainsi, la proportion d'adipocytes matures au sein du TA humain semble se situer entre 80 et 90% du nombre de cellules totales, le reste étant constitué de préadipocytes et d'autres cellules de la fraction stroma-vasculaire. Dans notre modèle *in vitro*, la proportion d'adipocytes différenciés est ainsi seulement légèrement inférieure (70%) à celle observée *in vivo*. Ce modèle possède ainsi des caractéristiques similaires au TA humain *in vivo* et, malgré les difficultés dues à la présence de 2 types cellulaires dans nos cultures, il nous a permis de mettre en évidence un effet métabolique précoce sur les adipocytes matures : l'activation de la glycéronéogenèse.

Les modèles d'explants de TA sont une bonne alternative à ces cultures de préadipocytes différenciés *in vitro* et ont l'avantage de conserver intacte l'architecture cellulaire du TA humain. Ils présentent cependant l'inconvénient d'une plus grande hétérogénéité cellulaire (adipocytes + préadipocytes + autres cellules de la fraction stroma-vasculaire) et de grandes variations interindividuelles. L'induction de la gylcéronéogenèse a déjà été mise en évidence dans des explants de TA humains traités à la rosiglitazone, et il serait intéressant de vérifier nos résultats dans ce modèle.

Concernant l'effet pro-différenciant supposé du MEHP sur les préadipocytes humains, une façon simple de la vérifier est d'ajouter le MEHP au début du processus de différenciation des cellules et de mesurer des indicateurs biochimiques typiques de la différenciation (accumulation de TG, activité de la G3PDH…), comme cela a déjà été fait sur les cellules 3T3-L1 (Feige 2007).

VII.2 Forces et faiblesses de l'approche « top-down » utilisée

Le but de ce travail était d'améliorer la compréhension des effets directs de xénobiotiques environnementaux sur le TA humain en utilisant des méthodes non ciblées, «omiques ». L'utilisation de deux techniques à haut débit, la transcriptomique et la métabonomique par RMN, a permis une analyse globale et non ciblée des perturbations induites par 24 et 48h de traitement de préadipocytes humains différenciés *in vitro* avec la TCDD et le MEHP. Cette approche a révélé des aspects inattendus de l'impact de ces polluants sur le TA humain. Par exemple, elle a permis de montrer que le traitement des adipocytes au MEHP entrainait une diminution de la concentration de proline dans le milieu de culture. Cependant, il n'a pas été possible à cette étape de déterminer les causes de cet effet (surconsommation nécessaire pour la synthèse d'AG, sous-excrétion lié au remodelage de la matrice extra-cellulaire…) sans mener des expériences complémentaires. Pour aller plus loin dans l'explication de ce phénomène, il serait par exemple intéressant de cultiver les cellules en présence de ^{3}H-proline et d'étudier son incorporation dans les TG intracellulaires ou le collagène excrété. L'utilisation des techniques « omiques » pour générer des hypothèses

biologiques et les étudier ensuite par d'autres méthodes biologiques dirigées est appelée approche « top-down ». Elle a été ici appliquée avec succès à d'autres effets induits par le traitement au MEHP. L'analyse des profils métaboliques des cellules traitées a par exemple révélé une diminution importante de la concentration intracellulaire de lactate, très précocement, dès 24h de traitement, qui ne pouvait pas encore s'expliquer par une augmentation de la synthèse de TG. Une analyse cinétique dirigée des gènes impliqués dans différentes voies métaboliques de l'adipocyte a ensuite permis d'affiner l'hypothèse vers une induction de la glycéronéogenèse, qui a été confirmée par l'induction précoce de l'expression de la protéine PEPCK et la diminution de la libération des AG non estérifiés en conditions lipolytiques.

Un des défis de ce travail était aussi d'essayer d'intégrer les données issues des analyses non ciblées à divers niveaux d'observation. Partant du principe qu'un décalage cinétique pouvait avoir lieu entre les régulations transcriptomiques et métaboliques, nous avons observé ces changements avec un décalage temporel. Cette approche a permis tout d'abord la description « naïve » des perturbations à tous les niveaux d'observation (ARNm, milieu de culture, extraits cellulaires organiques et aqueux). Nous avons ensuite intégré ces perturbations entre elles, en nous basant en priorité sur des raisonnements biologiques. Cette intégration gènes-métabolites guidée par la biologie, nous a permis de générer un grand nombre d'hypothèses, comme celle sur l'influence du MEHP sur la désaturation des AG et la sensibilité à l'insuline. Une des grandes forces de cette approche est ainsi la génération rapide d'un nombre important d'hypothèses biologiques. Le problème est la validation en aval de ces hypothèses, qui est souvent omise et peut être extrêmement longue.

Nous avons aussi essayé d'intégrer ces données de façon purement statistique, sans nous laisser influencer par nos hypothèses biologiques. Nous avons ainsi montré que le décalage temporel utilisé pour l'observation des 2 niveaux ARNm et métabolites était pertinent. Cette démarche a de plus permis d'appuyer nos hypothèses biologiques. Cependant, limités par le faible pouvoir statistique de notre plan d'expérience (n=5 dans chaque groupe), et ayant

souhaité nous concentrer sur la validation de nos hypothèses biologiques, nous n'avons pas été plus loin dans ce raisonnement guidé par les statistiques. Cependant, une étude plus approfondie des corrélations gènes-métabolites nous aurait certainement encore permis de générer des hypothèses intéressantes ou de confirmer celles déjà formulées.

Cette étude est donc très encourageante et montre qu'avec un design expérimental approprié, et une bonne puissance statistique, l'intégration des données « omiques » peut mener à la génération d'hypothèses originales concernant les mécanismes cellulaires induits par une perturbation, et à une meilleure compréhension de ces mécanismes.

VII.3 Perspectives

L'étude des effets transcriptomiques induits par le traitement des adipocytes humains à la TCDD a montré de faibles perturbations dans l'expression des gènes après 24h de traitement. En confirmation de ces résultats, aucune de nos études métabonomiques n'a montré de perturbations significatives dans les cellules traitées. Notre étude précédente avait pourtant démontré la fonctionnalité de la voie d'induction AhR dans le TA humain et plus particulièrement dans ce modèle *in vitro*. Une explication possible est que la ^{1}H-RMN n'est pas adaptée pour visualiser les perturbations métaboliques engendrées par l'activation de ce facteur de transcription. L'utilisation de la métabonomique par spectrométrie de masse, plus sensible, pourrait peut-être nous aider.

La transcriptomique et métabonomique par ^{1}H-RMN ont toutefois été très adaptée pour étudier les effets du MEHP sur les adipocytes humains. Notre démarche pourrait ainsi s'inscrire dans une caractérisation plus systématique des effets des composés environnementaux sur le TA humain. Le choix du modèle pour étudier ces effets reste encore problématique, mais diverses questions peuvent cependant déjà être étudiées avec la même démarche que celle que nous avons utilisée. Par exemple, en utilisant les mêmes cellules, on pourrait comparer les effets de très faibles doses de MEHP à celle d'une plus forte dose. En effet, une courbe dose-

réponse non monotone du TA humain au MEHP a déjà été évoquée pour d'autres effets du DEHP *in vivo* (Ge et al., 2007). Une autre piste intéressante pourrait être de comparer les effets différentiels métaboliques induits par les traitements au MEHP et à la rosiglitazone, comme cela a déjà été fait pour leurs effets transcriptomiques, afin de vérifier si l'activation partielle de PPARγ par les composés environnementaux implique les mêmes conséquences que l'activation par les TZDs et d'améliorer nos conclusions sur les effets possibles du MEHP *in vivo*. Enfin, une étude récente effectuée *in vivo* chez des souris C57BI6J a montré que le DEHP exerçait des effets anti-adipogéniques dépendant uniquement du récepteur PPARα hépatique et n'étaient pas observables chez des souris transgéniques exprimant la forme humaine du récepteur PPARα (Feige et al., 2010). Au contraire, les souris exprimant la forme humaine du récepteur présentent une légère augmentation de leur TA lors de l'exposition au DEHP mais les causes de cette augmentation ne sont pas encore totalement comprises. Ce modèle de souris transgénique pourrait être un bon modèle pour nous aider à mieux comprendre les conséquences *in vivo* pour l'Homme de l'exposition au MEHP et il semblerait intéressant d'effectuer une étude métabonomique complète chez ces souris afin de déterminer le site principale d'action du DEHP *in vivo*. Il serait par exemple possible d'adapter le protocole de Claus et al. (Claus et al., 2008) et d'étudier les conséquences métaboliques de l'exposition au MEHP dans tous les organes de ces souris, avec une attention particulière pour le foie et les TA blancs et bruns.

Références

Ahima RS, Qi Y, Singhal NS, Jackson MB and Scherer PE (2006) Brain adipocytokine action and metabolic regulation. *Diabetes* **55 Suppl 2:**S145-154.

Ailhaud G, Grimaldi P and Negrel R (1992) Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr* **12:**207-233.

Alexander DL, Ganem LG, Fernandez-Salguero P, Gonzalez F and Jefcoate CR (1998) Aryl-hydrocarbon receptor is an inhibitory regulator of lipid synthesis and of commitment to adipogenesis. *J Cell Sci* **111 (Pt 22):**3311-3322.

Andersson S, Davis DL, Dahlback H, Jornvall H and Russell DW (1989) Cloning, structure, and expression of the mitochondrial cytochrome P-450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme. *J Biol Chem* **264:**8222-8229.

Anghel SI and Wahli W (2007) Fat poetry: a kingdom for PPAR gamma. *Cell Res* **17:**486-511.

Antizar-Ladislao B (2008) Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT)-contaminated marine environment. a review. b_antizar@hotmail.com. *Environ Int* **34:**292-308.

Arrebola JP, Martin-Olmedo P, Fernandez MF, Sanchez-Cantalejo E, Jimenez-Rios JA, Torne P, Porta M and Olea N (2009) Predictors of concentrations of hexachlorobenzene in human adipose tissue: a multivariate analysis by gender in Southern Spain. *Environ Int* **35:**27-32.

Arsenescu V, Arsenescu RI, King V, Swanson H and Cassis LA (2008) Polychlorinated biphenyl-77 induces adipocyte differentiation and proinflammatory adipokines and promotes obesity and atherosclerosis. *Environ Health Perspect* **116:**761-768.

Ashida H, Enan E and Matsumura F (1996) Protective action of dehydroascorbic acid on the Ah receptor-dependent and receptor-independent induction of lipid peroxidation in adipose tissue of male guinea pig caused by TCDD administration. *J Biochem Toxicol* **11:**269-278.

Baes M, Gulick T, Choi HS, Martinoli MG, Simha D and Moore DD (1994) A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily that interacts with a subset of retinoic acid response elements. *Mol Cell Biol* **14:**1544-1552.

Bahr R, Hansson P and Sejersted OM (1990) Triglyceride/fatty acid cycling is increased after exercise. *Metabolism* **39:**993-999.

Bakshi S, Zhang X, Godoy-Tundidor S, Cheng RY, Sartor MA, Medvedovic M and Ho SM (2008) Transcriptome analyses in normal prostate epithelial cells exposed to low-dose cadmium: oncogenic and immunomodulations involving the action of tumor necrosis factor. *Environ Health Perspect* **116:**769-776.

Bal-Price AK, Hogberg HT, Buzanska L, Lenas P, van Vliet E and Hartung T (2009) In vitro developmental neurotoxicity (DNT) testing: Relevant models and endpoints. *Neurotoxicology*.

Barbier O, Villeneuve L, Bocher V, Fontaine C, Torra IP, Duhem C, Kosykh V, Fruchart JC, Guillemette C and Staels B (2003) The UDP-glucuronosyltransferase 1A9 enzyme is a peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma target gene. *J Biol Chem* **278:**13975-13983.

Barouki R, Coumoul X and Fernandez-Salguero PM (2007) The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. *FEBS Lett* **581:**3608-3615.

Bartosiewicz MJ, Jenkins D, Penn S, Emery J and Buckpitt A (2001) Unique gene expression patterns in liver and kidney associated with exposure to chemical toxicants. *J Pharmacol Exp Ther* **297:**895-905.

Beale EG, Hammer RE, Antoine B and Forest C (2002) Glyceroneogenesis comes of age. *FASEB J* **16:**1695-1696.

Beard J (2006) DDT and human health. *Sci Total Environ* **355:**78-89.

Beaune P and Loriot MA (2000) Bases moléculaires de la susceptibilité aux xénobiotiques: aspects métaboliques. *Médecine/Sciences* **16:**1051-1056.

Becker K, Goen T, Seiwert M, Conrad A, Pick-Fuss H, Muller J, Wittassek M, Schulz C and Kolossa-Gehring M (2009) GerES IV: phthalate metabolites and bisphenol A in urine of German children. *Int J Hyg Environ Health* **212:**685-692.

Beckonert O, Keun HC, Ebbels TM, Bundy J, Holmes E, Lindon JC and Nicholson JK (2007) Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat Protoc* **2:**2692-2703.

Ben-Jonathan N, LaPensee CR and LaPensee EW (2008) What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocr Rev* **29:**1-41.

Berman T, Hochner-Celnikier D, Calafat AM, Needham LL, Amitai Y, Wormser U and Richter E (2009) Phthalate exposure among pregnant women in Jerusalem, Israel: results of a pilot study. *Environ Int* **35:**353-357.

Beylot M, Martin C, Laville M, Riou JP, Cohen R and Mornex R (1991) Lipolytic and ketogenic fluxes in human hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* **73:**42-49.

Bieche I, Narjoz C, Asselah T, Vacher S, Marcellin P, Lidereau R, Beaune P and de Waziers I (2007) Reverse transcriptase-PCR quantification of mRNA levels from cytochrome (CYP)1, CYP2 and CYP3 families in 22 different human tissues. *Pharmacogenet Genomics* **17:**731-742.

Boberg J, Metzdorff S, Wortziger R, Axelstad M, Brokken L, Vinggaard AM, Dalgaard M and Nellemann C (2008) Impact of diisobutyl phthalate and other PPAR agonists on steroidogenesis and plasma insulin and leptin levels in fetal rats. *Toxicology* **250:**75-81.

Borkman M, Storlien LH, Pan DA, Jenkins AB, Chisholm DJ and Campbell LV (1993) The relation between insulin sensitivity and the fatty-acid composition of skeletal-muscle phospholipids. *N Engl J Med* **328:**238-244.

Boyer IJ (1989) Toxicity of dibutyltin, tributyltin and other organotin compounds to humans and to experimental animals. *Toxicology* **55:**253-298.

Braun JE and Severson DL (1992) Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase. *Biochem J* **287 (Pt 2):**337-347.

Brewster DW and Matsumura F (1984) TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) reduces lipoprotein lipase activity in the adipose tissue of the guinea pig. *Biochem Biophys Res Commun* **122:**810-817.

Brewster DW and Matsumura F (1989) Differential effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on adipose tissue lipoprotein lipase activity in the guinea pig, rat, hamster, rabbit, and mink. *Comp Biochem Physiol C* **93:**49-53.

Brindle JT, Antti H, Holmes E, Tranter G, Nicholson JK, Bethell HW, Clarke S, Schofield PM, McKilligin E, Mosedale DE and Grainger DJ (2002) Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using 1H-NMR-based metabonomics. *Nat Med* **8:**1439-1444.

Brodie AE, Azarenko VA and Hu CY (1996) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) inhibition of fat cell differentiation. *Toxicol Lett* **84:**55-59.

Bushel PR, Heinloth AN, Li J, Huang L, Chou JW, Boorman GA, Malarkey DE, Houle CD, Ward SM, Wilson RE, Fannin RD, Russo MW, Watkins PB, Tennant RW and Paules RS (2007) Blood gene expression signatures predict exposure levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104:**18211-18216.

Cadoudal T, Blouin JM, Collinet M, Fouque F, Tan GD, Loizon E, Beale EG, Frayn KN, Karpe F, Vidal H, Benelli C and Forest C (2007) Acute and selective regulation of glyceroneogenesis and cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase in adipose tissue by thiazolidinediones in type 2 diabetes. *Diabetologia* **50:**666-675.

Cadoudal T, Distel E, Durant S, Fouque F, Blouin JM, Collinet M, Bortoli S, Forest C and Benelli C (2008) Pyruvate dehydrogenase kinase 4: regulation by thiazolidinediones and implication in glyceroneogenesis in adipose tissue. *Diabetes* **57:**2272-2279.

Calafat AM, Kuklenyik Z, Reidy JA, Caudill SP, Ekong J and Needham LL (2005) Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Perspect* **113:**391-395.

Calvo JC, Rodbard D, Katki A, Chernick S and Yanagishita M (1991) Differentiation of 3T3-L1 preadipocytes with 3-isobutyl-1-methylxanthine and dexamethasone stimulates cell-associated and soluble chondroitin 4-sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* **266:**11237-11244.

Cambon B, Reyne Y and Nougues J (1998) In vitro induction of UCP1 mRNA in preadipocytes from rabbit considered as a model of large mammals brown adipose tissue development: importance of PPARgamma agonists for cells isolated in the postnatal period. *Mol Cell Endocrinol* **146:**49-58.

Carson R (1962) *Silent Spring*, Boston.

Casals-Casas C, Feige JN and Desvergne B (2008) Interference of pollutants with PPARs: endocrine disruption meets metabolism. *Int J Obes (Lond)* **32 Suppl 6:**S53-61.

Casteilla L, Pénicaud L, Cousin B and Calise D Choosing an Adipose Tissue Depot for Sampling, in: *Adipose Tissue Protocols* (Ailhaud G ed), pp 1-20.

Chen CL, Brodie AE and Hu CY (1997) CCAAT/enhancer-binding protein beta is not affected by tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) inhibition of 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Obes Res* **5:**146-152.

Clarke CJ and Haselden JN (2008) Metabolic profiling as a tool for understanding mechanisms of toxicity. *Toxicol Pathol* **36:**140-147.

Claus SP, Tsang TM, Wang Y, Cloarec O, Skordi E, Martin FP, Rezzi S, Ross A, Kochhar S, Holmes E and Nicholson JK (2008) Systemic multicompartmental effects of the gut microbiome on mouse metabolic phenotypes. *Mol Syst Biol* **4:**219.

Clayton TA, Lindon JC, Cloarec O, Antti H, Charuel C, Hanton G, Provost JP, Le Net JL, Baker D, Walley RJ, Everett JR and Nicholson JK (2006) Pharmaco-metabonomic phenotyping and personalized drug treatment. *Nature* **440:**1073-1077.

Cloarec O, Dumas ME, Craig A, Barton RH, Trygg J, Hudson J, Blancher C, Gauguier D, Lindon JC, Holmes E and Nicholson J (2005a) Statistical total correlation spectroscopy: an exploratory approach for latent biomarker identification from metabolic 1H NMR data sets. *Anal Chem* **77:**1282-1289.

Cloarec O, Dumas ME, Trygg J, Craig A, Barton RH, Lindon JC, Nicholson JK and Holmes E (2005b) Evaluation of the orthogonal projection on latent structure model limitations caused by chemical shift variability and improved visualization of biomarker changes in 1H NMR spectroscopic metabonomic studies. *Anal Chem* **77:**517-526.

Cobellis L, Latini G, De Felice C, Razzi S, Paris I, Ruggieri F, Mazzeo P and Petraglia F (2003) High plasma concentrations of di-(2-ethylhexyl)-phthalate in women with endometriosis. *Hum Reprod* **18:**1512-1515.

Collins JM, Neville MJ, Hoppa MB and Frayn KN (2009) De novo lipogenesis and stearoyl-CoA desaturase are coordinately regulated in the human adipocyte and protect against palmitate-induced cell injury. *J Biol Chem* **285:**6044-6052.

Cooper DY, Levin S, Narasimhulu S and Rosenthal O (1965a) Photochemical Action Spectrum of the Terminal Oxidase of Mixed Function Oxidase Systems. *Science* **147:**400-402.

Cooper DY, Narasimhulu S, Slade A, Raich W, Foroff O and Rosenthal O (1965b) Hemoprotein content and activity of solubilized steroid 11 beta-hydroxylase preparations from adrenocortical mitochondria. *Life Sci* **4:**2109-2114.

Court MH, Hazarika S, Krishnaswamy S, Finel M and Williams JA (2008) Novel polymorphic human UDP-glucuronosyltransferase 2A3: cloning, functional characterization of enzyme variants, comparative tissue expression, and gene induction. *Mol Pharmacol* **74:**744-754.

Craig A, Cloarec O, Holmes E, Nicholson JK and Lindon JC (2006) Scaling and normalization effects in NMR spectroscopic metabonomic data sets. *Anal Chem* **78:**2262-2267.

Curtis K and Wilding BC (2010) Is it in us ? Chemical contamination in our bodies, Commonweal Biomonitoring Ressource Center.

Czech MP (2002) Fat targets for insulin signaling. *Mol Cell* **9:**695-696.

Czene K, Lichtenstein P and Hemminki K (2002) Environmental and heritable causes of cancer among 9.6 million individuals in the Swedish Family-Cancer Database. *Int J Cancer* **99:**260-266.

Dakeshita S, Kawai T, Uemura H, Hiyoshi M, Oguma E, Horiguchi H, Kayama F, Aoshima K, Shirahama S, Rokutan K and Arisawa K (2009) Gene expression signatures in peripheral blood cells from Japanese women exposed to environmental cadmium. *Toxicology* **257:**25-32.

Dani C, Smith AG, Dessolin S, Leroy P, Staccini L, Villageois P, Darimont C and Ailhaud G (1997) Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro. *J Cell Sci* **110 (Pt 11):**1279-1285.

Denison MS and Nagy SR (2003) Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **43:**309-334.

Deslex S, Negrel R, Vannier C, Etienne J and Ailhaud G (1987) Differentiation of human adipocyte precursors in a chemically defined serum-free medium. *Int J Obes* **11:**19-27.

Despres JP, Nadeau A, Tremblay A, Ferland M, Moorjani S, Lupien PJ, Theriault G, Pinault S and Bouchard C (1989) Role of deep abdominal fat in the association between regional adipose tissue distribution and glucose tolerance in obese women. *Diabetes* **38:**304-309.

Desvergne B and Wahli W (1999) Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* **20:**649-688.

Diraison F, Yankah V, Letexier D, Dusserre E, Jones P and Beylot M (2003) Differences in the regulation of adipose tissue and liver lipogenesis by carbohydrates in humans. *J Lipid Res* **44:**846-853.

Dobrzyn P, Jazurek M and Dobrzyn A (2010) Stearoyl-CoA desaturase and insulin signaling - What is the molecular switch? *Biochim Biophys Acta*.

Dresser GK, Spence JD and Bailey DG (2000) Pharmacokinetic-pharmacodynamic consequences and clinical relevance of cytochrome P450 3A4 inhibition. *Clin Pharmacokinet* **38:**41-57.

Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G and Wahli W (1992) Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* **68:**879-887.

Dumas ME, Maibaum EC, Teague C, Ueshima H, Zhou B, Lindon JC, Nicholson JK, Stamler J, Elliott P, Chan Q and Holmes E (2006) Assessment of analytical reproducibility of 1H NMR spectroscopy based metabonomics for large-scale epidemiological research: the INTERMAP Study. *Anal Chem* **78:**2199-2208.

Durmaz E, Ozmert EN, Erkekoglu P, Giray B, Derman O, Hincal F and Yurdakok K (2009) Plasma phthalate levels in pubertal gynecomastia. *Pediatrics* **125:**e122-129.

Dutheil F, Beaune P and Loriot MA (2008) Xenobiotic metabolizing enzymes in the central nervous system: Contribution of cytochrome P450 enzymes in normal and pathological human brain. *Biochimie* **90:**426-436.

Ebbels TM, Keun HC, Beckonert OP, Bollard ME, Lindon JC, Holmes E and Nicholson JK (2007) Prediction and classification of drug toxicity using probabilistic modeling of temporal metabolic data: the consortium on metabonomic toxicology screening approach. *J Proteome Res* **6:**4407-4422.

Elferink MG, Olinga P, Draaisma AL, Merema MT, Bauerschmidt S, Polman J, Schoonen WG and Groothuis GM (2008) Microarray analysis in rat liver slices correctly predicts in vivo hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* **229:**300-309.

Ellero SL, Chakhtoura G, Barreau C, Langouet S, Benelli C, Penicaud L, Beaune PH and De Waziers I (2009) Xenobiotic-Metabolizing Cytochromes P450 in Human White Adipose Tissue: Expression and Induction. *Drug Metab Dispos*.

Enan E, Liu PC and Matsumura F (1992a) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin causes reduction of glucose transporting activities in the plasma membranes of adipose tissue and pancreas from the guinea pig. *J Biol Chem* **267:**19785-19791.

Enan E, Liu PC and Matsumura F (1992b) TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-P-dioxin) causes reduction in glucose uptake through glucose transporters on the plasma membrane of the guinea pig adipocyte. *J Environ Sci Health B* **27:**495-510.

Enan E and Matsumura F (1993) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-P-dioxin induced alterations in protein phosphorylation in guinea pig adipose tissue. *J Biochem Toxicol* **8:**89-99.

Enan E, Moran F, VandeVoort CA, Stewart DR, Overstreet JW and Lasley BL (1996) Mechanism of toxic action of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in cultured human luteinized granulosa cells. *Reprod Toxicol* **10:**497-508.

Entenmann G and Hauner H (1996) Relationship between replication and differentiation in cultured human adipocyte precursor cells. *Am J Physiol* **270:**C1011-1016.

Eun JW, Ryu SY, Noh JH, Lee MJ, Jang JJ, Ryu JC, Jung KH, Kim JK, Bae HJ, Xie H, Kim SY, Lee SH, Park WS, Yoo NJ, Lee JY and Nam SW (2008) Discriminating the molecular basis of hepatotoxicity using the large-scale characteristic molecular signatures of toxicants by expression profiling analysis. *Toxicology* **249:**176-183.

Feige JN, Gelman L, Rossi D, Zoete V, Metivier R, Tudor C, Anghel SI, Grosdidier A, Lathion C, Engelborghs Y, Michielin O, Wahli W and Desvergne B (2007) The endocrine disruptor monoethyl-hexyl-phthalate is a selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulator that promotes adipogenesis. *J Biol Chem* **282:**19152-19166.

Feige JN, Gerber A, Casals-Casas C, Yang Q, Winkler C, Bedu E, Bueno M, Gelman L, Auwerx J, Gonzalez FJ and Desvergne B (2010) The pollutant diethylhexyl phthalate regulates hepatic energy metabolism via species-specific PPARalpha-dependent mechanisms. *Environ Health Perspect* **118:**234-241.

Fisher RM, Thorne A, Hamsten A and Arner P (2002) Fatty acid binding protein expression in different human adipose tissue depots in relation to rates of lipolysis and insulin concentration in obese individuals. *Mol Cell Biochem* **239:**95-100.

Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL and Johnson CL (2002) Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000. *JAMA* **288:**1723-1727.

Forner F, Kumar C, Luber CA, Fromme T, Klingenspor M and Mann M (2009) Proteome differences between brown and white fat mitochondria reveal specialized metabolic functions. *Cell Metab* **10:**324-335.

Fukuwatari T, Doi M, Sugimoto E, Kawada T and Shibata K (2001) Changes of pyridine nucleotide levels during adipocyte differentiation of mouse 3T3-L1 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* **65:**2565-2568.

Garfinkel D (1958) Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch Biochem Biophys* **77:**493-509.

Gartland KP, Sanins SM, Nicholson JK, Sweatman BC, Beddell CR and Lindon JC (1990) Pattern recognition analysis of high resolution 1H NMR spectra of urine. A nonlinear mapping approach to the classification of toxicological data. *NMR Biomed* **3:**166-172.

Ge RS, Chen GR, Dong Q, Akingbemi B, Sottas CM, Santos M, Sealfon SC, Bernard DJ and Hardy MP (2007) Biphasic effects of postnatal exposure to diethylhexylphthalate on the timing of puberty in male rats. *J Androl* **28:**513-520.

Gesta S, Lolmede K, Daviaud D, Berlan M, Bouloumie A, Lafontan M, Valet P and Saulnier-Blache JS (2003) Culture of human adipose tissue explants leads to profound alteration of adipocyte gene expression. *Horm Metab Res* **35:**158-163.

Gocmen A, Peters HA, Cripps DJ, Bryan GT and Morris CR (1989) Hexachlorobenzene episode in Turkey. *Biomed Environ Sci* **2:**36-43.

Gonzalez FJ (1988) The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacol Rev* **40:**243-288.

Gonzalez FJ, Skoda RC, Kimura S, Umeno M, Zanger UM, Nebert DW, Gelboin HV, Hardwick JP and Meyer UA (1988) Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. *Nature* **331:**442-446.

Goodwill MH, Lawrence DA and Seegal RF (2007) Polychlorinated biphenyls induce proinflammatory cytokine release and dopaminergic dysfunction: protection in interleukin-6 knockout mice. *J Neuroimmunol* **183:**125-132.

Goodwin B, Redinbo MR and Kliewer SA (2002) Regulation of cyp3a gene transcription by the pregnane x receptor. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42:**1-23.

Green H and Kehinde O (1975) An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* **5:**19-27.

Green MD, Oturu EM and Tephly TR (1994) Stable expression of a human liver UDP-glucuronosyltransferase (UGT2B15) with activity toward steroid and xenobiotic substrates. *Drug Metab Dispos* **22:**799-805.

Greenberg AS, Egan JJ, Wek SA, Moos MC, Jr., Londos C and Kimmel AR (1993) Isolation of cDNAs for perilipins A and B: sequence and expression of lipid droplet-associated proteins of adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90:**12035-12039.

Gregoire F, Genart C, Hauser N and Remacle C (1991) Glucocorticoids induce a drastic inhibition of proliferation and stimulate differentiation of adult rat fat cell precursors. *Exp Cell Res* **196:**270-278.

Gregoire FM (2001) Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. *Exp Biol Med (Maywood)* **226:**997-1002.

Gregoire FM, Smas CM and Sul HS (1998) Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* **78:**783-809.

Grun F and Blumberg B (2006) Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. *Endocrinology* **147:**S50-55.

Grun F and Blumberg B (2009) Endocrine disrupters as obesogens. *Mol Cell Endocrinol* **304:**19-29.

Grun F, Watanabe H, Zamanian Z, Maeda L, Arima K, Cubacha R, Gardiner DM, Kanno J, Iguchi T and Blumberg B (2006) Endocrine-disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. *Mol Endocrinol* **20:**2141-2155.

Gueguen Y, Mouzat K, Ferrari L, Tissandie E, Lobaccaro JM, Batt AM, Paquet F, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P and Souidi M (2006) [Cytochromes P450: xenobiotic metabolism, regulation and clinical importance]. *Ann Biol Clin (Paris)* **64:**535-548.

Guengerich FP (2005) Human Cytochrome P450 Enzymes, in: *Cytochrome P450 : Structure, Mechanism, and Biochemistry* (Montellano Od ed), pp 377-530, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New-York.

Guengerich FP (2007) Mechanisms of cytochrome P450 substrate oxidation: MiniReview. *J Biochem Mol Toxicol* **21:**163-168.

Guillette LJ, Jr., Gross TS, Masson GR, Matter JM, Percival HF and Woodward AR (1994) Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ Health Perspect* **102:**680-688.

Guo X and Liao K (2000) Analysis of gene expression profile during 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Gene* **251:**45-53.

Guo YL, Lambert GH, Hsu CC and Hsu MM (2004) Yucheng: health effects of prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and dibenzofurans. *Int Arch Occup Environ Health* **77:**153-158.

Hanlon PR, Ganem LG, Cho YC, Yamamoto M and Jefcoate CR (2003) AhR- and ERK-dependent pathways function synergistically to mediate 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin suppression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma1 expression and subsequent adipocyte differentiation. *Toxicol Appl Pharmacol* **189:**11-27.

Harries HM, Fletcher ST, Duggan CM and Baker VA (2001) The use of genomics technology to investigate gene expression changes in cultured human liver cells. *Toxicol In Vitro* **15:**399-405.

Hausman GJ, Hausman DB and Martin RJ (1992) Biochemical and cytochemical studies of preadipocyte differentiation in serum-free culture of porcine stromal-vascular cells: interaction of dexamethasone and growth hormone. *Acta Anat (Basel)* **143:**322-329.

He Q, Engelson ES and Kotler DP (2005) A comparison of abdominal subcutaneous adipose tissue pattern in obese and lean HIV-infected women. *J Nutr* **135:**53-57.

Heinloth AN, Irwin RD, Boorman GA, Nettesheim P, Fannin RD, Sieber SO, Snell ML, Tucker CJ, Li L, Travlos GS, Vansant G, Blackshear PE, Tennant RW, Cunningham ML and Paules RS (2004) Gene expression profiling of rat livers reveals indicators of potential adverse effects. *Toxicol Sci* **80:**193-202.

Henriksen GL, Ketchum NS, Michalek JE and Swaby JA (1997) Serum dioxin and diabetes mellitus in veterans of Operation Ranch Hand. *Epidemiology* **8:**252-258.

Hertz-Picciotto I, Park HY, Dostal M, Kocan A, Trnovec T and Sram R (2008) Prenatal exposures to persistent and non-persistent organic compounds and effects on immune system development. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **102:**146-154.

Hiroi T, Imaoka S and Funae Y (1998) Dopamine formation from tyramine by CYP2D6. *Biochem Biophys Res Commun* **249:**838-843.

Hollenberg NK (2003) Considerations for management of fluid dynamic issues associated with thiazolidinediones. *Am J Med* **115 Suppl 8A:**111S-115S.

Holmes E, Nicholson JK, Bonner FW, Sweatman BC, Beddell CR, Lindon JC and Rahr E (1992) Mapping the biochemical trajectory of nephrotoxicity by pattern recognition of NMR urinanalysis. *NMR Biomed* **5:**368-372.

Hoppe AA and Carey GB (2007) Polybrominated diphenyl ethers as endocrine disruptors of adipocyte metabolism. *Obesity (Silver Spring)* **15:**2942-2950.

Howdeshell KL, Hotchkiss AK, Thayer KA, Vandenbergh JG and vom Saal FS (1999) Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature* **401:**763-764.

Huang da W, Sherman BT and Lempicki RA (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* **4:**44-57.

Huber WW, Grasl-Kraupp B and Schulte-Hermann R (1996) Hepatocarcinogenic potential of di(2-ethylhexyl)phthalate in rodents and its implications on human risk. *Crit Rev Toxicol* **26:**365-481.

Hugo ER, Brandebourg TD, Comstock CE, Gersin KS, Sussman JJ and Ben-Jonathan N (2006) LS14: a novel human adipocyte cell line that produces prolactin. *Endocrinology* **147:**306-313.

Hugo ER, Brandebourg TD, Woo JG, Loftus J, Alexander JW and Ben-Jonathan N (2008) Bisphenol A at environmentally relevant doses inhibits adiponectin release from human adipose tissue explants and adipocytes. *Environ Health Perspect* **116:**1642-1647.

Hurst CH and Waxman DJ (2003) Activation of PPARalpha and PPARgamma by environmental phthalate monoesters. *Toxicol Sci* **74:**297-308.

Ibrahimi A and Abumrad NA (2002) Role of CD36 in membrane transport of long-chain fatty acids. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **5:**139-145.

Inadera H and Shimomura A (2005) Environmental chemical tributyltin augments adipocyte differentiation. *Toxicol Lett* **159:**226-234.

Ingelman-Sundberg M (2005) Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J* **5:**6-13.

Isenberg JS, Kamendulis LM, Smith JH, Ackley DC, Pugh G, Jr., Lington AW and Klaunig JE (2000) Effects of Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) on gap-junctional intercellular communication (GJIC), DNA synthesis, and peroxisomal beta oxidation (PBOX) in rat, mouse, and hamster liver. *Toxicol Sci* **56:**73-85.

Jessen BA and Stevens GJ (2002) Expression profiling during adipocyte differentiation of 3T3-L1 fibroblasts. *Gene* **299:**95-100.

Jowsey IR, Murdock PR, Moore GB, Murphy GJ, Smith SA and Hayes JD (2003) Prostaglandin D2 synthase enzymes and PPARgamma are co-expressed in mouse 3T3-L1 adipocytes and human tissues. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **70:**267-284.

Kamijo Y, Hora K, Nakajima T, Kono K, Takahashi K, Ito Y, Higuchi M, Kiyosawa K, Shigematsu H, Gonzalez FJ and Aoyama T (2007) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha protects against glomerulonephritis induced by long-term exposure to the plasticizer di-(2-ethylhexyl)phthalate. *J Am Soc Nephrol* **18:**176-188.

Kanayama T, Kobayashi N, Mamiya S, Nakanishi T and Nishikawa J (2005) Organotin compounds promote adipocyte differentiation as agonists of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma/retinoid X receptor pathway. *Mol Pharmacol* **67:**766-774.

Kato S (1999) Genetic mutation in the human 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene causes vitamin D-dependent rickets type I. *Mol Cell Endocrinol* **156:**7-12.

Kavlock R (2000) NTP-CERHR expert panel report on Di(2-ethylhexyl)phthalate.

Kell DB, Brown M, Davey HM, Dunn WB, Spasic I and Oliver SG (2005) Metabolic footprinting and systems biology: the medium is the message. *Nat Rev Microbiol* **3:**557-565.

Kelling CK, Christian BJ, Inhorn SL and Peterson RE (1985) Hypophagia-induced weight loss in mice, rats, and guinea pigs treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Fundam Appl Toxicol* **5:**700-712.

Kerkvliet NI (2009) AHR-mediated immunomodulation: the role of altered gene transcription. *Biochem Pharmacol* **77:**746-760.

Kern PA, Dicker-Brown A, Said ST, Kennedy R and Fonseca VA (2002) The stimulation of tumor necrosis factor and inhibition of glucose transport and lipoprotein lipase in adipose cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Metabolism* **51:**65-68.

Kirkland JL, Hollenberg CH and Gillon WS (1990) Age, anatomic site, and the replication and differentiation of adipocyte precursors. *Am J Physiol* **258:**C206-210.

Klein S, Fontana L, Young VL, Coggan AR, Kilo C, Patterson BW and Mohammed BS (2004) Absence of an effect of liposuction on insulin action and risk factors for coronary heart disease. *N Engl J Med* **350:**2549-2557.

Kliewer SA, Goodwin B and Willson TM (2002) The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism. *Endocr Rev* **23:**687-702.

Klingenberg M (1958) Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* **75:**376-386.

Koch HM, Preuss R and Angerer J (2006) Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): human metabolism and internal exposure-- an update and latest results. *Int J Androl* **29:**155-165; discussion 181-155.

Koenen TB, Tack CJ, Kroese JM, Hermus AR, Sweep FC, van der Laak J, Stalenhoef AF, de Graaf J, van Tits LJ and Stienstra R (2009) Pioglitazone treatment enlarges subcutaneous adipocytes in insulin-resistant patients. *J Clin Endocrinol Metab* **94:**4453-4457.

Konieczny SF and Emerson CP, Jr. (1984) 5-Azacytidine induction of stable mesodermal stem cell lineages from 10T1/2 cells: evidence for regulatory genes controlling determination. *Cell* **38:**791-800.

Kung T, Murphy KA and White LA (2009) The aryl hydrocarbon receptor (AhR) pathway as a regulatory pathway for cell adhesion and matrix metabolism. *Biochem Pharmacol* **77:**536-546.

Lafontan M, Bousquet-Melou A, Galitzky J, Barbe P, Carpene C, Langin D, Berlan M, Valet P, Castan I, Bouloumie A and et al. (1995) Adrenergic receptors and fat cells: differential recruitment by physiological amines and homologous regulation. *Obes Res* **3 Suppl 4:**507S-514S.

Lang IA, Galloway TS, Scarlett A, Henley WE, Depledge M, Wallace RB and Melzer D (2008) Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *JAMA* **300:**1303-1310.

Laviola L, Perrini S, Cignarelli A, Natalicchio A, Leonardini A, De Stefano F, Cuscito M, De Fazio M, Memeo V, Neri V, Cignarelli M, Giorgino R and Giorgino F (2006) Insulin signaling in human visceral and subcutaneous adipose tissue in vivo. *Diabetes* **55:**952-961.

Lee DH, Lee IK, Porta M, Steffes M and Jacobs DR, Jr. (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:**1841-1851.

Letexier D, Pinteur C, Large V, Frering V and Beylot M (2003) Comparison of the expression and activity of the lipogenic pathway in human and rat adipose tissue. *J Lipid Res* **44:**2127-2134.

Lewis DF (2004) 57 varieties: the human cytochromes P450. *Pharmacogenomics* **5:**305-318.

Li QQ, Loganath A, Chong YS, Tan J and Obbard JP (2006) Levels of persistent organic pollutant residues in human adipose and muscle tissues in Singapore. *J Toxicol Environ Health A* **69:**1927-1937.

Li W, Vogel CF and Matsumura F (2007) Studies on the cell treatment conditions to elicit lipolytic responses from 3T3-L1 adipocytes to TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J Cell Biochem* **102:**389-402.

Lindon JC, Holmes E, Bollard ME, Stanley EG and Nicholson JK (2004) Metabonomics technologies and their applications in physiological monitoring, drug safety assessment and disease diagnosis. *Biomarkers* **9:**1-31.

Lindon JC, Holmes E and Nicholson JK (2007) Metabonomics in pharmaceutical R&D. *FEBS J* **274:**1140-1151.

Longnecker MP and Michalek JE (2000) Serum dioxin level in relation to diabetes mellitus among Air Force veterans with background levels of exposure. *Epidemiology* **11:**44-48.

Lorber M, Angerer J and Koch HM (2008) A simple pharmacokinetic model to characterize exposure of Americans to Di-2-ethylhexyl phthalate. *J Expo Sci Environ Epidemiol* **20:**38-53.

Luiken JJ, Coort SL, Koonen DP, van der Horst DJ, Bonen A, Zorzano A and Glatz JF (2004) Regulation of cardiac long-chain fatty acid and glucose uptake by translocation of substrate transporters. *Pflugers Arch* **448:**1-15.

Maenpaa J, Pelkonen O, Cresteil T and Rane A (1993) The role of cytochrome P450 3A (CYP3A) isoform(s) in oxidative metabolism of testosterone and benzphetamine in human adult and fetal liver. *J Steroid Biochem Mol Biol* **44:**61-67.

Maloney EK and Waxman DJ (1999) trans-Activation of PPARalpha and PPARgamma by structurally diverse environmental chemicals. *Toxicol Appl Pharmacol* **161:**209-218.

Mansuy D and Battioni P (2000) Diversity of reactions catalyzed by heme-thiolate proteins, in: *Biochemistry and binding : activation of small molecules* (Kadish K, Smith K and Guilard R eds), pp 1-15, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New-York.

Marin P, Hogh-Kristiansen I, Jansson S, Krotkiewski M, Holm G and Bjorntorp P (1992) Uptake of glucose carbon in muscle glycogen and adipose tissue triglycerides in vivo in humans. *Am J Physiol* **263:**E473-480.

Masuno H, Iwanami J, Kidani T, Sakayama K and Honda K (2005) Bisphenol a accelerates terminal differentiation of 3T3-L1 cells into adipocytes through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Toxicol Sci* **84:**319-327.

Masuno H, Kidani T, Sekiya K, Sakayama K, Shiosaka T, Yamamoto H and Honda K (2002) Bisphenol A in combination with insulin can accelerate the conversion of 3T3-L1 fibroblasts to adipocytes. *J Lipid Res* **43:**676-684.

Matthews PM, Bland JL, Gadian DG and Radda GK (1982) A 31P-NMR saturation transfer study of the regulation of creatine kinase in the rat heart. *Biochim Biophys Acta* **721:**312-320.

McMillian M, Nie AY, Parker JB, Leone A, Kemmerer M, Bryant S, Herlich J, Yieh L, Bittner A, Liu X, Wan J and Johnson MD (2004) Inverse gene expression patterns for macrophage activating hepatotoxicants and peroxisome proliferators in rat liver. *Biochem Pharmacol* **67:**2141-2165.

Mead JR, Irvine SA and Ramji DP (2002) Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J Mol Med* **80:**753-769.

Michalek JE, Tripathi RC, Caudill SP and Pirkle JL (1992) Investigation of TCDD half-life heterogeneity in veterans of Operation Ranch Hand. *J Toxicol Environ Health* **35:**29-38.

Miller WL (1998) Early steps in androgen biosynthesis: from cholesterol to DHEA. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* **12:**67-81.

Miyawaki J, Sakayama K, Kato H, Yamamoto H and Masuno H (2007) Perinatal and postnatal exposure to bisphenol a increases adipose tissue mass and serum cholesterol level in mice. *J Atheroscler Thromb* **14:**245-252.

Moreno-Aliaga MJ and Matsumura F (1999) Endrin inhibits adipocyte differentiation by selectively altering expression pattern of CCAAT/enhancer binding protein-alpha in 3T3-L1 cells. *Mol Pharmacol* **56:**91-101.

Moreno-Aliaga MJ and Matsumura F (2002) Effects of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)-ethane (p,p'-DDT) on 3T3-L1 and 3T3-F442A adipocyte differentiation. *Biochem Pharmacol* **63:**997-1007.

Mullerova D and Kopecky J (2007) White adipose tissue: storage and effector site for environmental pollutants. *Physiol Res* **56:**375-381.

Murray GI, Melvin WT, Greenlee WF and Burke MD (2001) Regulation, function, and tissue-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41:**297-316.

Mutoh S, Osabe M, Inoue K, Moore R, Pedersen L, Perera L, Rebolloso Y, Sueyoshi T and Negishi M (2009) Dephosphorylation of threonine 38 is required for nuclear translocation and activation of human xenobiotic receptor CAR (NR1I3). *J Biol Chem* **284:**34785-34792.

Nebert DW, Adesnik M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Kemper B, Levin W and et al. (1987) The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA* **6:**1-11.

Nebert DW and Russell DW (2002) Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* **360:**1155-1162.

Negrel R, Grimaldi P and Ailhaud G (1978) Establishment of preadipocyte clonal line from epididymal fat pad of ob/ob mouse that responds to insulin and to lipolytic hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75:**6054-6058.

Newbold RR, Jefferson WN and Padilla-Banks E (2007) Long-term adverse effects of neonatal exposure to bisphenol A on the murine female reproductive tract. *Reprod Toxicol* **24:**253-258.

Newton RK, Aardema M and Aubrecht J (2004) The utility of DNA microarrays for characterizing genotoxicity. *Environ Health Perspect* **112:**420-422.

Nicholls AW, Holmes E, Lindon JC, Shockcor JP, Farrant RD, Haselden JN, Damment SJ, Waterfield CJ and Nicholson JK (2001) Metabonomic investigations into hydrazine toxicity in the rat. *Chem Res Toxicol* **14:**975-987.

Nikaido Y, Yoshizawa K, Danbara N, Tsujita-Kyutoku M, Yuri T, Uehara N and Tsubura A (2004) Effects of maternal xenoestrogen exposure on development of the reproductive tract and mammary gland in female CD-1 mouse offspring. *Reprod Toxicol* **18:**803-811.

Nishimura M, Yaguti H, Yoshitsugu H, Naito S and Satoh T (2003) Tissue distribution of mRNA expression of human cytochrome P450 isoforms assessed by high-sensitivity real-time reverse transcription PCR. *Yakugaku Zasshi* **123:**369-375.

OFSP (2006) Factsheet : les phthalates (Publique OFdlS ed.

Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, Mori Y, Iwamoto K, Umesono K, Akanuma Y, Fujiwara T, Horikoshi H, Yazaki Y and Kadowaki T (1998) Troglitazone increases the number of small adipocytes

without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J Clin Invest* **101:**1354-1361.

Olsen H, Enan E and Matsumura F (1994) Regulation of glucose transport in the NIH 3T3 L1 preadipocyte cell line by TCDD. *Environ Health Perspect* **102:**454-458.

Olsen H, Enan E and Matsumura F (1998) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin mechanism of action to reduce lipoprotein lipase activity in the 3T3-L1 preadipocyte cell line. *J Biochem Mol Toxicol* **12:**29-39.

Omura T and Sato R (1962) A new cytochrome in liver microsomes. *J Biol Chem* **237:**1375-1376.

Omura T and Sato R (1964) The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for Its Hemoprotein Nature. *J Biol Chem* **239:**2370-2378.

Park HS and Lee K (2005) Greater beneficial effects of visceral fat reduction compared with subcutaneous fat reduction on parameters of the metabolic syndrome: a study of weight reduction programmes in subjects with visceral and subcutaneous obesity. *Diabet Med* **22:**266-272.

Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Duret C, Daujat-Chavanieu M, Vilarem MJ and Maurel P (2008) The tangle of nuclear receptors that controls xenobiotic metabolism and transport: crosstalk and consequences. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **48:**1-32.

Patisaul HB and Bateman HL (2008) Neonatal exposure to endocrine active compounds or an ERbeta agonist increases adult anxiety and aggression in gonadally intact male rats. *Horm Behav* **53:**580-588.

Pavek P and Dvorak Z (2008) Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues. *Curr Drug Metab* **9:**129-143.

Pesatori AC, Consonni D, Rubagotti M, Grillo P and Bertazzi PA (2009) Cancer incidence in the population exposed to dioxin after the "Seveso accident": twenty years of follow-up. *Environ Health* **8:**39.

Phillips M, Enan E, Liu PC and Matsumura F (1995) Inhibition of 3T3-L1 adipose differentiation by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J Cell Sci* **108 (Pt 1):**395-402.

Polyzou C, Khatter K, Freeman A, Foulds J, Smith R, Vom Saal FS and Stone C (2008) Toxic Baby Bottles in Canada, Environmental Defence.

Raamsdonk LM, Teusink B, Broadhurst D, Zhang N, Hayes A, Walsh MC, Berden JA, Brindle KM, Kell DB, Rowland JJ, Westerhoff HV, van Dam K and Oliver SG (2001) A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nat Biotechnol* **19:**45-50.

Remillard RB and Bunce NJ (2002) Linking dioxins to diabetes: epidemiology and biologic plausibility. *Environ Health Perspect* **110:**853-858.

Rendic S (2002) Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metab Rev* **34:**83-448.

Reshef L, Olswang Y, Cassuto H, Blum B, Croniger CM, Kalhan SC, Tilghman SM and Hanson RW (2003) Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *J Biol Chem* **278:**30413-30416.

Revollo JR, Grimm AA and Imai S (2004) The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. *J Biol Chem* **279:**50754-50763.

Ridd K, Zhang SD, Edwards RE, Davies R, Greaves P, Wolfreys A, Smith AG and Gant TW (2006) Association of gene expression with sequential proliferation, differentiation and tumor formation in murine skin. *Carcinogenesis* **27:**1556-1566.

Riddick DS, Huang Y, Harper PA and Okey AB (1994) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin versus 3-methylcholanthrene: comparative studies of Ah receptor binding, transformation, and induction of CYP1A1. *J Biol Chem* **269:**12118-12128.

Ritter L. SKR, Forget J., Stemeroff M., O'Leary C. (2007) Persitent Organic Pollutants : An Assessment Report on DDT-Aldrin-Dieldrin-Endrin-Chlordane-Heptachlor-Hexachlorobenzene-Mirex-

Toxaphene-Polychlorinated Biphenyls-Dioxins and Furans The International Programme on Chemical Safety (IPCS)

Roberts RA (1999) Peroxisome proliferators: mechanisms of adverse effects in rodents and molecular basis for species differences. *Arch Toxicol* **73:**413-418.

Rubin BS, Murray MK, Damassa DA, King JC and Soto AM (2001) Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environ Health Perspect* **109:**675-680.

Rubin BS and Soto AM (2009) Bisphenol A: Perinatal exposure and body weight. *Mol Cell Endocrinol* **304:**55-62.

Salay E and Garabrant D (2009) Polychlorinated biphenyls and thyroid hormones in adults: a systematic review appraisal of epidemiological studies. *Chemosphere* **74:**1413-1419.

Sears DD, Hsiao A, Ofrecio JM, Chapman J, He W and Olefsky JM (2007) Selective modulation of promoter recruitment and transcriptional activity of PPARgamma. *Biochem Biophys Res Commun* **364:**515-521.

Seefeld MD, Corbett SW, Keesey RE and Peterson RE (1984a) Characterization of the wasting syndrome in rats treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol Appl Pharmacol* **73:**311-322.

Seefeld MD, Keesey RE and Peterson RE (1984b) Body weight regulation in rats treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol Appl Pharmacol* **76:**526-536.

Sen A, Lea-Currie YR, Sujkowska D, Franklin DM, Wilkison WO, Halvorsen YD and Gimble JM (2001) Adipogenic potential of human adipose derived stromal cells from multiple donors is heterogeneous. *J Cell Biochem* **81:**312-319.

Sharpe RM and Irvine DS (2004) How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health? *BMJ* **328:**447-451.

Shi Q, Guo L, Patterson TA, Dial S, Li Q, Sadovova N, Zhang X, Hanig JP, Paule MG, Slikker W, Jr. and Wang C Gene expression profiling in the developing rat brain exposed to ketamine. *Neuroscience* **166:**852-863.

Shimada T, Hayes CL, Yamazaki H, Amin S, Hecht SS, Guengerich FP and Sutter TR (1996) Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer Res* **56:**2979-2984.

Shimba S, Todoroki K, Aoyagi T and Tezuka M (1998) Depletion of arylhydrocarbon receptor during adipose differentiation in 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **249:**131-137.

Si Y, Yoon J and Lee K (2007) Flux profile and modularity analysis of time-dependent metabolic changes of de novo adipocyte formation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **292:**E1637-1646.

Silva MJ, Barr DB, Reidy JA, Malek NA, Hodge CC, Caudill SP, Brock JW, Needham LL and Calafat AM (2004) Urinary levels of seven phthalate metabolites in the U.S. population from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2000. *Environ Health Perspect* **112:**331-338.

Slim RM, Robertson DG, Albassam M, Reily MD, Robosky L and Dethloff LA (2002) Effect of dexamethasone on the metabonomics profile associated with phosphodiesterase inhibitor-induced vascular lesions in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* **183:**108-109.

Smink A, Ribas-Fito N, Garcia R, Torrent M, Mendez MA, Grimalt JO and Sunyer J (2008) Exposure to hexachlorobenzene during pregnancy increases the risk of overweight in children aged 6 years. *Acta Paediatr* **97:**1465-1469.

Spiegelman BM and Farmer SR (1982) Decreases in tubulin and actin gene expression prior to morphological differentiation of 3T3 adipocytes. *Cell* **29:**53-60.

Stahlhut RW, van Wijngaarden E, Dye TD, Cook S and Swan SH (2007) Concentrations of urinary phthalate metabolites are associated with increased waist circumference and insulin resistance in adult U.S. males. *Environ Health Perspect* **115:**876-882.

Stahlhut RW, Welshons WV and Swan SH (2009) Bisphenol A data in NHANES suggest longer than expected half-life, substantial nonfood exposure, or both. *Environ Health Perspect* **117:**784-789.

Su X, Han X, Yang J, Mancuso DJ, Chen J, Bickel PE and Gross RW (2004) Sequential ordered fatty acid alpha oxidation and Delta9 desaturation are major determinants of lipid storage and utilization in differentiating adipocytes. *Biochemistry* **43:**5033-5044.

Sul HS, Smas C, Mei B and Zhou L (2000) Function of pref-1 as an inhibitor of adipocyte differentiation. *Int J Obes Relat Metab Disord* **24 Suppl 4:**S15-19.

Suna S, Yamaguchi F, Kimura S, Tokuda M and Jitsunari F (2007) Preventive effect of D-psicose, one of rare ketohexoses, on di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)-induced testicular injury in rat. *Toxicol Lett* **173:**107-117.

Supornsilchai V, Soder O and Svechnikov K (2007) Stimulation of the pituitary-adrenal axis and of adrenocortical steroidogenesis ex vivo by administration of di-2-ethylhexyl phthalate to prepubertal male rats. *J Endocrinol* **192:**33-39.

Swan SH, Brazil C, Drobnis EZ, Liu F, Kruse RL, Hatch M, Redmon JB, Wang C and Overstreet JW (2003) Geographic differences in semen quality of fertile U.S. males. *Environ Health Perspect* **111:**414-420.

Swan SH, Main KM, Liu F, Stewart SL, Kruse RL, Calafat AM, Mao CS, Redmon JB, Ternand CL, Sullivan S and Teague JL (2005) Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environ Health Perspect* **113:**1056-1061.

Talsness CE (2008) Overview of toxicological aspects of polybrominated diphenyl ethers: a flame-retardant additive in several consumer products. *Environ Res* **108:**158-167.

Tan GD, Fielding BA, Currie JM, Humphreys SM, Desage M, Frayn KN, Laville M, Vidal H and Karpe F (2005) The effects of rosiglitazone on fatty acid and triglyceride metabolism in type 2 diabetes. *Diabetologia* **48:**83-95.

Tang QQ, Otto TC and Lane MD (2003) Mitotic clonal expansion: a synchronous process required for adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100:**44-49.

Tang Z, Martin MV and Guengerich FP (2009) Elucidation of functions of human cytochrome P450 enzymes: identification of endogenous substrates in tissue extracts using metabolomic and isotopic labeling approaches. *Anal Chem* **81:**3071-3078.

Tchernof A, Levesque E, Beaulieu M, Couture P, Despres JP, Hum DW and Belanger A (1999) Expression of the androgen metabolizing enzyme UGT2B15 in adipose tissue and relative expression measurement using a competitive RT-PCR method. *Clin Endocrinol (Oxf)* **50:**637-642.

Thorne A, Lonnqvist F, Apelman J, Hellers G and Arner P (2002) A pilot study of long-term effects of a novel obesity treatment: omentectomy in connection with adjustable gastric banding. *Int J Obes Relat Metab Disord* **26:**193-199.

Tiziani S, Lodi A, Khanim FL, Viant MR, Bunce CM and Gunther UL (2009) Metabolomic profiling of drug responses in acute myeloid leukaemia cell lines. *PLoS One* **4:**e4251.

Toschke AM, Koletzko B, Slikker W, Jr., Hermann M and von Kries R (2002) Childhood obesity is associated with maternal smoking in pregnancy. *Eur J Pediatr* **161:**445-448.

Trigg J. and S. W (2002) Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). *Journal of chemometrics* **16:**119-128.

Tusher VG, Tibshirani R and Chu G (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98:**5116-5121.

Tyl RW, Myers CB, Marr MC, Thomas BF, Keimowitz AR, Brine DR, Veselica MM, Fail PA, Chang TY, Seely JC, Joiner RL, Butala JH, Dimond SS, Cagen SZ, Shiotsuka RN, Stropp GD and Waechter JM (2002) Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci* **68:**121-146.

Usmani KA, Rose RL and Hodgson E (2003) Inhibition and activation of the human liver microsomal and human cytochrome P450 3A4 metabolism of testosterone by deployment-related chemicals. *Drug Metab Dispos* **31:**384-391.

van den Berg RA, Hoefsloot HC, Westerhuis JA, Smilde AK and van der Werf MJ (2006) Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics* **7:**142.

van Leeuwen DM, van Herwijnen MH, Pedersen M, Knudsen LE, Kirsch-Volders M, Sram RJ, Staal YC, Bajak E, van Delft JH and Kleinjans JC (2006) Genome-wide differential gene expression in children exposed to air pollution in the Czech Republic. *Mutat Res* **600:**12-22.

van Vliet E, Morath S, Eskes C, Linge J, Rappsilber J, Honegger P, Hartung T and Coecke S (2008) A novel in vitro metabolomics approach for neurotoxicity testing, proof of principle for methyl mercury chloride and caffeine. *Neurotoxicology* **29:**1-12.

Vannier C, Gaillard D, Grimaldi P, Amri EZ, Djian P, Cermolacce C, Forest C, Etienne J, Negrel R and Ailhaud G (1985) Adipose conversion of ob17 cells and hormone-related events. *Int J Obes* **9 Suppl 1:**41-53.

Verreth W, De Keyzer D, Pelat M, Verhamme P, Ganame J, Bielicki JK, Mertens A, Quarck R, Benhabiles N, Marguerie G, Mackness B, Mackness M, Ninio E, Herregods MC, Balligand JL and Holvoet P (2004) Weight-loss-associated induction of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma correlate with reduced atherosclerosis and improved cardiovascular function in obese insulin-resistant mice. *Circulation* **110:**3259-3269.

Veselkov KA, Lindon JC, Ebbels TM, Crockford D, Volynkin VV, Holmes E, Davies DB and Nicholson JK (2009) Recursive segment-wise peak alignment of biological (1)h NMR spectra for improved metabolic biomarker recovery. *Anal Chem* **81:**56-66.

Viant MR, Bearden DW, Bundy JG, Burton IW, Collette TW, Ekman DR, Ezernieks V, Karakach TK, Lin CY, Rochfort S, de Ropp JS, Teng Q, Tjeerdema RS, Walter JA and Wu H (2009) International NMR-based environmental metabolomics intercomparison exercise. *Environ Sci Technol* **43:**219-225.

Viant MR, Pincetich CA, Hinton DE and Tjeerdema RS (2006) Toxic actions of dinoseb in medaka (Oryzias latipes) embryos as determined by in vivo 31P NMR, HPLC-UV and 1H NMR metabolomics. *Aquat Toxicol* **76:**329-342.

Viluksela M, Unkila M, Pohjanvirta R, Tuomisto JT, Stahl BU, Rozman KK and Tuomisto J (1999) Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on liver phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) activity, glucose homeostasis and plasma amino acid concentrations in the most TCDD-susceptible and the most TCDD-resistant rat strains. *Arch Toxicol* **73:**323-336.

Vulimiri SV, Misra M, Hamm JT, Mitchell M and Berger A (2009) Effects of Mainstream Cigarette Smoke on the Global Metabolome of Human Lung Epithelial Cells. *Chem Res Toxicol*.

Wabitsch M, Brenner RE, Melzner I, Braun M, Moller P, Heinze E, Debatin KM and Hauner H (2001) Characterization of a human preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation. *Int J Obes Relat Metab Disord* **25:**8-15.

Wajchenberg BL (2000) Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* **21:**697-738.

Wang EJ, Snyder RD, Fielden MR, Smith RJ and Gu YZ (2008a) Validation of putative genomic biomarkers of nephrotoxicity in rats. *Toxicology* **246:**91-100.

Wang Y, Beydoun MA, Liang L, Caballero B and Kumanyika SK (2008b) Will all Americans become overweight or obese? estimating the progression and cost of the US obesity epidemic. *Obesity (Silver Spring)* **16:**2323-2330.

Warensjo E, Ingelsson E, Lundmark P, Lannfelt L, Syvanen AC, Vessby B and Riserus U (2007) Polymorphisms in the SCD1 gene: associations with body fat distribution and insulin sensitivity. *Obesity (Silver Spring)* **15:**1732-1740.

Waterman MR and Simpson ER (1985) Regulation of the biosynthesis of cytochromes P-450 involved in steroid hormone synthesis. *Mol Cell Endocrinol* **39:**81-89.

Weiner FR, Shah A, Smith PJ, Rubin CS and Zern MA (1989) Regulation of collagen gene expression in 3T3-L1 cells. Effects of adipocyte differentiation and tumor necrosis factor alpha. *Biochemistry* **28:**4094-4099.

Welshons WV, Nagel SC and vom Saal FS (2006) Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology* **147:**S56-69.

Weuve J, Sanchez BN, Calafat AM, Schettler T, Green RA, Hu H and Hauser R (2006) Exposure to phthalates in neonatal intensive care unit infants: urinary concentrations of monoesters and oxidative metabolites. *Environ Health Perspect* **114:**1424-1431.

White SS and Birnbaum LS (2009) An overview of the effects of dioxins and dioxin-like compounds on vertebrates, as documented in human and ecological epidemiology. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* **27:**197-211.

Whitehead JP, Richards AA, Hickman IJ, Macdonald GA and Prins JB (2006) Adiponectin--a key adipokine in the metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab* **8:**264-280.

Wold S (1984) Modeling Data Tables by Principal Components and Pls - Class Pattern and Quantitative Predictive Relations. *Analusis* **12:**477-485.

Wright HM, Clish CB, Mikami T, Hauser S, Yanagi K, Hiramatsu R, Serhan CN and Spiegelman BM (2000) A synthetic antagonist for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem* **275:**1873-1877.

Xie Y, Yang Q, Nelson BD and DePierre JW (2002) Characterization of the adipose tissue atrophy induced by peroxisome proliferators in mice. *Lipids* **37:**139-146.

Xu Y, Knipp GT and Cook TJ (2006) Effects of di-(2-ethylhexyl)-phthalate and its metabolites on the lipid profiling in rat HRP-1 trophoblast cells. *Arch Toxicol* **80:**293-298.

Yang X and Smith U (2007) Adipose tissue distribution and risk of metabolic disease: does thiazolidinedione-induced adipose tissue redistribution provide a clue to the answer? *Diabetologia* **50:**1127-1139.

Yao-Borengasser A, Rassouli N, Varma V, Bodles AM, Rasouli N, Unal R, Phanavanh B, Ranganathan G, McGehee RE, Jr. and Kern PA (2008) Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 gene expression increases after pioglitazone treatment and is associated with peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma responsiveness. *J Clin Endocrinol Metab* **93:**4431-4439.

Yoo H, Stephanopoulos G and Kelleher JK (2004) Quantifying carbon sources for de novo lipogenesis in wild-type and IRS-1 knockout brown adipocytes. *J Lipid Res* **45:**1324-1332.

Yoshinari K, Okino N, Sato T, Sugatani J and Miwa M (2006) Induction of detoxifying enzymes in rodent white adipose tissue by aryl hydrocarbon receptor agonists and antioxidants. *Drug Metab Dispos* **34:**1081-1089.

Yoshinari K, Sato T, Okino N, Sugatani J and Miwa M (2004) Expression and induction of cytochromes p450 in rat white adipose tissue. *J Pharmacol Exp Ther* **311:**147-154.

Zancanaro C, Nano R, Marchioro C, Sbarbati A, Boicelli A and Osculati F (1994) Magnetic resonance spectroscopy investigations of brown adipose tissue and isolated brown adipocytes. *J Lipid Res* **35:**2191-2199.

Zechner R, Strauss JG, Haemmerle G, Lass A and Zimmermann R (2005) Lipolysis: pathway under construction. *Curr Opin Lipidol* **16:**333-340.

Zhang YH, Chen BH, Zheng LX and Wu XY (2003) [Study on the level of phthalates in human biological samples]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* **37:**429-434.

Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, Lass A, Neuberger G, Eisenhaber F, Hermetter A and Zechner R (2004) Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* **306:**1383-1386.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP and Hedrick MH (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* **7:**211-228.

Annexe 1 : Publication en cours

En parallèle de ce travail de thèse, nous avons travaillé avec le Dr. Sandrine Claus (Biomolecular Medicine, Department of Surgery and Cancer, Faculty of Medicine, Imperial College London) sur la caractérisation des modifications systémiques induites, chez la souris, par l'acquistion de la flore intestinale. Des souris axéniques ont été mises en contact avec les faeces de souris contrôles et les modifications métaboliques ont été suivies dans tous les organes par ^{1}H-RMN pendant 20 jours du processus de colonisation. D'importantes modifications du métabolisme hépatique ont été mises en évidence qui nous ont amené à nous poser la question de l'influence de ce processus de colonisation sur le métabolisme des xénobiotiques. Pour approfondir cette question, nous avons utilisé une démarche similaire à celle que nous avions appliquée pour étudier la distribution des P450s dans le TA humain, et nous avons quantifié par RT-PCR l'expression de nombreux P450s et récepteurs nucléaires dans les foies des souris normales et recolonisées. Ce travail a fait l'objet d'une publication actuellement en cours de soumission.

Top-down metabonomic study of systemic modifications of the host metabolism during acquisition of the microbiome

Sandrine P Claus, Sandrine Ellero, Bernard Berger, Lutz Krause, Anne Bruttin, Alain Paris, Elizabeth Want, Olivier Cloarec, Selena Richards, Yulan Wang, Alastair Ross, Serge Rezzi, Isabelle de Wazier, Sunil Kochhar, Marc Dumas, Elaine Holmes, Jeremy K Nicholson

Abstract :

The gut microbiota enhance the host's metabolic capacity for processing nutrients and drugs and modulates the activities of multiple pathways in a variety of organ systems. We have probed the systemic metabolic adaptation and phenotypic changes for 20 days during gut microbiome acquisition following exposure of gnotobiotic mice (n=35) to general environmental microbial sources. We used high-resolution 1H NMR spectroscopy to analyze urine, plasma, liver, kidney and colon (5 time-points) and also characterized the activity and expression of hepatic cytochrome P450's (CYPs). Acquisition of the gut microbiome was associated with rapid increase in body weight (4 %) over the first 5 days of colonization with parallel changes in multiple pathways in all compartments analyzed. In particular, the colonization process stimulated glycogenesis in the liver prior to triggering increased in hepatic triglyceride synthesis. These changes were associated with modifications of hepatic Cyp8b1 expression and the subsequent alteration of bile acid metabolites, including taurocholate and tauromuricholate, and global hydrophobicity of the bile acid pool. Activity and expression of the drug metabolizing enzymes Cyp3a11 and Cyp2c29 were also significantly altered in germ-free animals. Finally, bidirectional correlation between the hepatic metabotype and microbiome composition revealed strong associations of the Coriobacteriaceae of the genus Eggerthella sp. with the hepatic triglyceride levels, energy metabolites and Cyp3a11 activity. These data demonstrate the importance of microbiome activity in systemic metabolic phenotype development and in hepatic P450 induction state indicating that microbiome modulation will be a useful tool in modulating drug metabolism in personalized healthcare.

Annexe 2 : Publication dans Drug Metabolism and Disposition

0090-9556/10/3804-679–686$20.00
DRUG METABOLISM AND DISPOSITION
DMD 38:679–686, 2010
Copyright © 2010 by The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics
Vol. 38, No. 4
29249/3567561
Printed in U.S.A.

Xenobiotic-Metabolizing Cytochromes P450 in Human White Adipose Tissue: Expression and Induction

Sandrine Ellero, Ghassan Chakhtoura, Corinne Barreau, Sophie Langouët, Chantal Benelli, Luc Penicaud, Philippe Beaune, and Isabelle de Waziers

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité Mixte de Recherche 775, and Université Paris Descartes, Interdisciplinary Institute of Life Sciences des Saints Pères, Paris, France (S.E., G.C., P.B., I.d.W.); AgroParisTech, Ecole Nationale du Génie Rural, des Eaux et des Forêts, Paris, France (S.E.); Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 5241, Université Paul Sabatier, Toulouse, France (C.Ba., L.P.); Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U620, Université de Rennes 1, Rennes, France (S.L.); and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité Mixte de Recherche 747, Université Paris Descartes, Paris, France (C.Be.)

Received June 30, 2009; accepted December 24, 2009

ABSTRACT:

Lipophilic pollutants can accumulate in human white adipose tissue (WAT), and the consequences of this accumulation are still poorly understood. Cytochromes P450 (P450s) have recently been found in rat WAT and shown to be inducible through mechanisms similar to those in the liver. The aim of our study was to describe the cytochrome P450 pattern and their induction mechanisms in human WAT. Explants of subcutaneous and visceral WAT and primary culture of subcutaneous adipocytes were used as WAT models, and liver biopsies and primary culture of hepatocytes were used as liver models to characterize P450 expression in both tissues. The WAT and liver models were then treated with typical P450 inducers (rifampicin, phenobarbital, and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin) and lipophilic pollutants (lindane, prochloraz, and chlorpyrifos), and the effects on P450 expression were studied. P450 expression was considerably lower in WAT than in the liver, except for CYP1B1 and CYP2U1, which were the most highly expressed adipose P450s in all individuals. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and prochloraz induced CYP1A1 and CYP1B1 expression in both tissues. The aryl hydrocarbon receptor was also present in WAT. In contrast, neither phenobarbital nor rifampicin treatment induced CYP2 or CYP3 mRNA in WAT, and constitutive androstane receptor and pregnane X receptor were almost undetectable. These results suggest that the mechanisms by which P450s of family 1 are regulated in the liver are also functional in human WAT, but those regulating CYP2 and CYP3 expression are not.

White adipose tissue (WAT) has a very important double physiological role: through its triacylglyceride storage capacity, it is the key organ for energy homeostasis, but it is also becoming increasingly apparent that WAT is a major endocrine organ (Ahima and Flier, 2000). The adipocyte secretes many hormones and proteins that have been implicated in metabolic, neuroendocrine, immune, and cardiovascular regulation. Because 70% of the mass of WAT is formed by lipids, this tissue represents a major reservoir for many different lipophilic contaminants.

Humans are indeed exposed to an increasing numbers of environmental xenobiotics. Some of these chemicals escape from the body metabolic system and tend to accumulate in WAT. Consequences of this accumulation are still poorly understood, but by modulating WAT metabolism and function, pollutants could affect the physiological role of WAT, leading, for instance, to the development of obesity-related disorders. The mechanisms through which chemicals can modulate the differentiation, metabolism, and secretory function of adipocytes are numerous (Müllerová and Kopecký, 2007). The link between exposure to endocrine disruptor xenobiotics and obesity has already been proposed (Elobeid and Allison, 2008) and some phthalates, which are highly prevalent lipophilic pollutants, have been shown to promote adipocyte differentiation, therefore supporting this hypothesis (Feige et al., 2007). Several epidemiological studies have also linked dioxin exposition to increased risk of diabetes or modified glucose metabolism (Uemura et al., 2008).

Cytochromes P450 (P450s) are a multigene family of constitutively expressed and inducible enzymes involved in the oxidative metabolic activation and detoxification of many endogenous and exogenous compounds (Nebert and Dalton, 2006). These enzymes are mainly expressed in the liver. However, several P450s contribute to drug metabolism in extrahepatic tissues, particularly in organs directly in contact with xenobiotics, such as the small intestine, the colon, the respiratory tract, or the skin (Park et al., 1995; Bièche et al., 2007). Up to now, three main P450 families (1, 2, and 3), numbering 23 isoforms, have been identified as being involved in xenobiotic metabo-

Article, publication date, and citation information can be found at http://dmd.aspetjournals.org.
doi:10.1124/dmd.109.029249.

ABBREVIATIONS: WAT, white adipose tissue; P450, cytochrome P450; PB, phenobarbital; RIF, rifampicin; TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin; CAR, constitutive androstane receptor; PXR, pregnane X receptor; AhR, aryl hydrocarbon receptor; LIND, lindane; PRO, prochloraz; CPY, chlorpyrifos; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; PCR, polymerase chain reaction; DMSO, dimethyl sulfoxide; RT, reverse transcription; TBP, TATA-binding protein; Ct, cycle threshold; SVF, stroma vascular fraction.

lism. The expression of these enzymes is known to be regulated by physiological, pathological, genetic, and environmental factors. Xenobiotics themselves play an important role as P450 inducers: enhancing P450 expression is indeed a common cellular mechanism leading to increased metabolism of xenobiotics. The mechanism of this P450 induction is mostly transcriptional, resulting in elevated mRNA levels (Dogra et al., 1998). Indeed, typical P450 inducers, phenobarbital (PB), rifampicin (RIF), and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) activate nuclear receptors, the constitutive androstane receptor (CAR), the pregnane X receptor (PXR), and the aryl hydrocarbon receptor (AhR), respectively, leading to binding of these receptors to specific responsive elements in the *CYP2B*, *CYP3A*, or *CYP1* gene sequences.

Many other environmental pollutants have been described as P450 inducers. Lindane (LIND), for example, an organochlorine insecticide and fumigant that is used in agriculture and in veterinary and human medicine, has been reported as a CYP2B1/2B2, CYP1A1/1A2, and CYP2E1 inducer in the rat brain and liver (Parmar et al., 2003). Prochloraz (PRO) is an imidazole derivative that is widely used as an antifungal agent in agriculture. It has been described as a mixed inducer of P450s in rat liver microsomes (Needham et al., 1992). Chlorpyrifos (CPY) is an organophosphorated pesticide that has been on the market since 1965 and that can bind to PXR and therefore induce CYP2B6 and CYP3A4 expression in human hepatocytes (Lemaire et al., 2004). Residues of all of those compounds have been found in human adipose tissue samples (Russo et al., 2002; Ibarluzea Jm et al., 2004).

Two recent studies conducted by Yoshinari et al. (2004, 2006) have shown that some drug-metabolizing P450 isoforms were present and functional in the rat adipose tissue and that typical P450 inducers enhanced the expression of these enzymes, probably through the same transcriptional mechanisms as in the liver. This observation has raised the possibility that lipophilic environmental contaminants accumulated in adipose tissue may dysregulate the gene expression profile of this tissue. Because interspecies differences regarding P450 expression and regulation are numerous, we aimed to describe the P450 gene expression pattern in human WAT. Moreover, we also investigated the effects of typical P450 inducers and of various lipophilic environmental pollutants on the expression of these adipose P450s, and we compared them with the P450 regulation mechanisms in human hepatocytes.

P450 expression in human WAT was found to be low, and CYP1B1 and CYP2U1 were the most highly expressed P450 isoforms. The AhR-CYP1 induction pathway was also functional in this tissue.

Materials and Methods

Materials. Unless otherwise stated, all chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Human Samples. *Human adipose tissue explants.* The study was performed according to the Declaration of Helsinki. All patients gave informed written consent.

Samples from human abdominal subcutaneous adipose tissue were obtained from women undergoing elective surgery. They were aged 45 ± 15 years and had a body mass index of 29.5 ± 4.5 kg/m^2. None of the subjects had known metabolic or malignant diseases nor were they taking medications known to alter WAT metabolism. Adipose tissue was cut into ±20-mg fragments in DMEM (GIBCO; Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) containing 12.5 mM glucose, 200 IU/ml penicillin, 50 mg/l streptomycin, 10% bovine serum albumin, fatty acid-free, and 1 μM dexamethasone. Explants were then either immediately frozen or preincubated for 1 h in a humidified 37°C incubator with 10% CO_2 before inducer treatment.

Samples from human visceral adipose tissue were obtained from women undergoing various forms of gastrointestinal surgery at Hôpital Européen Georges Pompidou (Paris, France). They were aged 60 ± 10 years and had a body mass index of 26.2 ± 4.5 kg/m^2. Visceral fat specimens were extracted from the greater omentum, and explants were prepared in the same conditions as subcutaneous adipose tissue explants.

Primary culture of adipocytes. Primary culture of preadipocytes and in vitro differentiation into adipocytes were performed at Unité Mixte de Recherche 5241 as described previously (Saillan-Barreau et al., 2008). In brief, stroma vascular fraction cells of the adipose tissue were isolated and seeded in plastic plates before being cultured in DMEM/F12 (1:1) supplemented with 5% newborn calf serum, 100 μg/ml pantothenic acid, 100 μM ascorbic acid, 16 μM biotin, 250 μg/ml amphotericin, 5 μg/ml streptomycin, and 5 U/ml penicillin. Preadipocytes were cultured in this medium until cells reached confluence (day 0). At day 0, adipose cell differentiation was induced using a differentiation medium (DMEM/F12, 5% newborn calf serum, 1 μM dexamethasone, and 60 μM indomethacin, supplemented with 450 μM 3-isobutyl-1 methylxanthine) for 3 days. Differentiated adipocytes were obtained 8 to 10 days after induction of differentiation and then were subjected to inducer treatment.

Human liver samples. cDNA from 12 human liver biopsies was a generous gift from Dr. I. Bièche (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité Mixte de Recherche 735, Saint-Cloud, France). The samples originated from four women and eight men. The origin and preparation of these samples was as described previously (Bièche et al., 2007). The 12 cDNA samples were pooled to perform the real-time PCR reactions. Microsomal fractions of pooled human liver were purchased from BD Gentest (Woburn, MA).

Culture of human hepatocytes. Culture and induction of human hepatocytes from three donors were performed by KaLy-Cell (Illkirch, France, http://www.kaly-cell.com). The other three primary cultures were performed at Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U620 as described previously (Langouët et al., 2002). The samples originated from five men and one woman.

Treatment of Cultures. Human WAT models and hepatocytes were incubated with inducers for 48 h. RIF, PB, TCDD, LIND, PRO, and CPY were dissolved in DMSO and added to the culture medium to give a final concentration of 50 μM, 1 mM, 10 nM, 50 μM, 25 μM, and 10 μM, respectively. Doses of inducers were not toxic for any cultured model. DMSO concentration in the culture medium was 0.1% (v/v). The medium was renewed every day with fresh inducers.

Real-Time RT-PCR. Total RNA was isolated using TriPure Isolation Reagent (Roche Applied Science, Meylan, France), submitted to DNase treatment using an RNeasy MinElute Cleanup kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France), and then reverse-transcribed using a High Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Villebon-sur-Yvette, France).

Analysis of the expression pattern of P450 mRNA isoforms in liver and WAT was performed using real-time RT-PCR as described previously (Girault et al., 2005). The TATA-binding protein (TBP), a component of the DNA-binding protein complex TFIID, was used as an endogenous control. The expression of TBP was very stable in all WAT models, and ΔCt of TBP between WAT and liver models did not exceed 2. Moreover, its expression was not modified by any inducer treatment.

Nucleotide primer pairs for the P450s of families 1 to 3 have previously been tested and validated (Girault et al., 2005) and are available from Biopredic International (Rennes, France, http://www.biopredic.com). Primers for nuclear receptors were designed and validated as performed previously for P450 primers. Sequences are as follows: AhR Up 5′ TAA CCC AGA CCA GAT TCC TCC AGA 3′ and Low 5′ CCC TTG GAA ATT CAT TGC CAG A 3′; CAR Up 5′ TGC CCG TCT TCC GTT CCC T 3′ and Low 5′ GTT TTG TGT TTG GAG ACA GAA AGT GGT 3′; and PXR Up 5′ CCC CAG CCT GCT CAT AGG TTC T 3′ and Low 5′ GCT GGG TGT GCT GAG CAT TGA T 3′.

Each sample was normalized on the basis of its TBP content as described previously (Bièche et al., 2007), using the $2^{\Delta Ct}$ method. With this method, the values displayed in the tables of this article do not provide absolute quantification of P450 mRNA, normalized to cell number or transcriptional activity of the tissue, but can be interpreted as relative one to each other. This means that, relying on our data, one can discuss the relative levels of a given P450 between models and also the relative levels of different P450 isoforms.

Western Blotting. Homogenized explants of WAT, sonicated cultured adipocytes, and hepatocytes were subjected to differential centrifugation to obtain microsomal fractions. To remove the lipid layer effectively the homogenates from WAT models were first centrifuged at 1000*g* at 4°C for 5 min, and the resulting pellets and fat cakes were discarded. The resultant middle layer and the hepatocyte homogenates were then centrifuged at 9000*g* at 4°C for 20 min, and the supernatant was centrifuged at 100,000 g at 4°C for 60 min to recover the microsomal pellet. The 100,000*g* pellet was resuspended in a buffer containing 100 mM NaH_2PO_4, 10 mM $MgCl_2$, and 20% glycerol, adjusted to pH 7.4. The protein concentration was determined with a BCA kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Proteins were boiled in Laemmli buffer, subjected to electrophoresis on 10% SDS-polyacrylamide gels, and blotted onto Hybond-C transfer membranes (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Anti-CYP2U1 rabbit antiserum and HEK293 cells transfected with the human pCMV4-CYP2U1 vector used as a positive control were a generous gift from Professor Magnus Ingelman-Sundberg (Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden) (Karlgren et al., 2004). Polyclonal rabbit anti-CYP1A1 antibody and recombinant yeast expressing human CYP1A1, used as a positive control, were produced in our laboratory (Belloc et al., 1996). Polyclonal rabbit anti-CYP1B1 was purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA); recombinant yeast expressing human CYP1B1 was produced in our laboratory, and extracts were used as a positive control. To ensure the quantity of loaded proteins, actin protein has been quantified. Images were then analyzed using ImageJ software (Abramoff et al., 2004).

Statistical Analysis. Data were analyzed for statistically significant differences between control and treated cultures using the Friedmann nonparametric test followed by Dunn's posttest, at the 5% level of significance.

Results

Quantification of P450 mRNAs in Human WAT and Liver. To examine whether P450s are expressed in human WAT, real-time RT-PCR was carried out on liver biopsies and on subcutaneous and visceral WAT. Relative mRNA levels of P450s of families 1 to 3 are shown in Table 1. Results discussed in this section concern uncultured models of liver and WAT, i.e., liver biopsies and WAT explants at $t = 0$.

The P450 expression pattern was highly similar in both visceral and subcutaneous WAT. As expected, P450 mRNA levels were much lower in WAT than in the liver, except for CYP1B1 and CYP2U1. CYP1B1 was significantly more expressed in visceral WAT than in subcutaneous WAT or in the liver. CYP1A1 mRNA levels showed very important interindividual variations in WAT, because only one individual of six had significant 1A1 expression in subcutaneous WAT (>2000 arbitrary units), whereas the others had almost undetectable CYP1A1 mRNA levels (<200 arbitrary units). Consistent with previous data (Hasler, 1999), CYP1A2 was detected only in the liver and the highest mRNA levels in the liver were those of CYP2E1, CYP3A4, and CYP2C9, thus validating our approach.

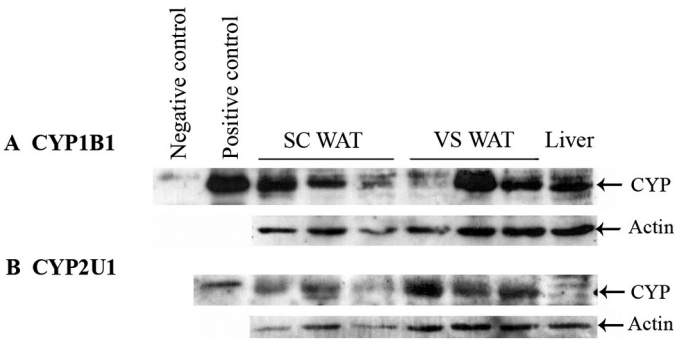


FIG. 1. P450 proteins in human liver and WAT. Microsomal proteins (30 μg/lane) from pooled human liver, subcutaneous WAT (SC WAT), and visceral WAT (VS WAT) were subjected to Western blotting with anti-CYP1B1 (A) and anti-CYP2U1 (B) antibodies. Actin was used as an internal standard.

Detection of P450 Proteins in Human WAT and Liver. To confirm the results obtained at the mRNA level, microsomal proteins of human liver and subcutaneous and visceral WAT were subjected to Western blotting (Fig. 1). Because all P450s, except for CYP1B1 and CYP2U1, were expressed at low levels in WAT compared with liver, protein expression was investigated only for those two isoforms.

Compared with liver microsomes, CYP1B1 was expressed 1.7 ± 1-fold in subcutaneous WAT and 1.8 ± 2.2-fold in visceral WAT, using actin as an internal standard ($n = 6$). As expected from the P450 mRNA pattern, CYP1B1 was expressed both in subcutaneous and visceral WAT (Fig. 1A) with important interindividual variations.

TABLE 1

Relative mRNA levels of P450s in human liver and WAT

Relative mRNA levels of P450 were measured using RT-PCR in uncultured (explants $t = 0$, $n = 6$) or cultured (explants $t = 48$ h, $n = 6$, and primary culture of adipocytes, $n = 6$) WAT and liver biopsies (pool, $n = 12$). Relative mRNA levels were calculated by dividing P450 levels by TBP levels and are means ± S.D. CYP2F1 and CYP2W1 mRNA were not detected and are therefore not shown in this table.

P450	Liver Biopsies	Subcutaneous WAT			Visceral WAT	
		Explants ($t = 0$)	Explants ($t = 48$ h)	Adipocytes	Explants ($t = 0$)	Explants ($t = 48$ h)
CYP1A1	24,432	571 ± 1080	8561 ± 6494	71 ± 59	222 ± 220	1839 ± 1258
CYP1A2	323,914	N.D.	N.D.	4 ± 2	N.D.	N.D.
CYP1B1	1884	1251 ± 564	8396 ± 3793	71,850 ± 14,605	9336 ± 2119	18,461 ± 5081
CYP2A6	144,272	N.D.	N.D.	N.D.	14 ± 19	N.D.
CYP2A7	28,956	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
CYP2B6	49,353	50 ± 54	192 ± 304	19 ± 8	76 ± 42	19 ± 8
CYP2C18	54,865	219 ± 121	N.D.	N.D.	104 ± 98	9 ± 3
CYP2C19	74,445	60 ± 50	N.D.	N.D.	48 ± 40	7 ± 3
CYP2C8	360,803	41 ± 31	116 ± 139	23 ± 13	246 ± 286	46 ± 20
CYP2C9	494,491	9 ± 18	N.D.	N.D.	40 ± 36	N.D.
CYP2D6	86,014	145 ± 22	139 ± 64	120 ± 49	337 ± 99	166 ± 46
CYP2E1	3,244,323	155 ± 40	98 ± 25	105 ± 52	268 ± 202	136 ± 24
CYP2J2	50,999	17 ± 24	7 ± 5	5 ± 1	349 ± 304	78 ± 77
CYP2R1	457	133 ± 90	510 ± 186	265 ± 71	239 ± 83	505 ± 161
CYP2S1	895	201 ± 153	97 ± 54	7 ± 4	247 ± 95	148 ± 78
CYP2U1	2610	2135 ± 803	1750 ± 846	3599 ± 345	3567 ± 1041	1890 ± 539
CYP3A4	50,5805	116 ± 83	6 ± 6	N.D.	30 ± 11	2 ± 1
CYP3A43	5094	18 ± 14	N.D.	4 ± 1	14 ± 81	12 ± 1
CYP3A5	75,422	426 ± 358	199 ± 77	6 ± 4	350 ± 45	89 ± 36
CYP3A7	16,355	N.D.	N.D.	N.D.	30 ± 18	3 ± 7

N.D., not detected (Ct >33).

CYP2U1 was hardly detected in the liver but was expressed in both visceral and subcutaneous WAT (Fig. 1B). Quantification between liver and WAT was not possible, given the very low level of CYP2U1 protein detected in human liver microsomes.

The presence of CYP2B6 and CYP3A5 proteins was also investigated in subcutaneous ($n = 1$) and visceral ($n = 3$) samples. Results were consistent with mRNA levels, because none of these proteins were detected in WAT (data not shown).

Detection of P450 mRNAs in Cultured Human WAT. Two ex vivo models are commonly used to study human WAT metabolism and/or gene regulation: explants of whole adipose tissue and primary culture of preadipocytes, which can be differentiated in vitro. We used both of these models to investigate whether they were appropriate to study a potential xenobiotic metabolism in human WAT and/or the consequences of the exposition of this tissue to xenobiotics. Using RT-PCR, we investigated whether the P450 mRNA expression pattern observed in uncultured WAT explants was stable in cultured explants of WAT and primary culture of adipocytes (Table 1).

In cultured explants as in culture of adipocytes, CYP1B1 and CYP2U1 were the most expressed P450 isoforms, consistent with the results of uncultured tissue. However, several differences were observed between cultured and uncultured models of WAT. CYP1B1 mRNA was greatly enhanced in adipocyte culture. CYP1A1 and CYP1B1 mRNA were increase in cultured explants, more in subcutaneous culture (by 15 and 6 times compared with uncultured explants, respectively) than in visceral explants (8- and 2-fold increase, respectively).

Induction of Hepatic P450 mRNA Levels by Typical P450 Inducers and Other Pollutants. As a positive control and to allow direct comparison between P450 regulation in the liver and WAT, human hepatocytes were treated with the same compounds as human WAT models. Typical P450 inducers, RIF, PB, and TCDD, which mainly induce CYP3A4, CYP2B6, and CYP1A1, respectively, were used. We also investigated the effects of environmental pollutants possibly found in human WAT (LIND, PRO, and CPY) on P450 expression. Induction of P450 mRNA was investigated for the 23 isoforms of families 1, 2, and 3 using RT-PCR. Results are presented in Table 2.

As expected, RIF treatment increased CYP2B6 and CYP3A4 mRNAs, as did PB treatment, which also induced CYP2A6 and CYP3A7 mRNA. CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 mRNAs were induced by TCDD treatment. Lindane induced CYP2B6 mRNA significantly and CYP3A4 and CYP3A7 to a lesser extent. Prochloraz was a significant CYP1 inducer and induced CYP1A1 and CYP1A2, but induction factors were lower than with the TCDD treatment. PRO was also a strong repressor of a few P450 isoforms, such as CYP2D6, CYP2E1, CYP2J2, and CYP2U1. CPY treatment increased CYP1A1 and CYP1A2 mRNA levels. These findings confirm that the inducer doses and the experimental procedures used in this study were suitable for the observation of the P450 induction mechanisms.

Induction of Adipose P450 mRNA by Typical P450 Inducers and Other Pollutants. To investigate whether P450 induction is also possible in human WAT, we treated our human WAT models with P450 inducers as described in the previous section.

For P450s of families 2 and 3, mRNA levels were not modified by chemical treatments in WAT models. Only the TCDD and PRO treatments had effects on CYP1 family mRNA and, therefore, only results of CYP1A1 and CYP1B1 are presented in Fig. 2.

TCDD was a significant CYP1A1 and CYP1B1 inducer in visceral WAT and subcutaneous adipocytes, although induction factors were significantly lower than in hepatocytes. In cultured adipocytes, the basal level of CYP1A1 mRNA was very low and induction with TCDD was therefore important. We were surprised to find that subcutaneous explants barely responded to TCDD treatment. PRO was a weaker CYP1A1 inducer in visceral WAT. In subcutaneous explants, it was also a significant CYP1A1 and CYP1B1 inducer, and it even displayed a stronger effect than TCDD.

Induction of Adipose and Hepatic P450 Proteins. Only treatments by TCDD and PRO induced changes in CYP1 mRNA levels in WAT. To examine whether these changes have consequences at the protein level, microsomal fractions were prepared from WAT models

TABLE 2

Induction of P450s of families 1 to 3 in human hepatocytes

Human hepatocytes ($n = 6$) were treated with (50 μM), PB (1 mM), TCDD (10 nM), LIND (50 μM), PRO (25 μM), or CPY (10 μM) for 48 h. Levels of P450 mRNA were investigated by RT-PCR. Results indicate mRNA -fold induction compared with that for vehicle-treated cells (0.1% DMSO) and are means ± S.D. CYP2F1 and CYP2W1 mRNA were not detected even after inducer treatments and are therefore not shown.

P450	RIF	PB	TCDD	LIND	PRO	CPY
CYP1A1	3.9 ± 2	2 ± 0.7	1135 ± 748***	1.9 ± 0.9	84 ± 68**	27 ± 44*
CYP1A2	1.1 ± 0.5	0.8 ± 0.5	341 ± 306**	0.6 ± 0.4	13 ± 16	12 ± 8
CYP1B1	1.1 ± 0.3	0.9 ± 0.2	345 ± 103*	1.8 ± 1.1	1.7 ± 0.8	1.2 ± 0.5
CYP2A6	1.7 ± 0.3	3 ± 1.8*	1.1 ± 0.7	1.8 ± 1.5	0.9 ± 0.7	1.9 ± 1.1
CYP2A7	1.5 ± 0.3	2.1 ± 0.9	0.9 ± 0.5	1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	1.5 ± 0.4
CYP2B6	4.9 ± 1.3*	7.5 ± 4.9**	3.5 ± 1.9	7 ± 5.4**	2.9 ± 3	2.7 ± 0.9
CYP2C18	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.1*	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.2	0.9 ± 0.2
CYP2C19	1.4 ± 0.5	1.2 ± 0.5	1 ± 0.3	0.9 ± 0.2	0.6 ± 0.3	0.9 ± 0.2
CYP2C8	2.4 ± 0.9	2.3 ± 1.2	0.8 ± 0.3	1.1 ± 0.8	0.3 ± 0.2	1.3 ± 0.3
CYP2C9	1.8 ± 0.3	1.7 ± 0.2	0.8 ± 0.2	1.1 ± 0.6	0.7 ± 0.3	1.3 ± 0.4
CYP2D6	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.2	0.9 ± 0.4	0.5 ± 0.2**	0.4 ± 0.2***	0.7 ± 0.2
CYP2E1	0.4 ± 0.2*	0.3 ± 0.2*	0.4 ± 0.2	0.2 ± 0.2***	0.3 ± 0.2***	0.5 ± 0.1
CYP2J2	0.7 ± 0.1*	0.7 ± 0.1*	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.2**	0.8 ± 0.1
CYP2R1	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.2	1.4 ± 0.5	1 ± 0.1
CYP2S1	1 ± 0.9	0.7 ± 0.4b	0.9 ± 0.7	1.2 ± 0.9	1.2 ± 1	0.8 ± 0.4
CYP2U1	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.1*	0.8 ± 0.1	0.6 ± 0.1*	0.9 ± 0.1
CYP3A4	6.9 ± 4.9**	5.7 ± 3.4*	0.7 ± 0.5	3 ± 1.5	0.7 ± 0.5	2.6 ± 1.5
CYP3A43	1.4 ± 0.4	1.4 ± 0.5	0.6 ± 0.4	1 ± 0.4	0.4 ± 0.2	1 ± 0.2
CYP3A5	1.3 ± 0.2	1.3 ± 0.1	0.8 ± 0.2	1.4 ± 0.2	0.9 ± 0.3	1.1 ± 0.2
CYP3A7	3.1 ± 4.6	4.3 ± 6.7*	1 ± 0.5	2.9 ± 5.3	0.9 ± 1.2	2.5 ± 3.2

* $p < 0.05$, using the Friedman nonparametric test followed by Dunn's posttest.
** $p < 0.01$.
*** $p < 0.001$.

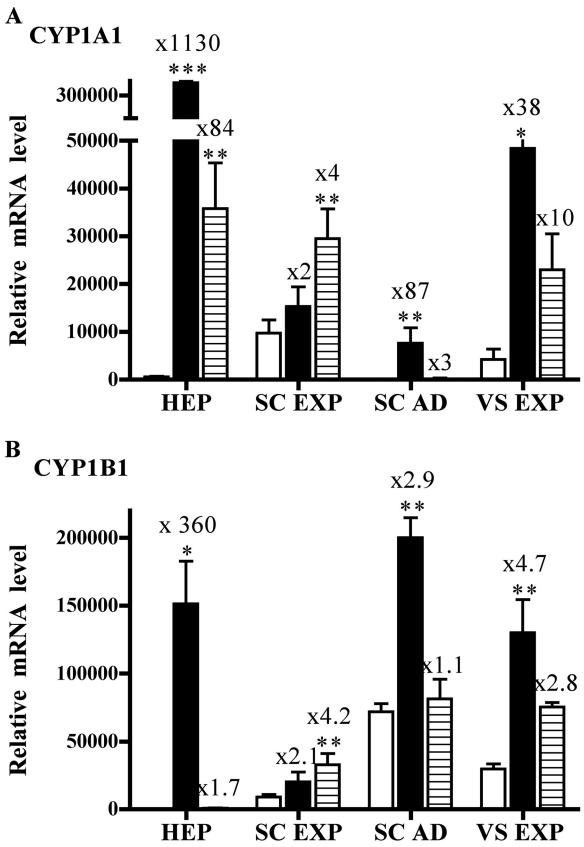


FIG. 2. Induction of CYP1A1 and CYP1B1 mRNA in human hepatocytes and WAT models. Explants of various adipose tissues [subcutaneous (SC EXP) or visceral (VS EXP)] or primary cells from human liver [hepatocytes (HEP)] or from human subcutaneous WAT [subcutaneous adipocytes (SC AD)] were treated with TCDD (10 nM) or PRO (25 μM) for 48 h. Levels of CYP1A1 (A) and CYP1B1 (B) mRNA were investigated by RT-PCR. Numbers above bars indicate -fold induction compared with DMSO-treated models. Results are presented as mRNA arbitrary units (mean ± S.D. for $n = 6$). □, DMSO; ■, TCDD; ▤, PRO. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$, using the Friedman nonparametric test followed by Dunn's posttest.

and from primary culture of hepatocytes treated with TCDD or PRO. Western Blotting was then performed (Fig. 3).

CYP1A1 protein was significantly increased by TCDD treatment in hepatocytes (Fig. 3A). In cultured subcutaneous adipocytes, the CYP1A1 protein level was below the limit of Western blotting detection, even after TCDD or PRO treatment. In subcutaneous and visceral explants of WAT, the CYP1A1 protein was detected at very low levels. Quantification was difficult, and no induction was found to be significant, even after TCDD or PRO treatment.

TCDD treatment enhanced the amount of CYP1B1 protein in all WAT models (Fig. 3B). In subcutaneous explants, consistent with mRNA results, CYP1B1 protein levels were lower and quantification of the induction was then more difficult. TCDD enhanced CYP1B1 protein in this model, but this induction was not statistically significant. PRO treatment also enhanced CYP1B1 protein in all WAT models, but to a lesser extent.

Detection of Adipose Transcription Factors Involved in P450 Induction. In human WAT, none of the P450s of families 2 or 3 were induced by typical inducer treatment, namely RIF and PB. To explain these results, we looked for transcription factors usually involved in the induction of these P450s, mainly AhR for CYP1 and CAR and PXR for CYP2 and CYP3 (Table 3).

We found that AhR was present both in subcutaneous and visceral WAT. The AhR mRNA level was significantly higher in visceral WAT than in subcutaneous WAT or in the liver. On the contrary, CAR and PXR were undetected or expressed at very low levels in WAT models. This result was not due to an expression decrease during the culturing process of WAT models, because neither CAR nor PXR was detected in uncultured WAT explants.

Discussion

Human WAT represents a reservoir of lipophilic environmental pollutants. Chemicals such as dioxins, furans, polychlorinated biphenyls, organochlorine, organophosphorus pesticides, or brominated diphenyl esters have been found in WAT samples in numerous populations (Pauwels et al., 2000; Petreas et al., 2004; Jimenez Torres et al., 2006). In rat, previous studies (Yoshinari et al., 2004) have shown that some xenobiotic-metabolizing forms of P450 were expressed in

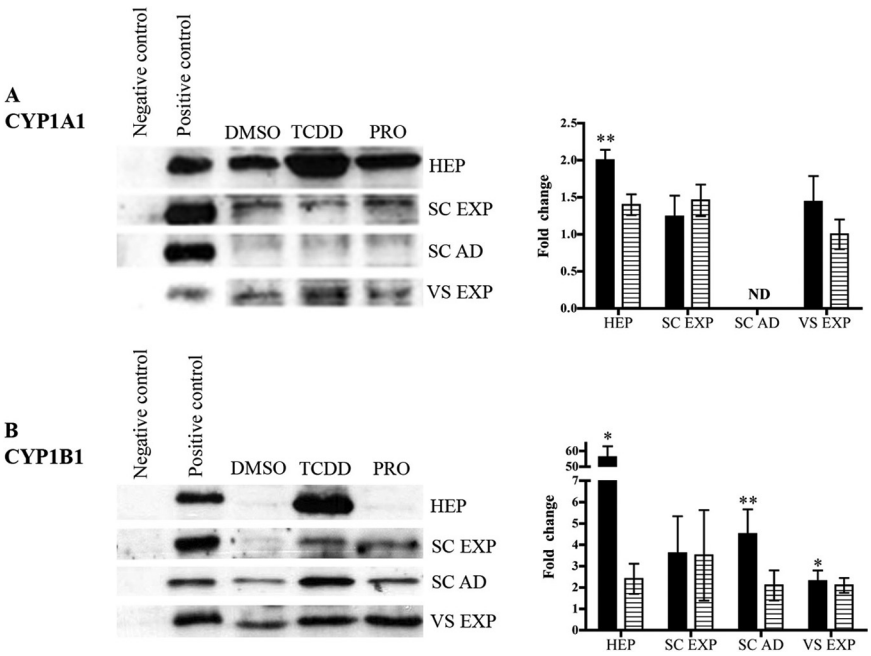


FIG. 3. Induction of P450 proteins in human hepatocytes and WAT models. Explants (SC EXP) and primary culture of adipocytes of subcutaneous WAT (SC AD), explants of visceral WAT (VS EXP), and primary culture of hepatocytes (HEP) were prepared as described earlier and treated with TCDD and PRO as described in the legend to Fig. 2. Microsomal proteins (30 μg) were then submitted to Western blotting with anti-CYP1A1 (A) and anti-CYP1B1 (B) antibodies. -Fold changes in protein levels were quantified using actin as an internal standard, and results are presented as -fold change compared with DMSO-treated models (mean ± S.D. for $n = 3$). ■, TCDD; ▤, PRO. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$, using the Friedman nonparametric test followed by Dunn's posttest. ND, not determined.

TABLE 3

Relative mRNA levels of transcription factors involved in P450 induction in human liver and WAT

Relative mRNA levels of P450 were measured using RT-PCR as described in the legend to Table 1. Relative mRNA levels were calculated by dividing receptors levels by TBP levels and are means ± S.D.

Gene	Liver Biopsy	Hepatocytes	Subcutaneous WAT			Visceral WAT	
			Explants (t = 0)	Explants (t = 48 h)	Adipocytes	Explants (t = 0)	Explants (t = 48 h)
AhR	8871	6431 ± 1342	3960 ± 1264	1940 ± 105	1522 ± 361	17,881 ± 6790	8744 ± 3328
CAR	18,618	5390 ± 1743	N.D.	8 ± 8	N.D.	N.D.	N.D.
PXR	13,612	13,153 ± 2570	N.D.	N.D.	2 ± 1	5 ± 5	7 ± 4

N.D., not detected (Ct >33).

WAT and that their expression was increased by typical P450 inducers. These results demonstrated the presence of active P450s as well as the functionality of the induction pathways of P450s in this tissue.

However, little is known about human WAT. In this study, we demonstrated that a few P450 isoforms were expressed in human WAT, mainly CYP1B1 and CYP2U1. CYP2U1 was identified and characterized by Chuang et al. (2004). It was specifically detected in both the human brain and thymus and shown to metabolize long-chain fatty acids. It has been postulated that CYP2U1 plays an important role in fatty acid signaling processes in both the cerebellum and thymus, and our results suggest that this role could also be important in human WAT. CYP1B1 is expressed in many extrahepatic organs and is involved in the metabolism of 17β-estradiol and testosterone (Spink et al., 1994). These results have led to speculation about its possible physiological function: the metabolism of steroid hormones. In mouse preadipocyte cell lines, CYP1B1 expression has been shown to rise during adipogenesis (Alexander et al., 1997), suggesting that CYP1B1 may generate or remove physiological substrates that regulate this process. CYP1B1 has also been shown to be inducible by AhR ligands and is involved in activation of many human promutagens and procarcinogens (Shimada et al., 1996), and it is therefore believed to be an extrahepatic route of xenobiotic metabolism. We also detected CYP1A1, another AhR-inducible P450 isoform, but interindividual variations in its expression were significant. Some individuals indeed had high CYP1A1 mRNA levels, whereas in others CYP1A1 mRNA was undetectable.

Moreover, we have found significant differences in adipose P450 expression after culturing processes. In in vitro differentiated adipocytes, CYP1B1 expression was highly enriched compared with that in all other WAT models. This discrepancy could be explained by the fact that WAT explants contain not only mature adipocytes but also other cells constituting the stroma vascular fraction (SVF) of WAT. However, most of the cells in WAT explants are mature adipocytes, and some complementary experiments, in which CYP1B1 expression was compared between isolated adipocytes and SVF cells from the same individual, have shown that differences in P450 expression between adipocytes and SVF cells are not sufficient to account for this enrichment in CYP1B1 (data not shown). More probably, its expression was induced by the adipogenic hormonal mixture used to stimulated adipocyte differentiation, as described in C3H10T1/2 cells, in which this mechanism was independent of the AhR (Cho et al., 2005). Here, culture of WAT explants also led to CYP1A1 and CYP1B1 induction. WAT explant culture has already been shown to drastically change adipocyte gene expression (Gesta et al., 2003), and CYP1A1 expression has been shown to be greatly enhanced during several culturing processes, through mechanisms that were independent of the AhR. For example, in Caco-2 cells, physiological compounds contained in serum induced CYP1A1 gene expression by transcriptional activation independent of the AhR pathway (Guigal et al., 2000). In our study, we cannot conclude whether the CYP1 induction that we observed in our cultured WAT models is dependent on the AhR. It is thus very important that the P450 expression pattern described here for the first time was in uncultured human WAT samples, showing actual constitutive expression of CYP1B1 and CYP2U1. Whether their physiological role in this tissue concerns adipogenesis regulation, fatty acid, steroid, or xenobiotic metabolism still needs to be elucidated.

In vivo rat studies have shown that P450s are regulated in WAT in the same way that they are in the liver: CYP1A1, CYP2B, and CYP3A mRNA and protein inductions were indeed observed after β-naphthoflavone, PB, and dexamethasone treatment, respectively, both in rat epididymal WAT and liver. Nuclear receptors CAR and PXR, as well as AhR mRNA, have also been detected in rat epididymal WAT. We thus treated human WAT models with three typical P450 inducers that use the same receptor systems in both species: PB for CAR, RIF for PXR, and TCDD for AhR. In our human WAT models, neither PB nor RIF induced CYP2B of CYP3A mRNA, whereas human hepatocytes treated with the same doses and preparations of inducers showed clear and statistically significant inductions of CYP2B6 and CYP3A4. Taken together with the fact that CAR and PXR mRNA were almost undetectable in our WAT samples, our results show that CYP2 and CYP3 are not regulated in human WAT in the same way that they are in the human liver or in the rat WAT. Numerous interspecies expression differences in nuclear receptor distribution have already been reported (Timsit and Negishi, 2007). Thus, it seems very likely that differences between rat and human concerning CYP2 and CYP3 regulation in WAT are due to interspecies differences in nuclear receptor expression.

TCDD is well known to accumulate in WAT, its half-life being estimated between 5.8 and 9.6 years in humans (Michalek et al., 1992). In in vivo animal studies in WAT, the inhibition of glucose transport (Enan et al., 1992), lipoprotein lipase activity (Brewster and Matsumura, 1988), and fatty acid synthesis (Lakshman et al., 1989) have been reported as consequences of the presence of TCDD. The effects of TCDD are mediated through AhR, for which depletion occurs during adipose differentiation in 3T3-L1 cells (Shimba et al., 1998), raising the hypothesis that mature adipocytes could lose their functional response to TCDD. In this work, we detected AhR mRNA in all models of subcutaneous and visceral WAT, at levels that are comparable with and sometimes even higher than those that we found in hepatocytes. Moreover, TCDD treatment significantly increased CYP1A1 and CYP1B1 mRNA and proteins in most WAT models. Only subcutaneous explants barely responded to TCDD at the mRNA level, whereas cultured subcutaneous adipocytes did. AhR expression was comparable in both models and can therefore not account for this large difference. One possible explanation is that stromal vascular adipose cells do not respond to TCDD, as shown in rat epididymal WAT (Yoshinari et al., 2006). As discussed previously, important CYP1 inductions occurred during the culturing processes of WAT explants and, more importantly, in subcutaneous rather than in vis-

ceral WAT. Whether these inductions depend on the AhR is not clear. However, it is possible that such inductions nearly saturated the AhR pathway in this model, lowering the sensitivity to AhR inducers. But even though we were not in optimal conditions, CYP1 inductions were still observable in most WAT models after TCDD treatment, and it has previously been demonstrated that AhR mediated the CYP1A1 induction by β-naphthoflavone in rat WAT (Yoshinari et al., 2006). Our results thus suggest the existence of a constitutive functional AhR-CYP1 induction pathway in human WAT and in human adipocytes.

AhR mRNA levels, as well as CYP1A1 and CYP1B1 induction, were significantly higher in visceral than in subcutaneous adipose tissue. Other differences were observed between subcutaneous and visceral WAT, such as greater CYP1B1 and CYP2U1 expression in visceral samples. Differences in endocrine and biochemical characteristics have already been reported between subcutaneous and visceral fat (Lafontan and Berlan, 2003). Because of their different anatomic location and subsequent different vascularization, one can assume that xenobiotic distribution would vary according to the fat deposit localization. Our results suggest that subcutaneous and visceral adipose tissues may react differently after xenobiotic exposition.

Human WAT models were also treated with the pesticides lindane, prochloraz, and chlorpyrifos, which have all been found in human WAT and which have been reported to be potent P450 inducers. Lindane has been described as a CYP1A1, CYP2B1/2, and CYP2E1 inducer in rat liver microsomes (Parmar et al., 2003) and a PXR ligand inducing CYP2B6 and CYP3A4 expression in human hepatocytes (Lemaire et al., 2004). Our findings in human hepatocytes confirm these results, but no significant changes in adipose P450s were observed. On the other hand, prochloraz showed some significant effects on adipose P450s. Prochloraz has been shown to cause CYP1A induction in a rainbow trout cell line (Babín et al., 2005) and to have a mixed induction profile close to that of phenobarbital in rat liver enzymes (Needham et al., 1992). In human hepatocytes, we found that PRO is indeed a CYP2B6 inducer, but mostly a significant CYP1A1/2 inducer. These results suggest that PRO could be a ligand for the AhR. However, the fact that subcutaneous explants of WAT do respond to PRO and not to TCDD and that PRO does not induce CYP1B1 mRNA in hepatocytes also suggest that other mechanisms could be involved in the PRO induction pathway. Nevertheless, these results highlight the fact that not only the very potent AhR ligand TCDD but also some less documented environmental pollutants could modify the CYP1 expression pattern in human WAT.

In conclusion, we have identified the expression of xenobiotic-metabolizing P450s in human WAT. We have also demonstrated that some, but not all, of the P450 hepatic regulation mechanisms are functional in this tissue. This point raises the possibility that such P450s could play a role in in situ xenobiotic elimination and in the half-life time of lipophilic pollutants in the human body. By activating the functional receptors of WAT, some pollutants can indeed modify the expression pattern of xenobiotic-metabolizing enzymes in this physiologically important tissue.

Acknowledgments. We thank Professor Magnus Ingelman-Sundberg (Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden) for donating the anti-CYP2U1 antibody and Dr. Ivan Bièche (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité Mixte de Recherche 735, Saint-Cloud, France) for donating the nuclear receptor RT-PCR primers and the human liver cDNA solutions. We also thank Dr. Chevalier, Professor Berger (Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France), and Professor Penna (Hôpital Ambroise Paré, Boulogne-Billancourt, France) for providing us with the human adipose tissue samples.

References

Abramoff MD, Magelhaes PJ, and Ram SJ (2004) Image Processing with ImageJ. *Biophotonics Int* **11:**36–42.

Ahima RS and Flier JS (2000) Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* **11:**327–332.

Alexander DL, Eltom SE, and Jefcoate CR (1997) Ah receptor regulation of CYP1B1 expression in primary mouse embryo-derived cells. *Cancer Res* **57:**4498–4506.

Babín M, Casado S, Chana A, Herradón B, Segner H, Tarazona JV, and Navas JM (2005) Cytochrome P4501A induction caused by the imidazole derivative Prochloraz in a rainbow trout cell line. *Toxicol In Vitro* **19:**899–902.

Belloc C, Baird S, Cosme J, Lecoeur S, Gautier JC, Challine D, de Waziers I, Flinois JP, and Beaune PH (1996) Human cytochromes P450 expressed in Escherichia coli: production of specific antibodies. *Toxicology* **106:**207–219.

Bièche I, Narjoz C, Asselah T, Vacher S, Marcellin P, Lidereau R, Beaune P, and de Waziers I (2007) Reverse transcriptase-PCR quantification of mRNA levels from cytochrome (CYP)1, CYP2 and CYP3 families in 22 different human tissues. *Pharmacogenet Genomics* **17:**731–742.

Brewster DW and Matsumura F (1988) Reduction of adipose tissue lipoprotein lipase activity as a result of in vivo administration of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin to the guinea pig. *Biochem Pharmacol* **37:**2247–2253.

Cho YC, Zheng W, Yamamoto M, Liu X, Hanlon PR, and Jefcoate CR (2005) Differentiation of pluripotent C3H10T1/2 cells rapidly elevates CYP1B1 through a novel process that overcomes a loss of Ah receptor. *Arch Biochem Biophys* **439:**139–153.

Chuang SS, Helvig C, Taimi M, Ramshaw HA, Collop AH, Amad M, White JA, Petkovich M, Jones G, and Korczak B (2004) CYP2U1, a novel human thymus- and brain-specific cytochrome P450, catalyzes ω- and (ω-1)-hydroxylation of fatty acids. *J Biol Chem* **279:**6305–6314.

Dogra SC, Whitelaw ML, and May BK (1998) Transcriptional activation of cytochrome P450 genes by different classes of chemical inducers. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **25:**1–9.

Elobeid MA and Allison DB (2008) Putative environmental-endocrine disruptors and obesity: a review. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* **15:**403–408.

Enan E, Liu PC, and Matsumura F (1992) TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-P-dioxin) causes reduction in glucose uptake through glucose transporters on the plasma membrane of the guinea pig adipocyte. *J Environ Sci Health B* **27:**495–510.

Feige JN, Gelman L, Rossi D, Zoete V, Métivier R, Tudor C, Anghel SI, Grosdidier A, Lathion C, Engelborghs Y, et al. (2007) The endocrine disruptor monoethyl-hexyl-phthalate is a selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulator that promotes adipogenesis. *J Biol Chem* **282:**19152–19166.

Gesta S, Lolmède K, Daviaud D, Berlan M, Bouloumié A, Lafontan M, Valet P, and Saulnier-Blache JS (2003) Culture of human adipose tissue explants leads to profound alteration of adipocyte gene expression. *Horm Metab Res* **35:**158–163.

Girault I, Rougier N, Chesné C, Lidereau R, Beaune P, Bieche I, and de Waziers I (2005) Simultaneous measurement of 23 isoforms from the human cytochrome P450 families 1 to 3 by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Drug Metab Dispos* **33:**1803–1810.

Guigal N, Seree E, Bourgarel-Rey V, and Barra Y (2000) Induction of CYP1A1 by serum independent of AhR pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **267:**572–576.

Hasler JA (1999) Pharmacogenetics of cytochromes P450. *Mol Aspects Med* **20:**12–24, 25–137.

Ibarluzea Jm J, Fernández MF, Santa-Marina L, Olea-Serrano MF, Rivas AM, Aurrekoetxea JJ, Expósito J, Lorenzo M, Torné P, Villalobos M, et al. (2004) Breast cancer risk and the combined effect of environmental estrogens. *Cancer Causes Control* **15:**591–600.

Jimenez Torres M, Campoy Folgoso C, Cañabate Reche F, Rivas Velasco A, Cerrillo Garcia I, Mariscal Arcas M, and Olea-Serrano F (2006) Organochlorine pesticides in serum and adipose tissue of pregnant women in Southern Spain giving birth by cesarean section. *Sci Total Environ* **372:**32–38.

Karlgren M, Backlund M, Johansson I, Oscarson M, and Ingelman-Sundberg M (2004) Characterization and tissue distribution of a novel human cytochrome P450-CYP2U1. *Biochem Biophys Res Commun* **315:**679–685.

Lafontan M and Berlan M (2003) Do regional differences in adipocyte biology provide new pathophysiological insights? *Trends Pharmacol Sci* **24:**276–283.

Lakshman MR, Chirtel SJ, Chambers LL, and Coutlakis PJ (1989) Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on lipid synthesis and lipogenic enzymes in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* **248:**62–66.

Langouët S, Paehler A, Welti DH, Kerriguy N, Guillouzo A, and Turesky RJ (2002) Differential metabolism of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine in rat and human hepatocytes. *Carcinogenesis* **23:**115–122.

Lemaire G, de Sousa G, and Rahmani R (2004) A PXR reporter gene assay in a stable cell culture system: CYP3A4 and CYP2B6 induction by pesticides. *Biochem Pharmacol* **68:**2347–2358.

Michalek JE, Tripathi RC, Caudill SP, and Pirkle JL (1992) Investigation of TCDD half-life heterogeneity in veterans of Operation Ranch Hand. *J Toxicol Environ Health* **35:**29–38.

Müllerová D and Kopecký J (2007) White adipose tissue: storage and effector site for environmental pollutants. *Physiol Res* **56:**375–381.

Nebert DW and Dalton TP (2006) The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* **6:**947–960.

Needham D, Creedy CL, and Dawson JR (1992) The profile of rat liver enzyme induction produced by prochloraz and its major metabolites. *Xenobiotica* **22:**283–291.

Park BK, Pirmohamed M, and Kitteringham NR (1995) The role of cytochrome P450 enzymes in hepatic and extrahepatic human drug toxicity. *Pharmacol Ther* **68:**385–424.

Parmar D, Yadav S, Dayal M, Johri A, Dhawan A, and Seth PK (2003) Effect of lindane on hepatic and brain cytochrome P450s and influence of P450 modulation in lindane induced neurotoxicity. *Food Chem Toxicol* **41:**1077–1087.

Pauwels A, Covaci A, Weyler J, Delbeke L, Dhont M, De Sutter P, D'Hooghe T, and Schepens PJ (2000) Comparison of persistent organic pollutant residues in serum and adipose tissue in a female population in Belgium, 1996–1998. *Arch Environ Contam Toxicol* **39:**265–270.

Petreas M, Smith D, Hurley S, Jeffrey SS, Gilliss D, and Reynolds P (2004) Distribution of persistent, lipid-soluble chemicals in breast and abdominal adipose tissues: lessons learned from a breast cancer study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **13:**416–424.

Russo MV, Campanella L, and Avino P (2002) Determination of organophosphorus pesticide

residues in human tissues by capillary gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometry analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **780:**431–441.

Saillan-Barreau C, Tabbakh O, Chavoin JP, Casteilla L, and Pénicaud L (2008) Drug-specific effect of nelfinavir and stavudine on primary culture of human preadipocytes. *J Acquir Immune Defic Syndr* **48:**20–25.

Shimada T, Hayes CL, Yamazaki H, Amin S, Hecht SS, Guengerich FP, and Sutter TR (1996) Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer Res* **56:**2979–2984.

Shimba S, Todoroki K, Aoyagi T, and Tezuka M (1998) Depletion of arylhydrocarbon receptor during adipose differentiation in 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **249:**131–137.

Spink DC, Hayes CL, Young NR, Christou M, Sutter TR, Jefcoate CR, and Gierthy JF (1994) The effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on estrogen metabolism in MCF-7 breast cancer cells: evidence for induction of a novel 17 β-estradiol 4-hydroxylase. *J Steroid Biochem Mol Biol* **51:**251–258.

Timsit YE and Negishi M (2007) CAR and PXR: the xenobiotic-sensing receptors. *Steroids* **72:**231–246.

Uemura H, Arisawa K, Hiyoshi M, Satoh H, Sumiyoshi Y, Morinaga K, Kodama K, Suzuki T, Nagai M, and Suzuki T (2008) Associations of environmental exposure to dioxins with prevalent diabetes among general inhabitants in Japan. *Environ Res* **108:**63–68.

Yoshinari K, Okino N, Sato T, Sugatani J, and Miwa M (2006) Induction of detoxifying enzymes in rodent white adipose tissue by aryl hydrocarbon receptor agonists and antioxidants. *Drug Metab Dispos* **34:**1081–1089.

Yoshinari K, Sato T, Okino N, Sugatani J, and Miwa M (2004) Expression and induction of cytochromes P450 in rat white adipose tissue. *J Pharmacol Exp Ther* **311:**147–154.

Address correspondence to: Dr. Isabelle de Waziers, INSERM U775, Centre Universitaire des Saints Pères, 45 rue des Saints Pères, 75732 Paris Cedex 06, France. E-mail: isabelle.waziers@parisdescartes.fr