



**HAL**  
open science

# Impacts métaboliques d'un mélange faiblement dosé de polluants alimentaires dans un modèle murin : effets dépendants de l'âge, du sexe et du contexte nutritionnel

Emmanuel Labaronne

## ► To cite this version:

Emmanuel Labaronne. Impacts métaboliques d'un mélange faiblement dosé de polluants alimentaires dans un modèle murin : effets dépendants de l'âge, du sexe et du contexte nutritionnel. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Lyon, 2016. Français. NNT : 2016LYSE1204 . tel-01583883

**HAL Id: tel-01583883**

**<https://theses.hal.science/tel-01583883>**

Submitted on 8 Sep 2017

**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.



N°d'ordre NNT : 2016LYSE1204

**THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**

opérée au sein de  
**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale ED 205**  
**Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences Santé**

**Spécialité de doctorat : Biologie**

Soutenue publiquement le 03 Novembre 2016, par :  
**Emmanuel Labaronne**

---

**Impacts métaboliques d'un mélange  
faiblement dosé de polluants  
alimentaires dans un modèle murin.  
Effets dépendants de l'âge, du sexe et  
du contexte nutritionnel**

---

Devant le jury composé de :

Dr Vidal, Hubert

Président

Dr Demeilliers, Christine

Rapporteur

Dr Balaguer, Patrick

Rapporteur

Pr Laville, Martine

Examinatrice

Dr Ruzzin, Jérôme

Examineur

Dr Le Magueresse-Battistoni Brigitte

Directrice de thèse

# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## **Président de l'Université**

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directeur Général des Services

**M. le Professeur Frédéric FLEURY**

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

M. Alain HELLEU

## ***COMPOSANTES SANTE***

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

## ***COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE***

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E. PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

# Remerciements

Et voilà la partie sans doute la plus lue dans une thèse. Celle qu'on veut écrire à la fin, parce qu'on se dit que c'est la partie la plus facile, mais qui se révèle aussi difficile à écrire que tout le reste...

En premier lieu, j'aimerais remercier Hubert Vidal pour m'avoir permis de préparer ma thèse dans son laboratoire de recherche.

Je tiens à remercier les membres de mon jury. Un grand merci au Docteur Christine Demeilliers et au Docteur Patrick Balaguer pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail.

Je remercie également sincèrement ma directrice de thèse Brigitte Le Magueresse-Battistoni pour m'avoir soutenu et encouragé à réaliser ce travail. Pendant ces trois années, et même quatre en comptant le master, j'y ai découvert la recherche en laboratoire et particulièrement le travail sur souris. Tu as eu la patience de m'apprendre à mener une recherche à partir d'un modèle animal à moi, biochimiste dans l'âme. Mais je pense avoir réussi à m'adapter et à trouver l'utilité de tous ces sacrifices. Merci pour tous tes précieux conseils et de m'avoir poussé à toujours aller plus loin.

Je remercie Danielle, Claudie et Natalie, sans qui cet énorme travail n'aurait pu être fait ! Une équipe de choc, dont aucune n'a jamais rechigné pour donner un coup de main. Merci aussi pour toutes les discussions (scientifiques ou non, et elles sont nombreuses !), pour toutes les techniques et manipulations que vous m'avez apprises et pour toutes les astuces qui m'ont fait gagner un temps fou. Bref, un grand merci à toutes les trois.

Je remercie également la région Rhône-Alpes Auvergne pour m'avoir financé tout au long de ces trois ans.

Passons aux remerciements des co-locataires/thésard du bureau. Ce n'est pas facile d'être originale quand 4 remerciements de thèses ont déjà été écrits ! Avec vous ça a été : « Faire une thèse, c'est un peu comme une relation amoureuse ».

Vanessa et Sabrina... Je suis obligé de vous remercier en un bloc, même si ça va vous déplaire ! Mais ça fait 4 ans qu'on est côte à côte, à vivre les mêmes m... aventures ! Merci pour ces 4 années, merci pour tous les moments partagés. Par contre, je ne vous remercie pas pour toutes ces conversations que j'aurais préféré ne pas entendre ☺ Avec vous, il y avait toujours de l'ambiance dans ce bureau ! Je ne désespère pas d'arriver à vous faire camper un soir dans la montagne en pleine hiver et si possible dans un igloo ! Je ne suis jamais venu à

reculons au labo, et c'est en partie grâce à vous ! Par contre, si c'était à refaire, je vous ferai greffer du tissu adipeux brun supplémentaire, histoire que je puisse enfin ouvrir cette maudite fenêtre quand il fait 50°C (au moins) dans le bureau ! Et ne niez pas, j'ai Marwa de mon côté !

En parlant de toi Marwa... J'ai désespérément cherché une réplique dont tu as le secret, histoire de la mettre en pleine face par écrit mais n'en ai jamais trouvée... Faut croire que ce n'est pas mon truc ☺ Je laisse ma place aux professionnels de ton genre ☺ Ton franc parlé a toujours bien animé le bureau, avec tous les ragots et histoires que tu sortais toujours d'on ne-sait-où ! Toi qui es arrivée avec une âme si innocente dans ce bureau, tu as dû un peu souffrir de nos conversations, mais en tout cas, ça nous a bien fait marrer ! Reste comme tu es, le meilleur reste à venir ! ☺

Caro et Pierre : Vous nous avez lâchés pour cette dernière année ! Bande de méchants ! Comme l'a si justement ~~dit~~ écrit Sabrina dans ses remerciements, vous êtes vraiment papa Pierre et maman Caro. Toujours le bon conseil au bon moment ! Enfin, vous n'avez pas uniquement été de bons conseils, il faut l'avouer ! Je ne dénombre même plus le nombre de conneries qu'on a dit/pensé/imaginé/fait ☺ Pierre je dois t'avouer que depuis que tu m'a laissé tout seul avec toutes ces filles, j'ai regretté plusieurs fois d'avoir jeté ce carton-Château Fort que tu nous avais dégoté !

Autre remerciement à faire en bloc : Le plateau génomique ! Merci à toutes les trois ! Premièrement, pour tous vos conseils, et ils ont été nombreux ! Mais surtout pour toutes les discussions non scientifiques, qui ont toujours été aussi intrigante qu'intéressante ! Avec vous l'ambiance était toujours là, et heureusement parce que j'ai quand même passé une partie non négligeable de ma thèse dans votre antre à faire des plaques PCR (ou à voler du thé...)

Manu Combe et Aurélie, vous faite un peu parti du plateau génomique aussi ! Toujours là quand je cherchais un bout de chocolat, ou des conneries à dire après 18h... Vous avez fait un sacré duo Nestlé ! Manu, tu n'as toujours pas réussi à m'entraîner six pieds sous terre, mais un jour on finira bien par se la faire cette via ferrata ! Ça sera forcément un jour où il y a beaucoup de vent et de pluie, vu notre karma ☺

Passons aux gens « du bas » :

Déjà, merci à tous pour tout et surtout pour l'ambiance que vous mettez au laboratoire !

Merci à :

- Guillaume pour tous tes conseils sur à peu près toutes les techniques que j'ai faites. Tu es une vraie source inépuisable d'astuces et de bidouillages de laboratoires qui m'ont permis d'arriver à mes fins !
- Béatrice pour ta bonne humeur constante
- JJ, la reine de la bio mol !
- Poupinou pour tes conneries ☺ Promis, je ne t'oublie pas pour aller grimper, dès que j'ai 1 minute !
- Anne Mey, Jennifer, Etienne, Sophie, Anne-Marie et Assia : Encore un bloc de remerciements car vous avez tous été là quand j'avais besoin de vous ! Merci !
- Vanessa E, pour toujours avoir le temps de donner un coup de main ! Peu importe l'heure ou ce que tu fais, tu es toujours là pour celui qui le demande !
- Audrey pour toujours avoir la petite anecdote à raconter ! Bon courage pour tes études ;)
- Luciano pour toute la partie épigénétique de ma thèse, même si je n'ai pas réussi à le mettre en application ! Et surtout pour ton caractère, toujours optimiste et encourageant mais en restant franc ! En plus tu as toujours la petite anecdote scientifique qui nous fait marrer à raconter
- Stéphanie, Christine, Marie-Agnès pour tous les conseils, et les discussions « le temps du lavage de la membrane », même si à cause de ces discussions, le lavage durait un peu trop longtemps ☺
- Brigitte Roux : je pense que tous les thésards font à peu près les mêmes remerciements, mais je pense que tu nous as réellement tous sauvé des mystères de l'administration et de l'incompréhensible papasserie qui nous sont totalement inconnus !
- Valérie et les post-docs : Bérangère Emily et Kassem ! (ca ferait bon titre de film ^^) Même si on vous a mis « à la porte du laboratoire », ;- ) vous savez mettre l'ambiance ! Kassem, si jamais tu as envie de faire une pièce montée pour mon pot de thèse, ne t'en prive pas ! ☺ Et bon courage pour la reprise de la partie informatique ! Tu vas voir, ce n'est pas si compliqué !

J'espère n'avoir oublié personne du laboratoire ! Et si c'est le cas, c'est parce que c'est tellement évident que je n'ai pas pensé à l'écrire ! ☺

Ligia y Momo ! (Momo, démerde toi pour traduire ☺ ) Se quedaron a penas un año, y en ese poco tiempo, me dejaron recuerdos inolvidables ! Muchas gracias por todo, por ser tan

locas que nunca sabemos cómo se va a pasar la hora que sigue. Ligia, gracias por todas las horas que pasamos tomando maté, me dio la energía para poder terminar mi tesis. Momo, ¡nunca he visto alguien capaz de pelear tanto con sus experimentos, trabajar días interminables y llegar a la noche sonriendo como si de nada! ¡Quédate así! ¡Suerte a los dos por sus tesis respectivas! (Viste ligia, logré poner los acentos y mismo el ¡! jajaja)

Passons maintenant aux non-scientifiques ! Et vu le nombre, des gros blocs s'imposent ! En premier lieu, les scouts ! Merci chers PioKs pour tous les moments que vous m'avez fait passer ! Des réunions en ville aux nuits dans les igloos, autant de moment qui m'ont permis de décompresser de la thèse ! Et même si des fois j'ai un peu râlé parce que mes trois seules semaines de vacances étaient pour le camp, je ne l'ai jamais regretté ! Vous voir grandir est vraiment merveilleux !

Continuons avec les scouts, mais les grands cette fois ! D'un bloc, merci à tous les violets ! Pour ce que vous êtes, pour votre accueil, et me faire sentir comme à la maison dans le groupe !

Particulièrement, merci Cécile et Charles ! Amis, co-chefs, témoins, parrain/marraine... Je ne sais pas quel titre vous va le mieux, mais vous avez tout fait à la perfection ! Merci pour tous les moments passés ensemble, et j'espère qu'il y en aura à tout jamais !

Et je termine par le plus évident, le plus important, et le plus difficile : Alice ! Une thèse entière de remerciements n'aurait pas suffi à te remercier suffisamment ! De la Tour-du-Pin à la Croix-Rousse, ces années de thèses auront été riches en aventures ! Entre nos randos, notre mariage, les scouts, la montagne et ses grandes voies et Charlotte, tu m'as fait vivre probablement mes plus belles années ! Et surtout, merci d'avoir si bien réussi Charlotte ! C'est la plus belle !





# Sommaire

<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>3</b>
<b>SOMMAIRE.....</b>	<b>9</b>
<b>RESUMES.....</b>	<b>15</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>19</b>
<b>PUBLICATIONS ET PARTICIPATIONS AUX CONGRES.....</b>	<b>23</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>27</b>
<b>I. L'OBESITE ET LE DIABETE DE TYPE 2.....</b>	<b>28</b>
<b>A. QUELQUES ELEMENTS IMPORTANTS.....</b>	<b>28</b>
1. DEFINITIONS.....	28
2. LES CHIFFRES DE L'OBESITE ET DU DIABETE .....	28
3. ETIOLOGIE DE L'OBESITE ET DU DIABETE DE TYPE 2 .....	29
<b>B. PHYSIOLOGIE ET PHYSIOPATHOLOGIE DU METABOLISME ENERGETIQUE.....</b>	<b>31</b>
1. LA SIGNALISATION DE L'INSULINE .....	34
2. L'INSULINO-RESISTANCE .....	35
i. Le foie dans un état d'insulino-résistance .....	37
ii. Le tissu adipeux dans un état d'insulino-résistance .....	38
iii. Le muscle insulino-résistant.....	39
iv. Les causes de l'insulino-résistance.....	40
<b>C. LE METABOLISME DU CHOLESTEROL .....</b>	<b>41</b>
1. REGULATION DU CHOLESTEROL PLASMATIQUE.....	41
2. REGULATION DE LA SYNTHESE DU CHOLESTEROL .....	44
3. ELIMINATION DU CHOLESTEROL .....	47
<b>D. LE DIMORPHISME SEXUEL.....</b>	<b>48</b>
1. SENSIBILITE A L'INSULINE .....	48
2. LES TISSUS ADIPEUX .....	50
3. BALANCE ENERGETIQUE.....	50
4. SUBSTRAT ENERGETIQUE .....	50
5. LE FOIE .....	52

<b>E.</b>	<b>LE CYCLE CIRCADIEN.....</b>	<b>54</b>
<b>II.</b>	<b><u>LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS : DEFINITIONS ET CARACTERISTIQUES.....</u></b>	<b>57</b>
<b>A.</b>	<b>LES POLLUANTS, UNE SOURCE DE PE.....</b>	<b>58</b>
<b>B.</b>	<b>LA PROBLEMATIQUE DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS.....</b>	<b>62</b>
1.	LES EFFETS A FAIBLES DOSES.....	62
2.	LES EFFETS NON-MONOTONES.....	64
3.	EFFETS A DISTANCE.....	64
<b>C.</b>	<b>LA PROBLEMATIQUE DES MELANGES.....</b>	<b>66</b>
1.	MECANISMES D’ACTION DES PE PRIS INDIVIDUELLEMENT.....	67
2.	LES MECANISMES D’ACTION POSSIBLES DES MELANGES.....	71
<b>III.</b>	<b><u>LES PERTURBATEURS METABOLIQUES ET LEURS EFFETS SUR LA SANTE.....</u></b>	<b>73</b>
<b>A.</b>	<b>LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS ET LA PERTURBATION METABOLIQUE.....</b>	<b>78</b>
1.	LES DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES.....	78
2.	LES DONNEES EXPERIMENTALES.....	82
<b>B.</b>	<b>EFFETS METABOLIQUES IDENTIFIES DES PE APRES ACTIVATION DES RECEPTEURS CIBLES.....</b>	<b>87</b>
1.	EFFETS POST LIAISON AUX RECEPTEURS AUX ŒSTROGENES.....	87
2.	EFFETS POST LIAISON AUX RECEPTEURS AUX GLUCOCORTICOÏDES ET AUX HORMONES THYROÏDIENNES (TH)	88
3.	EFFETS POST LIAISON AUX XENONSENSEURS.....	89
4.	EFFETS POST LIAISON AUX PPAR.....	90
5.	EFFETS VIA LA MODIFICATION DE L’EPIGENOME.....	91
6.	EFFETS VIA LA MODIFICATION DU MICROBIOTE INTESTINAL.....	93
7.	EFFETS VIA LA MODIFICATION DU RYTHME CIRCADIEN.....	94
	<b><u>OBJECTIFS DE LA THESE.....</u></b>	<b>97</b>
	<b><u>MATERIELS ET METHODES.....</u></b>	<b>101</b>
<b>I.</b>	<b><u>MODELE ANIMAL.....</u></b>	<b>102</b>
<b>A.</b>	<b>PREPARATION DE LA NOURRITURE.....</b>	<b>102</b>

B.	PROTOCOLE ANIMAL.....	102
C.	TESTS METABOLIQUES.....	104
<b>II.</b>	<b><u>RT-QPCR .....</u></b>	<b><u>104</u></b>
A.	EXTRACTION D'ARN.....	104
B.	TRANSCRIPTION INVERSE (RT) .....	105
C.	QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION (qPCR).....	105
D.	CONCEPTION ET VALIDATION D'AMORCES .....	107
<b>III.</b>	<b><u>ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE PAR LES PUCES A ADN .....</u></b>	<b><u>108</u></b>
A.	REALISATION DES PUCES A ADN .....	108
B.	INTERPRETATION BIOLOGIQUE DES DONNEES .....	109
C.	ANALYSE FONCTIONNELLE DES GENES.....	109
D.	ANALYSE DES PROMOTEURS DES GENES .....	110
<b>IV.</b>	<b><u>WESTERN BLOT.....</u></b>	<b><u>110</u></b>
A.	EXTRACTION ET DOSAGE DES PROTEINES .....	110
B.	WESTERN BLOT.....	111
	<b><u>RESULTATS .....</u></b>	<b><u>113</u></b>
	<b><u>L'EXPOSITION A UN MELANGE DE POLLUANTS FAIBLEMENT DOSES ENTRAINE DES EFFETS METABOLIQUES DANS LE FOIE DE LA DESCENDANCE DE SOURIS OBESES .....</u></b>	<b><u>115</u></b>
	<b><u>IMPACTS METABOLIQUES DE SOURIS FEMELLES EXPOSEES A UN MELANGE DE POLLUANTS FAIBLEMENT DOSE DANS UN CONTEXTE D'OBESITE .....</u></b>	<b><u>135</u></b>
	<b><u>L'EXPOSITION A UN MELANGE DE POLLUANTS FAIBLEMENT DOSES ENTRAINE DES ALTERATIONS METABOLIQUES CHEZ LA SOURIS FEMELLE DONT CERTAINS SONT COMMUNS A CEUX INDUITS PAR LE REGIME OBESOGENE.....</u></b>	<b><u>163</u></b>
	<b><u>DISCUSSION GENERALE .....</u></b>	<b><u>205</u></b>

1.	PERTINENCE DES DOSES DES PE UTILISEES DANS LE MELANGE.....	207
2.	PERTINENCE A ETUDIER LES DEUX SEXES .....	208
3.	LES EFFETS DU MELANGE : EFFETS COMBINES OU PROPRES A CHAQUE PE ? .....	210
4.	COMPARAISON ENTRE LES IMPACTS METABOLIQUES D'UN REGIME OBESOGENE ET CEUX INDUITS PAR UNE EXPOSITION AU MELANGE DE PE .....	211
5.	LIMITES DU MODELE EXPERIMENTAL .....	212
6.	PERSPECTIVES .....	213
<b><u>REFERENCES .....</u></b>		<b><u>217</u></b>
<b><u>ANNEXES .....</u></b>		<b><u>239</u></b>
<b><u>ANNEXE 1 : LISTE DES RESUMES DES PRESENTATIONS .....</u></b>		<b><u>240</u></b>
<b><u>ANNEXE 2 : FORMATION REALISEE PENDANT LA THESE .....</u></b>		<b><u>247</u></b>
<b><u>ANNEXE 3 : CHARTE DE LA JEUNESSE SCIENTIFIQUE .....</u></b>		<b><u>248</u></b>
<b><u>ANNEXE 4 : ARTICLE EN COLLABORATION .....</u></b>		<b><u>253</u></b>



# Résumés



Plusieurs travaux suggèrent l'implication des polluants de l'environnement dans l'épidémie d'obésité et l'incidence du diabète. Cependant, l'impact cumulé de cette myriade de polluants auxquels l'homme est exposé à faibles doses pendant toute sa vie n'a pas été totalement appréhendé.

Au laboratoire, nous utilisons un modèle souris d'exposition chronique (toute la vie) à un mélange de polluants (TCDD, PCB153, DEHP et BPA) via leur ajout à une alimentation obésogène ou standard. Les doses des polluants sont ajustées de sorte à ce que l'exposition soit de l'ordre de la Dose Journalière Tolérable, supposée sans effet chez l'homme, pour chacun des 4 polluants.

Nos résultats montrent que dans un contexte d'obésité induite par le régime et à l'âge adulte, l'exposition au mélange de polluants altère le métabolisme hépatique du cholestérol chez les mâles et aggrave l'intolérance au glucose chez les femelles. L'analyse du profil métabolique de femelles immatures nourries avec le régime obésogène indique que les effets des polluants sont liés au contexte hormonal et à l'activité oestrogéno-mimétique des polluants. Enfin, en condition de régime standard, nous observons une dyslipidémie chez les femelles adultes exposées au mélange, possiblement en lien avec la dérégulation génique dans le foie de plusieurs voies métaboliques dont le rythme circadien et le métabolisme du cholestérol. En revanche, les polluants n'ont pas d'effet obésogène.

En conclusion, nos travaux démontrent que les polluants en mélange exercent un impact métabolique adverse chez la souris à des doses supposées sans effet individuellement, et ces effets sont dépendants du sexe, de l'âge et du contexte alimentaire.

Pollutants are suspected to contribute to the etiology of obesity and related metabolic disorders but the current risk assessment does not take into account the cocktail effect resulting from the large amount of chemicals to which humans are exposed.

We fed mice with high fat or standard diet with or without a mixture of food pollutants, either persistent pollutants (TCDD, PCB153) or short-lived pollutants (DEHP, BPA). Doses are adjusted resulting in mice exposure at the Tolerable Daily Intake dose range for each pollutant. Mice are chronically exposed from preconception to adult life.

We demonstrated that a mixture of 4 pollutants triggers in the adult male offspring (12 weeks) an alteration of hepatic cholesterol metabolism. In females, there was a marked deterioration of glucose tolerance, which may be related to decreased hepatic estrogen signaling. The analyze of 7 week-old female mice, when they exhibit early signs of obesity and immature estrogen levels, showed that pollutant exposure alleviated HFSD-induced glucose intolerance, suggesting apparent biphasic effects of pollutants along with hormonal context. Then we compared hepatic signature of gene expressions from pollutant-exposed non-obese or non-exposed obese females and we highlight 4 main pathways that were targeted by both treatments and appeared to be affected by different but overlapping mechanisms. Plus, we showed that pollutants can markedly alter the circadian clock in the liver.

Altogether, we emphasize that, pollutants presented in a mixture, have adverse metabolic effects at doses where they are supposed to be without any individual effect, and these effects depend on the gender, age and dietary context.



# Liste des abréviations

## A

ABC : ATP Binding Cassette  
ACC : Acetyl-CoA Corboxylase  
ADN : acide désoxyribonucléique  
AF : Activation function  
AhR : Aryl hydrocarbon receptor  
AhRE : Element de réponse à AhR  
AKT : Protein Kinase B  
AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique  
aP : adipocyte protein  
Apo : Apolipoprotein  
AR : Récepteur aux androgènes  
AS160 : AKT Substrate of 160 kDa  
ATP : Adénosine TriPhosphate

## B

BCA : acide bicinchoninique  
BCL6 : B-cell lymphoma 6 protein  
bHLH : basic helix-loop-helix  
BMAL : brain and muscle ARNT-like1  
BPA : Bisphénol A  
BSA : Albumine sérique bovine

## C

CAR : Constitutive Androstane Receptor  
CDRNM : Courbe dose-réponse non-monotone  
ChIP-seq : Immunoprécipitation de la chromatine suivie d'un séquençage haut débit  
CHREBP : Carbohydrate-responsive element-binding protein  
CLK2 : CDC Like Kinase 2  
CLOCK : circadian locomotor output cycles kaput protein  
COP : coat protein  
CRY : cryptochrome  
CUX2 : cut-like homeobox 2  
Cyp : Cytochrome P450

## D

DAG : Diacylglycérine  
DAVID : Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery  
DBD : dibutyl phtalate

DDE :  
dichlorodiphényldichloroethylene  
DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane  
DEHP : phtalate di(2-ethylhexyl)  
phtalate  
DES : diéthylstilbestrol  
DGAT : Diacylglycerol O-Acyltransferase  
DHT : dihydrotestotérone  
DJT : Dose journalière Tolérable  
DMSO : Diméthylsulfoxyde  
DOHaD : Origines développementales de la santé (*Developmental Origin of Health and Disease*)  
DT2 : Diabète de type 2

## E

EE2 : éthinylestradiol  
EPA : Environmental protection agency  
ER : Récepteurs aux œstrogènes  
ERE : Element de réponse aux œstrogènes

## F

FABP : Fatty acid binding protein  
FAS : Fatty acid synthase  
FDA : Food and drug administration  
FOXO1 : Forkhead box O1  
FXR : Farnesoid X Receptor

## G

G6Pase : Glucose-6-phosphatase  
GH : hormone de croissance  
GHR : Récepteur à l'hormone de croissance  
GO : Gene Ontology  
GR : récepteur aux glucocorticoïdes  
GS : Glycogen Synthase  
GSK3 : Glycogen Synthase Kinase 3  
Gusb :  $\beta$ -Glucuronidase

## H

HCF : Hypercholestérolémie sévère familiale  
HDL : High Density Lipoprotein  
HEK : human embryonic kidney

HMGR : 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase

HNF : Hepatocyte nuclear factor

HPRT : Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase

HSL : Hormon sensitive Lipase

## I

IFN : interféron

IGF : insulin growth factor

IL6 : Interleukin 6

IMC : Indice de Masse Corporelle

INSIG : Insulin induced gene

IRS : Insulin Receptor Substrate

## J

JAK : Janus kinase 2

JNK : c-Jun N-terminal kinases

## L

LDL : Low Density Lipoprotein

LDLR : Récepteur aux LDL

LOAEL : lowest observable adverse effect level

LPL : Lipoprotein lipase

LXR : Liver X receptor

## M

MBzP : Methylbenzylpiperazine

MCF7 : Michigan Cancer Foundation - 7

MCMHP : mono(2-carboxyméthylhexyl) phtalate

MCPP : Mono-(3-carboxypropyl) phthalate

MECPP : mono(2-éthyl-5-carboxypentyl) phtalate

MEHHP : mono(2-éthyl-5-hydroxyhexyl) phtalate

MEHP : mono(2-éthylhexyl)-phtalate

MEOHP : mono(2-éthyl-5-oxohexyl) phtalate

mTORC1 : mammalian target of rapamycin complex 1

## N

NCHS : National Center for Health Statistics

NF- $\kappa$ B : nuclear factor-kappa B

NHANES : National Health and Nutrition Examination Survey

NHS : Nurses's Health Study

NOAEL : No observable adverse effect level

NTA : National Toxicology Program

NURR : Nuclear receptor related protein

## O

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ONU : organisation des nations unies

OR : odds ratio

OVX : ovariectomie

## P

PCB : polychlorobiphényles

PCDF : Polychlorodibenzofurane

PDE3B : Phosphodiesterase 3B

PDK : Phosphoinositol dependant kinase

PE : perturbateur endocrinien

PEPCK : Phosphoénolpyruvate carboxykinase

PER : period encoding gene

PFC : polyfluoroalkyles

PFOA : Acide perfluorooctanoïque

PH : Pleckstrin homology

PI3K : Phosphoinositol 3 kinase

PIP2 : Phosphatidylinositol 2 phosphate

PIP3 : Phosphatidylinositol 3 phosphate

PKA : Protein Kinase A

PKB : Protein Kinase B

PKC : Protein Kinase C

POMC : neuropeptide pro-opiomélanocortine

POP : Polluant organique persistant

PPAR : Peroxisome proliferator-activated receptor

PSCK9 : proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9

PXR : Pregnane X receptor

## R

RCT : Reverse cholesterol transport  
RE : Réticulum endoplasmique  
REV-ERB : reverse-ERB receptor  
RN : Récepteur nucléaire  
ROR : retinoid acid receptor-related orphan receptors  
ROS : Espèce réactive de à l'oxygène

## S

S6K : P70-S6 Kinase 1  
SCAP : SREBP cleavage-activating protein  
SERM : Modulateur sélectif des récepteurs aux œstrogènes  
SF-1 : Steroidegenic factor 1  
SHP : Small Heterodimer Partner  
SR-B1 : Scavenger receptor class B member 1  
Srebp1c : Sterol Regulatory element binding protein 1c  
SRM : Modulateur sélectif des récepteurs  
STAT : signal transducer and activator of transcription

## T

TAG : Triacylglycérol  
TAsc : Tissu adipeux sous-cutané  
TAv : Tissu adipeux viscéral  
TBT : Tributylétain  
TCDD : 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine  
TCDF : 2,3,7,8-tétrachlorodibenzofuran  
TEF : Toxic equivalent factor  
TEQ : Toxic equivalent quotient  
TH : hormones thyroïdiennes  
TLR : Toll-like receptor  
TNC : Trans-nonachlore  
TNF $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$   
TR : récepteurs aux hormones thyroïdiennes

## V

VLDL : Very Low Density Lipoprotein

## X

XRE : Element de réponse aux xénobiotiques

# Publications et participations aux congrès



## Liste des publications :

### **Low-dose food contaminants trigger sex-specific, hepatic metabolic changes in the progeny of obese mice**

*Naville D., Pinteur C.\*, Vega N.\*, Menade Y., Vigier M., Le Bourdais A., Labaronne E., Debard C., Luquain-Costaz C., Bégeot M., Vidal H., Le Magueresse-Battistoni B*

\* These authors contributed equally to the work.

FASEB Journal 27(9):3860-70, Septembre 2013. PMID : 23756648

---

### **Metabolic outcome of female mice exposed to a mixture of low-dose pollutants in a diet-induced obesity model**

*Naville D.\*, Labaronne E.\*, Vega N.<sup>§</sup>, Pinteur C.<sup>§</sup>, Canet-Soulas E., Vidal H., Le Magueresse-Battistoni B*

\* These authors contributed equally to the work.

Plos One 10(4):e0124015, Avril 2015. PMID : 25909471

---

### **Exposure to a low-dose pollutant mixture or high-fat feeding triggers metabolic disturbances in female mice through distinct and overlapping hepatic pathways including the circadian clock**

*Labaronne E., Pinteur C.<sup>§</sup>, Vega N.<sup>§</sup>, Pesenti S., Julien B., Meugnier-Fouilloux E., Vidal H., Naville D.\* , Le Magueresse-Battistoni B\**

<sup>§</sup> These authors contributed equally to the work.

\* These authors share the last authorship.

*Article en préparation*

---

### **At-risk profile from imaging and tissue biomarkers combine inflammatory and anti-inflammatory features in non-human primates under cholesterol diet**

*Di Cataldo V., Piraquive J., Geloën A., Verset M., Paturet A., Serusclat A., Lambertson F., Ibarolla D., Lavenne F., Le Bars D., Labaronne E., Loizon E., Contamin H., Canet-Soulas E.*

*Article en préparation*

## Liste des communications orales et affichées :

### Société Francophone du diabète

Paris, France

11-14 mars 2014

*Présentation affichée : L'impact d'un cocktail de polluants alimentaires faiblement dosés dépend du sexe et du régime alimentaire. Etude dans un modèle murin. "*

---

### Journée scientifique G2L2

Grenoble, France

23 Mai 2014

*Présentation affichée : " L'impact d'un cocktail de polluants alimentaires faiblement dosés dépend du sexe et du régime alimentaire. Etude dans un modèle murin. "*

*Prix Poster*

---

### Journée scientifique de l'ARC

L'isle d'abeau, France

19 septembre 2014

*Présentation affichée : " Impact métabolique d'un mélange de polluants alimentaires faiblement dosés dans un modèle de souris obèse "*

---

### Journée scientifique de l'EDISS

Villeurbanne, France

16 octobre 2014

*Présentation affichée : " L'impact d'un cocktail de polluants alimentaires faiblement dosés dépend du sexe et du régime alimentaire. Etude dans un modèle murin. "*

*Prix Poster*

---

### Société Française d'Endocrinologie

Lyon, France

5-8 novembre 2014

*Présentation affichée : " L'impact d'un cocktail de polluants alimentaires faiblement dosés dépend du sexe et du régime alimentaire. Etude dans un modèle murin "*

---

### Journée scientifique de l'ARC

L'isle d'abeau, France

24 septembre 2014

*Présentation orale : " Impacts métaboliques d'un mélange de polluants faiblement dosés chez la souris femelle obèse "*

## Journée scientifique de l'EDISS

Villeurbanne, France

15 octobre 2015

*Présentation orale : " Impacts métaboliques d'un mélange de polluants faiblement dosés chez la souris femelle obèse "*

---

## Journée scientifique G2L2

Lausanne, Suisse

16 décembre 2015

*Présentation affichée : " Metabolic Outcome of Female Mice Exposed to a Mixture of Low-Dose Pollutants in a Diet-Induced Obesity Model "*

---

## 2<sup>nd</sup> workshop on Endocrine Disruptors Effets on Wildlife and Human Health

Paris, France

21-22 janvier 2016

*Présentation affichée : " Exposure to a mixture of low-dose endocrine disruptors triggers insulin resistance in young adult male mice fed a diet-inducing obesity "*

---

## Société Francophone du diabète

Lyon, France

22-25 mars 2016

*Présentation affichée : " Exposure to a mixture of low-dose endocrine disruptors triggers insulin resistance in young adult male mice fed a diet-inducing obesity "*

# Introduction

## I. L'obésité et le diabète de type 2

### A. Quelques éléments importants

#### 1. Définitions

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit le surpoids et l'obésité comme « une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut nuire à la santé ». L'obésité et le surpoids sont des facteurs de risque de plusieurs maladies métaboliques comme le diabète, les maladies cardiovasculaires ou certains cancers. Ils sont diagnostiqués par l'indice de masse corporelle (IMC). Cet indice s'exprime en  $\text{kg}/\text{m}^2$  et s'obtient en divisant le poids (kg) par le carré de la taille ( $\text{m}^2$ ). Selon les valeurs de l'IMC, un individu peut être classé dans l'une des quatre catégories suivantes :

- Maigre :  $\text{IMC} < 18.5$
- Normal :  $18.5 < \text{IMC} < 24.9$
- Surpoids :  $25 < \text{IMC} < 29.9$
- Obèse :  $\text{IMC} > 30$

Le diabète est une maladie définie par une hyperglycémie chronique. Une personne est considérée diabétique lorsque la glycémie à jeun est supérieure à  $1.26 \text{ g/L}$  lors de deux examens consécutifs. Il existe deux types de diabètes qui diffèrent par leur origine. Chez le diabétique de type 1, le pancréas ne produit pas suffisamment d'insuline pour réguler la glycémie. Chez le diabétique de type 2 (DT2), l'organisme est résistant à l'action de l'insuline. Dans un premier temps, l'organisme produit plus d'insuline pour maintenir une glycémie stable, mais la réponse insulinaire se dégrade au cours du temps et provoque une hyperglycémie chronique. Le DT2 représente 90 % des diabètes dans le monde.

#### 2. Les chiffres de l'obésité et du diabète

Un tiers des personnes obèses sont diabétiques et 75 % des personnes diabétiques sont obèses. L'augmentation du nombre de personnes obèses et/ou DT2 est alarmante, et l'OMS parle d'épidémie. Selon l'OMS, il y a eu entre 1980 et 2014 un doublement du nombre d'adultes obèses et un quadruplement du nombre de diabétiques. En 2014, près de 1.9 milliard

d'individus étaient en surpoids dont 600 millions étaient obèses - ce qui correspond à 39 % et 14 % de la population mondiale - et 422 millions de personnes étaient diabétiques.

L'obésité et le DT2 ne sont pas uniquement des fléaux des pays industrialisés. Dans un article paru dans « *The Lancet* », il est observé une augmentation de la prévalence de l'obésité et du DT2 plus forte dans les pays à revenus faibles ou intermédiaires que dans les pays à fort revenus (NCD Risk Factor Collaboration, 2016). La progression est telle que ces pays se retrouvent confrontés à la double problématique du surpoids et de la malnutrition (qui touche 795 millions de personnes dans le monde). Il a été estimé qu'en 2012 le diabète était responsable de 3.7 millions de décès et la sous-nutrition de 3.1 millions de décès. Il existe donc plus de décès attribuables au surpoids et à l'obésité qu'à l'insuffisance pondérale.

Enfin, alors que ces deux maladies ont longtemps touché uniquement les adultes, elles touchent aujourd'hui de plus en plus d'enfants. En 2013, 42 millions d'enfants de moins de 5 ans étaient en surpoids et obèses. Encore une fois, les pays émergents semblent plus touchés : l'augmentation du surpoids infantile est supérieure de 30 % dans les pays émergents par rapport aux pays développés (NCD Risk Factor Collaboration, 2016).

Ces deux maladies sont devenues des problèmes de santé et des problèmes économiques majeurs. Il a été estimé récemment que l'obésité et les maladies associées coûtent près de 2000 milliards de dollars par an dans le monde (Dobbs et al., 2014). Face à leur fort développement, il est important de comprendre les causes de la progression de l'obésité et de ses complications métaboliques.

### **3. Etiologie de l'obésité et du diabète de type 2**

La cause fondamentale de l'obésité est un déséquilibre entre l'apport calorique trop élevé par rapport à la dépense énergétique. On attribue principalement ce déséquilibre à un changement de mode de vie depuis l'industrialisation.

L'accès facilité à la nourriture a entraîné une augmentation de la fréquence des repas et de la quantité de nourriture consommée. Le type d'alimentation a également changé. L'alimentation de type *Western Diet*, qui caractérise une alimentation riche en acide gras saturés et en glucides, est devenue commune dans les pays industrialisés. En parallèle de cette augmentation de l'apport calorique, l'industrialisation a apporté un confort de vie qui entraîne

un manque d'activité physique (développement des transports, de l'urbanisme et de la nature sédentaire des différents métiers).

Mais ces deux aspects ne suffisent pas à expliquer l'ampleur et la cinétique de progression de l'obésité et des maladies associées et d'autres causes ont été avancées.

L'obésité peut avoir une cause génétique : il existe quelques rares cas d'obésité monogénique, notamment ceux liés aux mutations des gènes de la leptine ou de son récepteur. Ces deux mutations entraînent une hyperphagie sévère chez les patients atteints, dès la petite enfance (Clément et al., 1998; Montague et al., 1997).

La perturbation du cycle de sommeil peut également être responsable d'une obésité. Ainsi, le temps de sommeil moyen est passé de 8h30 dans les années 1960 à 6h30 en 2008 aux Etats-Unis et des études transversales et longitudinales chez l'homme montrent une corrélation inverse entre le temps de sommeil et l'IMC (Gangwisch et al., 2005; von Kries et al., 2002).

Cependant, l'augmentation du poids corporel moyen est également observé chez d'autres espèces, notamment chez les chimpanzés, les vervets, les marmottes, les chats, les rats sauvages et même les souris de laboratoire (Klimentidis et al., 2011). Ces résultats suggèrent, qu'en plus du changement du mode de vie, des facteurs environnementaux pourraient participer au développement de l'épidémie d'obésité et de diabète de type 2.

Chez l'Homme, les premières observations ont été faites chez les vétérans de la guerre du Vietnam exposés à l'agent orange, principalement composé de la dioxine 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD). Ainsi, 20 ans après la fin du conflit, les risques relatifs d'une perturbation de l'homéostasie du glucose (risque relatif = 1,4), de la prévalence du diabète (risque relatif = 1,5), et de l'utilisation de traitement anti-diabétique (risque relatif = 2,3) sont plus élevés chez les vétérans exposés à la dioxine (n=989) par rapport aux non-exposés (n=1276) (Henriksen et al., 1997). Dans une autre étude réalisée 15 ans après l'explosion de l'usine chimique Icmesa (près de Seveso) qui a répandu un nuage de dioxine dans la région de Lombardie (Italie), la population a été répartie en différents niveaux d'exposition en fonction de leur situation géographique. Il a été montré un plus fort taux de décès dû au diabète (risque relatif = 1.8) chez les individus exposés (n=38625) par rapport à la population non-exposée (n=232747) (Bertazzi et al., 1998).

## B. Physiologie et physiopathologie du métabolisme énergétique

L'énergie nécessaire à l'organisme est stockée sous forme d'ATP. La synthèse d'ATP provient principalement de la dégradation du glucose et des acides gras définis alors comme carburants métaboliques (figure 1). Ces deux carburants métaboliques peuvent être stockés sous forme de polymères, respectivement le glycogène et les triacylglycérols (TAG). La dégradation du glucose ou des acides gras permet de produire de l'acétyl-coA qui peut ensuite alimenter le cycle de l'acide citrique et la phosphorylation oxydative pour produire des molécules d'ATP. L'acétyl-CoA sert également de substrat pour la synthèse du glucose ou des lipides. En cas de jeûne prolongé, la production d'énergie peut également se faire à partir des protéines et des acides aminés, mais cette voie ne sera pas présentée dans ce manuscrit.

Après un repas, L'élévation de la glycémie stimule la production d'insuline par les cellules  $\beta$  du pancréas. L'insuline diminue la glycémie en :

- inhibant la production hépatique de glucose, en bloquant la glycogénolyse et la néoglucogenèse
- stimulant l'absorption de glucose par le tissu adipeux et le muscle squelettique et en stimulant la translocation du transporteur de glucose GLUT4 à la membrane plasmique

Dans le muscle, le glucose est polymérisé en glycogène. Dans le tissu adipeux, le glucose est stocké sous la forme de TAG. Dans le foie, le glucose est stocké sous forme de glycogène puis, une fois les hépatocytes saturés en glycogène, transformé en TAG qui est libéré dans la circulation et stocké dans le tissu adipeux.

A jeun, la sécrétion d'insuline diminue et le pancréas sécrète le glucagon, une hormone hyperglycémiant, qui favorise la néoglucogenèse, la glycogénolyse et l'utilisation des acides gras provenant des adipocytes pour la génération d'ATP et le maintien de la glycémie.

La figure 2 illustre la régulation des différentes voies métaboliques et les enzymes limitantes.



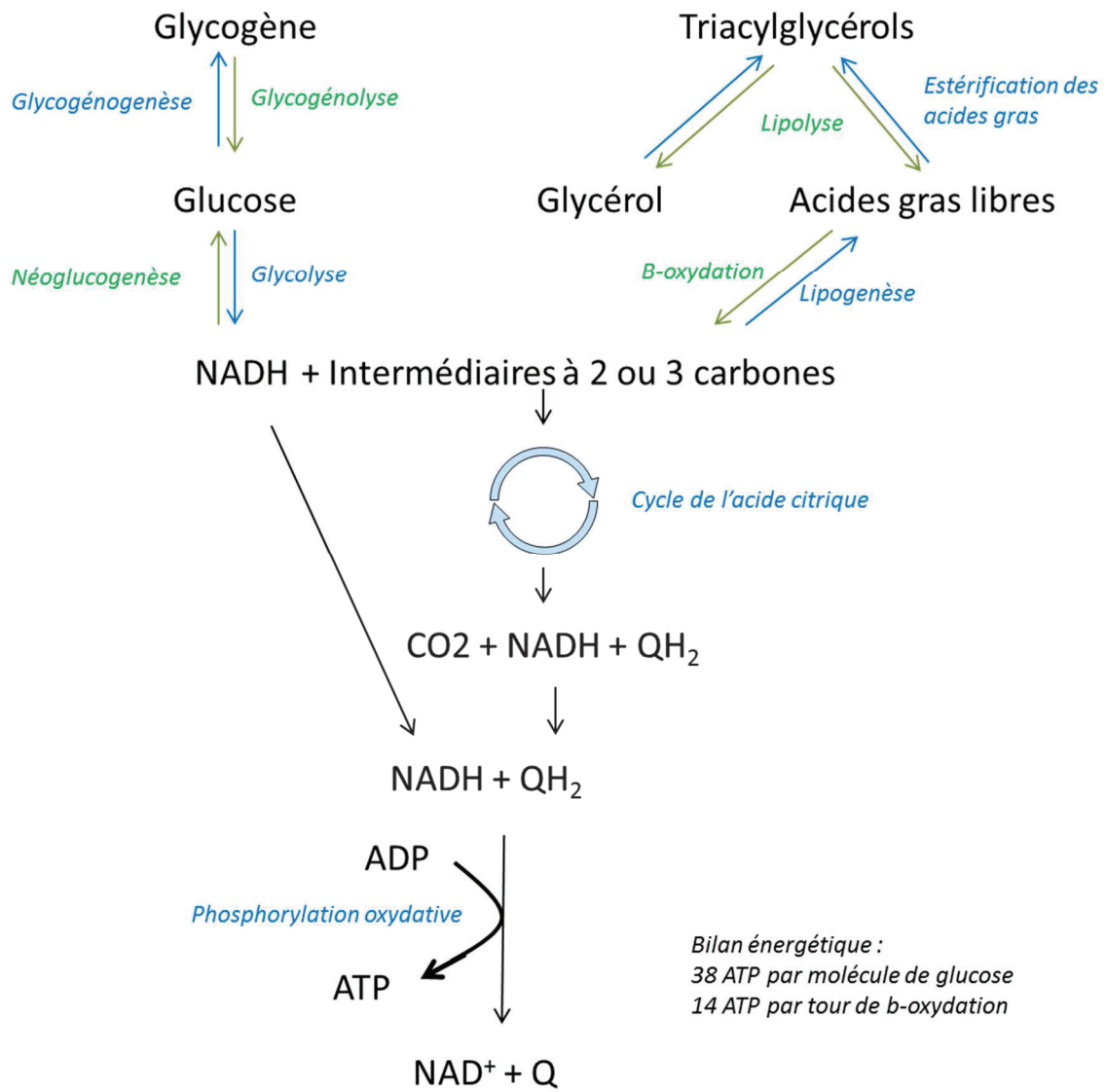
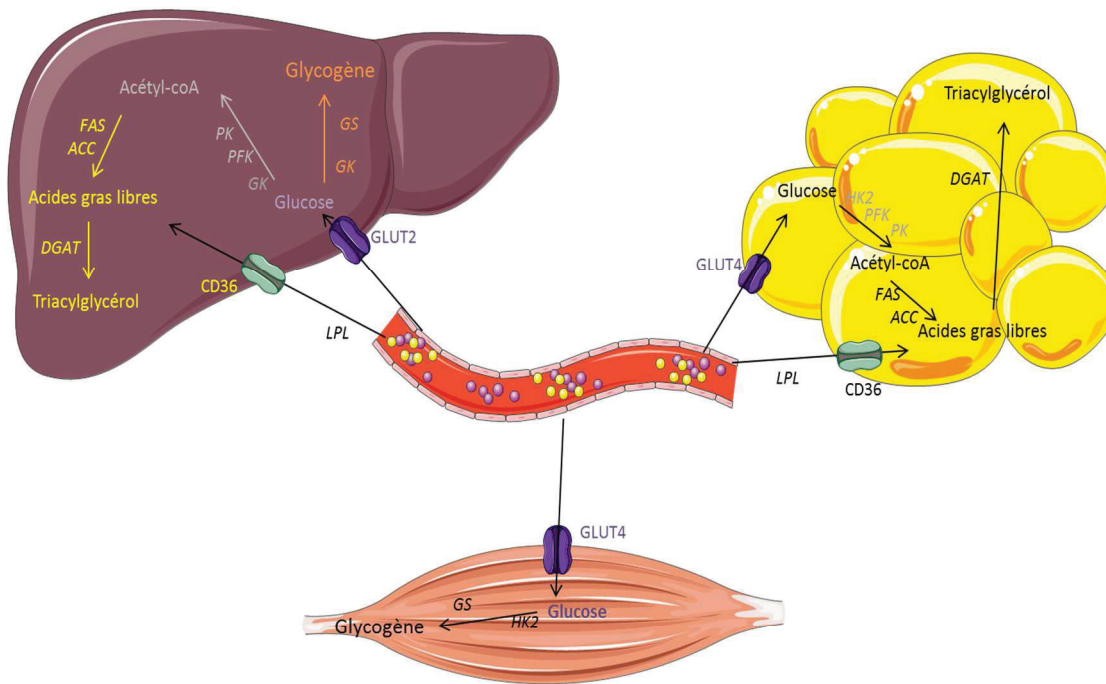


Figure 1 : Vue d'ensemble du métabolisme des carburants métaboliques. En bleu sont représentées les voies métaboliques stimulées lors d'un apport alimentaire, et en vert lors d'un jeun.

## Etat nourri



## A jeun

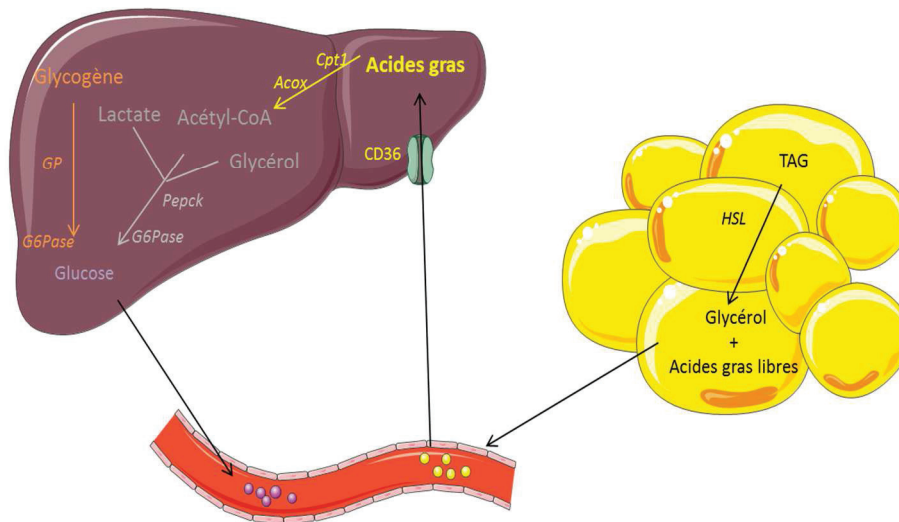


Figure 2 : Vue d'ensemble du métabolisme général lors de l'état nourri et lors d'un jeûne. Les principales enzymes limitantes de chaque voie métabolique sont représentées en italique sur le schéma. ACC : Acetyl-CoA carboxylase, Acox : Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase, Cpt1 : Carnitine palmitoyltransferase I, DGAT : Diacylglycerol O-Acyltransferase 1, FAS : Fatty Acid synthase, G6Pase : Glucose-6-phosphatase, GK : Glucokinase, GP : Glycogen Phosphorylase 1, GS : Glycogen Synthase, HK2 : Hexokinase 2, HSL : Hormone Sensitive Lipase, LPL : Lipoprotein lipase, Pepck : Phosphoenolpyruvate Carboxykinase 1, PFK : Phosphofruktokinase, PK : Pyruvate Kinase

## 1. La signalisation de l'insuline

Lorsque l'insuline se fixe sur son récepteur, celui-ci s'homodimérise. Cette dimérisation permet le rapprochement des deux domaines tyrosine kinase intracellulaires qui s'auto-phosphorylent. Ainsi activé, le récepteur phosphoryle les protéines IRS (*insulin receptor substrate*), ce qui permet le recrutement de la phosphoinositol-3-kinase (PI3K) à la membrane plasmique. La PI3K catalyse la réaction de phosphorylation de la phosphatidylinositol 2 phosphate (PIP2) en PIP3. L'accumulation de ce messager secondaire au niveau de la membrane cytoplasmique permet le recrutement des protéines *phosphoinositol dependant kinase* (PDK)1, PDK2 et Protéine Kinase B (PKB ou AKT) à la membrane cytoplasmique. En effet, ces trois protéines sont composées d'un domaine PH (pleckstrin homology) à l'extrémité N-terminale qui possède une forte affinité pour le PIP3 (Guo, 2013; Pirola et al., 2004). Le rapprochement de ces protéines permet la phosphorylation de la protéine AKT sur la tyrosine T308 et la sérine S473 par PDK1 et PDK2 respectivement, ce qui entraîne l'activation d'AKT (figure 3).

**Dans le foie :** Le facteur de transcription *Forkhead box O1* (FOXO1) active la transcription des gènes clefs de la néoglucogénèse comme la glucose-6-phosphatase (G6Pase) et la Phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK). AKT activé phosphoryle FOXO1. FOXO1 phosphorylé étant séquestré dans le cytoplasme, il n'active plus la transcription des gènes néoglucogéniques.

**Dans le muscle et le foie :** AKT phosphoryle également la *Glycogen Synthase Kinase 3* (GSK3), un régulateur de l'activité de la *Glycogène Synthase* (GS) nécessaire à la synthèse de glycogène. A l'état basal, GSK3 phosphoryle et inactive GS. Après action de l'insuline, AKT phosphoryle GSK3 et inhibe son activité de phosphorylation de GS et il y a donc levée de l'inhibition, ce qui permet la synthèse de glycogène.

**Dans le muscle et le tissu adipeux :** Lorsque AKT est activée, elle phosphoryle la protéine *Akt substrate of 160 kDa* (AS160). Cette protéine est présente dans les vésicules intracellulaires contenant les transporteurs de glucose GLUT4. En absence de phosphorylation, elle permet de maintenir les vésicules dans le cytosol. Après phosphorylation, AS160 est inhibée, et GLUT4 est transloqué à la membrane plasmique, permettant le captage massif de glucose.

**Dans le foie et le tissu adipeux :** L'activation d'AKT permet l'activation du facteur de transcription *Sterol regulatory element-binding protein-1c* (SREBP-1c), ce qui augmente l'expression des gènes clefs de la lipogenèse *de novo* (*Fatty acid Synthase* codant FAS, *Acetyl-CoA carboxylase alpha* ou *Acaca* codant ACC).

**Dans le tissu adipeux :** La lipolyse est stimulée par les catécholamines qui activent leur récepteur. Son activation entraîne l'augmentation de la concentration d'adénosine mono phosphate cyclique (AMPc) qui active à son tour la protéine kinase A (PKA). La PKA activée stimule l'activité de la lipase hormono-sensible (HSL) qui dégrade les TAG en acides gras. Sous l'action de l'insuline, AKT activée phosphoryle la phosphodiesterase 3B (PDE3B). Sa phosphorylation active cette protéine qui transforme l'AMPc en 5'AMP, empêchant l'activation de la PKA et donc de la lipolyse.

## 2. L'insulino-résistance

L'insulino-résistance se définit comme une réponse amoindrie à l'insuline. L'insulino-résistance résulte donc en une moins forte inhibition de la production hépatique de glucose et en une moindre utilisation du glucose par les organes périphériques, résultant en une augmentation de la glycémie.

Or, l'hyperglycémie est toxique. C'est la glucotoxicité qui provoque la mort des cellules, notamment des cellules  $\beta$  pancréatiques par apoptose. Ceci provoque une diminution de la production d'insuline et l'initiation d'un cercle vicieux qui aggrave l'hyperglycémie.

Le syndrome métabolique est défini par une série d'observations cliniques attestant d'une insulino-résistance de l'organisme. Il existe plusieurs classifications pour définir le syndrome métabolique : celle de l'OMS est présentée dans le tableau 1.

Paramètres	Homme	Femme
Tour de taille	$\geq 94\text{cm}$	$\geq 80\text{cm}$
Glycémie à jeun	$\geq 1\text{ g/L}$	$\geq 1\text{ g/L}$
Triglycéridémie à jeun	$\geq 1,5\text{ g/L}$	$\geq 1,5\text{ g/L}$
Cholestérol HDL à jeun	$\leq 0,4\text{ g/L}$	$\leq 0,5\text{ g/L}$
Pression artérielle	$\geq 130/80\text{ mm Hg}$	$\geq 130/80\text{ mm Hg}$

**Tableau 1 : Paramètres considérés pour le diagnostic du syndrome métabolique selon l'OMS. Une personne est considéré atteinte du syndrome métabolique lorsqu'au moins deux de ces paramètres sont observés**

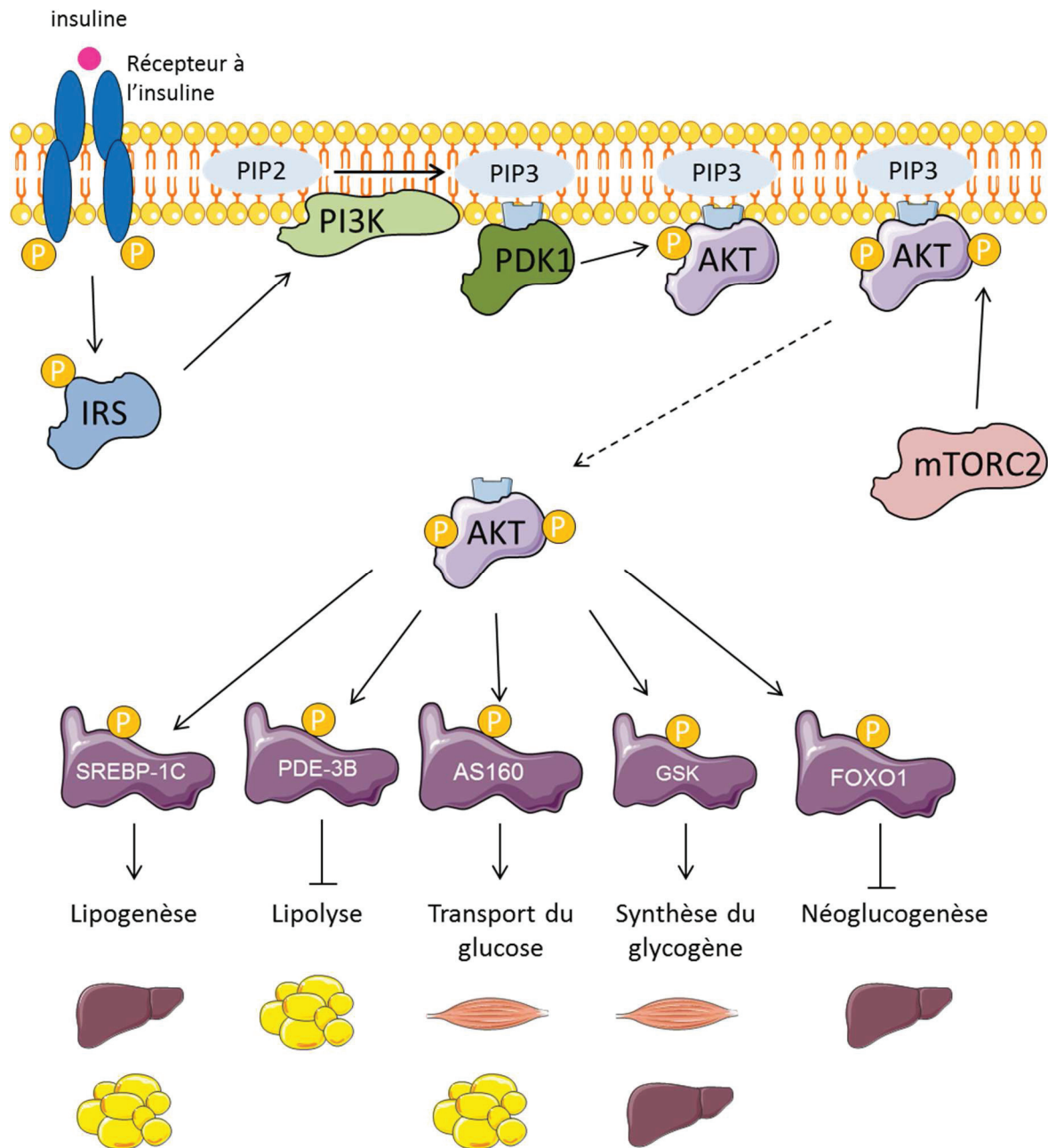
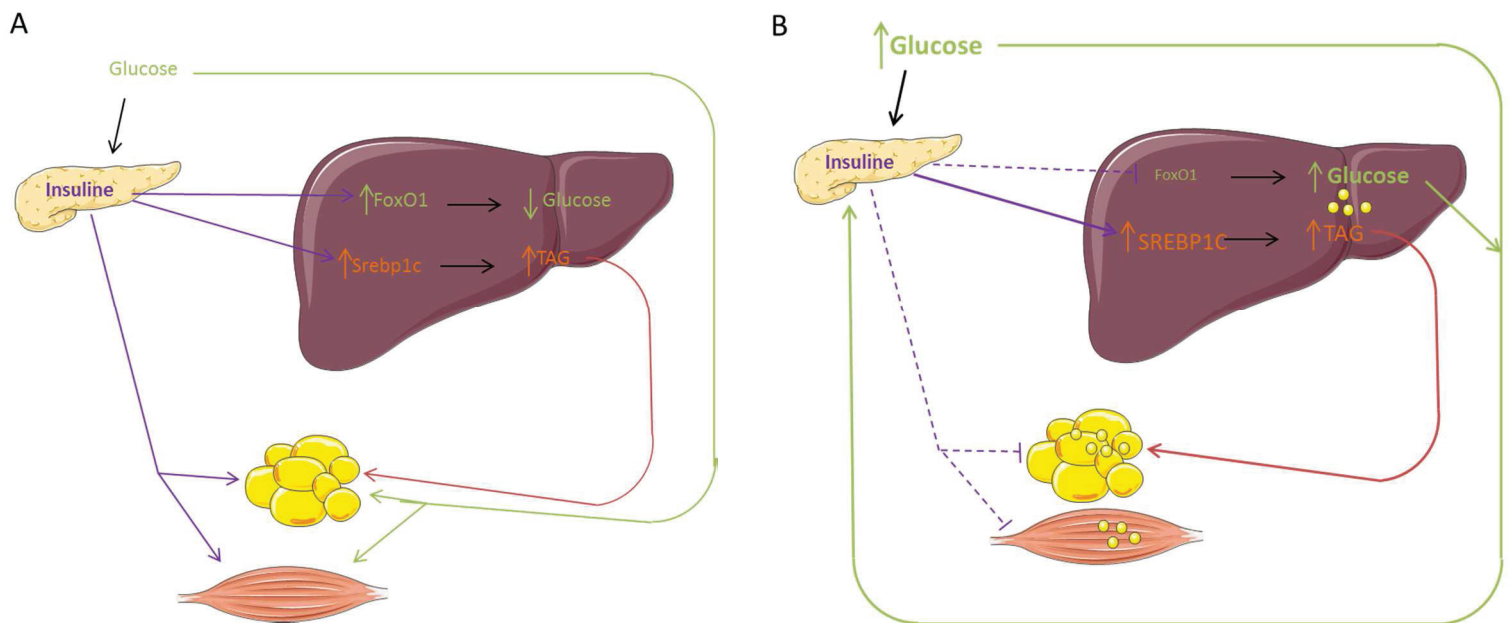


Figure 3 : Voie de signalisation de l'insuline. La liaison de l'insuline sur son récepteur induit son autophosphorylation. Le récepteur activé phosphoryle ensuite les protéines IRS (Insulin Receptor Substrate) sur les résidus tyrosines, permettant le recrutement à la membrane et l'activation de la protéine PI3K (phosphatidylinositol 3 kinase). Ceci permet l'activation de la protéine AKT par les phosphorylations par PDK1 (Phosphoinositide-dependent protein Kinase 1) et mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2). L'activation de cette voie de signalisation résulte en capture du glucose sanguin, synthèse de glycogène, activation de la lipogenèse et en une inhibition de la lipolyse et de la néoglucogenèse selon les organes regardés.

AS160 : Akt substrate of 160 kDa, FOXO1 : Forkhead box O1, GSK : Glycogène Synthase Kinase, PDE-3B : phosphodiesterase 3B, PIP2 : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PIP3 : Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate, Srebp-1c : Sterol regulatory element-binding protein 1c

### i. Le foie dans un état d'insulino-résistance

Les souris sous régime *high fat* ou les souris db/db (déficient pour la leptine) ou ob/ob (déficient pour le récepteur de la leptine) sont obèses et présentent des forts taux d'insuline circulante alors même que la production hépatique de glucose n'est plus inhibée, ce qui illustre la résistance à l'insuline. Cependant, l'insuline continue d'entraîner l'activation de *Srebp1c* et par conséquent l'augmentation de la lipogenèse *de novo* provoquant une hypertriglycéridémie hépatique et plasmatique en plus de l'hyperglycémie. Cette insulino-résistance sélective est caractéristique du foie insulino-résistant (Brown and Goldstein, 2008) (voir figure 4).



**Figure 4 : Modèle illustrant la résistance à l'insuline sélective. (A) Réponse normale du foie à une charge en glucose. L'insuline mène à une diminution de la néoglucogenèse et une augmentation de la synthèse des acides gras et des TAG. (B) La résistance à l'insuline hépatique sélective. L'insuline n'inhibe plus la néoglucogenèse mais continue de stimuler la production d'acides gras et de TAG. Ceci mène à une hyperglycémie et une hypertriglycéridémie. (Adapté de Brown et Goldstein, 2008)**

Le développement de souris invalidées pour le récepteur à l'insuline a permis de développer des souris diabétiques non-obèses sous régime standard. On a ici une insulino-résistance hépatique totale. Les souris ont une production hépatique de glucose augmentée et une lipogenèse *de novo* diminuée. Les souris sont donc hyperglycémiques, intolérantes au glucose et présentent une diminution des TAG hépatiques et plasmatiques (Biddinger et al., 2008).

Les causes de la résistance à l'insuline sélective ne sont pas encore bien comprises. Les deux modèles présentés suggèrent que l'obésité peut avoir un rôle dans le développement de la résistance à l'insuline sélective du foie. Récemment, Pajvani et ses collaborateurs ont montré que l'obésité chez les souris stimule la signalisation du récepteur Notch1 dans le foie. Cette activation résulte en l'activation de SREBP-1c via la stabilisation du complexe mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*) (Czech, 2013; Pajvani et al., 2013), de manière indépendante de l'activation de la signalisation de l'insuline.

Plus récemment, l'inactivation du *growth factor receptor binding protein 14* (GRB14) spécifiquement dans le foie chez des souris contrôles se caractérise par une stimulation de l'inhibition de la production hépatique de glucose et une inhibition de la lipogenèse *de novo*. GRB14 pourrait donc être une composante de la résistance à l'insuline sélective du foie. Précisément, les auteurs montrent que l'inhibition de l'expression de Grb14 entraîne à une activation du facteur de transcription *nuclear factor erythroid-2-related factor 2* (NRF2) qui vient réprimer l'activité lipogénique du *liver X receptor* (LXR) (Popineau et al., 2016).

## **ii. Le tissu adipeux dans un état d'insulino-résistance**

Le tissu adipeux est un organe endocrine. Il sécrète notamment la leptine qui induit la satiété, l'adiponectine qui sensibilise les organes à l'action de l'insuline et des cytokines pro-inflammatoires (dont le *Tumor Necrosis  $\alpha$*  – TNF $\alpha$  - et l'*Interleukine 6* - IL6)

Lorsque le tissu adipeux est insulino-résistant, l'absorption des lipides circulants n'est plus stimulée et la lipolyse n'est plus inhibée. Il en résulte une hyperlipidémie et un afflux des lipides vers les autres organes (foie, muscles...). Ce stockage ectopique des lipides dégrade la sensibilité à l'insuline de ces tissus. On parle alors de lipotoxicité (Lee et al., 2013).

Le tissu adipeux insulino-résistant se caractérise par la présence d'une inflammation chronique à bas bruit, qui aggrave l'insulino-résistance systémique. Cette inflammation peut être causée par l'hypertrophie des adipocytes qui entraîne une hypoxie des régions les plus éloignées des zones vascularisées et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et chemoattractantes. Ces deux événements mènent à une infiltration macrophagique et à une activation des macrophages résidents en macrophage de type inflammatoire M1 (Cinti et al., 2005; Pang et al., 2008; Strissel et al., 2007), à l'origine de l'inflammation chronique à bas bruit.

- L'accumulation excessive de graisse au niveau du tissu adipeux viscéral (TAV) est délétère sur le plan métabolique : les individus masculins accumulant du TAV

présentent des complications plus sévères que les individus accumulant du tissu adipeux sous-cutané (TAsc) (Després and Lemieux, 2006). Le TAv exprime de manière plus importante l'IL6 et le TNF $\alpha$  que le tissu adipeux sous-cutané (TAsc) et a donc un phénotype plus inflammatoire (Kershaw and Flier, 2004).

- les molécules sécrétées par le TAv sont directement relâchées dans la veine porte et ont par conséquent un accès direct au foie alors que celles sécrétées par le TAsc le sont dans la circulation systémique (Kershaw and Flier, 2004), ce qui est cohérent avec un impact hépatique plus important lors d'un dysfonctionnement du TAv.

L'accumulation de graisse au niveau du TAv modifie également la fonction endocrine du tissu adipeux. L'expression de la leptine augmente avec l'augmentation de la masse de tissu adipeux. En revanche, l'obésité est associée avec l'apparition d'une résistance à l'action de cette hormone. La production d'adiponectine est diminuée avec le développement du tissu adipeux, ce qui participe aussi au développement de l'insulino-résistance (Kershaw and Flier, 2004).

### *iii. Le muscle insulino-résistant*

Le muscle squelettique est responsable de 80 % de l'absorption du glucose stimulé par l'insuline et l'hyperglycémie est la principale conséquence d'une insulino-résistance musculaire.

Cependant, l'inactivation du récepteur à l'insuline spécifiquement dans le muscle (souris MIRKO) n'entraîne pas d'hyperglycémie malgré une diminution de 80 % de l'absorption musculaire du glucose et de la synthèse de glycogène (Kim et al., 2000). En revanche, ces souris présentent davantage de tissu adipeux. On observe une augmentation de 48 % du nombre d'adipocytes dans le TAv. De façon intéressante, ceci s'accompagne également d'une augmentation des taux d'adiponectine circulants (Cariou et al., 2004), qui sensibilisent les différents tissus à l'insuline. Ceci pourrait expliquer que ces souris ne présentent pas d'hyperinsulinémie. Cette étude indique donc que l'absence de réponse à l'insuline dans le muscle peut être compensée par le développement du TAv, et suggère donc que les complications métaboliques ne seront visibles que lorsque le TAv développera une insulino-résistance.



#### iv. Les causes de l'insulino-résistance

Plusieurs éléments ont été identifiés à l'origine de l'insulino-résistance (Castro et al., 2014; Guo, 2013; Rieusset, 2015) et sont représentés dans la figure 5. Nous détaillons ici la lipotoxicité et l'inflammation.

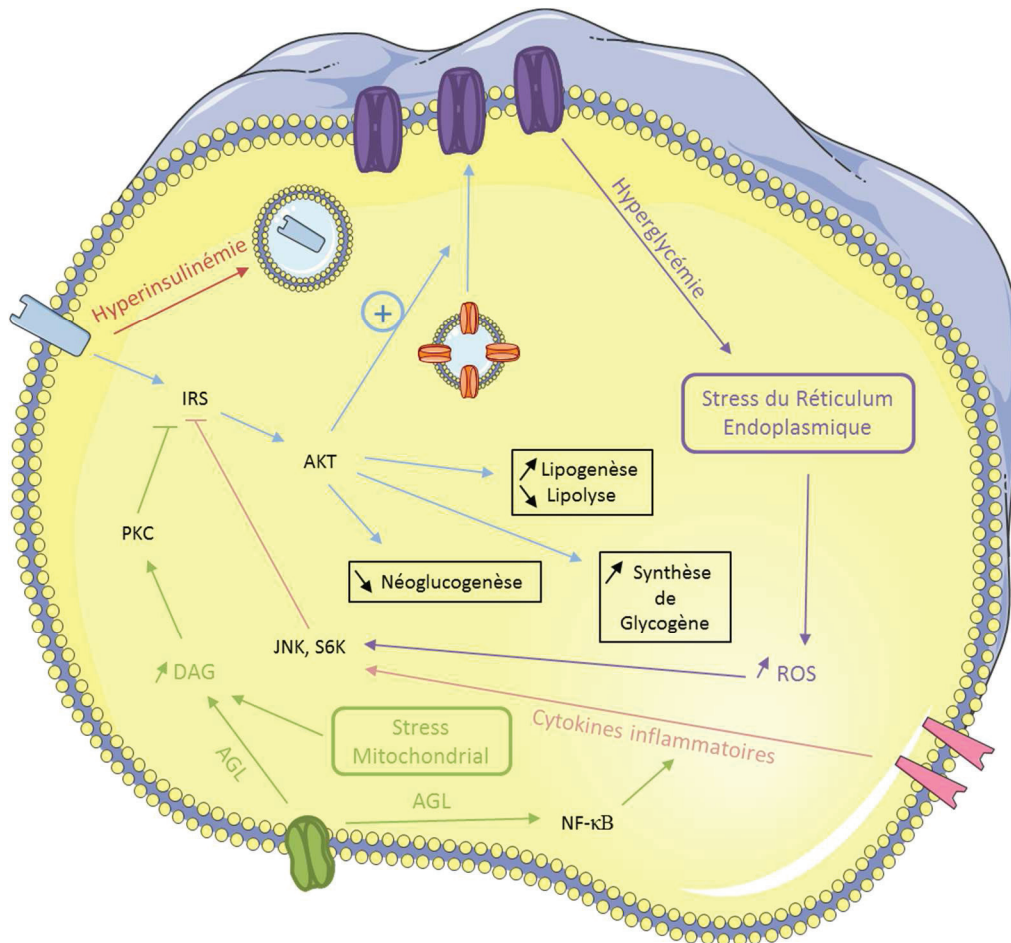


Figure 5 : Résumé des principaux mécanismes de l'insulino-résistance dans une cellule hypothétique.

L'hyperinsulinémie provoque l'internalisation et la dégradation du récepteur à l'insuline. L'hyperglycémie chronique entraîne la glycosylation des protéines et un stress du RE, conduisant à l'augmentation des ROS. Les ROS et l'activation des récepteurs TLR4 par les cytokines pro-inflammatoires mènent à l'activation de JNK et S66K qui diminuent les taux de IRS dans la cellule. L'augmentation des acides gras libres dans la cellule entraîne l'activation de NF-kB et à la production de DAG. NF-kB active la transcription des cytokines pro-inflammatoires. L'augmentation de la quantité de DAG active la PKC, qui diminue les taux de IRS cellulaire et donc la signalisation de l'insuline. (Adapté de Castro et al., 2014)

Lipotoxicité : Une élévation de la concentration plasmatique en acides gras libres ou de leur stockage ectopique dans le foie ou le muscle squelettique sont des éléments menant à l'insulino-résistance. Ainsi, la perfusion d'acides gras libres chez le rat entraîne une insulino-résistance du muscle squelettique, via l'activation de la Protéine Kinase C (PKC) $\theta$  (Griffin et

al., 1999) qui va diminuer la phosphorylation des protéines IRS1 et 2 stimulées par l'insuline, et entraîne une insulino-résistance (Yu et al., 2002).

Les acides gras n'activent pas directement la PKC : leur augmentation entraîne la formation de diacylglycérides (DAG), qui sont des puissants activateurs des différents isoformes PKC (Boden, 2011). De fait, la surexpression de l'enzyme DGAT (qui convertit les DAG en TAG) dans le muscle squelettique diminue les taux de DAG cellulaire et protège ainsi la souris de l'insulino-résistance induite par un régime gras (Liu et al., 2007).

Il a été montré que les acides gras saturés sont capables d'induire l'activation du récepteur *Toll-like receptor* (TLR4), ce qui conduit à l'activation de *nuclear factor-kappa B* (NF- $\kappa$ B) (Pal et al., 2012). Or, NF- $\kappa$ B joue un rôle majeur dans le contrôle de la réponse pro-inflammatoire, puisque son activation mène à la sécrétion de molécules pro-inflammatoires (comme le TNF $\alpha$ ), exacerbant alors l'insulino-résistance provoquée par les acides gras.

Inflammation : Le développement de l'obésité et de l'insulino-résistance est associé à une inflammation chronique à bas bruit, et notamment à une élévation des cytokines TNF $\alpha$  et d'IL6 (Romeo et al., 2012). Ainsi, la stimulation de cellules en culture par du TNF $\alpha$  est aujourd'hui couramment utilisé pour induire une insulino-résistance (Feinstein et al., 1993). De même, les souris n'exprimant pas TNF $\alpha$  de manière constitutive sont protégées contre l'insulino-résistance induite par un régime gras (Uysal et al., 1997). D'un point de vue moléculaire, les cytokines inflammatoires activent les protéines c-Jun N-terminal kinases (JNK), P70-S6 Kinase 1 (S6K) qui phosphorylent la protéine IRS1 sur la sérine 270, ce qui conduit à sa dégradation et donc à une perte de la réponse insulinique (Chen et al., 2015).

## C. Le métabolisme du cholestérol

Le cholestérol est essentiel à l'organisme : il est un composant des membranes cellulaires, il participe à la fluidité membranaire, il est le précurseur des hormones stéroïdiennes et il a un rôle antioxydant. Cependant, il est toxique en excès et on observe la formation de plaques d'athéromes responsables des accidents cardio-vasculaires.

### 1. Régulation du cholestérol plasmatique

Le transport du cholestérol dans le sang est assuré par les lipoprotéines. Les lipoprotéines sont des complexes lipides-protéines formant des vésicules et permettant le transport des lipides hydrophobes dans le sang. Elles sont composées :

- d'un cœur hydrophobe contenant principalement des TAG et des esters de cholestérol
- d'une couche de phospholipides et de cholestérol libre
- de protéines appelées apolipoprotéines (Apo).

Les lipoprotéines sont classées en fonction de leur densité. Elles diffèrent selon leur contenu lipidique et les Apo associées (voir figure 6 et tableau 2). On distingue les *very low density lipoprotein* (VLDL), les *low density lipoprotein* (LDL), les *high density lipoprotein* (HDL). Le foie secrète les VLDL riches en TAG et en cholestérol dans la circulation. Au niveau du tissu adipeux, la Lipoprotéine Lipase (LPL) hydrolyse les TAG contenus dans les VLDL, aboutissant à la formation de LDL, enrichis en cholestérol.

Les travaux de Brown et Goldstein réalisés à partir de biopsies de la peau provenant de patients atteints d'hypercholestérolémie sévère familiale (HCF), ont mis en évidence que les fibroblastes provenant de patients HCF n'étaient pas capables de récupérer le cholestérol contenu dans les LDL présents dans le milieu de culture, contrairement aux fibroblastes normaux (Goldstein and Brown, 1973). Cette observation a permis la découverte du récepteur aux LDL (LDLR) et à la compréhension de l'anomalie chez les patients HCF (Brown and Goldstein, 1974). En effet, le LDLR reconnaît la protéine ApoB présente à la surface des LDL. Après fixation sur son récepteur, la LDL pénètre la cellule par endocytose où elle est dégradée par les lysosomes. Le cholestérol est alors libéré dans la cellule et le LDLR recyclé à la membrane (Anderson et al., 1977).

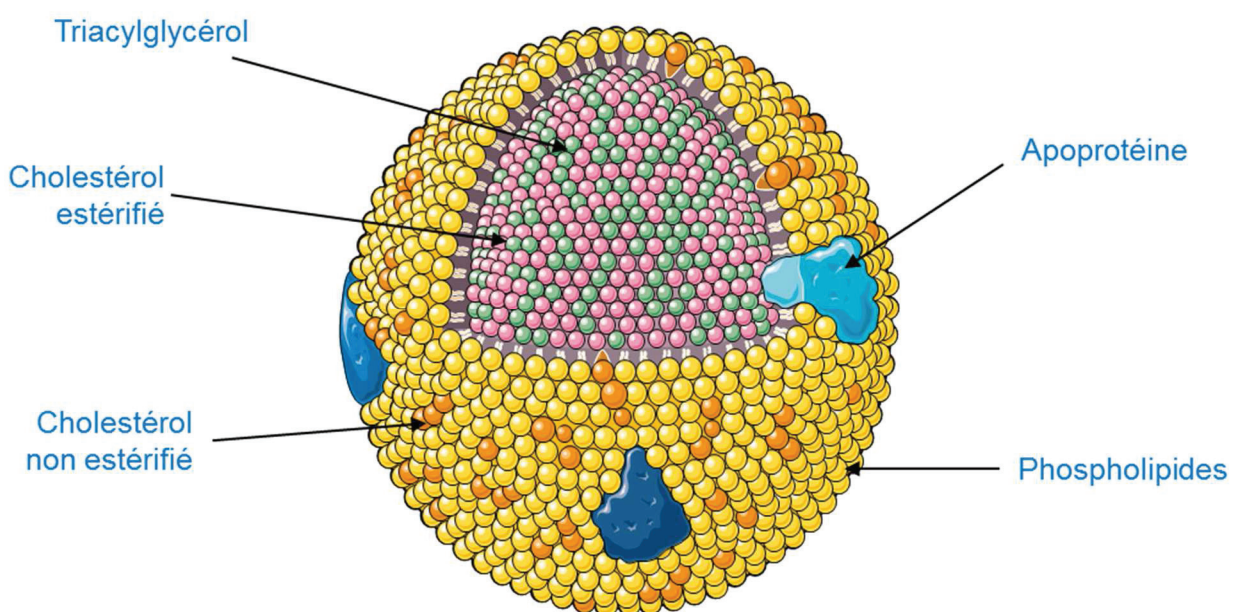


Figure 6 : Représentation schématique d'une lipoprotéine

Nom	Masse volumique (g/ml)	Diamètre (nm)	Lipides majoritaires	Apolipoprotéine(s) majoritaire(s)	Source
Chylomicrons	< 0,95	100 - 1000	TAG	ApoA1, ApoA2, ApoA4, ApoC1, ApoC2, ApoC3, ApoB48, ApoE	Intestin
Lipoprotéines de très basse densité (VLDL)	0,95 - 1,006	30 - 80	TAG	ApoB100, ApoE, ApoC1, ApoC2, ApoC3	Foie
Lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL)	1,006 - 1,019	25 - 50	CE	ApoB100, ApoE, ApoC	Catabolisme des VLDL
Lipoprotéines de basse densité (LDL)	1,019 - 1,063	18 - 28	CE	ApoB100	Catabolisme des IDL
Lipoprotéines de haute densité (HDL)	> 1,063	5 - 15	CE, PL	ApoA1, ApoA2, ApoA4, ApoC1, ApoC2, ApoC3, ApoE	Foie, intestin

**Tableau 2 : Caractéristiques des différentes lipoprotéines. Apo : Apolipoprotéine, CE : Ester de cholestérol, PL : Phospholipide, TAG : Triacylglycérol**

C'est la *proprotein convertase subtilisine/kexine type 9* (PCSK9) qui régule le recyclage du LDLR à la membrane. Le PCSK9 est sécrétée dans le sang par le foie (Zaid et al., 2008). Ainsi, PCSK9 se lie au LDLR et perturbe le recyclage à la membrane du récepteur (Horton et al., 2009), résultant en une diminution des LDLR et une augmentation des LDL dans la circulation. Les patients présentant des mutations augmentant l'activité de la PCSK9 ont une augmentation des LDL plasmatiques. A l'inverse, les personnes dont la protéine PCSK9 est inactive ont une diminution des taux de LDL et donc des risques cardio-vasculaires (Goldstein and Brown, 2015; Horton et al., 2009).

Les HDL participent au *reverse cholesterol transport* (RCT), c'est-à-dire au transport du cholestérol des organes périphériques vers le foie, exerçant ainsi une action antiathérogène. Les HDL sont sécrétées par le foie sous la forme de HDL immatures. Dans la circulation, les HDL récupèrent du cholestérol provenant des LDL, des membranes ou des *foam cells*, qui sont des macrophages ayant phagocyté des LDL oxydées, responsables des plaques d'athéromes. Les HDL interagissent avec le transporteur *ATP Binding Cassette* (ABC)A1 des *foam cells* qui permet le transfert du cholestérol de ces macrophages à la membrane des HDL (Phillips, 2014). Les particules HDL deviennent matures en augmentant leur taille au fur et à mesure qu'elles incorporent du cholestérol (Lee-Rueckert et al., 2016). Les HDL matures sont

reconnus au niveau du foie par le récepteur *Scavenger receptor class B member 1* (SR-B1). Une fois fixées, les HDL sont endocytées et le cholestérol est dégradé en acides biliaries.

## 2. Régulation de la synthèse du cholestérol

Lorsque l'apport alimentaire en cholestérol est insuffisant, le foie en néosynthétise. Cette voie métabolique existe dans toutes les cellules, notamment pour assurer les fonctions de division cellulaires (Fernández et al., 2004). La voie de synthèse du cholestérol est représentée dans la figure 7.

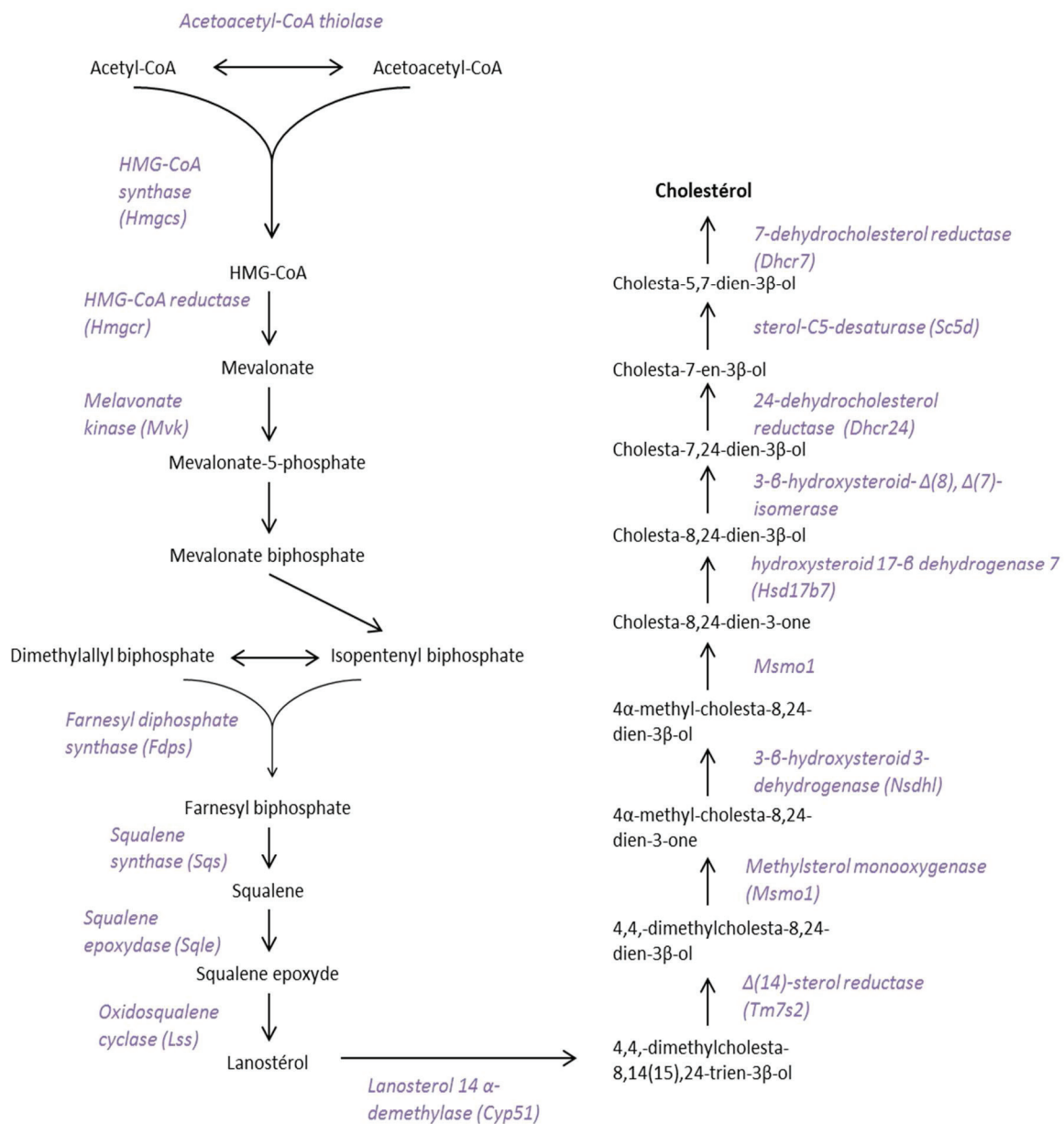


Figure 7 : Voie de synthèse du cholestérol. Les enzymes figurent en violet et les métabolites en noir

Parmi toutes les enzymes de la voie de synthèse du cholestérol, la 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (Hmgcr) est l'enzyme limitante et son expression est régulée par *sterol regulatory element-binding protein* (SREBP)-2. Il existe trois isoformes de SREBP :

- SREBP-1a
- SREBP-1c est exprimé majoritairement dans le foie et est impliqué dans la régulation de la lipogenèse sous l'action de l'insuline
- SREBP-2 qui régule la synthèse du cholestérol

Les SREBP sont synthétisés sous la forme de protéines membranaires ancrées à la membrane du réticulum endoplasmique (RE). L'extrémité N-terminale contient le domaine basique hélice-boucle-hélice (bHLH) qui est le domaine se liant à l'ADN et activant la transcription. L'extrémité C-terminale contient un domaine régulateur situé dans le cytosol. Dans la membrane du RE, SREBP se lie à la protéine *SREBP cleavage-activating protein* (SCAP) dont l'extrémité C-terminale interagit avec celle de SREBP (Hua et al., 1996; Sakai et al., 1998). Ce complexe interagit avec le complexe protéique COP-II, qui recouvre des vésicules (Sun et al., 2007). Ces vésicules transportent le complexe SCAP/SREBP2 vers l'appareil de Golgi. Dans cet organite, SREBP subit deux clivages par les protéases S1P et S2P, libérant le domaine bHLH qui peut alors entrer dans le noyau et activer la transcription des gènes cibles comme Ldlr, Hmgcr et Pcsk9.

SCAP joue un rôle clé dans la régulation de l'activation de SREBP en se comportant comme un senseur de cholestérol. Lorsque la composition de la membrane du RE atteint 5 % de cholestérol, ce dernier se lie à SCAP. Cette liaison induit un changement de conformation, empêchant l'interaction entre SCAP et COP-II. Dans cette conformation, la protéine *insulin-induced gene* (INSIG) interagit avec SCAP et stabilise la conformation, piégeant SCAP/SREBP2 dans la RE (Motamed et al., 2011) (voir figure 8).

Ainsi, lorsque la cellule contient suffisamment de cholestérol, SREBP-2 reste ancré à la membrane et n'active pas la transcription des gènes clefs comme Hmgcr et Ldlr. Lorsque la concentration en cholestérol diminue, SREBP-2 est clivée et active la transcription de Ldlr et Hmgcr, augmentant la capture de cholestérol depuis la circulation et la synthèse de celui-ci (figure 9).

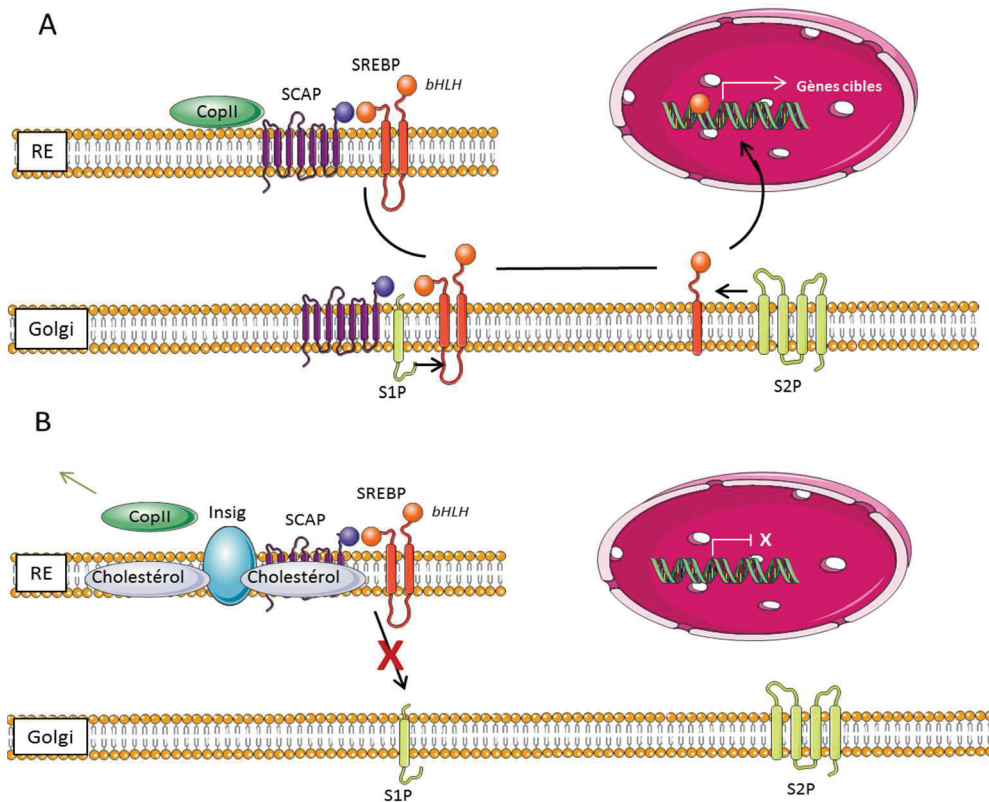


Figure 8 : Mécanisme d'activation de SREBP. (A) Lors d'un manque de cholestérol, SCAP se lie à COPII et incorpore le complexe SCAP/SREBP dans les vésicules, COPII, permettant la migration vers l'appareil de Golgi. Dans l'appareil de Golgi, SREBP est clivée par deux protéases S1P e S2P, libérant le domaine bHLH qui peut alors entrer dans le noyau et activer les gènes cibles. (B) Lors d'un excès de cholestérol (plus de 5% de cholestérol dans la membrane du RE) le cholestérol lie SCAP, entraînant l'interaction entre SCAP et INSIG. Ceci libère les protéines COPII, empêchant le transport du complexe SCAP/SREBP vers l'appareil de Golgi. (Adapté de Goldstein et Brown, 2015)

A Faible apport alimentaire de cholestérol

B Fort apport alimentaire de cholestérol

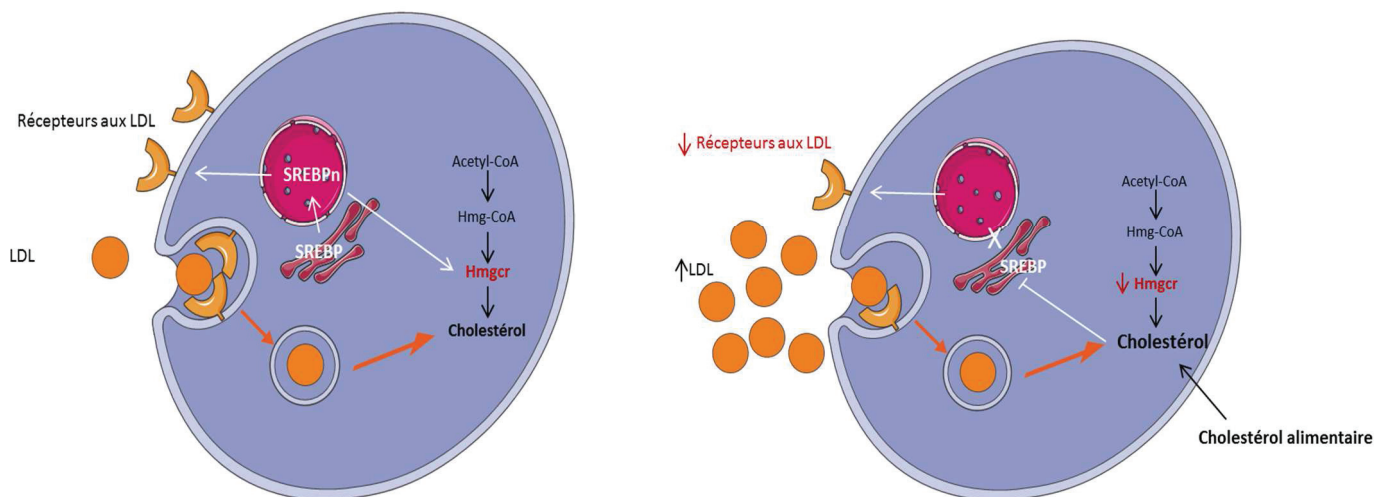


Figure 9 : Régulation de la voie de cholestérol par l'apport alimentaire. (A) Faible apport alimentaire de cholestérol. SREBP clivée entre dans le noyau et active l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol. SREBPn : domaine bHLH de SREBP obtenue après clivage. (B) Fort apport alimentaire de cholestérol. Le clivage de SREBP diminue résultant en une diminution de SREBPn et de l'activation des gènes cibles. La réduction du nombre de récepteurs aux LDL augmente la quantité de LDL plasmatique. (Adapté de Goldstein et Brown, 2015)

### 3. Elimination du cholestérol

La transformation du cholestérol en acides biliaires est l'unique voie de dégradation du cholestérol. L'homme synthétise entre 200 et 600 mg d'acides biliaires par jour et en élimine autant dans les selles.

La présence d'oxystérols dans la cellule, formés par oxydation spontanée ou enzymatique du cholestérol, active la voie de synthèse des acides biliaires en se fixant et en activant les *Liver X receptor* (LXR)  $\alpha$  et  $\beta$ . Dans le foie, l'activation des LXR entraîne la transcription gènes codant pour les transporteurs ABCA1, ABCG1, ABCG5 et ABCG8, qui permettent le transport du cholestérol vers le plasma et la vésicule biliaire, diminuant la quantité de cholestérol intrahépatique (Repa et al., 2002). LXR inhibe également l'apport de cholestérol en inhibant l'expression de Ldlr (Zhang et al., 2012) et des principaux gènes de la biosynthèse du cholestérol (Alberti et al., 2001; Peet et al., 1998). Ainsi, chez la souris, LXR $\alpha$  active la synthèse des acides biliaires en simulant l'expression de Cyp7a1. Ceci a été démontré en utilisant les souris KO pour LXR $\alpha$  qui sont incapables d'induire l'expression de Cyp7a1 (Peet et al., 1998). L'analyse des promoteurs de Cyp7a1 a mis en évidence l'existence de deux éléments de réponses aux LXR (Chiang et al., 2001). Ceci explique que l'inactivation de LXR $\alpha$  chez la souris nourrie au régime gras, source importante de cholestérol, induit une importante accumulation de cholestérol dans le foie (Korach-André et al., 2010).

Les acides biliaires sont des détergents et sont par conséquent toxiques pour la cellule. Ils se fixent et activent le *Farnesoid X receptor* (FXR). FXR induit l'expression de *small heterodimer partner* (SHP), un récepteur nucléaire atypique qui ne possède pas de domaine de liaison à l'ADN. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine suivie d'un séquençage haut-débit (ChIP-seq) ont montré que SHP inhibe la transcription des gènes impliqués dans la biosynthèse des acides biliaires (Cyp7a1, Cyp7b1, Cyp2b1), dans leur conjugaison (Bat) et dans leur transport (Bsep, Ntcp, Mdr2) (Boulias et al., 2005). De fait, les souris dont FXR est inactif spécifiquement dans le foie présentent une augmentation des taux d'acides biliaires plasmatiques et hépatiques (Schmitt et al., 2015), délétère pour l'organisme à cause de leurs propriétés détergentes.

La figure 10 retrace les principales étapes de la régulation de l'élimination du cholestérol.



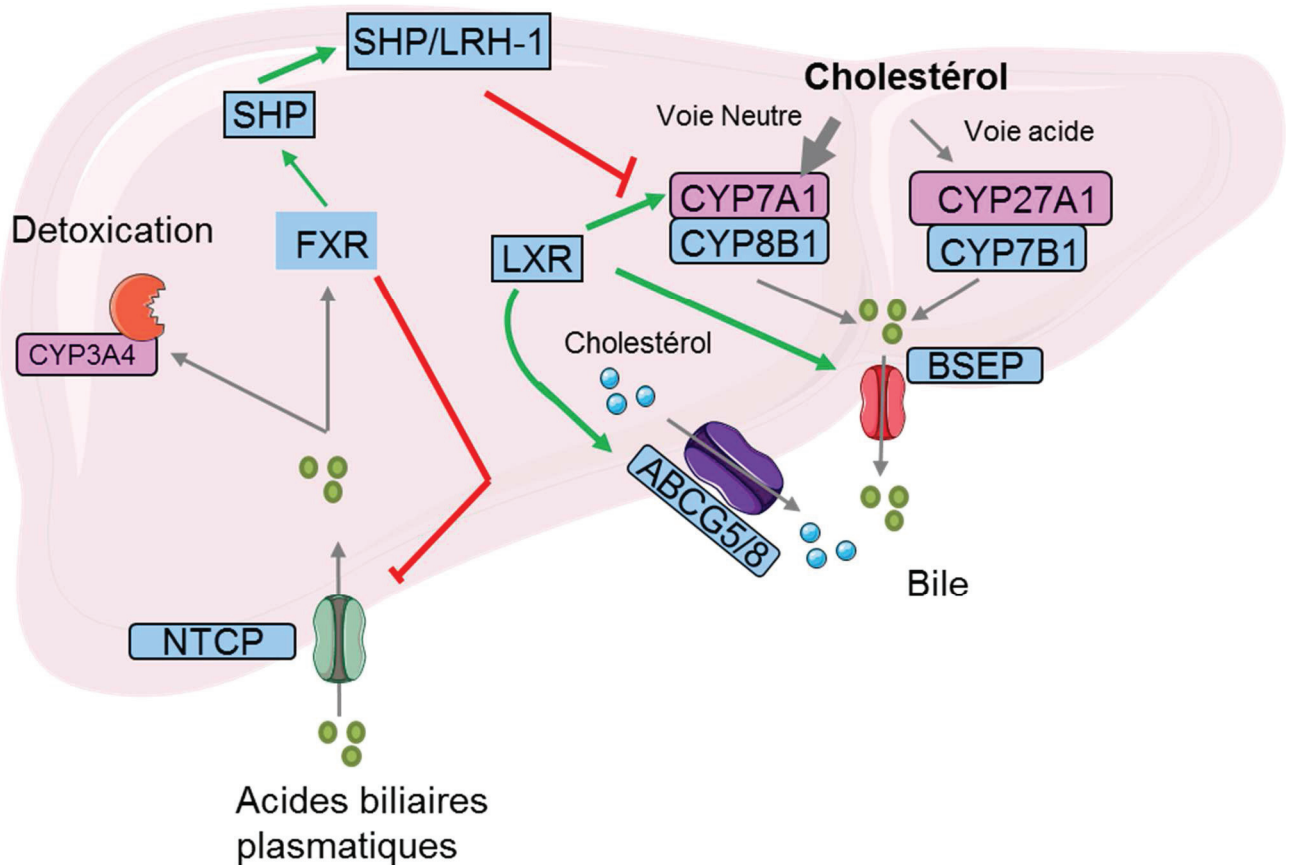


Figure 10 : Métabolisme du cholestérol. Dans le foie, le cholestérol est transformé en acides biliaries majoritairement par la voie neutre, puis est transporté dans la vésicule biliaire par le transporteur BSEP. Le cholestérol peut également être directement éliminé dans les sels biliaries via les récepteurs ABCG5/8. Les acides biliaries activent le récepteur nucléaire FXR qui, via la transcription de SHP, inhibe la production d'acides biliaries.

## D. Le dimorphisme sexuel

Le professeur Jean Vague montre en 1947 des formes différentes d'obésité entre les hommes et les femmes, notant que les femmes bien qu'ayant plus de masse grasse, sont moins sensibles aux complications métabolique de l'obésité (Vague, 1947). De fait, la prévalence de l'obésité est supérieure chez les femmes alors que la prévalence du diabète reste plus élevée chez les hommes (NCD Risk Factor Collaboration, 2016). La figure 11 récapitule les principales différences métaboliques entre les hommes et les femmes.

### 1. Sensibilité à l'insuline

Les femmes ne développent généralement pas d'hyperinsulinémie et l'incidence du diabète est inférieure chez les femmes avant la ménopause (Espeland et al., 1998). Après la

ménopause, la prévalence du diabète devient similaire chez les deux sexes, suggérant que les œstrogènes participent à l'action de sensibilisation des tissus à l'insuline.

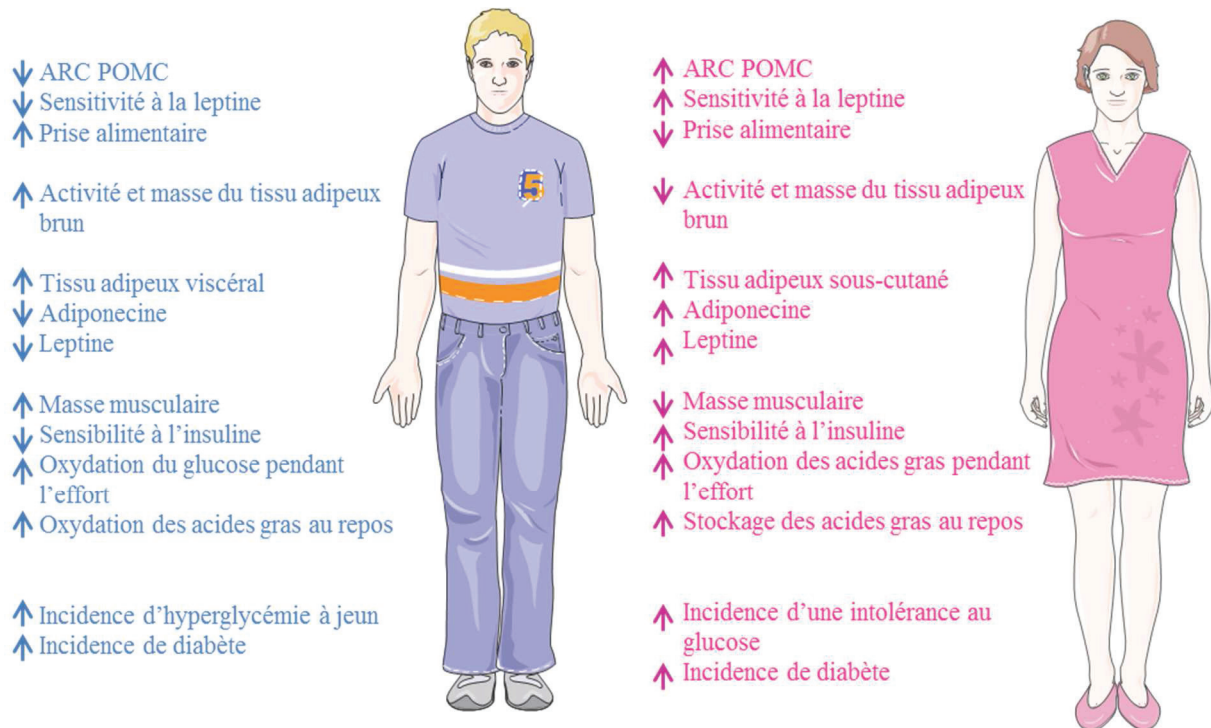


Figure 11 : Résumé du dimorphisme sexuel dans l'homéostasie métabolique, le diabète et l'obésité (Adapté de Mauvais-Jarvis, 2015)

Le lien entre le déficit œstrogénique ou sa signalisation et une résistance à l'insuline est démontré aussi bien chez l'Homme que chez le rongeur (Heine et al., 2000; Morishima et al., 1995; Smith et al., 1994). Les causes sont probablement multifactorielles. Chez les souris femelles n'exprimant pas le récepteur  $\alpha$  aux œstrogènes ( $ER\alpha$ ), l'insuline n'inhibe plus la production hépatique de glucose (Bryzgalova et al., 2006). Dans le même modèle il a été montré une accumulation de lipides pro-inflammatoires au niveau du muscle squelettique, à l'origine d'une insulino-résistance musculaire (Ribas et al., 2010). A l'inverse, l'administration chronique d'œstradiol chez les femelles ovariectomisées (OVX), même nourries avec un régime gras, améliore la tolérance au glucose et le niveau d'inflammation dans le tissu adipeux viscéral en comparaison de ces mêmes paramètres chez les souris OVX non traitées (Riant et al., 2009).

## 2. Les tissus adipeux

Les hommes accumulent plus de tissu adipeux viscéral (TAV, obésité androïde) alors que les femmes développent davantage le tissu adipeux sous-cutané (TAsc), notamment au niveau du bassin (obésité gynoïde). Ce dimorphisme est observé dès la puberté et jusqu'à la ménopause, ce qui suggère que les œstrogènes participent au développement du TAsc. A la ménopause, les lipides iront s'accumuler préférentiellement dans le TAV.

Le contrôle de la répartition des masses grasses se fait au niveau central. Ainsi, une étude menée chez le rat montre une augmentation de la masse du TAsc chez les mâles et les femelles OVX après une injection intracrânienne d'œstradiol (Clegg et al., 2006). De même et plus récemment, l'inactivation d'ER $\alpha$  spécifiquement dans les neurones hypothalamiques SF-1 (*Steroidogenic factor -1*) a montré un développement du tissu adipeux viscéral chez la souris femelle (Xu et al., 2011).

Par ailleurs, les régulations se font aussi au niveau systémique. La lipoprotéine lipase catalyse la réaction essentielle à l'accumulation des acides gras dans le tissu adipeux. Lors de la prise alimentaire, l'insuline stimule l'expression de la LPL dans le tissu adipeux et le muscle squelettique ainsi que sa migration vers la paroi vasculaire. Une fois ancrée à l'endothélium, la LPL hydrolyse les TAG présent dans les lipoprotéines, ce qui libère des acides gras libres qui peuvent pénétrer dans les cellules. Or, l'activité de la LPL est régulée par les hormones sexuelles. Chez les femmes, les œstrogènes stimulent l'activité de la LPL au niveau du TAsc, favorisant le stockage des lipides dans le TAsc des régions glutéales (Tessier et al., 2010). Chez les hommes, la testostérone inhibe l'activité de la LPL au niveau du TAsc situé dans la région fémorale (Ramirez et al., 1997), ce qui aboutit à une activité de la LPL plus forte au niveau du TAV qu'au niveau des autres tissus adipeux (Arner et al., 1991).

## 3. Balance énergétique

Chez les mammifères, les mâles consomment plus de nourriture que les femelles (Wade, 1972). Des études ont montré que le comportement alimentaire se mettait en place dès la naissance et se manifestait par un pic de sécrétion de dihydrotestostérone (DHT) périnatale (prénatal chez l'Homme et néonatale chez le rongeur) qui « masculinise » le comportement alimentaire (Mauvais-Jarvis, 2015). La prise alimentaire est contrôlée au niveau du noyau arqué dans l'hypothalamus par le neuropeptide pro-opiomélanocortine (POMC) qui a un effet

anorexigénique et par les neuropeptides AgRP (*agouti-related gene*) et NPY (*neuropeptide Y*) qui stimulent la prise alimentaire (Nestor et al., 2014). La leptine, produite par le tissu adipeux et induisant la satiété, stimule la production de POMC. La diminution de l'expression de POMC est associée à une augmentation de la prise alimentaire et les mâles ont une densité de POMC inférieure à celle des femelles (Nohara et al., 2011). Ainsi, les femelles présentent une meilleure sensibilité à l'action de la leptine (Clegg et al., 2003).

La régulation de la prise alimentaire par les œstrogènes s'effectue au moins au niveau des neurones POMC et AgRP/NPY du noyau arqué. Ainsi, la comparaison de souris OVX et des souris OVX stimulées aux œstrogènes a montré que les œstrogènes entraînent une augmentation du nombre des neurones POMC dans le noyau arqué chez les souris sauvages (Gao et al., 2007). A l'inverse, les souris OVX présentent une augmentation de l'expression de la production de NPY, qui n'est plus visible lorsque les souris OVX sont stimulées aux œstrogènes (Nestor et al., 2014). Ces deux actions des œstrogènes contribuent donc à diminuer la prise alimentaire.

#### 4. Substrat énergétique

La préférence du substrat énergétique est marquée sexuellement. Lors d'un effort, les femmes oxydent une plus grande proportion d'acide gras que de glucides, à l'inverse des hommes (Henderson, 2014). Chez les femmes ménopausées (Lovejoy et al., 2008) et les rongeurs ovariectomisés (Mauvais-Jarvis et al., 2013), l'oxydation des lipides diminue, suggérant l'implication des œstrogènes dans ce phénomène.

Cette différence est particulièrement mise en avant chez les souris invalidées pour le gène codant PPAR $\alpha$ , principal régulateur de l'oxydation des acides gras. Chez les mâles PPAR $\alpha$ <sup>-/-</sup>, l'inhibition de l'oxydation des lipides entraîne l'utilisation massive du glucose pour produire de l'énergie jusqu'à la mort par hypoglycémie. En revanche, cet effet n'est visible que dans 25 % des femelles PPAR $\alpha$ <sup>-/-</sup>, suggérant que 75% des femelles continuent d'oxyder des lipides. Ce phénotype n'est pas observé lorsque les mâles PPAR $\alpha$ <sup>-/-</sup> sont traités avec de l'œstradiol (Djouadi et al., 1998), illustrant bien le rôle des œstrogènes dans l'oxydation des lipides.

Il est suggéré que la préférence des femelles pour les acides gras comme carburant métabolique permettrait au glucose de ne pas être oxydé par le muscle, le préservant pour le fœtus et particulièrement le cerveau fœtal (Mauvais-Jarvis, 2015).

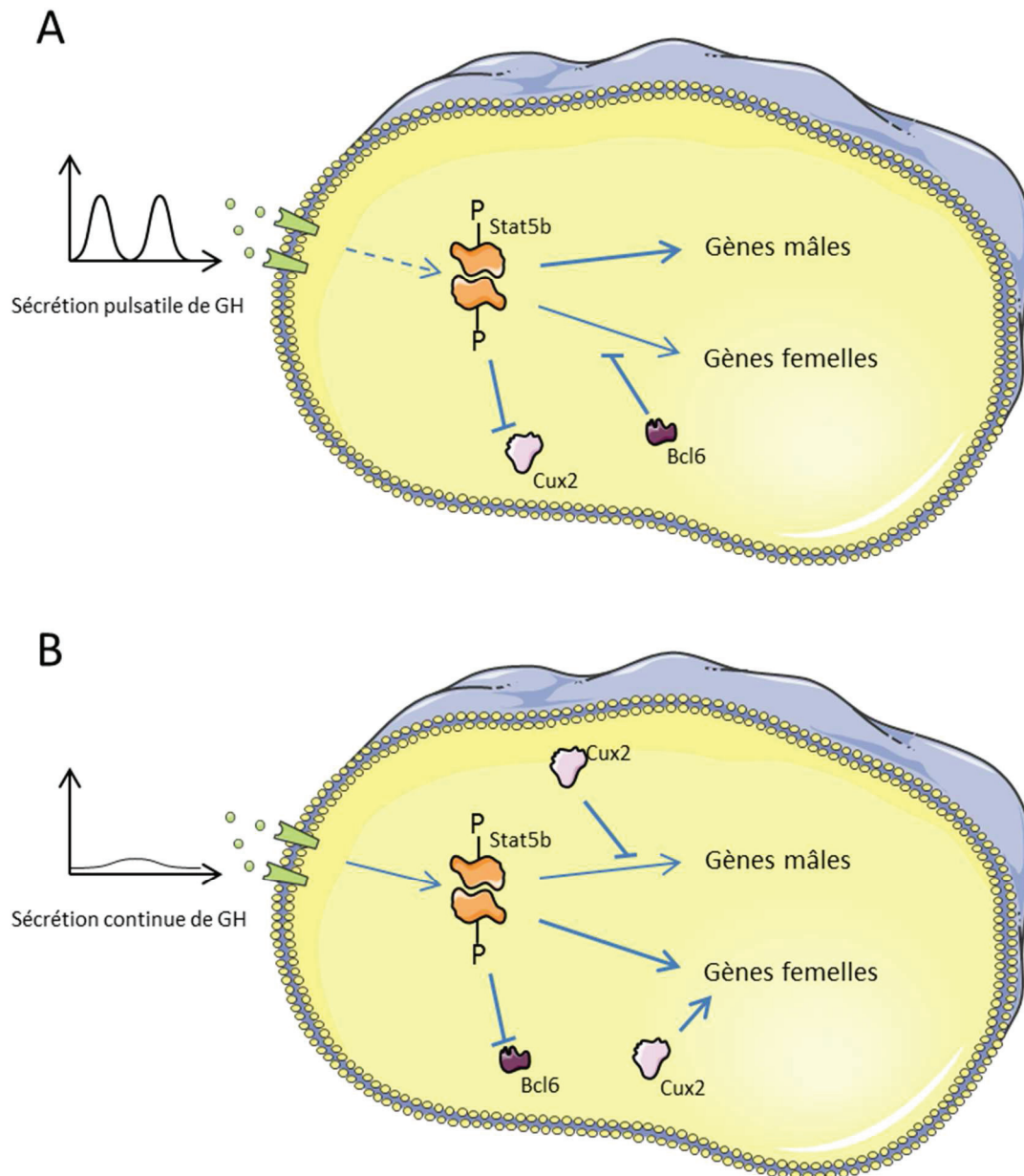
## 5. Le foie

Le dimorphisme sexuel dans le foie est régulé par le profil d'expression de l'hormone de croissance (GH), qui est pulsatile chez le mâle et continue chez la femelle (Waxman and O'Connor, 2006). La fixation de cette hormone sur son récepteur (GHR) active la tyrosine kinase JAK2 associée à GHR, entraînant la phosphorylation du facteur de transcription STAT5b. La phosphorylation de STAT5b entraîne sa dimérisation, sa translocation dans le noyau et l'activation de la transcription des gènes cibles (Waxman and O'Connor, 2006).

En réponse aux pics de GH, STAT5b va être activé également de façon pulsatile chez le mâle, entraînant l'expression des facteurs de transcription *Hepatocyte nuclear receptor* HNF6 et HNF4 $\alpha$ . Ensemble, ces trois facteurs de transcription vont activer l'expression de gènes qualifiés de gènes "masculins". Lorsque STAT5b n'est pas fonctionnel, 90% des gènes masculins sont sous-exprimés (Clodfelter et al., 2006). La pulsativité de l'activité de STAT5b active l'expression de *B-cell lymphoma 6 protein* (BCL6) (Zhang et al., 2011a), une protéine qui vient réprimer l'expression des gènes "féminins". Egalement, STAT5b empêche l'expression de CUX2 (Conforto et al., 2012), une protéine qui réprime l'expression des gènes "masculins" (voir figure 12A).

Chez les femelles, la GH est faiblement détectable dans le sang de manière continue menant à une faible mais persistante activation de STAT5b. L'activité persistante de STAT5b réprime l'expression de BCL6, favorisant l'expression des gènes "féminins" et permettant l'expression de CUX2, qui vient réprimer l'expression des gènes "masculins" (Conforto et al., 2012; Zhang et al., 2011a) (voir figure 12B).

Les travaux récents de Waxman et collaborateurs montrent que STAT5b, BCL6 et CUX2 participent au remodelage dépendant du sexe de la chromatine (Sugathan and Waxman, 2013; Zhang et al., 2011a). Ils mettent notamment en évidence que la répression des gènes "féminins" chez les mâles est associée à des modifications post-traductionnelles des histones (triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 ; H3K27me3) situées dans la région *enhancer* des gènes.



**Figure 12 : Signalisation GH chez les mâles et les femelles. (A) Chez le mâle. La pulsativité de sécrétion de GH mène à une activation pulsatile de Stat5b et de Bcl6 et réprime l'expression de Cux2. Bcl6 inhibe préférentiellement les gènes femelles. (B) Chez les femelles. La sécrétion de GH est continue, menant à une activité persistante de Stat5b qui réprime l'expression de Bcl6. Cux2 réprime 35 % des gènes mâles et induit l'expression de 36 % des gènes femelles. (Adapté de Conforto et al., 2012)**

Chez le rongeur, plus de 1000 gènes sont différenciellement exprimés selon le sexe. Ils sont impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques, des lipides et l'inflammation (Clodfelter et al., 2006; Wauthier and Waxman, 2008). Chez l'Homme, la différence des niveaux d'expression entre les gènes "masculins" et "féminins" est moins prononcée que chez le rongeur (Clodfelter et al., 2006; Zhang et al., 2011b). Il a été recensé plus de 1200 gènes qui présentent un dimorphisme sexuel. Ces gènes, dont 70 % sont des gènes féminins, sont impliqués essentiellement dans le métabolisme des lipides et des xénobiotiques. On note

particulièrement que les expressions hépatiques de *Ldlr*, *Abca1*, *Cyp7a1* sont supérieures chez les femmes que chez les hommes, ce qui est en accord avec le risque moindre d'accidents cardiovasculaires chez les femmes non-ménopausées (Zhang et al., 2011b).

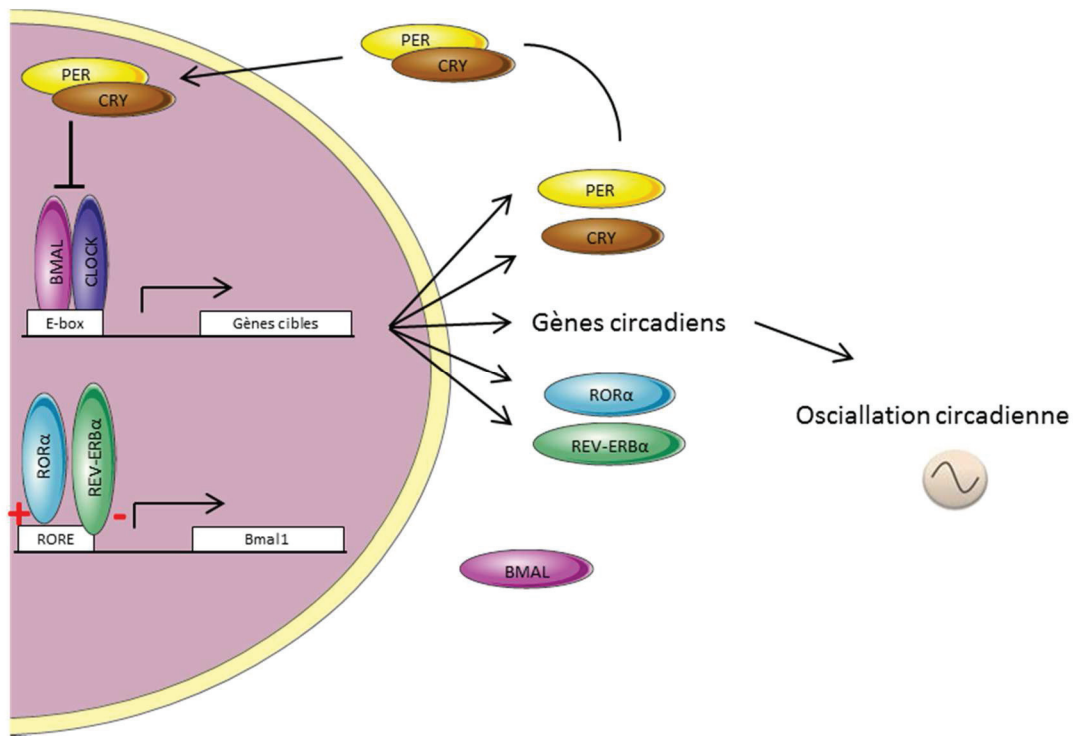
## E. Le cycle circadien

Un grand nombre de processus physiologiques suivent un rythme circadien, comme le sommeil, l'alimentation, la sécrétion des hormones...

Chaque cellule possède son horloge biologique et le fonctionnement synchrone de l'organisme repose sur la synchronisation de toutes les cellules. C'est le noyau suprachiasmatique, situé au-dessus du chiasma optique, qui assure la synchronisation des horloges en fonction des cycles jour / nuit. La nature précise des signaux permettant la synchronisation inter-organes et inter-cellules n'est pas encore bien élucidée, mais plusieurs études suggèrent l'implication d'une combinaison de facteurs hormonaux (notamment les glucocorticoïdes) et du système nerveux autonome périphérique (Husse et al., 2015; Ishida et al., 2005).

Le cœur de ce système est composé au niveau cellulaire de deux facteurs de transcription qui s'hétérodimérisent: *circadian locomotor output cycles protein* (CLOCK) et *brain and muscle ARNT-like1* (BMAL1). Ils activent la transcription de leur propre gène et des gènes codant *period encoding gene* (PER) et *cryptochrome* (CRY) via des séquences E-box présentes sur leur promoteur. PER et CRY dimérisent et perturbent le fonctionnement de CLOCK/BMAL1, inhibant leur transcription et leur activité. Le pic d'expression du complexe CLOCK/BMAL1 est décalé de 12 h du pic d'expression du complexe PER/CRY, ce qui permet un cycle de 24 h. Les expressions de *retinoid acid receptor-related orphan receptors* (ROR) et *reverse-ERB receptor* (REV-ERB) sont régulés par les boucles d'expression de CLOCK/BMAL1 et PER/CRY. ROR et REV-ERB activent et suppriment respectivement la transcription de CLOCK/BMAL1, impactant le rythme circadien (voir figure 13).

Le métabolisme énergétique est régulé de façon circadienne, et plusieurs études montrent que la perturbation du rythme circadien modifie le métabolisme énergétique. Par exemple, un modèle murin exempt de toute horloge cellulaire est obtenu en plaçant des souris n'exprimant pas le gène *Clock* constamment dans l'obscurité. En plus des dérèglements du sommeil et du comportement, ces souris deviennent hyperphages et obèses et développent un syndrome métabolique (Turek et al., 2005).



**Figure 13 :L'horloge moléculaire chez les mammifères. Le mécanisme moléculaire du rythme circadien fonctionne sur la transcription des gènes *Per* et *Cry* qui est activé par le complexe BMAL/CLOCK. PER et CRY inhibe l'action du complexe BMAL/CLOCK, inhibant leur propre transcription. Cette boucle est stabilisée par une boucle secondaire incluant les protéines REV-ERB et ROR qui affectent l'expression de BMAL. Ces boucles de régulation résultent en une oscillation d'approximativement 24h de l'activité du complexe BMAL/CLOCK et de ses gènes cibles.**

Le métabolisme lipidique semble être particulièrement sensible à une perturbation du rythme circadien. La perturbation du sommeil des souris pendant 6 jours entraînent une augmentation des niveaux plasmatiques de TAG et de cholestérol et des niveaux hépatiques des acides gras libres et des acides biliaires (Ferrell and Chiang, 2015). Il est probable que ces effets soient liés à la dérégulation du rythme circadien hépatique. En effet, l'horloge hépatique contrôle l'homéostasie des lipides via la régulation de l'expression des gènes impliqués dans les métabolismes des LDL [*Pcsk9*, *Ldlr* (Ma et al., 2015)], de la synthèse du cholestérol [*Hmgcr*, *Cyp51*, *Srebp-2* (Acimovic et al., 2008)], de la synthèse des acides biliaires [*Cyp7a1* (Yamada et al., 2000)], de la lipogenèse *de novo* [*Fasn*, *Scd1*, *Acaca* (Feng et al., 2011)] et de l'oxydation des lipides [*PPARα*, (Adamovich et al., 2015; Canaple et al., 2006)].

Chez le rat, environ 500 gènes ont une expression circadienne dans le foie (Nguyen et al., 2014). En dehors des gènes liés au métabolisme lipidique, l'horloge hépatique induit une expression cyclique des gènes impliqués dans les métabolismes du glucose, des acides aminés et des xénobiotiques (Reinke and Asher, 2016). Si l'horloge hépatique régule le métabolisme



énergétique, il a également été montré que les cycles d'alimentation et de jeûne régulent l'horloge hépatique.

Lorsque des souris sont nourries la journée (alors que naturellement elles mangent la nuit), un inversement du cycle circadien est observé dans les organes périphériques (foie, pancréas, reins et cœur), sans que le système nerveux central ne soit affecté (Damiola et al., 2000).

La consommation d'un régime gras génère également une perturbation de l'horloge hépatique. Ainsi, il a été montré que la consommation d'un régime gras chez la souris perturbe l'oscillation des transcrits, de sorte que certains gènes normalement non oscillants adoptent une expression circadienne (Eckel-Mahan et al., 2013). Ces travaux montrent également que la perturbation du rythme circadien causé par le régime gras apparaît avant l'obésité ou l'insulino-résistance hépatique, suggérant que la perturbation de l'horloge pourrait participer au développement des complications métaboliques.

## II. Les perturbateurs endocriniens : définitions et caractéristiques

Les premières relations entre les polluants et la perturbation du système endocrinien ont été faites sur la faune sauvage. En 1962, Rachel Carson publie *Silent Spring*, qui associe l'utilisation du pesticide dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) avec la raréfaction des rapaces dans la région des Grands Lacs d'Amérique du Nord. Plus tard, dans les années 1980, Louis Guillette observe dans le lac Apoka (Floride) une diminution importante du nombre d'alligators. L'observation de ces alligators montre un accroissement du nombre de mâles ayant un micro-pénis. De plus, l'analyse du sérum de ces animaux montre des niveaux 10 à 20 fois plus élevés de dichlorodiphényldichloroethylene (DDE, métabolite du DDT) comparé à celui des alligators des lacs voisins.

C'est à la conférence de Wingspread en 1991 que le terme de perturbateurs endocriniens a été utilisé pour la première fois (Colborn and Clement, 1992). Aujourd'hui près de 800 molécules sont suspectées ou connues pour être des perturbateurs endocriniens (Bergman et al., 2013). La définition la plus communément admise est celle de l'OMS proposée en 2002 : « un perturbateur endocrinien est une substance ou un mélange exogène, possédant des propriétés susceptibles d'induire une perturbation endocrinienne dans un organisme intact, chez ses descendants ou au sein de (sous)-populations ». L'EPA (Environmental Protection Agency) propose une autre définition : « agent exogène qui interfère avec la production, la libération, le transport, le métabolisme, la liaison ou l'élimination des ligands naturels responsables du maintien de l'homéostasie et de la régulation du développement de l'organisme ».

Ces définitions caractérisent un perturbateur endocrinien (PE) par ses effets et non par sa structure. Un grand nombre de molécules peut être défini comme perturbateur endocrinien. Le tableau 3 présente certains perturbateurs endocriniens classés en fonction de leurs propriétés chimiques et de leurs origines.

Classification	Exemple de PE
<u>Susbtances halogénées persistantes et bioaccumulation</u>	
Polluants organiques persistants (POP) (Convention de Stockholm)	PCDDs/PCDFs, PCBs, HCB, PFOS, PBDEs, PBB, Chlordane, Mirex, Taxophene, DDT/DDE, Lindane, Endosulfan
Autres polluants persistants	HBCDD, SCCP, PFCA, Octachlorostyrene, PCB methyl sulfones, TCDD
<u>Susbtances moins persistantes</u>	
Plastifiants	Phtalates (DEHP, BBP, DBP, DiNP) Triclocarban
Substances aromatiques polycycliques	Benzopyrène, benzoanthracene, pryène
Substances phénoliques halogénées	Diclorophenol, Triclosan
Substances non halogénées phénoliques	Bisphénol A, BPF, BPS, Nonylphenol, Résorcinol, BHA
<u>Pesticides, médicaments, additifs cosmétiques</u>	
Pesticides encore utilisés	Atrazine, Carbaryl, Malathion, Mancozeb, Vinclozolin, Prochloraz, Procymidone, Chlorpyrifos, Fenitrothion, Linuron
Médicaments, promoteurs de croissance, additifs cométiques	DES, Ethinylestradiol, tamoxifen, levonorgestrel, fluoxetine, flutamide, parabens, cyclic methyl silocane, galaxolide
<u>Autres substances</u>	
Métaux et organométalliques	Arsenic, cadmium, plomb, mercure, tributyltin
Hormones naturelles	17b-estradiol, estrone, testostérone
Phytoestrogènes	Isoflavones (genistéine), coumestrol, mycotoxines (zéaralénone)

Tableau 3 : Classification des différents perturbateurs endocriniens. (Adapté de Bergman et al., 2012)

## A. Les polluants, une source de PE

Les catastrophes industrielles mises à part, l'Homme est exposé aux polluants de **façon chronique** et à des **doses environnementales**. Une dose environnementale est par définition la dose à laquelle on est exposé via notre environnement. Elle représente généralement une dose faible, mais elle varie fortement en fonction du polluant considéré ainsi que de la localisation géographique. Par exemple, les habitants des milieux ruraux auront tendance à être plus exposés aux pesticides que les citadins. A l'inverse, la pollution atmosphérique est plus élevée dans les villes que dans les campagnes. De même, les pays en phase d'industrialisation sont davantage pollués que les pays occidentaux, ces derniers ayant davantage légiféré l'utilisation des polluants. De plus, même au sein d'une même région, les niveaux d'exposition peuvent différer selon les habitudes de la personne. L'alimentation est

une des voies majeure d'exposition et une personne qui mange préférentiellement des plats industriels sera plus exposée parce que cette nourriture est généralement plus riche en lipides (et contient donc plus de polluants lipophiles) et parce qu'elle est conditionnée dans des emballages alimentaires qui peuvent relarguer un certain nombre de PE.

Les problèmes liés à l'environnement ont pris une importance politique dès les années 60, avec l'apparition de la maladie de Minamata liée à l'intoxication au mercure. En effet, la consommation de poissons contaminés au mercure dans la baie de Minamata au Japon (qui provenait des déchets de l'entreprise pétrochimique Chisso rejetés dans la mer) a entraîné un empoisonnement en masse de la population locale. C'est en 1972 que l'organisation des nations unies (ONU) organise la première réunion internationale à but écologique.

Aujourd'hui, on retrouve des PE dans pratiquement tous les produits du quotidien (cosmétiques, solvants, peintures ou alimentation). Sur la base de leur biodégradation, on peut distinguer les polluants selon leur demi-vie, qui peut aller de quelques heures à plusieurs années.

Le terme de POP (Polluant Organique Persistant) regroupe les polluants lipophiles résistants à la dégradation environnementale et biologique. Leur demi-vie dans l'organisme est de plusieurs années (par exemple, chez l'homme la demi-vie des dioxines est de 7 à 11 ans et celle des polychlorobiphényles ou PCB peut aller jusqu'à 16 ans). Ils s'accumulent dans le tissu adipeux des organismes vivants et au travers de la chaîne alimentaire (Bergman et al., 2013) par le phénomène de bioaccumulation, illustré dans la figure 14.

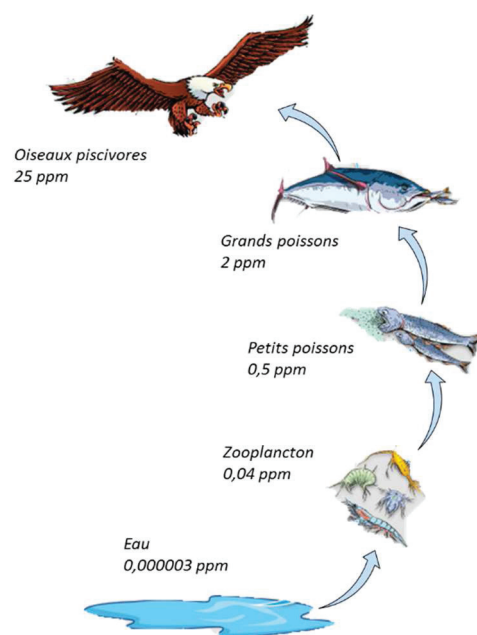


Figure 14: Exemple de la bioaccumulation au travers la chaîne alimentaire. Les taux de DDT sont donnés en parti pour million (ppm) pour les différents milieux et animaux

La catastrophe de Seveso et d'autres accidents industriels sont à l'origine de la convention de Stockholm, accord international signé en 2001. Son but est d'interdire ou de limiter l'utilisation de certains POP dangereux. En 2001, 12 POP étaient concernés par cet accord, auxquels se sont rajoutés par la suite 18 nouveaux polluants (voir tableau 4).

Réglementation	Polluant organique persistant	Année	Catégorie
Élimination	Aldrin	2001	Pesticide
Élimination	Chlordane	2001	Pesticide
Élimination	Chlordecone	2009	Pesticide
Élimination	Deldrin	2001	Pesticide
Élimination	Endrin	2001	Pesticide
Élimination	Heptachlor	2001	Pesticide
Élimination	Hexabromobiphenyl	2009	Produit chimique industriel
Élimination	Hexabromocyclododecane (HBCD)	2013	Produit secondaire
Élimination	Hexabromodiphenyl ether et heptabromodiphenyl ether	2009	Produit chimique industriel
Élimination	Hexachlorobenzene (HCB)	2001	Pesticide, produit chimique industriel, produit secondaire
Élimination	Hexachlorobutadiène	2015	Produit chimique industriel
Élimination	$\alpha$ -hexachlorocyclohexane	2009	Pesticide, produit secondaire
Élimination	$\beta$ -hexachlorocyclohexane	2009	Pesticide, produit secondaire
Élimination	Lindane	2009	Pesticide
Élimination	Mirex	2001	Pesticide
Élimination	Pentachlorobenzene	2009	Pesticide, produit chimique industriel, produit secondaire
Élimination	Pentachlorophenol et ses sels et esters	2015	Pesticide
Élimination	Polychlorobiphenyls (PCB)	2001	Produit chimique industriel, produit secondaire
Élimination	Naphtalènes polychlorés	2015	Produit chimique industriel, produit secondaire
Élimination	Endosulfan et ses isomères	2011	Pesticide
Élimination	Tetrabromodiphenyl ether et Pentabromodiphenyl ether	2009	Produit chimique industriel
Élimination	Toxaphène	2001	Pesticide
Restriction d'utilisation	DDT	2001	Pesticide
Restriction d'utilisation	Acide sulfonique perfluorooctane, ses sels et le perfluorooctane sulfonyl fluoride	2009	Produit chimique industriel
Réduction de la production secondaire	Hexachlorobenzene (HCB)	2001	Pesticide, produit chimique industriel, produit secondaire
Réduction de la production secondaire	Pentachlorobenzene	2009	Pesticide, produit chimique industriel et produit secondaire
Réduction de la production secondaire	Polychlorobiphenyls (PCB)	2001	Produit chimique industriel, produit secondaire
Réduction de la production secondaire	Polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDD)	2001	Produit secondaire
Réduction de la production secondaire	Dibenzofuranes polychlorés (PCDF)	2001	Produit secondaire
Réduction de la production secondaire	Naphtalènes polychlorés	2015	Produit chimique industriel, produit secondaire

Tableau 4 : Listes des polluants concernés par la convention de Stockholm

De par la rémanence des polluants et malgré la législation actuelle, l'exposition des populations aux POP reste présente de manière significative et l'accumulation des POP dans le tissu adipeux peut mener à des concentrations en POP plus importante dans l'organisme que dans l'environnement. Ce tissu devient donc un « réservoir » de polluants qui peuvent être libérés dans la circulation, devenant une source d'exposition chronique même en absence d'exposition environnementale (La Merrill et al., 2012).

Les polluants dont la demi-vie est de quelques heures à quelques semaines sont considérés comme des polluants à courte demi-vie. Cependant et malgré leur métabolisation plus rapide, l'homme y est régulièrement exposé car ils sont fabriqués en grande quantité et sont indissociables de notre quotidien et notamment dans l'industrie du plastique. A titre d'exemple, la production du bisphénol A (BPA) a été estimée à plus de  $2.5 \times 10^6$  tonnes par an (Vom Saal et al., 2012). Chez l'Homme, 24 h après son administration 80 à 100% du BPA est retrouvé dans les urines conjugué à un groupement glucuronide ou sulfate (Fenichel et al., 2013; Thayer et al., 2015). La cinétique d'élimination du BPA est différente chez les rongeurs. Chez le rat, l'administration par voie orale de BPA marqué à l'isotope stable  $^{14}\text{C}$  à des doses de 10 ou 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  montre qu'environ 80 % du BPA est éliminé dans les fèces après une première étape de métabolisation réalisée dans le foie (Pottenger et al., 2000). Quinze pourcent de BPA sont éliminés via les urines, majoritairement sous sa forme glucuronidée (60 %) ou non métabolisée (11%) (Pottenger et al., 2000). Le BPA n'est plus détecté dans le plasma des rats 72 h après l'administration. Cependant, certaines études ont détecté le BPA dans le tissu adipeux chez l'Homme et chez le rat (Fernandez et al., 2007; Nunez et al., 2001), suggérant que cet organe peut également servir de réservoir pour des polluants à courte demi-vie.

Par ailleurs, certains métabolites sont plus toxiques que la molécule mère. C'est le cas du phtalate di(2-éthylhexyl) phtalate (DEHP), qui est hydrolysé dans le tube digestif par la lipase pancréatique en mono(2-éthylhexyl)-phtalate (MEHP) (Frederiksen et al., 2007). Ainsi, Koch *et al.*, ont observé que 48h après une administration orale de DEHP deutéré à un volontaire sain, 75 % de cette molécule était éliminée dans les urines sous la forme de 5 métabolites actifs. Il s'agit des mono(2-éthyl-5-hydroxyhexyl) phtalate (MEHHP, 24.7%), mono(2-éthyl-5-carboxypentyl) phtalate (MECPP, 21.9 %), mono(2-éthyl-5-oxohexyl) phtalate (MEOHP, 14.9%), MEHP (7,3%) et du mono(2-carboxyméthylhexyl) phtalate (MCMHP, 5,4%) (Koch et al., 2004, 2005).

Les composés polyfluoroalkyles (PFC), les phtalates ou encore les bisphénols sont les polluants à courte demi-vie les plus représentés. Leur propriété hydrophile leur permet de pénétrer dans tous les tissus de l'organisme, menant à une pléiotropie d'effets qui dépendent du tissu touché.

## B. La problématique des perturbateurs endocriniens

La toxicologie « classique » repose sur le principe de Paracelse : « Tout est poison, rien n'est poison : c'est la dose qui fait le poison ». Les autorités sanitaires définissent pour chaque polluant ou famille de polluants, une dose en dessous de laquelle il n'y a pas d'effet chez l'homme. Cette dose, Dose Journalière Tolérable ou DJT, est par définition la dose à laquelle un être humain peut être exposé quotidiennement sans provoquer d'effet sur son organisme. Cette dose est extrapolée à partir de la dose sans effet (NOAEL pour *No Observable Adverse Effect Level*) ou entraînant le plus faible effet (LOAEL pour *Lowest Observed Adverse Effect Level*) déterminé chez l'animal de l'espèce la plus sensible, laquelle est divisée par un facteur de correction, variant de 100 à 1000, pour tenir compte de la variabilité inter-individus, inter-espèce et des données de la littérature.

Cependant, les PE possèdent plusieurs caractéristiques qui montrent la limite du principe de Paracelse. Ils peuvent agir à très faible dose, notamment en suivant une courbe dose-réponse non monotone, rendant l'extrapolation de la DJT non-pertinente. Ils peuvent également induire des effets à distance de la période d'exposition.

### 1. Les effets à faibles doses

Plusieurs définitions existent pour caractériser une « faible dose ». Le *National Toxicology Program* (NTP) définit les faibles doses comme « des doses proches des doses typiques d'exposition de l'homme ou des doses inférieures aux doses utilisées couramment en toxicologie ».

Physiologiquement, les hormones circulent en faible quantité : entre  $10^{-12}$  à  $10^{-9}$  mol/L, et les hormones stéroïdiennes (qui sont lipophiles) sont présentes dans trois états dans la circulation :

- La phase libre représente les hormones non conjuguées, capables de se fixer à leur récepteur

- La phase biodisponible représente les hormones liées à une protéine de transport comme l'albumine par des liaisons de faible énergie
- La phase inactive représente les hormones liées à des protéines par des fortes interactions

Dans le cas de l'œstradiol, la concentration de la phase libre est estimée à 0.1 – 9 pg/mL mais dépend grandement de l'âge, du sexe et du cycle menstruel chez la femme (Vandenberg et al., 2012).

Les récepteurs nucléaires possèdent une forte affinité pour leur ligand. Le corolaire de cette forte affinité est la relation hyperbolique entre le nombre de récepteurs ayant fixé un ligand et la concentration du ligand endogène (figure 15). Par ailleurs, la théorie intitulée *spare receptor hypothesis* stipule que la réponse biologique maximum peut être observée sans que des forts taux de récepteurs soient activés. Autrement dit, le mécanisme de réponse à la fixation du ligand sur son récepteur sature avant que la totalité des récepteurs ne soit occupée par leur ligand.

Nombre de récepteurs activés

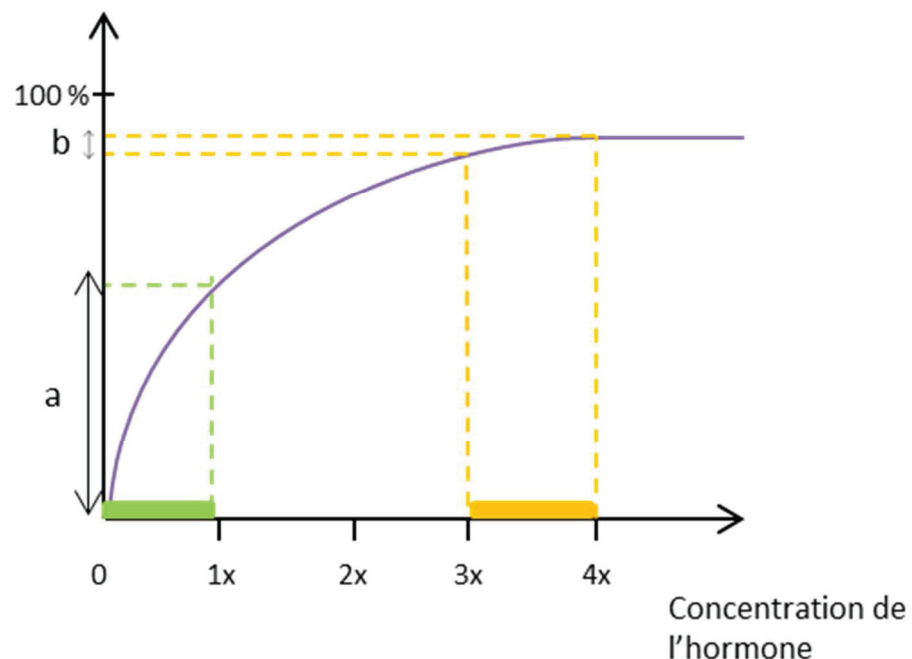


Figure 15 : Exemple schématique de la relation entre la réponse biologique et le nombre de récepteurs liés. Dans cet exemple, à faible concentration, l'augmentation de concentration de l'hormone de 0 à 1x provoque une augmentation de la réponse biologique d'environ 50 % (a). Pourtant, la même augmentation de la concentration hormonale aux fortes valeurs (de 3x à 4x) provoque une faible augmentation du nombre de récepteurs liés (b). Cependant il est important de garder à l'esprit que la relation entre la réponse biologique et le nombre de récepteurs liés n'est pas linéaire, et un faible nombre de récepteurs liés peut être associé à une réponse biologique maximale. (Adapté de Vandenberg et al., 2012)



Ces paramètres de liaison entre ligand et récepteur peuvent s'appliquer entre récepteur et PE, puisque tout ou une partie de leur effets passent par leur propriétés d'hormonomimétisme. Cela pourrait donc expliquer l'action à faible dose des perturbateurs endocriniens (Vandenberg et al., 2012).

## 2. Les effets non-monotones

Lors d'une réponse monotone, qu'elle soit linéaire ou non, la pente de la courbe ne s'inverse pas. En revanche, lorsque la pente de la courbe s'inverse, on parle de courbe dose-réponse non-monotone (CDRNM). Les CDRNM les plus courantes sont dites en U ou en cloche. Dans certains cas, la courbe peut être plus compliquée avec de multiples inversions de la pente de la courbe (figure 16) (Gore et al., 2015; Vandenberg et al., 2012).

Cytotoxicité, sélectivité du récepteur, désensibilisation et sous-régulation du récepteur, compétition pour le récepteur ou boucles de régulations négatives sont autant de mécanismes qui peuvent aboutir à une CDRNM.

Par exemple, la lignée cellulaire MCF7 dérivée d'un cancer du sein prolifère en réponse aux œstrogènes à des doses comprises entre  $10^{-12}$  à  $10^{-6}$  mol/L. Pour des doses supérieures, les œstrogènes sont cytotoxiques. La courbe du nombre de cellules en fonction de la concentration en œstrogènes dans le milieu est en cloche, avec un maximum atteint pour la dose de  $10^{-6}$  mol/L (Vandenberg et al., 2012).

## 3. Effets à distance

Les périodes néonatale et périnatale sont des périodes de forte vulnérabilité endocrine. Ces périodes critiques sont caractérisées par la régulation hormonale de la prolifération, la migration, la différenciation et la programmation des cellules et une perturbation de ces processus pourra entraîner des altérations durables. De fait, les travaux de David Barker ont amené à l'hypothèse sur les origines développementales de la santé (DOHaD). Dans une étude rétrospective sur 5654 hommes nés entre 1911 et 1930 publiée en 1989 dans *The Lancet*, il a été montré que les personnes nées avec un faible poids de naissance avaient le plus fort taux de décès dû à une maladie cardio-vasculaire (Barker et al., 1989). D'autres travaux ont montré que, pendant la famine liée à la seconde guerre mondiale et qui toucha la Hollande en 1944-1945, les fœtus sous-nutris dans les derniers mois de la grossesse avaient

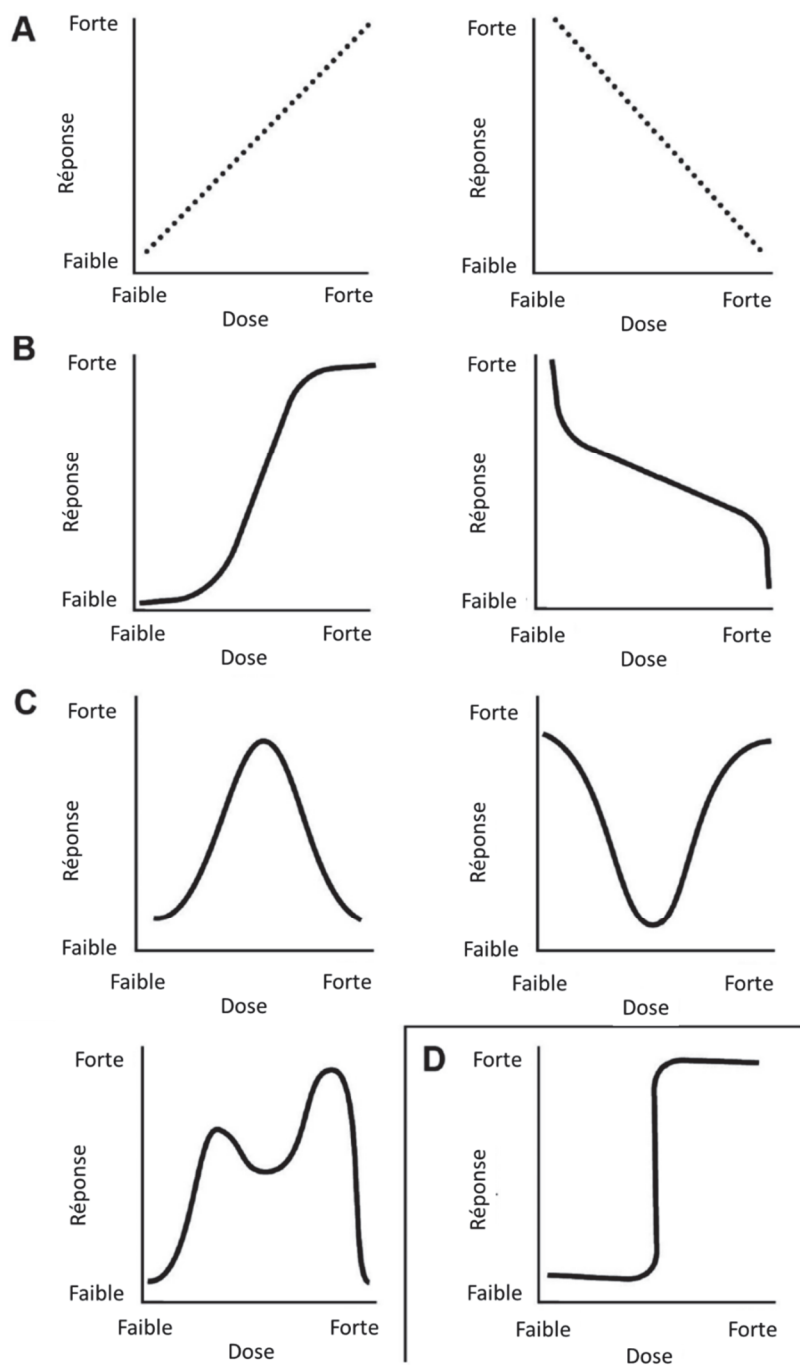


Figure 16 : Exemple de courbes effet-dose. A : Réponses linéaires positivement ou inversement associées à la dose. Ce type de courbe permet l'extrapolation de l'effet des différentes doses. B : Exemple de courbes non linéaires monotoniques. Dans ces exemples, la pente de la courbe ne change pas de signe, mais change de valeur. Connaître l'effet d'une très forte ou très faible dose ne permet pas la prédiction de l'effet aux doses intermédiaires. Ces courbes possèdent généralement un intervalle de linéarité et permet les prédictions des effets dans la limite de cet intervalle. C : Trois courbes non-monotones dont une courbe en cloche ou en U et une courbe multi-phasique. Ces relations entre l'effet et la dose ne permettent pas de prédire l'effet à partir des doses testées. D : Réponse binaire. Aucun effet n'est observé jusqu'à une dose seuil, à partir de laquelle l'effet maximum est observé. (D'après Vandenberg et al., 2012)

un risque fortement augmenté de développer une hypercholestérolémie et des maladies. L'avancée des études sur les perturbateurs endocriniens a permis d'étendre ce concept et de souligner les conséquences à long terme d'une exposition précoce aux polluants (Barouki et al., 2012a; Le Magueresse-Battistoni et al., 2016). Les fœtus et les jeunes enfants sont exposés via la mère aux différents polluants présents dans le sang du cordon, le placenta ou le lait maternel, et, une fois sevrés, directement par l'alimentation ou le portage des mains à la bouche. De plus, le système de détoxification hépatique est largement immature chez le fœtus et se met en place chez le jeune enfant (Milbrath et al., 2009), ce qui accroît encore la vulnérabilité des périodes fœtale et néonatale vis-à-vis des polluants.

Par exemple, le diéthylstilbestrol (DES), un œstrogène de synthèse, a été proposé aux femmes dans les années 50-60 pour prévenir les risques d'avortement. Cependant, dans les années 1970, un chercheur américain observe une recrudescence du cancer du vagin de type adénocarcinome à cellules claires (dont la survenue est très rare dans la population générale) chez les adolescentes et les jeunes adultes et le lien entre la prise du DES pendant la grossesse de la maman et l'apparition du cancer chez les filles a été établi. La compréhension des mécanismes induits par une exposition au DES a été ensuite déterminée expérimentalement. Ainsi, il a été montré qu'en plus des effets sur les organes reproducteurs, le DES injecté chez le rongeur perturbe également le métabolisme énergétique. En effet, chez la souris l'exposition au DES à la dose de 1 µg/kg/j pendant les premiers jours de vie entraîne une augmentation de la masse grasse visible sur la descendance à partir de la 6<sup>ème</sup> semaine de vie (Newbold et al., 2005).

### **C. La problématique des mélanges**

Le nombre de molécules suspectées d'avoir une activité PE est estimé supérieur à 800. Il existe donc un trop grand nombre de combinaisons de mélanges et il est impossible de tester toutes ces combinaisons. De plus, il est difficile de prévoir les cibles biologiques d'un mélange de polluants puisque un même récepteur nucléaire peut être activé par différents polluants et un polluant peut avoir un effet sur différentes voies de signalisation. Il peut y avoir additivité, antagonisme et même synergie entre les polluants considérés sur une cible identifiée.

Dans un premier temps, seront présentés les mécanismes identifiés de la perturbation endocrinienne des PE pris individuellement et dans un second temps les modes d'actions possibles des mélanges de PE.

## 1. Mécanismes d'action des PE pris individuellement

Les hormones peuvent activer deux grands types de récepteurs : les récepteurs membranaires, activés principalement par des hormones peptidiques comme l'insuline, et les récepteurs nucléaires (RN), activés par des hormones lipophiles comme les hormones sexuelles. Les PE ont surtout été étudiés via leur action génomique sur les récepteurs nucléaires (voir figure 17 pour le fonctionnement des RN). Cependant, plusieurs actions non-génomiques ont été rapportés, particulièrement pour les œstrogéno-mimétiques.

### Action agoniste

Un PE peut mimer l'action d'un ligand naturel en se fixant sur le récepteur cellulaire et en entraînant une réponse normale. C'est l'effet **agoniste**.

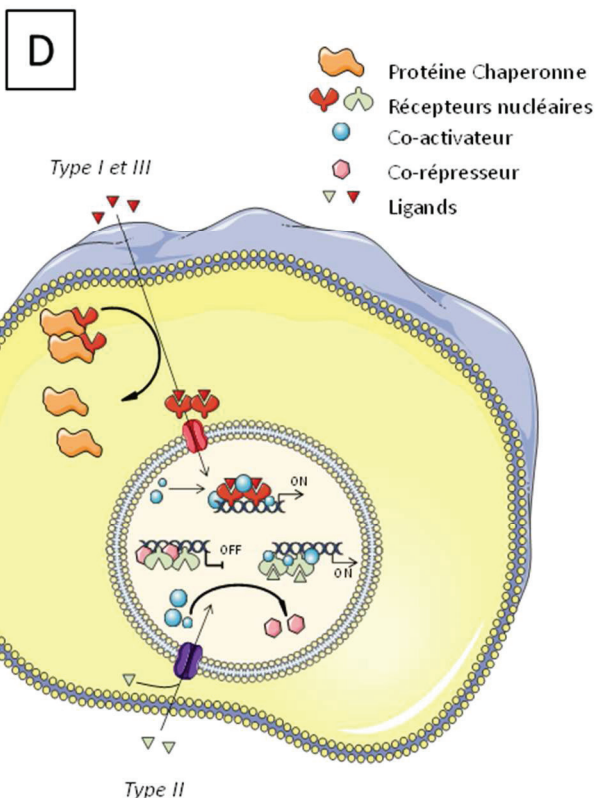
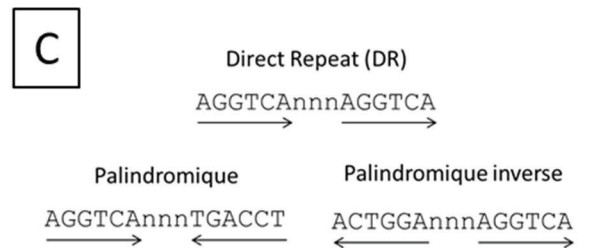
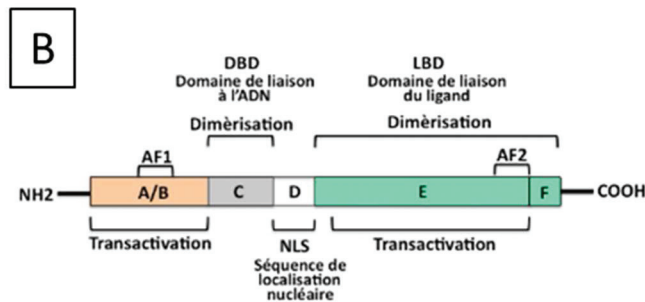
Exemple : *les xénoestrogènes sont des xénobiotiques capable de mimer l'action des œstrogènes par leur liaison aux récepteurs ER $\alpha$  et/ou ER $\beta$ . Ils peuvent être d'origine naturelle, produit par les plantes (phytoestrogènes : flavones, polyphénols...) ou par les champignons (mycoestrogènes), ou d'origine synthétique dans un but pharmacologique (comme l'éthinylestradiol retrouvé dans les pilules contraceptives) ou non (tableau 3). Mais la situation peut être plus complexe puisqu'il existe différents récepteurs aux œstrogènes dont les membres, les affinités, les effets et leur concentration peuvent différer selon le tissu considéré ou le stade de développement.*

### Action antagoniste

Le PE peut se lier au récepteur et empêcher la signalisation post-récepteur, entravant alors l'action du ligand. Il pourra y avoir compétition avec l'hormone en fonction de leurs affinités respectives et des concentrations ou inhibition du complexe ligand-récepteur. C'est l'effet **antagoniste**.

Exemple : *Le flutamide est une molécule utilisée pour traiter les cancers de la prostate. C'est un anti-androgène qui agit comme un antagoniste sélectif du récepteur aux androgènes (AR) par compétition avec la testostérone et la dihydrotestostérone, ligands naturels d'AR. Les cellules cancéreuses dépendent de ces hormones pour se multiplier. En bloquant l'action de ces hormones, le flutamide bloque la prolifération des cellules cancéreuses et la progression du cancer tant qu'il n'y a pas « échappement hormonal ».*

Groupe	Nom	Abbréviation	Nomenclature officielle	Ligands connus
III	Androgen receptor	AR	NR3C4	androgènes
I	Constitutive androstane receptor	CAR	NR1I3	xenobiotiques
III	Estrogen receptor $\alpha$	ER $\alpha$	NR3A1	oestrogènes
III	Estrogen receptor $\beta$	ER $\beta$	NR3A2	oestrogènes
III	Estrogen related receptor $\alpha$	ERR $\alpha$	NR3B1	
III	Estrogen related receptor $\beta$	ERR $\beta$	NR3B2	
III	Estrogen related receptor $\gamma$	ERR $\gamma$	NR3B3	
I	Farnesoid X receptor $\alpha$	FXR $\alpha$	NR1H4	acides biliaires
I	Farnesoid X receptor $\beta$	FXR $\beta$	NR1H5	
III	Glucocorticoid receptor	GR	NR3C1	glucocorticoïdes
II	Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$	HNF4 $\alpha$	NR2A1	[acides gras]
II	Hepatocyte nuclear factor 4 $\gamma$	HNF4 $\gamma$	NR2A2	[acides gras]
II	Liver receptor homolog-1	LRH-1	NR5A2	[phospholipides]
I	Liver X receptor $\alpha$	LXR $\alpha$	NR1H3	oxystérols
I	Liver X receptor $\beta$	LXR $\beta$	NR1H2	oxystérols
I	Peroxisome proliferator-activated receptor $\alpha$ PPAR $\alpha$	PPAR $\alpha$	NR1C1	acides gras
I	Peroxisome proliferator-activated receptor $\beta$ PPAR $\beta$	PPAR $\beta$	NR1C2	acides gras
I	Peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ PPAR $\gamma$	PPAR $\gamma$	NR1C3	acides gras
III	Progesterone receptor	PR	NR3C3	progesterone
I	Pregnane X receptor	PXR	NR1I2	endobiotiques et xénobiotiques
I	Retinoic acid receptor $\alpha$	RAR $\alpha$	NR1B1	acides rétinoïques
I	Retinoic acid receptor $\beta$	RAR $\beta$	NR1B2	acides rétinoïques
I	Retinoic acid receptor $\gamma$	RAR $\gamma$	NR1B3	acides rétinoïques
I	Reverse-Erb $\alpha$	REV-ERB $\alpha$	NR1D1	[hème]
I	Reverse-Erb $\beta$	REV-ERB $\beta$	NR1D2	[hème]
I	RAR-related orphan receptor $\alpha$	ROR $\alpha$	NR1F1	[stéroïds]
I	RAR-related orphan receptor $\beta$	ROR $\beta$	NR1F2	[stéroïds]
I	RAR-related orphan receptor $\gamma$	ROR $\gamma$	NR1F3	[stéroïds]
II	Retinoid X receptor $\alpha$	RXR $\alpha$	NR2B1	acide 9-cis rétinoïque et acide docosahexanoïque
II	Retinoid X receptor $\beta$	RXR $\beta$	NR2B2	acide 9-cis rétinoïque et acide docosahexanoïque
II	Retinoid X receptor $\gamma$	RXR $\gamma$	NR2B3	acide 9-cis rétinoïque et acide docosahexanoïque
	Short heterodimeric partner	SHP	NROB2	
I	Thyroid hormone receptor $\alpha$	TR $\alpha$	NR1A1	hormones thyroïdiennes
I	Thyroid hormone receptor $\beta$	TR $\beta$	NR1A2	hormones thyroïdiennes



### La super famille des récepteurs nucléaires (RN)

Il existe 48 récepteurs nucléaires, dont les principaux sont présentés dans le tableau (A). (B). Ils présentent une grande homologie de séquence et sont composés de 4 domaines : le domaine A/B contient la fonction d'activation (AF) 1, le domaine de liaison à l'ADN (DBD), le domaine de liaison au ligand (LBD) et le domaine de localisation nucléaire (NLS). Le domaine LBD peut également contenir un second AF (AF-2). (C). Les RN se fixent sur l'ADN au niveau des éléments de réponse situés dans les promoteurs des gènes cibles. Les séquences reconnues peuvent être des séquences répétées (DR), palindromiques ou palindromiques inverses. (D). La fixation des ligands sur les récepteurs nucléaires de type I et III entraîne leur libération par les protéines chaperonnes et leur translocation dans le noyau où ils vont recruter les co-activateurs au niveau des éléments de réponse des gènes cibles. Les récepteurs de type II en absence de ligand, recrute des co-répresseurs au niveau des éléments de réponse des gènes cibles. La fixation du ligand sur ces récepteurs entraîne le recrutement des co-activateurs à la place des co-répresseurs.

Figure 17 : Le fonctionnement des récepteurs nucléaires

## **Perturbation de la synthèse ou la dégradation des ligands**

Le PE peut **gêner** ou **bloquer** le mécanisme de production ou de régulation des ligands ou des récepteurs et ainsi modifier les concentrations des ligands naturellement présents dans l'organisme.

Exemple : *La 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) induit notamment l'expression du cytochrome P450 Cyp1b1 via l'activation d'AhR (Aryl hydrocarbon receptor). Cyp1b1 métabolise l'œstradiol, provoquant une diminution locale de la concentration de cette hormone. Cette activité pourrait rendre compte de l'action anti-estrogène de la TCDD (Barouki et al., 2012b).*

## **Les modulateurs sélectifs des récepteurs**

Un certain nombre de molécules naturelles ou synthétiques qui agissent par l'intermédiaire des récepteurs nucléaires affiche une réponse agoniste dans certains tissus et une réponse antagoniste dans d'autres tissus. Utilisée en thérapeutique, cette caractéristique peut être un avantage : il peut permettre de conserver les effets bénéfiques tout en minimisant les effets secondaires indésirables. Ces molécules sont appelés modulateurs sélectifs des récepteurs (SRM).

Exemple : *Le tamoxifène est un modulateur sélectif du récepteur aux œstrogènes (SERM). Cette molécule inhibe la fonction AF-2 du récepteur aux œstrogènes, sans modifier l'activité AF-1, ce qui permet d'expliquer l'action agoniste (AF-1 activé) et antagoniste (AF-2 inhibé) du tamoxifène selon le tissu considéré. Le tamoxifène est utilisé comme traitement contre le cancer du sein car il a une action antagoniste sur les cellules mammaires alors qu'il garde une action agoniste dans l'utérus, les os et sur le métabolisme lipidique (Maudelonde et al., 2005).*

## **Le « cross-talk » entre les récepteurs nucléaires**

La fixation d'un ligand sur son récepteur peut moduler l'activité d'un second récepteur nucléaire. En effet, deux RN peuvent entrer en compétition pour les éléments de réponse reconnus ou pour les co-activateurs recrutés. L'activation du premier RN peut provoquer une

activation synergique, une inhibition ou une dégradation par la voie du protéasome du second RN (tableau 5).

Exemple : *Lorsqu'AhR est activé par la dioxine 3-méthylcholanthrène, celui-ci est capable de s'associer et d'activer les récepteurs ER, induisant une réponse œstrogénique en absence d'œstradiol. Cependant, et comme mentionné précédemment, l'activation d'AhR par la dioxine diminue la réponse œstrogénique en présence d'œstradiol* (Brosens and Parker, 2003; Ohtake et al., 2003).

Crosstalk	Mécanisme	Conséquences
AhR/HIF	Partagent le même partenaire ARNT	Perturbation des gènes cibles d'AhR lors d'une hypoxie
AhR/ER	AhR se lie aux ERE; AhR se comporte comme un co-activateur d'ER; AhR augmente la dégradation d'ER par la voie du protéasome	Contrôle des gènes cibles d'ER par les xénobiotiques
CAR/ER	Métabolisme des œstrogènes par les gènes cibles de CAR	Diminution des niveaux d'œstrogènes lors de la présence de xénobiotiques
CAR-PXR/FXR	FXR et PXR ont des activateurs communs; FXR active les gènes cibles de CAR et de PXR; FXR contrôle l'expression de PXR (souris)	Augmentation du métabolisme des xénobiotiques par les acides biliaires; contrôle de l'homéostasie des acides biliaires par les xénobiotiques
CAR-PXR/SHP	Inhibition de l'activité transcriptionnelle de CAR et de PXR par SHP ; PXR contrôle l'expression de SHP dans la lignée cellulaire HepG2	contrôle du métabolisme des xénobiotiques par les acides biliaires; control de l'homéostasie des acides biliaires par les xénobiotiques
CAR-PXR/LXR	Inhibition de l'activité transcriptionnelle de CAR et de PXR par LXR	Diminution du métabolisme des xénobiotiques par les oxystérols
CAR-PXR/HNF4	Inhibition de l'activité transcriptionnelle de HNF4 par PXR et CAR	Contrôle de la néoglucogenèse et de l'homéostasie des acides biliaires et des acides gras par les xénobiotiques
CAR-PXR/FoxO1	Activation de l'activité transcriptionnelle de CAR et de PXR par FoxO1 ; inhibition de l'activité transcriptionnelle de FoxO1 par CAR et PXR	Interaction réciproque entre les xénobiotiques et la néoglucogenèse
PXR/FoxA2	Inhibition de l'activité transcriptionnelle de FoxA2 par PXR	Diminution du métabolisme des acides gras par les xénobiotiques
PXR/PPAR $\gamma$	Induction de PPAR $\gamma$ par PXR	Stéatose hépatique
CAR-PXR/GR	GR contrôle les expressions de RXR, CAR et PXR	Contrôle du métabolisme des xénobiotiques par les glucocorticoïdes
CAR-PXR/TR	CAR, PXR et TR partagent des éléments de réponses communs ; catabolisme des hormones thyroïdiennes par les gènes cibles de PXR et CAR	Diminution du niveau des hormones thyroïdiennes par les xénobiotiques

**Tableau 5: Cross-talk entre les récepteurs nucléaires et ses conséquences (D'après Pascussi et al., 2008)**

## 2. Les mécanismes d'action possibles des mélanges

### Additivité

On parle d'additivité lorsque l'effet résultat du mélange est égal à la somme des effets individuels.

Exemple : *Les dioxines et les PCB dioxin-like agissent en activant le facteur de transcription AhR. La toxicité relative (TEF pour toxic equivalent factor) de chaque congénère peut être déterminé par rapport à la toxicité de la 2,3,7,8 TCDD qui sert de référence et dont le TEF est fixé à 1. La toxicité d'un mélange de dioxine et de PCB dioxin-like est ainsi estimée par le calcul de l'équivalent toxique (TEQ). Cette valeur est obtenue en sommant les concentrations de chaque congénère pondérées par leur TEF.*

*Ce système de calcul a cependant ses limites : il concerne uniquement les effets délétères induits par l'activation d'AhR. De fait, les autres actions toxiques des dioxines ne sont pas prises en compte. De plus, l'action des dioxines est dépendante de la concentration : à forte dose, elles induisent un « wasting syndrome », caractérisé par une perte de poids, alors qu'elles induisent à faible dose une prise pondérale (Barouki et al., 2012b).*

### Synergisme

On parle de synergisme lorsque l'effet du mélange est supérieur à la somme des effets des produits pris individuellement

Par des études cellulaires, biophysiques et structurales, Delfosse et ses collaborateurs ont dissequé *in vitro* un mécanisme potentiel pour expliquer l'action synergique entre deux polluants, l'éthinylestradiol (EE2, l'œstrogène de synthèse le plus utilisé dans le monde) et le trans-nonachlore (TNC, un pesticide organochloré persistant connu pour être une des douze polluants majeurs à l'échelle mondiale une activation synergique) (Delfosse et al., 2015).

Ils montrent par des mesures d'activité des composés seuls ou en mélange, dans différentes lignées cellulaires et des cultures d'hépatocytes primaires humains une action synergique des deux molécules sur la stimulation de l'activité transcriptionnelle de PXR (*Pregnane X receptor, Nr1i2*) et l'expression du Cyp3a4, un gène cible de ce récepteur. Ces expériences



indiquent que le mélange binaire est capable d'induire une réponse biologique significative à des doses auxquelles les deux composés sont individuellement inactifs.

La suite des travaux montre que ces deux molécules peuvent se retrouver simultanément dans la poche de liaison de PXR. Dans cette configuration, elles se stabilisent pour former un ligand supramoléculaire qui occupe la totalité de l'espace de la poche de liaison (voir figure 18) et pour lequel PXR a une affinité 50 à 100 fois supérieure à celle des composants pris séparément. Les auteurs mettent ainsi en évidence un nouveau mécanisme moléculaire qui peut expliquer les effets synergiques des mélanges de polluants.

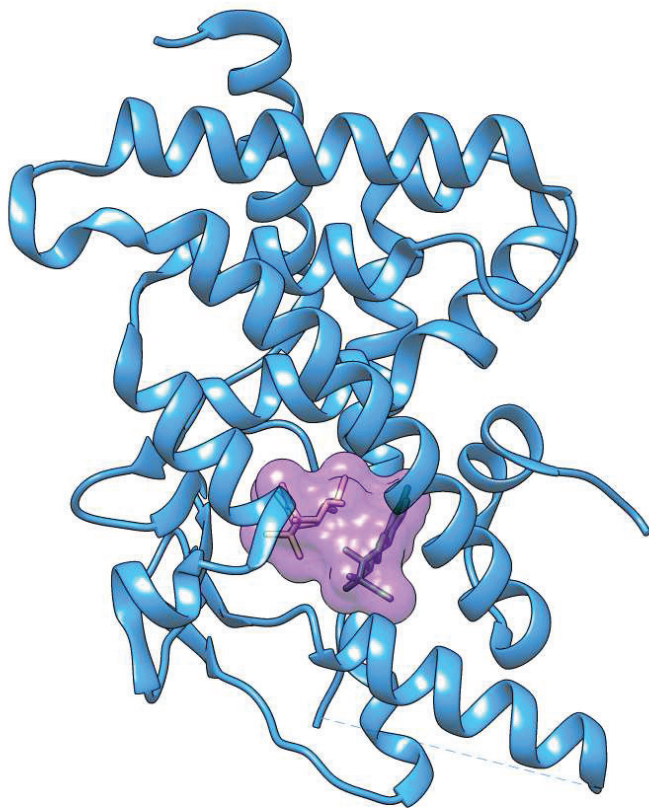


Figure 18 : Structure tridimensionnelle de la protéine Pregnane X receptor (PXR). Cette protéine a été cristallisée en présence des deux ligands (éthinyloestradiol et trans-nonachlore) présents simultanément dans la poche de liaison. La présence simultanée de ces deux ligands occupe la totalité de la poche de liaison, menant à une stabilisation des ligands et une activation de PXR à des concentrations plus faibles que lorsque les ligands sont pris séparément. Code PDB : 4X21G

### III. Les perturbateurs métaboliques et leurs effets sur la santé

L'homéostasie énergétique est sous contrôle hormonal et peut donc par conséquent être la cible des PE. Particulièrement, il est connu que les hormones sexuelles sont impliquées dans le métabolisme énergétique via leur RN présent dans la plupart des tissus métaboliques. De nombreux récepteurs nucléaires hépatiques sont impliqués dans la régulation des métabolismes glucidiques et lipidiques et sont présentés dans le tableau 6. Aussi, outre les récepteurs aux œstrogènes, l'inactivation totale du récepteur aux androgènes chez les mâles entraîne une obésité et une diminution de la dépense énergétique (tableau 6). La perturbation du métabolisme est donc un évènement compatible avec les PE. Il a donc été proposé que dans un environnement obésogène, les perturbations dans la signalisation métabolique, résultant de l'exposition à des produits chimiques alimentaires et environnementaux, pourraient aggraver les effets des déséquilibres alimentaires et entraîner une sensibilité accrue à l'obésité et les troubles liés à l'obésité (Grün and Blumberg, 2009). Ainsi, les polluants qui entraînent une augmentation de la masse grasse sont qualifiés d'obésogènes et ceux qui altèrent le métabolisme énergétique, sans modifier la quantité de masse grasse, sont qualifiés de diabétogènes (Lee et al., 2014).

Dans un premier temps, ce chapitre présente les données épidémiologiques et expérimentales suggérant un lien entre les principaux PE et l'obésité/le diabète de type 2. Du fait de l'abondance de la littérature, cette partie ne peut être exhaustive. D'une manière générale, les études montrent une grande disparité des résultats possiblement liée aux différentes doses utilisées, à la durée de l'exposition, à la période d'exposition ou aux différents modèles utilisés (particulièrement pour les effets passant par PPAR $\alpha$  ou PXR). Dans un second temps, nous présenterons les mécanismes potentiels par lesquels l'exposition à un PE pourrait entraîner une perturbation du métabolisme.

Nom commun	Nom Officiel	Tissu	Modèle	Phénotype	Références
AR	NR3C4	Total	Knockout	Obésité tardive Diminution de la dépense énergétique Pas de modification de l'insulino-sensibilité Augmentation de la sécrétion d'adiponectine	(Fan et al., 2005)
CAR	NR1I3	Total	Régime gras + injection intrapéritonéale de l'agoniste de CAR TCPOBOP (0.5mg/kg, une fois par semaine)	Résistant à la prise de poids sous régime gras Améliore les paramètres métaboliques (sensibilité à l'insuline et tolérance au glucose) Inhibition de la lipogénèse de novo dans le foie, le muscle et le tissu adipeux Inhibition de la néoglucogénèse	(Gao et al., 2009)
ER $\alpha$	NR3A1	Total	Invalidation du gène	Développement du tissu adipeux chez les mâles et les femelles Résistance à l'insuline chez les mâles et les femelles Intolérance au glucose chez les mâles et les femelles	(Heine et al., 2000)
ER $\alpha$	NR3A1	Foie	Délétion spécifique	Phénotype peu marqué	(Matic et al., 2013)
ER $\alpha$	NR3A1	Muscle	Délétion spécifique	Intolérance au glucose et résistance à l'insuline Dysfonction mitochondriale associée à une production de ROS et une inflammation dans le muscle	(Ribas et al., 2016)
ER $\alpha$	NR3A1	Adipocytes	Délétion spécifique	<b>Femelles :</b> Augmentation du poids corporel et de la masse grasse Pas de modification de la tolérance au glucose Forte augmentation de la taille des adipocytes Pas de modification de l'expression des marqueurs inflammatoires dans le tissu adipeux <b>Mâles :</b> Pas de modification du poids et de la masse grasse Forte intolérance au glucose Pas de modification de la taille des adipocytes Augmentation de l'expression des marqueurs inflammatoires dans le tissu adipeux	(Davis et al., 2013)

Nom commun	Nom Officiel	Tissu	Modèle	Phénotype	PMID
ERβ	NR3A2	Total	Invalidation du gène	Augmentation du poids corporel et de la masse grasse Diminution de la quantité de lipides hépatiques Amélioration de la tolérance au glucose Amélioration de la sensibilité à l'insuline	(Foryst-Ludwig et al., 2008)
ERRα	NR3B1	Total	Invalidation du gène	Diminution du poids corporel Résistant à l'obésité induit par un régime gras Diminution de l'adipogenèse dans le tissu adipeux Mauvaise absorption des lipides dans les intestins	(Carrier et al., 2004; Luo et al., 2003)
ERRβ	NR3B2	Total	Invalidation du gène	Mort embryonnaire à 10.5 jour post-coïtum	(Luo et al., 1997)
ERRβ	NR3B2	Total	Délétion dans les cellules somatiques	Diminution du poids corporel Augmentation de l'activité physique Augmentation de la prise alimentaire	(Byerly et al., 2013)
ERRβ	NR3B2	Neurones	Délétion spécifique	Augmentation du poids corporel et de la masse musculaire Augmentation de l'activité physique Amélioration de la tolérance au glucose Amélioration de la sensibilité à l'insuline	(Byerly et al., 2013)
FXRα	NR1H4	Foie	Régime enrichie en cholestérol Délétion spécifique de FXR	Forte accumulation lipidique dans le foie Hyperlipidémie Hypercholestérolémie Augmentation de la quantité de cholestérol dans le foie Augmentation des taux d'acides biliaires circulants Hyperglycémie obésité viscérale	(Schmitt et al., 2015)
GR	NR3C1	Tissu adipeux	Surexpression spécifique de la 11βHSD	hyperphagie hyperlipidémie hypertension résistance à l'insuline	(Masuzaki et al., 2001)

Nom commun	Nom Officiel	Tissu	Modèle	Phénotype	PMID
GR	NR3C1	Foie	Surexpression spécifique de la 11βHSD	Légère insulino-résistance pas de modification du poids ou de la masse grasse Stéatose hépatique Dyslipidémie	(Seckl, 2004)
LXRα	NR1H3	Total	invalidation du gène	Hypercholestérolémie augmentation du taux de cholestérol hépatique Diminution de l'excrétion des acides biliaires	(Peet et al., 1998)
LXRα/β	NR1H2	total	Double invalidation	Hypercholestérolémie Hyperlipidémie Augmentation des LDL Diminution des HDL Augmentation des <i>foam cells</i> dans la rate, les poumons et la crosse aortique	(Schuster et al., 2002)
PPARα	NR1C1	total	Invalidation du gène, nourri sous régime standard	Accumulation massive de lipides dans le foie et le cœur Mort par hypoglycémie	(Djouadi et al., 1998)
PPARα	NR1C1	total	Invalidation du gène, nourri sous régime gras	Protection contre la prise de poids et l'insulino-résistance induit par le régime	(Guerre-Millo et al., 2001)
PPARα	NR1C1	Foie	Invalidation du gène	Accumulation hépatique de lipides Hypoglycémie et hypothermie lors du jeun Développement d'une stéatose hépatique sous régime standard	(Djouadi et al., 1998)
PPARγ	NR1C3	Total	Délétion	Létale à E10 chez la souris	(Barak et al., 1999)
PPARγ	NR1C3	Tissu adipeux	Délétion spécifique	Diminution du nombre d'adipocytes Hypertrophie des adipocytes augmentation du taux d'acides gras libres sériques hypertriglycéridémie Résistance à l'insuline du foie et du tissu adipeux mais pas du muscle	(He et al., 2003)

Tableau 6 : 3/4

Nom commun	Nom Officiel	Tissu	Modèle	Phénotype	PMID
PPAR $\gamma$	NR1C3	Foie	Délétion spécifique	Diminution de la clairance des lipides Augmentation de la masse grasse hyperlipidémie résistance globale à l'insuline	(Gavrilova et al., 2003)
PPAR $\gamma$	NR1C3	Muscle	Délétion spécifique	Augmentation de la masse grasse Réduction de la prise alimentaire Résistance globale à l'insuline	(Norris et al., 2003)
PXR	NR1I2	Total	Inactivation du Souris sous régime gras	Résistant à la prise de poids sous régime gras Amélioration de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline Augmentation de la dépense énergétique Résistant à la stéatose hépatique Résistant à l'inflammation chronique dans le tissu adipeux	(He et al., 2013)
REV-ERB $\alpha$ REV-ERB $\beta$	NR1D1 NR1D2	Total	Double inactivation	Arythmie Stéatose hépatique	(Bugge et al., 2012)
ROR $\alpha$	NR1F1	Total	Souris Staggerer, souche exprimant un allèle de RORa dysfonctionnel	Amélioration de la tolérance au glucose Amélioration de la sensibilité à l'insuline Diminution de la triglycéridémie et du taux de TAG Diminution de la masse grasse Protège de l'obésité induit par le régime gras Forte proportion de HDL dans le sang	(Lau et al., 2008, 2011)

Tableau 6 : Rôles des récepteurs nucléaires sur le métabolisme énergétique (non exhaustif)

## A. Les perturbateurs endocriniens et la perturbation métabolique

### 1. Les données épidémiologiques

Une des difficultés dans les études chez l'homme réside dans l'incapacité de réaliser des études interventionnelles pour des raisons éthiques. De plus, l'omniprésence des polluants rend difficile (voire impossible) la composition d'un groupe d'individus non-exposés. Il existe cependant quelques études observationnelles chez l'homme à partir de différentes cohortes (les différents types d'études observationnelles sont présentés dans l'encart). La cohorte la plus étudiée est probablement la cohorte du programme de recherche NHANES (pour *National Health and Nutrition Examination Survey*), réalisée aux Etats-Unis par le *National Center for Health Statistics* (NCHS).

#### Les différentes études observationnelles chez l'homme

Cas-témoin: Les groupes sont composés en fonction de la présence ou non du phénotype d'intérêt. L'étude s'intéresse à l'association existante entre une exposition antérieure et l'apparition du phénotype.

Longitudinale : Les groupes sont constitués en fonction de l'exposition ou non au début de l'étude et sont suivis pendant une période donnée pour l'apparition du phénotype d'intérêt.

Transversale : Recherche d'une association entre une exposition et le phénotype d'intérêt à un instant donné.

Ce programme de recherche a débuté dans les années 1960 dans le but d'évaluer l'état de santé et l'état nutritionnel de la population américaine et de suivre les changements au cours du temps. Dans le cadre de ce programme, un certain nombre de polluants ont été dosés depuis 1999 dans les échantillons de sang et d'urines d'un échantillon représentatif de la population comprenant entre 5000 à 10000 individus. Tous les deux ans, une analyse transversale est réalisée sur cette cohorte.

#### Le bisphénol A

L'analyse de NHANES 2003-2004 sur 1455 participants issus de la population générale (Lang et al., 2008) met en évidence l'omniprésence dans le sang et les urines de plusieurs polluants, dont le bisphénol A (BPA). Cette étude conclut à une forte association entre le diabète et le BPA, avec un *odds ratio* (OR) de 2.43 (comparaison entre le dernier quartile et le premier quartile). De plus, les auteurs montrent que l'OR du diabète augmente avec la

concentration en BPA retrouvé dans les urines. Deux autres études, utilisant la même cohorte, rapportent également ces associations (Melzer et al., 2010; Silver et al., 2011).

Cependant, aucune association n'a été trouvée lors de l'analyse des cohortes NHANES 2005-2006, 2007-2008 ou 2009-2010 (Lakind et al., 2012; Melzer et al., 2010; Silver et al., 2011). La comparaison entre les différentes cohortes montre que les individus inclus dans NHANES 2003-2004 ont des concentrations de BPA urinaire 30 % supérieures aux autres cohortes et aux autres années (Chevalier and Fénichel, 2015). De plus, l'analyse réalisée par Lakind *et al.* sur la cohorte NHANES 2003-2004, qui normalisent les données par les antécédents de diabète, ne montre pas d'association entre le BPA et le DT2 (Lakind et al., 2012), ce qui suggère une interaction entre les facteurs génétiques et l'exposition au BPA. Par ailleurs, une étude récente incluant 2200 participants non-diabétiques suivis pendant 4 ans montre que l'association entre le BPA et l'apparition d'un DT2 est retrouvée uniquement chez les individus ayant des facteurs de risque génétique élevés pour le diabète de type 2 (Bi et al., 2016), ce qui suggère que le BPA serait plutôt un facteur aggravant qu'une cause du DT2.

L'hypothèse d'une interaction avec la génétique est également proposée dans d'autres études. Ainsi, à partir de l'analyse de 2664 et 2838 individus âgés entre 6 et 19 ans issus des cohortes NHANES 2003-2008, deux études (Bhandari et al., 2013; Trasande et al., 2012) montrent une association entre des concentrations élevées de BPA et une augmentation de l'obésité chez les enfants et adolescents. Ces deux études montrent que cette association est plus forte chez les enfants blancs non-hispaniques (OR = 5.87) que dans la population noire ou hispanique (OR = 1.21).

En plus d'une interaction génétique, les associations entre les concentrations de BPA et les maladies métaboliques pourraient dépendre du sexe. L'analyse des 1586 adultes de la cohorte NHANES 2005-2008 chez lesquels la concentration urinaire de BPA, la glycémie à jeun et l'insulinémie ont été mesurées montre une association entre BPA, hyper-insulinémie et insulino-résistance plus forte chez les hommes que chez les femmes (Beydoun et al., 2014).

Sun *et al.*, apportent des données supplémentaires à partir des cohortes *Nurses's Health Study* (NHS)I et NHSII qui incluent entre 1996 et 2001 121700 infirmières ménopausées (âgées entre 53 et 79 ans) et 116430 infirmières non ménopausées (âgées entre 25 et 42 ans). Des échantillons de sang et d'urine ont été prélevés. Parmi ces individus, 971 cas de DT2 ont été reportés et les auteurs mettent en évidence une association entre le DT2 et BPA chez les



femmes non-ménopausées mais pas chez les femmes ménopausées, après ajustement par l'âge, (Sun et al., 2014) suggérant une interaction entre le BPA et les œstrogènes endogènes.

Si l'ensemble de ces études concernent des cohortes des Etats-Unis, des interactions similaires ont été également retrouvées dans d'autres pays. Dans une cohorte chinoise incluant 3390 participants âgés d'au moins 40 ans, la concentration urinaire de BPA et l'augmentation de l'IMC et du tour de taille sont significativement associés (Wang et al., 2012).

### **Les phtalates**

L'analyse des données NHANES 1999-2002 montre chez les hommes adultes une association entre différents métabolites des phtalates dosés dans les urines (MBzP, MEHHP, MEOHP et MEP), l'augmentation de l'IMC, du tour de taille et de l'insulino-résistance (Hatch et al., 2008; Stahlhut et al., 2007). Chez les adolescentes et les femmes, cette association a été retrouvée de manière moins marquée seulement avec le MEP (Hatch et al., 2008). Cette association est retrouvée chez les femmes pré-ménopausées mais pas chez les femmes ménopausées sur la cohorte NHS (Sun et al., 2014), suggérant également une interaction entre les phtalates et les œstrogènes sur le métabolisme énergétique.

Chez les enfants les résultats sont plus controversés. Ainsi, une étude réalisée au sein d'une école chinoise (259 participants âgés de 8 à 15 ans) associe positivement le MEHP et le MEP avec l'IMC et le tour de taille (Wang et al., 2012), alors qu'aucune association n'a été trouvée dans l'étude réalisée par Hatch et ses collaborateurs sur 2000 participants âgés de 6 à 19 ans et relevant de la cohorte NHANES 1999-2002 (Hatch et al., 2008). Une autre étude sur une cohorte incluant 521 enfants New-Yorkais âgés de 6 à 8 ans montre une association entre le MEP, l'IMC et le tour de taille uniquement chez les enfants en surpoids (Teitelbaum et al., 2012).

Une étude associe les métabolites de phtalates de bas poids moléculaires (diethyl phthalate, di-n-butyl phthalate, di-n-octylphthalate et di-n-isobutyl phthalate) et le surpoids/obésité chez les enfants noirs non-hispaniques, mais pas dans les autres populations (hispanique ou blanc non-hispanique), suggérant ainsi une interaction avec le fond génétique (Trasande et al., 2012).

Dans une étude menée par Ashley et ses collaborateurs (Ashley-Martin et al., 2014), les auteurs ont dosé 11 métabolites de phtalates et le bisphénol A dans les urines maternelles lors du 1er trimestre de grossesse et les taux de leptine et d'adiponectine dans le sang fœtal récupéré dans le cordon ombilical. Chez les garçons, le BPA est négativement associé avec les taux d'adiponectine et le phtalate MCPP avec la leptine, indiquant une exposition du fœtus. Dans une étude longitudinale, il a été établi une association inverse entre la quantité de BPA dosé dans les urines de femmes pendant leur grossesse et l'IMC, le pourcentage de masse grasse du corps et un surpoids/obésité chez leurs filles à l'âge de 9 ans. Cela n'a pas été retrouvé chez les garçons (Harley et al., 2013).

### **Les polluants organiques persistants**

Différentes études prospectives ont été menées sur le DDE, les PCB, les pesticides organochlorés, HCB et les dioxines (Lee et al., 2010, 2011; Rignell-Hydbom et al., 2009; Taylor et al., 2013; Wang et al., 2008; Wu et al., 2013). Aucune d'entre elles ne montre d'association significative entre un POP donné et l'incidence du DT2. Cependant, cette association se révèle lorsque plusieurs POP sont considérés.

Trois études observationnelles menées sur des cohortes différentes ont mis en évidence des associations entre la quantité de POP et les maladies métaboliques. Dans la première cohorte de 886 participants adultes issus de la population générale de Catalogne (Espagne), Gasull et ses collaborateurs montrent des taux supérieurs de POP chez les diabétiques et prédiabétiques. De plus, cette étude montre que la prévalence du diabète et du prédiabète augmente de manière dépendante à la concentration de POP retrouvés dans le sang des individus. Cette étude impute une partie de l'association entre POP et diabète à l'âge et à l'IMC (Gasull et al., 2012).

La même observation est faite dans une seconde cohorte, qui inclut 8760 individus nés à Helsinki (Finlande) entre 1934 et 1944, soit avant le pic d'émission de POP lié à l'industrialisation. Cette démarche permet de révéler l'impact d'une exposition à l'âge adulte, et non les éventuels effets d'une exposition *in utero* (Airaksinen et al., 2011).

La troisième étude analyse les données NHANES 1999-2002 de 2016 participants âgés de plus de 20 ans. Les individus ont été répartis en quartiles selon leurs concentrations sériques en POP. Ceux du dernier quartile ont une prévalence au diabète 10 à 40 fois supérieure par

rapport aux individus du premier quartile. En revanche, aucune relation entre l'IMC et la prévalence du diabète n'a été trouvée (Lee et al., 2006), suggérant que les POP seraient le principal facteur de risque du DT2, avant le surpoids et l'obésité. En accord avec cette hypothèse, il a été observé une concentration de POP supérieure chez les obèses diabétiques par rapport aux obèses métaboliquement sains (Dirinck et al., 2016; Gauthier et al., 2014).

L'exposition périnatale au POP pourrait également prédisposer au surpoids et au DT2. Dans une étude longitudinale incluant 656 femmes enceintes des îles Féroé, Tang-Péronard *et al* montrent une association positive entre la quantité de POP dosée dans les urines des mères pendant la grossesse, le tour de taille et l'insulinémie de leur fille à l'âge de 5 ans. Ces associations ne sont pas observées chez les garçons (Tang-Péronard et al., 2014, 2015) sur une période plus longue, une étude prospective associe une exposition au POP PFOA à faible dose pendant la phase fœtale avec un surpoids chez les individus 20 ans plus tard (Halldorsson et al., 2012).

### **Les limites des études épidémiologiques**

Plusieurs limites existent à ces différentes études épidémiologiques, et elles pourraient expliquer pourquoi les associations entre PE et obésité/DT2 ne sont pas systématiquement retrouvées. Les concentrations urinaires de PE à courte demi-vie peuvent varier grandement au cours de la journée et d'un jour à l'autre. Par conséquent, et comme dans la plupart des études un seul prélèvement a été réalisé, les concentrations dosées ne sont pas représentatives de l'exposition journalière de l'individu (Appenzeller and Tsatsakis, 2012). De plus, en raison des effets à distance des PE, la mesure de la concentration du PE au moment où la maladie est déclarée ne correspond pas nécessairement à la concentration responsable de son développement, surtout si la maladie a mis plusieurs années à se développer. Enfin, les études observationnelles ne peuvent pas toujours dissocier les effets des différents PE, dans la mesure où nous sommes exposés quotidiennement à un large mélange de polluants.

## **2. Les données expérimentales**

Les études expérimentales permettent d'établir une relation causale entre une exposition et un effet qui peut dépendre de la dose, de l'âge et de la durée d'exposition.

## Le bisphénol A

En 2008, la *Food and Drug Administration* (FDA), agence américaine des produits alimentaire et médicamenteux, définit la dose sans effet (NOAEL) du BPA à 5 mg/kg/j. Cependant, très vite des effets adverses sont décrits pour des doses inférieures (Vandenberg et al., 2012).

Marmugi et al., ont exposé des souris CD-1 mâles adultes à différentes doses (5, 50, 500 ou 5000 µg/kg/j) de BPA par voie orale pendant 28 jours. Aucun effet n'a été observé à la dose NOAEL (5000 µg/kg/j). Cependant, aux doses inférieures, les souris exposées présentent une augmentation significative de la masse de tissu adipeux et des niveaux d'insuline, suivant une courbe en cloche, avec un effet plus marqué à la dose de 50 µg/kg/j (Marmugi et al., 2012). Les auteurs ont observé dans le foie une augmentation de l'expression des gènes codant des facteurs de transcription régulant la lipogenèse (LXR, SREBP1c et CHREBP), les principaux gènes impliqués dans la lipogenèse *de novo* (*Acaca*, *Fasn*, *Scd1*) ainsi qu'une stéatose hépatique (Marmugi et al., 2012). Lorsque l'exposition est poursuivie pendant 8 mois, les souris présentent une augmentation de la masse grasse, une hyperglycémie, une intolérance au glucose, une augmentation de l'expression des gènes de la biosynthèse du cholestérol et une hypercholestérolémie (Marmugi et al., 2014).

Des études ont également montré des atteintes pancréatiques. Des souris exposées au BPA à 0.1 mg/kg/j de BPA pendant 4 jours présentent une hyperinsulinémie observée en phase postprandiale, ce qui favorise l'insulino-résistance. De plus, la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose ainsi que le contenu en insuline des cellules β pancréatiques sont diminués chez ces souris, suggérant que le BPA aurait un effet diabétogène suite à l'altération de la fonction des cellules β du pancréas (Alonso-Magdalena et al., 2006).

Les adipocytes seraient également une cible du BPA. L'exposition de cellules isolées de tissus adipeux sous-cutané humain ou de la lignée cellulaire 3T3-L1 à 1 nmol/L de BPA pendant 24 h induit une diminution de la sensibilité à l'insuline et une augmentation de l'expression de marqueurs pro-inflammatoires comme l'interleukine 6 (IL6), ou l'interféron gamma (IFNγ) (Hugo et al., 2008; Valentino et al., 2013), favorisant l'insulino-résistance.

L'exposition périnatale au BPA entraîne également des effets dépendants de la dose. Par exemple, l'injection sous-cutanée de BPA à la dose de 10 µg/kg/j entre le 9<sup>ème</sup> et le 16<sup>ème</sup> jour

de gestation entraîne chez la descendance mâle une augmentation du poids visible à la naissance et au sevrage. Ces souris présentent également une intolérance au glucose et une forte résistance à l'insuline visible à l'âge de trois mois. La descendance mâle des mères exposées à 100 µg/kg/j pendant la gestation présente à trois mois une intolérance au glucose, sans altération de la sensibilité à l'insuline ni du fonctionnement des cellules β pancréatiques (Alonso-Magdalena et al., 2010).

L'effet de l'exposition périnatale au BPA dépend également de la période d'exposition. Liu et ses collaborateurs ont exposé des souris au BPA pendant la période de préimplantation de l'embryon (jour 1 à 6 de gestation), pendant la période fœtale (jour 6 à 21 de la gestation), pendant la période néonatale (depuis la naissance jusqu'au sevrage) et pendant la période fœtale et néonatale (jour 6 de la gestation jusqu'au sevrage). L'exposition pendant la période fœtale entraîne un plus petit poids de naissance et une intolérance au glucose à l'âge adulte chez les mâles alors que l'exposition néonatale se traduit par une augmentation de la prise de poids et une intolérance au glucose, et ces effets sont observés dès la 5<sup>ème</sup> semaine de vie (Liu et al., 2013).

### **Les phtalates**

Le DEHP a été très utilisé dans les années 1990 pour assouplir les plastiques, particulièrement dans les dispositifs médicaux et les emballages alimentaires. De nos jours, le DEHP est interdit dans tous les jouets et les articles de puériculture destinés aux enfants. L'utilisation de cette substance est également prohibée dans les cosmétiques dans la mesure où elle est considérée comme cancérigène, mutagène ou toxique pour la reproduction (substance CMR). La dose NOAEL déterminée pour le DEHP est de 4.8 mg/kg/j.

Dans la lignée cellulaire 3T3-L1 de préadipocytes murins, la présence de MEHP (métabolite actif du DEHP) entre 1 et 100 µmol/L dans le milieu de culture induit la différenciation des cellules en adipocytes de manière dépendante de la dose. Ceci a été mis en évidence par l'augmentation de l'accumulation de lipides dans les cellules ainsi que par l'augmentation de l'expression du marqueur de différenciation PPARγ, et de deux de ses gènes cibles : la LPL et l'aP2 (adipocyte protein 2 ou *Fatty Acid Binding Protein 4*, FABP4). L'augmentation de l'expression de ces gènes est également retrouvée dans le tissu adipeux épидidymal et dans le foie de souris 24 h après une injection de 500 µg/kg de MEHP (Hao et al., 2012), suggérant un éventuel effet obésogène du MEHP *in vivo*. De fait, l'exposition

périnatale au MEHP à la dose de 50 µg/kg/j (gavage des mères depuis le 12<sup>ème</sup> jour de gestation jusqu'au 7<sup>ème</sup> jour de lactation) entraîne une augmentation du poids de la descendance mâle à la 8<sup>ème</sup> semaine de vie, qui n'est pas visible à des doses supérieures (250 ou 500 µg/kg/j). Ces souris présentent également une augmentation du poids du tissu adipeux épидидymal ainsi que de la glycémie, de la triglycéridémie et de la cholestérolémie (Hao et al., 2012).

Des résultats similaires ont été retrouvés suite à une exposition au DEHP. Lee *et al.*, exposent des souris à 30 mg/kg/j de DEHP par voie orale pendant toute la durée de la gestation et la lactation. On retrouve chez la descendance une augmentation du poids corporel et du tissu adipeux viscéral, ainsi qu'une hypercholestérolémie. Les souris exposées ont une pression artérielle et des taux de cholestérol hépatique augmentés, ainsi qu'une diminution de l'expression des gènes hépatiques impliqués dans la régulation du cholestérol plasmatique (LDLR, SR-BI), de la dégradation du cholestérol en acide biliaire (Cyp7a1) et des transporteurs chargés d'extraire les acides biliaires dans la bile (ABCG5, ABCG8) (Lee et al., 2016), suggérant une diminution de la clairance du cholestérol.

Une étude réalisée par Lin *et al.*, montre d'autres effets du DEHP sur des rats exposés pendant la gestation à 1.25 ou 6.25 mg/kg/j. La descendance présente d'importantes altérations du métabolisme du glucose qui sont dépendantes du sexe et visibles à partir de la 27<sup>ème</sup> semaine de vie. Les souris femelles exposées présentent une intolérance au glucose avec une sécrétion d'insuline moins importante lors du test de tolérance au glucose et sans modification de la sensibilité à l'insuline périphérique, suggérant une atteinte pancréatique. De fait, l'analyse du pancréas montre une diminution de la masse et du contenu en insuline des cellules β. Ces effets sont visibles dès la 3<sup>ème</sup> semaine, ce qui suggère que le pancréas est une cible précoce du DEHP. Chez les mâles, aucun de ces effets n'est observé (Lin et al., 2011). Il est intéressant de constater que dans leur étude, Lin et al, n'observe pas de différence significative du poids corporel ou de la masse grasse, comme ce qui a été observé dans les études cités précédemment.

### **Les polluants organiques persistants**

Ruzzin et ses collaborateurs ont étudié les effets d'un mélange naturel de POP sur le métabolisme (Ibrahim et al., 2011; Ruzzin et al., 2010). Les poissons gras (comme le saumon) sont une source importante de POP, aux effets adverses, et d'acides gras polyinsaturés n-3,

aux effets bénéfiques à la santé. Dans leur travail, des rats adultes sont nourris avec un régime gras supplémenté en huile de saumon (HFC), contenant naturellement un mélange de POP, ou en huile de saumon raffiné (HFR), c'est-à-dire dont les POP ont été enlevés par blanchiment et filtration sur filtre à charbon actif. Après 28 jours, les rats HFC ont des taux de POP dans le tissu adipeux correspondant à ceux retrouvés chez l'Homme. Ces rats présentent une augmentation significative de la masse du tissu adipeux viscéral, une stéatose hépatique, ainsi que des taux de TAG, DAG et cholestérol hépatiques augmentés. Les auteurs ont mis en évidence une moindre inhibition de la production hépatique de glucose par l'insuline ainsi qu'une diminution de l'absorption du glucose par le muscle squelettique et le tissu adipeux, ce qui atteste d'une insulino-résistance globale. Les auteurs traitent également des adipocytes 3T3-L1 différenciés avec un mélange artificiel de POP contenant des pesticides organochlorés, des PCB, des dioxines ou des PCDF. Ils observent une diminution de l'action de l'insuline après exposition aux pesticides et au PCB à 1 nmol/L alors qu'aucune modification n'est observée avec les dioxines ou les PCDF, suggérant que l'effet du mélange pourrait être la conséquence de l'effet des pesticides et des PCB.

En revanche, dans des modèles cellulaires 3T3-L1, il a été montré une diminution de la différenciation des pré-adipocytes lorsqu'ils sont incubés avec 10 nmol/L de TCDD (Alexander et al., 1998; Phillips et al., 1995). Cependant, l'incubation des pré-adipocytes 3T3-L1 avec 0.1 nmol/L de TCDD induit la différenciation des cellules (Arsenescu et al., 2008), suggérant une opposition des effets à forte dose et à faible dose. De même, *in vivo*, l'exposition à des fortes doses de TCDD entraîne un *wasting syndrome*, c'est-à-dire une forte diminution du poids alors qu'à faible dose l'inverse est observé (Song et al., 2015)

L'effet inducteur de l'adipogenèse semble être un effet retrouvé pour plusieurs POP. Il a été montré que le PCB77 (Arsenescu et al., 2008), p-p' DDT (Moreno-Aliaga and Matsumura, 2002), l'aldrin et le dieldrin (Moreno-Aliaga and Matsumura, 1999) induisent la différenciation des pré-adipocytes et que le DDE et l'oxychlordane induisent l'absorption d'acide gras par les adipocytes, menant à l'hypertrophie de ces cellules (Howell and Mangum, 2011).

Les effets des POP sur le métabolisme semblent être différents selon le sexe. Par exemple, l'exposition de souris hybrides C57BL6 x FVB pendant la gestation et la lactation à la dioxine TCDD (10 pg/kg/j) montre à l'âge de 1 an une diminution de la masse grasse chez les mâles alors que les femelles exposées montrent une augmentation de leur masse grasse (van Esterik et al., 2015). Lorsque les souris sont exposés aux PCB153 (10 ng/kg/j) suivant le même

protocole (van Esterik et al., 2015), les souris mâles présentent une glycémie à jeun augmentée mais sans altération de la tolérance au glucose. Les femelles présentent une augmentation de la quantité de glucagon plasmatique, sans autre altération.

## **B. Effets métaboliques identifiés des PE après activation des récepteurs cibles**

### **1. Effets post liaison aux récepteurs aux œstrogènes**

Les souris mâles et femelles dont ER $\alpha$  a été inactivé présentent une résistance à l'insuline et une intolérance au glucose (tableau 6) (Heine et al., 2000). ER $\alpha$  joue également un rôle dans le contrôle de la prise alimentaire, comme cela a été décrit dans le 1<sup>er</sup> chapitre. Au niveau cellulaire, il a été montré que les préadipocytes expriment les deux isoformes d'ER et que les œstrogènes contribuent à l'augmentation du nombre d'adipocytes pendant le développement (Cooke and Naaz, 2004). Au niveau moléculaire, les œstrogènes et les ER régulent plusieurs aspects du métabolisme dont le transport du glucose, la glycolyse, la structure et l'activité mitochondriale et l'oxydation des acides gras (Chen et al., 2009).

Les différents effets du BPA peuvent potentiellement être imputables à l'activation d'ER. Par exemple, les dysfonctions pancréatiques observées suite à une exposition au BPA décrites précédemment sont retrouvées lorsque les souris sont exposées à des mêmes doses d'œstradiol (Alonso-Magdalena et al., 2008). Plus précisément, on sait aujourd'hui que le BPA active ER $\beta$  dans les cellules  $\beta$  pancréatiques, activant les canaux potassiques ATP-sensibles responsable de l'exocytose de l'insuline, ce qui se traduit par une hyperinsulinémie (Soriano et al., 2012).

Les œstrogènes activent également le récepteur aux œstrogènes associé à la protéine G (GPR30 ou GPER), qui induit des effets non-génomiques. Par exemple, il été montré que l'activité œstrogéno-mimétique du BPA à de faibles doses (1 nmol/L) est capable de potentialiser l'oscillation de calcium induit par le glucose dans des ilots pancréatiques fraîchement isolés, activant la sécrétion d'insuline. De plus, cet effet a été reproduit en exposant les ilots à l'œstradiol en présence de l'ICI182780, un inhibiteur des ER, ce qui montre que le BPA peut agir en mimant les œstrogènes autrement que par les ER (Chevalier and Fénichel, 2015; Quesada et al., 2002).



Il a été également montré que le BPA est capable d'activer les *estrogen-related receptors* (ERR). Bien que ces récepteurs soient similaires en termes de séquences aux ER, ils ne sont pas capables de lier les œstrogènes et sont considérés comme des récepteurs orphelins. Il existe trois isoformes : ERR $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Il a été montré que le BPA avait une affinité 100 fois supérieure pour ERR $\gamma$  que pour les récepteurs aux œstrogènes classiques et que sa liaison à ERR $\gamma$  entraînait des malformations de l'oreille interne chez le poisson zèbre, processus sous le contrôle de ce RN (Tohmé et al., 2014). Chez l'homme, l'analyse des promoteurs des gènes associés à l'obésité a montré une sur-représentation des éléments de réponses à ERR $\gamma$ , suggérant que l'activation de ce dernier par le BPA pourrait être impliquée dans le développement de l'obésité chez l'homme (Dong et al., 2016).

## **2. Effets post liaison aux récepteurs aux glucocorticoïdes et aux hormones thyroïdiennes (TH)**

Les perturbateurs endocriniens peuvent également moduler les récepteurs d'autres hormones, en particulier les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR) et aux hormones thyroïdiennes (TR).

Ces hormones sont fortement associées au métabolisme. Ainsi, une hyperthyroïdie se caractérise par un métabolisme accéléré, c'est-à-dire une augmentation de la lipolyse, de la biosynthèse et de l'excrétion du cholestérol et par une perte de poids. Un phénotype inverse est observé lors d'une hypothyroïdie. Or, plusieurs études ont montré que le BPA pouvait être un antagoniste de TR. Ainsi, il a été montré dans une lignée cellulaire dérivée de cellules de rein embryonnaire humain (HEK) que la présence de BPA à 1  $\mu\text{mol/L}$  diminue l'expression des gènes cibles de TR de manière dépendante à la dose en augmentant le recrutement du répresseur transcriptionnel NCoR sur le promoteur des gènes cibles de TR (Moriyama et al., 2002). *In vivo*, il a été montré que l'exposition de souris au BPA pendant la période périnatale entraîne une augmentation des niveaux de T4 circulants (Zoeller et al., 2005). Compte tenu de l'importance des TH pendant le développement, et dans le métabolisme, l'effet du BPA sur TR pendant le développement pourrait être un élément important dans l'augmentation du poids corporel sur le long terme.

L'activation de GR par les glucocorticoïdes permet à l'organisme de répondre au stress en stimulant la néoglucogénèse et l'oxydation des acides gras. Le syndrome de Cushing est défini par une sécrétion élevée de cortisol. Les personnes atteintes de ce syndrome présentent

notamment un trouble du rythme circadien, une néoglucogenèse accrue ainsi qu'une insulino-résistance. Le BPA et le dicyclohexyl phtalate sont capables d'activer GR. En effet, l'utilisation du gène rapporteur de la luciférase montre que ces deux molécules activent GR à des doses picomolaires (Sargis et al., 2010). De plus, dans les cellules 3T3-L1 en différenciation, il a été montré que le BPA et le dicyclohexyl phtalate pouvaient accélérer la différenciation des cellules et augmenter l'accumulation de lipides dans les cellules de manière dépendante de GR (Sargis et al., 2010), ce qui suggère que ces molécules ont une action obésogène en activant GR.

### 3. Effets post liaison aux xénosenseurs

Les enzymes nécessaires à la métabolisation et à l'élimination des xénobiotiques peuvent être divisées en trois catégories : les enzymes de phase I, qui permettent l'introduction d'un groupement fonctionnel sur la molécule ; les enzymes de phase II, qui conjuguent les xénobiotiques à des radicaux afin de les rendre plus hydrophiles et les protéines de phase III, qui sont des transporteurs prenant en charge la sécrétion extracellulaire des xénobiotiques métabolisés.

Le métabolisme des xénobiotiques est régulé par les facteurs de transcription PXR, CAR (*Constitutive Androstane Receptor*) et AhR (appelés xénosenseurs). L'action combinée de ces trois xénosenseurs permet l'élimination de la grande majorité des xénobiotiques. PXR et CAR reconnaissent également des endobiotiques comme les dérivés d'acides biliaires, les prégnanes (précurseurs de la progestérone), androstanes et métabolites stéroïdiens, suggérant que ces deux récepteurs nucléaires jouent un rôle dans la régulation du système endocrinien. Or, PXR, CAR et AhR contribuent également à la régulation du métabolisme énergétique (tableau 6) (Moreau et al., 2008; Wada et al., 2009).

Les premières preuves du rôle de PXR dans le métabolisme viennent des observations cliniques. Le traitement sur le long terme avec du phénobarbital, agoniste de PXR, induit une stéatose hépatique et un changement des profils lipidiques sanguins (Calandre et al., 1991; Lahtela et al., 1985). Chez les rongeurs, l'activation de PXR a un effet stéatogène dans le foie (Nakamura et al., 2007; Zhou et al., 2006). La délétion du gène PXR chez la souris rendue obèse par l'alimentation réduit la stéatose hépatique et la résistance à l'insuline en augmentant la consommation d'oxygène et la  $\beta$ -oxydation mitochondriale (He et al., 2013). En revanche, CAR a été décrit comme anti-obésogène, améliorant le diabète et la stéatose hépatique. En

effet, l'inactivation du gène CAR chez les souris diabétiques ob/ob réduit la glycémie et améliore la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline (Dong et al., 2009; Gao et al., 2009).

Un certain nombre de perturbateurs endocriniens activent PXR et CAR comme les nonyphenol, le DHEP ou le MEHP. Le BPA et certains PCB activent PXR chez l'Homme et PFOA, PFOS, et l'oganochlorine methoxylchlor peuvent activer CAR (Casals-Casas and Desvergne, 2011; Eveillard et al., 2009a; Ren et al., 2010).

AhR reconnaît les endobiotiques lipoxin A4, les dérivés des leukotriènes, les métabolites du hème et la bilirubine. Les xénobiotiques activant AhR sont essentiellement les dioxines et les PCB dit « dioxine-like ». Parmi les dioxines, la TCDD est l'agoniste parfait d'AhR. Certaines études ont montré que de faibles doses de TCDD ou du PCB *dioxin-like* 77 perturbent la biosynthèse du cholestérol, la synthèse des acides gras, le métabolisme du glucose (Arsenescu et al., 2008; Sato et al., 2014, 2008).

En plus de leurs effets directs, PXR, AhR et CAR influencent indirectement d'autres voies métaboliques en interférant avec d'autres récepteurs nucléaires (comme ER, FXR, LXR, PPAR $\gamma$ ) et facteurs de transcriptions (voir tableau 5) (Pascussi et al., 2008).

Cependant, il existe des différences entre l'homme et la souris qui ont été décrit particulièrement pour PXR. En effet, il a été montré en utilisant une lignée de cellule hépatique humaine HepG2 transfectés avec le gène humain ou murin de PXR et en mesurant son activation à l'aide d'un gène rapporteur, que le BPA pouvait activer le PXR humain mais pas son orthologue murin (Sui et al., 2012). Cette étude met en évidence des effets de perturbateurs endocriniens spécifique de l'espèce étudiée.

#### **4. Effets post liaison aux PPAR**

La famille des PPAR est composée de trois isoformes. PPAR $\alpha$  est fortement exprimé dans le foie, les muscles, les reins et le cœur. Il joue un rôle majeur dans l'oxydation des lipides, contrôlant le métabolisme des lipoprotéines et limitant l'inflammation. PPAR $\beta$  est ubiquitaire et joue un rôle dans la différenciation cellulaire. PPAR $\gamma$  est exprimé majoritairement dans les adipocytes et les macrophages et induit l'adipogenèse, le stockage des lipides, contrôle la sensibilité à l'insuline et participe à la réponse inflammatoire (Auwerx, 1999; Barish et al., 2006; Michalik and Wahli, 2007).

Le tributylétain (TBT) est un puissant biocide utilisé comme pesticide et antifouling dans les années 1960. Cette molécule est un fort activateur de PPAR $\gamma$  et de RXR, menant à l'activation des partenaires de RXR comme LXR ou NURR1 (Casals-Casas and Desvergne, 2011). Le TBT induit la différenciation des préadipocytes en adipocytes dans la lignée cellulaire 3T3-L1, concordant avec le rôle adipogénique de PPAR $\gamma$ . L'exposition *in utero* au TBT induit chez le rongeur une augmentation de la masse grasse, des altérations dans la structure et le métabolisme du tissu adipeux et une stéatose hépatique (Grün et al., 2006). LE TBT est de fait l'obésogène parfait et ses mécanismes d'actions ont été bien décryptés.

Le phtalate MEHP est également un activateur de PPAR $\gamma$ . Il induit l'adipogenèse dans les cellules 3T3-L1 via l'activation de ce RN. Cependant, l'analyse transcriptomique montre que le MEHP n'induit que 70 % des gènes induits par la rosiglitazone, un agoniste parfait de PPAR $\gamma$ , ce qui suggère que le MEHP est plutôt un modulateur sélectif de PPAR $\gamma$  qu'un agoniste parfait (Feige et al., 2007). *A contrario* du TBT, le MEHP et le DEHP induisent *in vivo* une diminution du poids corporel, comme décrit dans le point précédent. Cet effet, à priori contradictoire, est dû à l'activation de PPAR $\alpha$ , induisant l'oxydation des lipides. De plus, l'activation de PPAR $\alpha$  par une exposition à l'acide perfluorooctanoïque (PFOA) entraîne également une diminution de la prise alimentaire, ce qui suggère que PPAR $\alpha$  a également un effet anorexigène (Asakawa et al., 2008).

Il est intéressant de constater que les effets des PE dépendant de PPAR $\alpha$  ne sont pas retrouvés lorsque la souris exprime le gène humain de PPAR $\alpha$ , montrant une spécificité de réponse aux PE selon l'espèce (Feige et al., 2010; Nakamura et al., 2009).

## 5. Effets via la modification de l'épigénome

Les PE peuvent perturber l'épigénome en altérant les différentes composantes de l'épigénétique, à savoir, les micro-ARN (Avisar-Whiting et al., 2010), les modifications post-traductionnelles des histones ou la méthylation de l'ADN (Manikkam et al., 2012, 2013; Skinner, 2014; Skinner et al., 2013). Le domaine est encore peu exploré et nous présentons les études les plus significatives.

Une preuve de l'influence de l'épigénétique sur le métabolisme peut être observée dans les effets transgénérationnels. Un effet est dit transgénérationnel lorsqu'il est visible sur la 3<sup>ème</sup> génération (F3). En effet, une exposition au cours de la gestation expose directement les fœtus (F1), mais également les gamètes en formation qui engendreront la génération F2. Un effet

visible sur la génération F2 peut donc être dû à un effet direct des PE sur les cellules germinales. La génération F3 est donc la 1<sup>ère</sup> génération qui n'est pas directement exposée aux PE (voir figure 19).

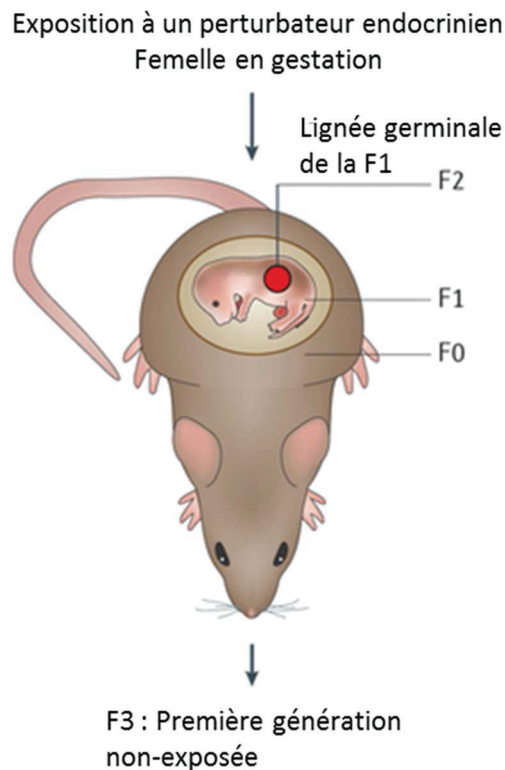


Figure 19 : Représentation schématique d'une exposition environnementale et des générations affectées. L'exposition à un perturbateur endocrinien d'une femelle en gestation (F0) expose également les souriceaux (F1) in utero. Les cellules germinales de la F1 se mettent en place pendant la gestation et par conséquent l'exposition peut affecter cette lignée germinale, entraînant des effets visibles dans la descendance de la F1 (F2). Ainsi, la descendance de la F2 (F3) est la première génération qui n'est pas directement exposée au perturbateur endocrinien lorsque la femelle F0 en gestation est exposée. Les effets visibles sur la F3 résultent donc en des modifications de l'épigénome qui sont transmissibles aux générations suivantes. (Adapté de Skinner et al., 2016)

L'exposition simultanée au BPA, DEHP et DBD (dibutyl phtalate) à 25, 325 et 33 mg/kg/j respectivement sur des rats en gestation entraîne sur la troisième génération (F3) une obésité visible chez les mâles et les femelles. Cette exposition entraîne des modifications des régions d'ADN méthylés qui sont toujours visibles dans la F3. L'analyse de l'ensemble des gènes épimutés montre que ceux-ci sont principalement impliqués dans la signalisation, le métabolisme/transport et le développement (Manikkam et al., 2013).

Plusieurs autres polluants ont été décrits comme ayant des effets transgénérationnels et sont présentés dans le tableau 7 (Skinner, 2014).

<b>Perturbateurs endocriniens</b>	<b>Caractéristiques des polluants</b>	<b>Références</b>
Vinclozoline	Pesticide, activité anti-androgénique	(Anway et al., 2005, 2006)
Methoxychlore	Pesticide organochloré (persistant)	(Anway et al., 2005; Manikkam et al., 2014)
TCDD	Polluant persistant, activité anti-oestrogénique, active le récepteur nucléaire AhR	(Bruner-Tran and Osteen, 2011; Manikkam et al., 2012a)
BPA – DEHP – DBP en mélange	Polluants moins persistant, présents dans les plastiques. Décrits comme oestrogénomimétiques	(Manikkam et al., 2012b, 2013)
Permethrine et DEET	Pesticide et anti-mositque	(Manikkam et al., 2012c)
DDT	Insecticide organochloré, associé à l'infertilité chez l'homme.	(Skinner et al., 2013)
Phtalates	Plastifiants rapidement métabolisés	(Doyle et al., 2013)
Tributylétain	Polluant persistant, agoniste de PPAR $\gamma$ et obésogène	(Chamorro-García et al., 2013)
BPA	Activité oestrogéno-mimétique, plastifiant rapidement métabolisé	(Salian et al., 2009; Wolstenholme et al., 2012)

Tableau 7 : Différents perturbateurs endocriniens induisant des effets transgénérationnels (Adapté de Skinner et al., 2014)

Chez l'homme, une association a été mise en évidence entre les taux de phtalates et phénols dans les urines des mères et différentes marques épigénétiques placentaires au niveau des gènes soumis à empreinte H19 et IGF2 (LaRocca et al., 2014). L'empreinte parentale est une inactivation sélective de quelques gènes durant la spermatogenèse ou l'ovogenèse, de sorte que le génome diploïde issu de la fécondation soit fonctionnellement haploïde pour ces gènes. Leur expression dépend généralement du degré de méthylation de leur promoteur. L'altération épigénétique de ces gènes mène au syndrome de Beckwith-Wiedemann, caractérisé par une croissance excessive, une prédisposition tumorale et des malformations congénitales. L'association entre les polluants et les marques épigénétiques de ces gènes suggère que chez l'homme, les PE et leurs métabolites peuvent être à l'origine de perturbation du développement, pouvant conduire à l'âge adulte à des problèmes métaboliques (LaRocca et al., 2014).

## 6. Effets via la modification du microbiote intestinal

De plus en plus d'études soulignent l'importance de la flore intestinale dans l'homéostasie énergétique. En effet, l'activité de l'ensemble des gènes bactériens dans l'intestin permet par

exemple la dégradation de nombreux composés alimentaires, la mise en place d'un système immunitaire adapté, et peut influencer l'équilibre énergétique alimentaire, jouant ainsi un rôle déterminant dans l'obésité (Turnbaugh et al., 2009).

En ingérant les PE, le microbiote intestinal peut également être une cible. Une étude particulière s'est intéressé à l'exposition à un PE et a étudié l'altération du microbiote et la perturbation du métabolisme énergétique de l'hôte. Dans ce travail, des souris ont été exposées à des fortes doses de dioxine 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran (TCDF) pendant 5 jours via l'alimentation. Les auteurs montrent une altération des espèces de bactéries présentes dans le colon, consécutives à une perturbation du métabolisme des acides biliaires provoquée par une inhibition de la voie de signalisation de FXR. De plus, les souris exposées présentent une forte inflammation intestinale et systémique, une altération de la lipogenèse hépatique, de la néoglucogenèse et de la glycolyse (Zhang et al., 2015).

## 7. Effets via la modification du rythme circadien

Les facteurs de transcription et les récepteurs nucléaires sont importants pour la régulation du rythme circadien et pour la rythmicité du métabolisme énergétique. De manière intéressante, l'analyse des promoteurs de gènes impliqués dans le rythme circadien a révélé des éléments de réponse à AhR (AhRE), aux œstrogènes (ERE) et aux xénobiotiques (XRE) (Rhee et al., 2014), ce qui suggère que ces gènes peuvent être la cible des PE. Ainsi, les PE en activant ces récepteurs, provoqueraient une perturbation du rythme circadien.

La dioxine TCDD est le premier PE pour lequel il a été montré qu'il pouvait entraîner une perturbation du rythme circadien. Plus précisément, les études ont montré que des faibles doses de TCDD ou du PCB *dioxin-like* 77 perturbent le rythme circadien via l'activation de AhR affectant dans le foie la biosynthèse du cholestérol, la synthèse des acides gras, le métabolisme du glucose (Arsenescu et al., 2008; Sato et al., 2014, 2008). Ainsi, il a été montré que l'exposition de souris à la TCDD par gavage à la dose de 1 µg/kg/j pendant 5 jours altère le rythme d'expression de Per1 dans le foie (Xu et al., 2010) et de Per2 dans les ovaires (Tischkau et al., 2011). Les auteurs montrent également dans un modèle de lignée cellulaire dérivé d'un hépatome murin (Hepa-1c1c7) que l'activation d'AhR mène à une répression de l'expression de Per1, en perturbant l'activité transcriptionnelle du complexe BMAL-CLOCK (Xu et al., 2010).

Il a également été montré que le DEHP pouvait perturber le fonctionnement de l'horloge moléculaire. En effet, l'analyse transcriptomique de foie de souris exposées au DEHP montre une activation de Rev-Erb $\alpha$  via CAR, perturbant l'horloge cellulaire et le métabolisme (Eveillard et al., 2009b).

Enfin, une étude bioinformatique a montré plus récemment en modélisant des interactions (*docking*) que le BPA pouvait interagir avec la protéine *CDC Like Kinase 2* (CLK2), impliquée dans la régulation du rythme circadien (Montes-Grajales and Olivero-Verbel, 2013). Ce résultat est appuyé par une autre étude qui montre que le BPA modifie l'expression des gènes impliqués dans le rythme circadien chez le poisson. (Rhee et al., 2014)





# Objectifs de la thèse

Cette revue non exhaustive de la littérature présente un grand nombre de données de la littérature sur l'impact des perturbateurs métaboliques sur la santé. Cependant, si de très nombreuses molécules ou familles de molécules ont été investiguées, peu d'études se sont intéressées au cas particulier des mélanges. Pour autant, s'il n'est pas envisageable d'estimer les risques pour l'ensemble des scénarios d'exposition, il est en revanche possible d'identifier des populations et des fenêtres d'exposition vulnérables, ainsi que des combinaisons de polluants particulièrement à risque. C'est la raison pour laquelle, nos travaux se sont concentrés sur l'impact d'une exposition couvrant la période maternelle à un mélange de polluants dans un contexte d'obésité chez les mâles et les femelles.

Précisément, le mélange que nous avons utilisé est constitué de 4 polluants, individuellement montrés comme PE et largement présents dans l'alimentation. Par ailleurs, les polluants choisis incluent des polluants persistants pour lesquels la concentration augmente avec l'âge (même si leur production est interdite ou limitée, en raison de leur rémanence) et des non-persistants, qui sont produits en grande quantité et envahissent notre quotidien comme les bisphénols et les phtalates. Dans notre modèle, l'exposition est chronique de sorte à mimer un « scénario réaliste ». Elle concerne notamment la période d'exposition maternelle qui est une période hautement vulnérable. En effet, les fœtus et les enfants ont un système de détoxification encore immature et sont donc plus vulnérables face à une agression toxique. Ainsi, la période maternelle caractérisée par la prolifération, la migration, la différenciation et la programmation des cellules qui, si elles sont ciblées par les PE, entraîneront des altérations durables (effet DOHaD).

Nous avons également choisi de travailler dans un premier temps dans un contexte d'obésité. En effet, il a été montré que les populations obèses sont plus à risque de développer des désordres métaboliques. Par ailleurs, Barouki *et al* suggèrent qu'une alimentation déséquilibrée augmente l'exposition aux polluants alimentaires (Barouki et al., 2012a). Il a aussi été montré que les hommes obèses sont plus sensible aux expositions puisqu'à IMC équivalent, l'incidence du diabète croît avec la concentration sérique en polluants (Lee et al., 2006). Cette interaction a également été retrouvée en expérimentation animale en montrant que l'impact métabolique du PCB153 (Wahlang et al., 2013), du BPA (Wei et al., 2011) et d'un mélange de POP (Ibrahim et al., 2011; Ruzzin et al., 2010) sont accentués dans un contexte d'obésité.

Au laboratoire, nous utilisons un modèle d'obésité induite chez la souris par une alimentation enrichie en lipides et saccharose à laquelle est ajouté un mélange de polluants

alimentaires répandus (dioxine, PCB153, DEHP et BPA). Les doses sont ajustées de sorte à ce que l'exposition soit de l'ordre de la Dose Journalière Tolérable (DJT), de la dose sans effet chez l'animal (NOAEL) ou 10 fois supérieure à la dose NOAEL pour chaque polluant. Ce traitement est initié 5 semaines avant l'accouplement, et poursuivi pendant la gestation et la lactation, et jusqu'à 12 semaines dans la descendance. Les altérations des fonctions métaboliques sont appréciées sur la base des mesures de poids, dépense énergétique, prise alimentaire, tolérance au glucose et sensibilité à l'insuline. Le patron d'expression de gènes candidats a été étudié dans le foie des descendants à 12 semaines d'âge dans les deux sexes.

**La première étude (article 1)**, à laquelle j'ai participé à mon arrivée au laboratoire conclut sur deux points essentiels. Premièrement, le mélange constitué à partir des 4 polluants chacun globalement à sa dose NOAEL est toxique pour la reproduction et/ou le développement périnatal (diminution significative du nombre de petits par portée et de la survie des souriceaux). Deuxièmement, le mélange constitué à partir des 4 polluants globalement à la dose DJT n'est pas sans effet sur les paramètres métaboliques et les effets observés sont dépendants du sexe de l'animal. Chez les femelles nous décrivons une aggravation de l'intolérance au glucose et une perturbation de la signalisation œstrogénique hépatique. Chez les mâles, nous observons une altération de la voie de synthèse du cholestérol et des acides biliaires. Cette étude apporte donc la preuve de concept sur les effets d'un mélange à très faible dose.

**La deuxième étude (article 2)** porte sur les femelles qui présentaient un phénotype plus marqué dans l'article 1. Pour comprendre l'origine des défauts, nous avons étudié des souris de 7 semaines en surpoids mais non obèses et présentant des taux sériques d'œstrogènes faibles (inférieures aux taux adultes).

Enfin, dans **la troisième étude (article 3)**, nous avons comparé les effets du mélange de polluants dans un contexte de régime standard aux effets induits par le régime obésogène chez la femelle. Le foie est un organe métabolique important dont les études précédentes ont montré qu'il était une cible des polluants et qui joue un rôle majeur dans la détoxification de l'organisme. Une étude transcriptomique a donc été réalisée dans cet organe de sorte à identifier les principales voies métaboliques impactées en réponse au mélange de polluants en comparaison des voies métaboliques ciblées par un régime obésogène chez les femelles.



# Matériels et méthodes

## I. Modèle Animal

Toutes les procédures ont été mises en place avec l'approbation du Comité Régional d'Éthique pour les Expériences Animales.

### A. Préparation de la nourriture

Les différents polluants sont dilués dans du DMSO et solubilisés dans de l'huile de maïs ( $6 \times 10^{-5}$  L/g de nourriture) avant d'être mélangés à l'alimentation des souris. La concentration des polluants présents dans la nourriture est décrite dans le tableau 8.

Afin que les souris soient exposées aux doses indiquées dans le tableau 8, 0,0585 g de nourriture contenant les polluants est donné par gramme de souris et par jour (soit 1g de nourriture pour 17 g de souris par jour). Cette nourriture est complétée par de la nourriture non polluée. La nourriture ne contenant pas les polluants contient les mêmes doses de DMSO et d'huile de maïs.

Polluants	DJT (g/kg/j)	Concentration dans la nourriture (g/g de nourriture)	Dose d'exposition (g/kg/j de souris)
<b>BPA</b>	$5.0 \times 10^{-6}$	$8.50 \times 10^{-8}$	$5.00 \times 10^{-6}$
<b>DEHP</b>	$5.0 \times 10^{-5}$	$8.47 \times 10^{-7}$	$5.00 \times 10^{-5}$
<b>TCDD</b>	$2.0 \times 10^{-12}$	$3.40 \times 10^{-14}$	$2.00 \times 10^{-12}$
<b>PCB153</b>	$2.0 \times 10^{-8}$	$1.36 \times 10^{-9}$	$8.00 \times 10^{-8}$

Tableau 8: Concentration des différents polluants utilisés et doses d'exposition

### B. Protocole animal

Des souris femelles de 4 semaines ont été commandées chez Harlan (Le Marcoulet, France). Pour éviter le relargage de BPA par les cages en polycarbonates, les souris sont placées dans des cages en polypropylène. Les biberons sont également en polypropylène. Après une semaine d'acclimatation, les souris sont séparées en 5 groupes. Les traitements diffèrent de par leur régime alimentaire (gras ou standard) et la présence de la mixture de polluants dans la nourriture.

Le régime enrichie en gras et en sucre (REGS) (Harlan) contient 36 % de lipides au lieu de 6 % pour le régime standard et entraîne chez le mâle une obésité en 5 semaines et un

diabète de type 2 en 12 à 16 semaines (Gout et al., 2010). La composition est détaillée dans le tableau 9

	Nourriture Standard (Rod16)		Standard + véhicule (STveh)		REGS	
	% en poids (g)	% en kcal	% en poids (g)	% en kcal	% en poids (g)	% en kcal
Lipides provenant de la nourriture	4.3		3.2		34.3	
Huile de maïs ajoutée			7.0		5.1	
<b>Total lipides</b>	<b>4.3</b>	<b>11.8</b>	<b>10.2</b>	<b>31.2</b>	<b>39.4</b>	<b>63.0</b>
<b>Glucides</b>	<b>55 (matodextrines + amidon)</b>		<b>35.6 (maltodextrine + amidon)</b>	<b>48.2</b>	<b>33.2 (50 % maltodextrine + 50 % fructose)</b>	<b>23.6</b>
Protéines provenant de la nourriture	16.9	67.6	14.6		18.8	
Protéines provenant de la gélatine			0.7			
<b>Total protéines</b>	<b>16.9</b>	<b>20.6</b>	<b>15.2</b>	<b>20.6</b>	<b>18.8</b>	<b>13.4</b>
<b>kcal/g</b>	<b>3.3</b>		<b>3.0</b>		<b>5.6</b>	

Tableau 9: Composition des nourritures utilisées

Après 5 semaines de régime, les souris sont accouplées avec des mâles contrôles. Les femelles continuent de recevoir le même régime qu'auparavant pendant la gestation et la lactation. Au sevrage (21 jours), les souriceaux sont nourris avec le même régime que leur mère. Selon le protocole, les animaux âgés de 7 ou 12 semaines sont euthanasiés par dislocation cervicale, les tissus rapidement prélevés et congelés dans de l'azote liquide (figure 20).

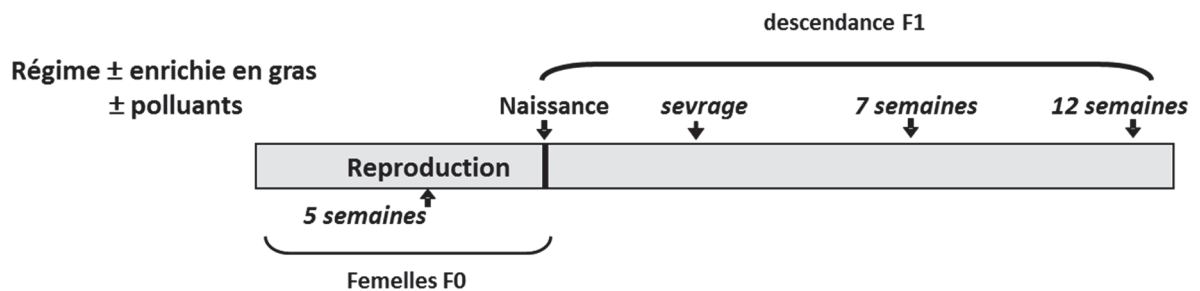


Figure 20: Modèle animal. Les souris sont nourries avec un régime gras ou non, mélangé ou non à des polluants. Après 5 semaines de régime, les femelles sont mises aux mâles. Elles reçoivent le même régime alimentaire pendant la gestation et la lactation. Au bout de 21 jours, la descendance est nourrie avec le même régime alimentaire que la mère jusqu'au sacrifice (7 ou 12 semaines de vie).



## C. Tests métaboliques

Les souris sont mises à jeun 16 h avant le début du test de tolérance au glucose ou 6 h avant le début du test de sensibilité à l'insuline.

Le test de tolérance au glucose permet de déterminer la capacité d'une souris à normaliser sa glycémie après une injection de glucose. La normalisation de la glycémie repose sur la capacité de l'animal à sécréter de l'insuline, à inhiber la production hépatique de glucose et à capter le glucose sanguin par les organes périphériques (muscles squelettique et tissus adipeux). On observe donc chez la souris standard un premier pic hyperglycémique suite à l'injection de glucose, suivi d'une diminution de la glycémie et un retour de la normoglycémie au bout de 90 min.

Le test de sensibilité à l'insuline permet de déterminer la sensibilité à l'insuline des tissus. Pour ce test, une injection d'insuline est réalisée au temps 0 et la glycémie est suivie pendant 60 min. Ce test permet d'apprécier surtout la capacité à capter le glucose du muscle et du tissu adipeux.

La mesure de la glycémie s'effectue avec un glucomètre OneTouchUltra (Lifescan, Issy-les-Moulineaux, France) sur une goutte de sang prélevée sur la queue avant injection (temps 0) et à intervalles réguliers après une injection intrapéritonéale de glucose (1 mg/g de souris) ou d'insuline (0.75 mU/g de souris)

## II. RT-qPCR

### A. Extraction d'ARN

Les ARN totaux sont extraits à partir des tissus congelés et broyés dans l'azote liquide. Environ 10 à 15 mg de foie, 100 à 150 mg de tissu adipeux ou 20 à 30 mg de muscle sont utilisés par extraction. L'extraction est réalisée selon le principe de Chomczynski et Sacchi grâce à un mélange de guanidinium thiosulfate-phénol-chloroforme (Chomczynski and Sacchi, 1987). Le guanidinium thiosulfate est un chaotrope qui, en dénaturant les protéines, protège les ARN des RNases. Le mélange phénol-chloroforme permet la séparation des molécules selon leur solubilité dans une émulsion à deux phases : une organique et l'autre aqueuse. Les protéines dénaturées se retrouvent dans la phase organique du mélange et les acides nucléiques dans la phase aqueuse. Afin de séparer l'ARN de l'ADN, le mélange phénol-chloroforme est utilisé à pH acide. Ainsi, les protons présents dans l'émulsion vont

neutraliser les charges négatives des ions  $\text{HPO}_4^{3-}$  du squelette de l'ADN qui devient donc neutre et hydrophobe et se retrouve donc dans la phase organique avec les protéines. L'ARN, étant simple brin, reste dans la phase aqueuse grâce aux liaisons hydrogènes que les bases azotées forment avec les molécules d'eau.

En pratique, le tissu broyé est dissout dans 1 mL de Trizol (Invitrogen) contenant le guanidinium thiosulfate et le phénol puis mélangé à 200  $\mu\text{L}$  de chloroforme. Après centrifugation (15 min à 12000 rpm,  $4^\circ\text{C}$ ), 500  $\mu\text{L}$  de la phase aqueuse contenant les ARNs sont récupérées puis mélangés à 500  $\mu\text{L}$  d'isopropanol avant une nouvelle centrifugation (10 min à 13000 rpm,  $4^\circ\text{C}$ ), afin de précipiter les ARNs. Après deux lavages à l'éthanol 75 %, les ARN précipités sont dissout dans 100  $\mu\text{L}$  d'eau RNase free. La concentration des ARN est déterminée par spectrométrie à 260 nm. Les contaminations protéique et phénolique sont déterminées en faisant les rapports 260/280 et 260/230 respectivement. Ces deux rapports doivent être compris entre 1,8 et 2 pour que la qualité de l'ARN soit considérée comme correcte.

## **B. Transcription inverse (RT)**

La transcription inverse permet d'obtenir des ADN complémentaires (ADNc) à partir des ARN. L'utilisation d'amorces oligo dT permet d'amplifier spécifiquement les ARNm, à partir de leur queue polyA.

Les RT sont réalisées à partir de 1  $\mu\text{g}$  d'ARN dans un volume de 10  $\mu\text{L}$ , auquel sont ajoutés 10  $\mu\text{L}$  de mélange réactionnel (kit Takara, ClonTech, Saint-Germain-en-Laye, France), composé de 4  $\mu\text{L}$  de tampon de réaction 5 X, 1  $\mu\text{L}$  de transcriptase inverse Takara, 1  $\mu\text{L}$  d'oligo dT à 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  et 4  $\mu\text{L}$  d'amorces hexanucléotidiques aléatoires. La réaction se déroule pendant 15 min à  $37^\circ\text{C}$ . Il s'ensuit une étape de 15 secondes à  $85^\circ\text{C}$  pour dénaturer l'enzyme. Chaque tube est ensuite traité avec 1  $\mu\text{L}$  de RNase H (60 U, Takara) à  $30^\circ\text{C}$  pendant 20 min pour dégrader les ARN ayant servi de matrice. Les échantillons sont ensuite dilués 20 ou 60 fois (selon le niveau d'expression) pour les dosages de PCR quantitative.

## **C. Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)**

La qPCR permet la quantification d'ADNc, proportionnelle au taux d'ARNm de l'échantillon, en utilisant un intercalant fluorescent de l'ADN, le Syber Green. L'observation de la quantité de fluorescence émise à chaque cycle permet de déterminer la cinétique

d'amplification de la PCR afin de déterminer la zone d'amplification exponentielle pendant laquelle l'augmentation du signal est proportionnelle à la quantité d'ADNc.

Les PCR en temps réel sont réalisées à l'aide d'un Rotorgene Q (Qiagen, France) dans un volume final de 20  $\mu$ L. Ce volume contient 5  $\mu$ L de la solution d'ADNc dilué 20 ou 60 fois et 15  $\mu$ L d'un mélange réactionnel contenant 4  $\mu$ L d'eau, 0,5  $\mu$ L d'amorce sens, 0,5  $\mu$ L d'amorce anti-sens et 10  $\mu$ L de solution ABSolute QPCR SYBR Green (Thermo Scientific, Courtaboeuf, France). La solution ABSolute QPCR SYBR Green contient les dNTP, la Taq polymérase, du calcium ainsi que du SYBR GREEN, un fluorophore qui émet à 510 nm lorsqu'il s'intercale dans la double hélice d'ADN. Pour la quantification, une gamme étalon en 6 points est réalisée :

- soit à partir du gène cloné dans un vecteur et dilué de façon à obtenir de 150 à 30000 molécules par tube pour une quantification absolue.
- soit à partir d'une dilution en cascade des échantillons qui permet l'obtention des valeurs relatives pour la comparaison entre échantillon au sein d'un même run.

Le logiciel Rotor-Gene Q Series v2.0.2 (Qiagen) permet d'établir une valeur de Ct (threshold cycle = cycle seuil), correspondant au cycle au cours duquel la fluorescence est supérieure au bruit de fond. La valeur de Ct de l'échantillon est ensuite transformée en nombre de molécules ou en valeur arbitraire à l'aide de la gamme amplifiée.

Les valeurs d'expression ainsi obtenue sont ensuite divisées par les valeurs d'expression d'un gène de ménage. Ce dernier est un gène dont l'expression n'est pas modifiée dans nos conditions expérimentales et donc la variation de valeur correspond aux variations des procédures expérimentales. Pour le foie, le gène Gusb ( $\beta$ -Glucuronidase) a été choisi comme gène de ménage et l'HPRT (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase) pour le tissu adipeux. Chaque échantillon est dosé en duplicat.

Symbol du gène	Numérieron d'accension Refseq	séquences: 5'→3'	
		Sens	Anti-sens
Abca1	NM_013454	CAG-GAG-GTG-ATG-TTT-CTG-ACC-A	TTG-GCT-GTT-CTC-CAT-GAA-GGT-C
Abcg5	NM_031884	AGC-CTC-GCT-CTG-AGC-TCT-TC	TTC-AGG-ACA-GGG-GTA-ACC-AC
Abcg8	NM_026180	AGC-CTC-GCT-CTG-ACA-TCT-TC	GTC-AAG-TCC-ACG-TAG-AAG-TC
Acaca	NM_022193	GAG-CAA-GGG-ATA-AGT-TTG-AG	AGG-TGC-ATC-TTG-TGA-TTA-GC
Acadm	NM_007382	CAT-TTG-GAA-AGC-TGC-TAG-TG	CCA-TAG-CCT-CCG-AAA-ATC-TG
Acox1	NM_015729;NM_001271898	TGA-GGG-CGC-CAG-TCT-GAA-ATC	TGA-AGC-TCA-GGC-AGC-TCA-CTC
AdipoQ	NM_004797; NM_001177800	AGG-CCG-TGA-TGG-CAG-AGA-TG	CTT-CTC-CAG-GTT-CTC-CTT-TCC-TGC
Ahr	NM_013464.4	TCA-TCT-GGT-TTC-CTG-GCA-ATG-AAT	ATA-AGC-TGC-CCT-TTG-GCA-TC
Arntl	NM_007489	CTG-CCT-GGA-AGG-AAG-TTA-CA	AAG-GTC-CAC-AGG-ATT-TGA-CT
Ccl5	NM_031116.3	CTT-GCA-GTC-GTC-TTT-GTC-AC	GAG-TAG-AGC-AAG-CAA-TGA-CAG
Cd36	NM_001159558.1	AAG-ATC-CAA-AAC-TGT-CTG-TA	GTC-CTG-GCT-GTG-TTT-GGA-GG
Cd68	NM_009853	AGC-ATA-GTT-CTT-TCT-CCA-GC	ATG-ATG-AGA-GGC-AGC-AAG-AG
Cpt1a	NM_013495	TCT-GAG-CCA-TGG-AGG-TTG-TC	CATCATGGCTTGCTCAAGTGC
Cyp1a2	NM_009993	TCA-TCC-TGG-AGA-TCT-ACC-GA	TGACCTGCCACTGGTTTATG
Cyp51	NM_020010	AGT-GCC-TGG-ATG-GGC-TTC-TT	GGA-GGC-CTC-AGT-CTT-AGT-GT
Cyp7a1	NM_007824.2	TAC-AGA-GTG-CTG-GCC-AAG-AG	AGT-GAA-GTC-CTC-CTT-AGC-TG
Dgat1	NM_010046	ACC-GCG-AGT-TCT-ACA-GAG-ATT-GGT	ACA-GCT-GCA-TTG-CCA-TAG-TTC-CCT
Dgat2	NM_026384	TGG-GTC-CAG-AAG-AAG-TTC-CAG-AAG-TA	ACC-TCA-GTC-TCT-GGA-AGG-CCA-AAT
Esr1	NM_000125;NM_001122740;NM_001122741;NM_001122742	TGT-TTG-CTC-CTA-ACT-TGC-TC	CCT-TCT-CTT-CCA-GAG-ACT-TC
Fabp2	NM_007980	ACC-TCT-CGG-ACA-GCA-ATC-AG	CTT-TCC-CTA-CAG-TCT-AGC-AG
Fasn	NM_017332	GTG-CAC-CCC-ATT-GAA-GGT-TCC-	GGT-TTG-GAA-TGC-TGT-CCA-GGG
Gusb	NM_010368	CTT-CAT-GAC-GAA-CCA-GTC-AC	GCA-ATC-CTC-CAG-TAT-CTC-TC
Hmgcr	NM_008255	CCG-GCC-TGT-GTG-TCG-CTG-GT	CCA-GCG-ACT-ATG-AGC-GTG-AA
Hprt	NM_000194	TTG-CTG-ACC-TGC-TGG-ATT-AC	AGT-TGA-GAG-ATC-ATC-TCC-AC
Hsl	NM_001039507;NM_010719	GTG-TGT-CAG-TGC-CTA-TTC-AG	GTC-AGC-TTC-TTC-AAG-GTA-TC
Igf1	NM_001111276;NM_001111274;NM_184052	ACC-AAA-ATG-ACC-GCA-CCT-GC	AAC-ACT-CAT-CCA-CAA-TGC-CTG-TC
Il1b	NM_008361	ACT-GTT-CCT-GAA-CTC-AAC-TG	CTT-GTT-GAT-GTG-CTG-CTG-CG
Il6	NM_031168	AGT-TGC-CTT-CTT-GGG-ACT-GAT	TCC-ACG-ATT-TCC-CAG-AGA-AC
Nqo1	NM_008706	GGC-CGA-TTC-AGA-GTG-GCA-TCC-TG	TCT-GCA-TGC-GGG-CAT-CTG-GTG
Nr1c1	NM_011144; NM_001113418.1	AAG-GGC-TTC-TTT-CGG-CGA-AC	GTT-CAT-GTT-GAA-GTT-CTT-CAG
Nr1c3	NM_001127330;NM_011146	TCT-CTC-CGT-AAT-GGA-AGA-CC	GCA-TTA-TGA-GAC-ATC-CCC-AC
Nr1h2	NM_007121	AGG-ACC-AGA-TCG-CCC-TCC-TG	GGT-GGA-AGT-CGT-CCT-TGC-TGT-AGG
Nr1h3	NM_005693;NM_001130101;NM_001130102	CCG-GGA-AGA-CTT-TGC-CAA-AGC	GGA-GCT-GGT-CCT-GCA-CGT-TG
Nr1i2	NM_010936.3	AGG-AGG-AGT-ATG-TGC-TGA-TG	CTT-CAG-GAA-CAG-GAA-CCT-GTG
Nr1i3	NM_001243063;NM_001243062;NM_009803	GTC-CCA-TCT-GTC-CGT-TTG-C	AGG-GCT-TCT-GAC-AGT-ATC
Per1	NM_0011065;NM_001159367	TGA-GCC-AGA-GGC-CAG-ATT-G	TGT-ATG-GCT-GCT-CTG-ACT-G
Scd1	NM_009127	GAT-ACA-CTC-TGG-TGC-TCA-AC	AAC-GTG-GTG-AAG-TTG-ATG-TG
Sepp1	NM_009155.3	ATG-ACA-GAT-GTG-GCC-GTC-TTG-TGT	GCC-TCT-GAG-GGC-TCC-GCA-GT
Soat2	NM_146064	GCT-CTA-TGC-CTG-CTT-CAT-CC	GTC-TCC-AAA-CCG-CAG-CAT-CT
Sqle	NM_009270	CTC-AGT-GAA-CAA-ACG-AGG-CG	TTT-TCG-GAG-CTG-ATG-CAA-GG
SrebF1	NM_011480	ACG-GAG-CCA-TGG-ATT-GCA-CA	AAG-GGT-GCA-GGT-GTC-ACC-TT
SrebF2	NM_033218	CCT-GTG-ATG-ATG-GGG-CAA-CAG	CCT-CAG-AAC-GCC-AGA-CTT-G
Stat5b	NM_001113563;NM_011489	GGC-TAT-GTG-GAT-ACA-GGC-TC	GCT-GGG-TGG-CCT-TAA-TGT-TC
Sult1e1	NM-023135.2	TCT-TGG-CAA-GGC-CAG-ATG-AC	TCC-CAA-AAT-GAT-GCT-GGA-AGG
Tnfa	NM_013693.2	CCT-CAC-ACT-CAG-ATC-ATC-TTC	TGG-CAC-CAC-TAG-TTG-GTT-GTC
Ugt1a1	NM_201645.2	GCA-TCT-ATC-TCG-CTG-ATG-AG	CAG-AGG-CGT-TGA-CAT-AGG

Tableau 10 : Liste des amorces utilisées

## D. Conception et validation d'amorces

Le choix et la spécificité des amorces sont des paramètres clefs pour le dosage de l'expression des gènes. Les amorces sont conçues en respectant plusieurs critères :

- L'amplicon doit faire entre 100 et 200 pb
- Les amorces doivent faire une vingtaine de nucléotides

- Les amorces sens et anti-sens doivent être situés sur deux exons différents pour éviter toute contamination d'ADN génomique
- La séquence 3' des amorces doit se terminer par un G ou un C, mais pas plus de 3 dans les 5 derniers nucléotides
- Les répétitions des 3 mêmes nucléotides sont évitées
- Les amorces doivent avoir entre 9 et 12 G ou C

Une fois les amorces conçues, des qPCR sont réalisées avec quelques échantillons d'intérêts pour déterminer la bonne température d'hybridation et vérifier leur fonctionnalité. Une migration des amplicons est systématiquement réalisée dans un gel d'agarose 3 % afin de vérifier la présence d'un seul amplicon de taille attendue.

La liste des amorces utilisées est présentée dans le tableau 10

### III. Analyse transcriptomique par les puces à ADN

#### A. Réalisation des puces à ADN

Les puces à ADN permettent de mesurer l'ensemble du transcriptome. Pour nos expériences, une puce a été réalisée par échantillon et les comparaisons des niveaux d'expression ont été réalisées *in silico*. Ces expériences ont été réalisées par la plateforme technique génomique du laboratoire à l'aide des puces Agilent 4x44K.

Pour cela, une RT est réalisée à partir de 100 ng d'ARN. L'ADNc obtenu est transcrit pour reconstituer le brin d'ARNm (ARNc). L'ARNc est ensuite marqué à l'aide du fluorochrome Cy3. Cet ARNc marqué est ensuite hybridé sur la puce. La puce contient des sondes qui sont des séquences spécifiques complémentaires de l'ARNc. Après l'hybridation, la puce est lavée (pour enlever les ARNc qui ne sont pas liés spécifiquement aux sondes) puis scannée. Le signal fluorescent est détecté et analysé, en partant du principe que l'intensité du signal est proportionnel au nombre d'ARNc hybridés.

L'analyse qualitative et la normalisation ont été réalisées par la plateforme génomique du laboratoire sous le logiciel R. La normalisation des données est une étape obligatoire avant le calcul des intensités, et a pour but de permettre la comparaison entre les différentes lames. Elle permet de s'affranchir des variations systématiques liées à la technologie même des puces à ADN, c'est-à-dire aux propriétés des fluorochromes, à la méthode de marquage, ainsi

qu'aux paramètres du scanner. Ces variations peuvent induire un biais dans l'estimation des niveaux d'expression des transcrits.

Une fois normalisées, les expressions sont comparées *in silico* afin de déterminer les gènes dont l'expression est significativement modifiée par les conditions expérimentales. L'expression des gènes est considérée comme significativement modifiée lorsque le *fold-change* d'expression est supérieur ou égal à 1.2 ( $FC \geq 1.2$ ) et que la *p-value* est inférieure ou égale à 0.05. Également la *p-value* ajusté selon Benjamini-Hochberg a été considérée pour minimiser les erreurs dues aux comparaisons multiples.

## **B. Interprétation biologique des données**

Les études transcriptomiques génèrent une grande quantité de résultats. C'est à la fois la force et la faiblesse de cette méthode. De nombreux outils existent aujourd'hui pour donner un sens biologique à cette masse d'information.

## **C. Analyse fonctionnelle des gènes**

L'analyse fonctionnelle permet l'intégration de métadonnées (c'est-à-dire d'informations complémentaires) issues de plusieurs sources aux gènes. Ces métadonnées, généralement disponibles sous la forme de base de données publiques, sont nombreuses et de qualité hétérogène. L'attribution de ces métadonnées permet ensuite la construction de groupes fonctionnels de gènes.

Plusieurs approches existent pour définir ces groupes fonctionnels. Le consortium *GeneOntology* (GO) propose une organisation structurée et hiérarchique des diverses annotations qui décrit le produit d'un gène par les processus biologiques, les composés cellulaires et les fonctions moléculaires auxquels il est associé. Une seconde approche consiste à relier les gènes en fonction des données métaboliques et des produits des différentes enzymes grâce aux données de KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

Toutes les analyses fonctionnelles reposent sur le même principe : l'enrichissement du nombre de gènes d'un groupe fonctionnel par rapport à un groupe de gènes obtenu de manière aléatoire. Les analyses fonctionnelles ont été réalisées à l'aide du programme DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, <https://david.ncifcrf.gov>), g:Profiler (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/>) ou Babelomics5 (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es/>).

Sur le programme DAVID, l'analyse a été réalisée à partir des sources GOTERM\_BP\_FAT, GOTERM\_CC\_FAT, GOTERM\_MF\_FAT, KEGG\_PATHWAY et PANTHER\_PATHWAY. Les groupes fonctionnels ont été considérés significatifs si leur enrichissement était supérieur à 2 et si la *p-value* ajustée selon Benjamini-Hochberg était inférieure à 0.05.

#### **D. Analyse des promoteurs des gènes**

En plus des groupes fonctionnels, des sites putatifs de fixation de facteurs de transcription connus peuvent être recherchés dans les promoteurs des gènes régulés afin d'identifier un ou plusieurs facteurs de transcription impliqués dans la réponse aux stimuli d'intérêt (exposition aux polluants, régime alimentaire). Les séquences promotrices ont été obtenues grâce à l'outil BioMart du projet Ensembl sur une longueur de 2000 paires de bases (pb) en amont du site d'initiation de la transcription. Les sites putatifs de liaison des facteurs de transcriptions sont analysés grâce à l'outil MatInspector de la suite Genomatix. MatInspector utilise une large banque de données de matrices définies pour les sites de fixation de facteurs de transcription et recherche l'occurrence de ces matrices sur les séquences promotrices à analyser. Les paramètres de l'analyse utilisés recherchent une identité de séquences avec le cœur du motif de 75 % ainsi qu'une similarité de séquences de la matrice entière optimisée. Cet outil permet l'analyse de 10000 nucléotides au maximum toutes séquences confondues, soit 50 gènes simultanément selon nos paramètres.

Sur le même principe, l'outil *common TF* de Genomatix permet la recherche de facteurs de transcription communs à un grand nombre de gènes. En parallèle, cet outil évalue la représentativité des sites de fixation dans un jeu de données d'intérêt par rapport à un jeu aléatoire (séquences promotrices de gènes sélectionnés aléatoirement). Cette analyse statistique permet de savoir si le facteur de transcription est considéré plus ou moins présent dans l'ensemble des promoteurs des gènes d'intérêt de façon significative.

## **IV. Western Blot**

### **A. Extraction et dosage des protéines**

Les protéines sont extraites à partir de 10 à 15 mg de foie, 100 à 150 mg de tissu adipeux ou 20 à 30 mg de muscle congelé et broyé dans de l'azote liquide. Le tissu est ensuite solubilisé dans un tampon de lyse (PBS, SDS 0.1%, sodium deoxycholate 0.5%, Nonidet

NP40 1%, EDTA 5 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM, NaF 20 mM, dithiothreitol DTT 1mM ; Simga Aldrich, St-Quentin-Fallavier, France) en présence d'inhibiteur de protéases puis laissé à reposer 30 min sur la glace. Après centrifugation (15 min à 13000 rpm, 4°C) le surnageant contenant les protéines est récupéré puis congelé à -20°C.

Les protéines sont dosées selon la méthode de Biuret à l'aide du kit BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Dix microlitres de protéines diluées au 1/5 sont mélangés à 200 µL de solution contenant l'acide bicinchoninique, le sodium de tartrate et le sulfate de cuivre puis incubé 30 min à 37°C. L'absorbance est lue à 562 nm puis la concentration en protéines est déduite à partir d'une gamme étalon de BSA (Albumine Sérique Bovine). Les échantillons sont dosés en triplicat et la gamme est réalisée en duplicat.

## **B. Western Blot**

Le Western Blot permet de quantifier de manière semi-significative les niveaux d'expression d'une protéine d'intérêt grâce à l'utilisation d'un anticorps spécifique.

Les échantillons protéiques sont dénaturés à 75 °C pendant 10 min en présence de tampon de Laemmli (Tris-HCl 50 nmol/L, glycérol 12 %, SDS 1%, β-mercatoéthanol 4% et Bleu de BromoPhénol 0.01%, pH 6.8). Les protéines sont ensuite déposées dans un gel de migration de manière à les séparer en fonction de leur poids moléculaire par électrophorèse. Ce gel est composé d'un gel de concentration (contenant 4% d'acrylamide à pH 6,8) et d'un gel de séparation (pH 8.8) dont la concentration en acrylamide dépend de la protéine d'intérêt. La migration est réalisée en ampérage constant, à 30 mA par gel.

Une fois les protéines séparées, elles sont transférées sur une membrane de PVDF (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) en réalisant un transfert liquide pendant 1h à 100 V en système sandwich. La membrane est ensuite récupérée puis mise à incuber 2 h avec une solution de lait 5 % pour bloquer les sites de liaisons non-spécifiques. A la fin du lavage, la membrane est mise en contact avec un anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt dans du lait 5 % toute la nuit à 4°C. Les membranes sont ensuite lavées trois fois 15 min dans du tampon TBS (Euromedex, France) + 0,3% de Tween 20 (Euromedex, France) avant d'être incubées 1 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire dilué au 1/10000<sup>ème</sup> dans du lait 5 % dirigé contre la partie Fc de l'espèce qui a produit l'anticorps. L'anticorps secondaire est couplé à la peroxydase de raifort.



Les anticorps secondaires sont mis en évidence par chimiluminescence à l'aide du révélateur *Luminata Forte* (Millipore, Molsheim, France). Une fois révélées, les membranes sont lavées dans du TBS + 0,03 % de Tween 20 15 min puis déshybridées de leur anticorps primaire et secondaire à l'aide de la solution Stripping Buffer Western Blot (Thermo Scientific) pour pouvoir être à nouveau hybridées avec l'anticorps primaire dirigé contre l' $\alpha$ -tubuline servant de protéine de référence.

Chaque anticorps possède des conditions optimales de fonctionnement qui sont présentés dans le tableau 11.

<b>Paramètres du Western Blot</b>	<b>Anticorps primaire</b>				
	<b>ER</b>	<b>EST</b>	<b>pAKT</b>	<b>AKT</b>	<b>Tubuline</b>
Quantité de protéine déposée	10 $\mu$ g	10 $\mu$ g	10 $\mu$ g	10 $\mu$ g	10 $\mu$ g
Concentration du gel de séparation	10%	10%	10%	10%	10%
Tampon de blocage	Lait 5%	Lait 5%	BSA 4%	BSA 4%	lait 5% ou BSA 4%
Temps d'incubation de l'anticorps primaire	Toute la nuit	Toute la nuit	Toute la nuit	Toute la nuit	Toute la nuit ou 2h
Température d'incubation de l'anticorps primaire	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C ou température ambiante
Animal dont est issue l'anticorps primaire	Lapin	Lapin	Lapin	Lapin	Souris
Temps de révélation	60 s	180 s	5 s	60 s	10 s

**Tableau 11 : Anticorps primaires utilisés et paramètres optimaux pour leur utilisation**

# Résultats



**L'exposition à un mélange de polluants faiblement dosés  
entraîne des effets métaboliques dans le foie de la  
descendance de souris obèses**

*The FASEB Journal, 2013*

**Article 1: Low-dose food contaminants trigger sex-specific, hepatic  
metabolic changes in the progeny of obese mice**

*Naville D., Pinteur C.\*, Vega N.\*, Menade Y., Vigier M., Le Bourdais A., Labaronne E.,  
Debard C., Luquain-Costaz C., Bégeot M., Vidal H., Le Magueresse-Battistoni B*

\* These authors contributed equally to the work.

## **Résumé :**

Plusieurs travaux de la littérature suggèrent l'implication des polluants de l'environnement dans l'épidémie d'obésité et l'incidence du diabète. Il s'agit de polluants persistants qui se concentrent dans la chaîne alimentaire par bioaccumulation (ex : dioxines, PCB) ou bien de polluants présents notamment dans les emballages alimentaires (ex : phtalates, BPA), à demi-vie courte mais produits en grande quantité par l'industrie. Cependant, l'impact cumulé de cette myriade de polluants auxquels l'homme est exposé à faibles doses toute la vie, dont la période fœtale, n'est pas appréhendé dans l'évaluation du risque.

Nous utilisons un modèle d'obésité induite chez la souris par une alimentation enrichie en lipides et saccharose à laquelle est ajouté un mélange de polluants alimentaires répandus (dioxine, PCB153, DEHP et BPA). Les doses sont ajustées de sorte à ce que l'exposition soit de l'ordre de la Dose Journalière Tolérable (DJT), de la dose sans effet chez l'animal (NOAEL) ou 10 fois supérieure à la dose NOAEL pour chaque polluant. Ce traitement est initié 5 semaines avant l'accouplement, et poursuivi pendant la gestation et la lactation, et jusqu'à 12 semaines dans la descendance. Les altérations des fonctions métaboliques sont appréciées sur la base des mesures de poids, dépense énergétique, prise alimentaire, tolérance au glucose et sensibilité à l'insuline. Le patron d'expression de gènes candidats a été étudié dans le foie des descendants à 12 semaines d'âge dans les deux sexes.

Dans une première expérience, les souris ont été exposées à différentes doses de polluants. Nous observons que les polluants à la dose 10 NOAEL sont toxiques et reprotoxiques. A la dose NOAEL l'exposition des mères aux polluants diminue la taille des portées et le nombre de souriceaux survivant à la première semaine, montrant un effet reprotoxique. En revanche, lorsque les souris sont exposées à la dose DJT, les polluants n'impactent pas la durée de la gestation, la taille de la portée, le sex-ratio, le poids des petits et leur survie.

Par ailleurs, à 12 semaines d'âge la descendance exposée à la dose DJT ne présente aucun signe de toxicité générale. Nous n'observons pas non plus de différences dans la courbe pondérale, la prise alimentaire ou la dépense énergétique entre les groupes de souris nourries avec le régime gras contenant ou non la mixture de polluants. Les paramètres plasmatiques étudiés incluant la glycémie, l'insulinémie, la leptinémie, les taux de triglycérides sériques ou du cholestérol total ou estérifié ne sont pas non plus modifiés entre ces 2 groupes. En revanche, l'étude approfondie des souris exposées révèle la présence de modifications métaboliques qui varient selon le sexe. Chez les mâles, les polluants augmentent l'expression

hépatique de gènes liés au métabolisme du cholestérol sans affecter la sensibilité à l'insuline ou la tolérance au glucose. Chez les femelles, nous observons que les polluants aggravent l'intolérance au glucose associée à l'obésité sans modification de la réponse aux tests de sensibilité à l'insuline, suggérant une résistance à l'insuline d'origine hépatique. Comme les œstrogènes sont connus pour protéger les femelles des effets délétères de l'obésité, nous avons suivi l'expression du récepteur alpha des estrogènes et de plusieurs gènes régulés par les estrogènes. Nos résultats mettent en évidence une diminution de l'expression hépatique de ces gènes. En revanche, l'expression de l'Estrogène-SulfoTranfêrase, qui métabolise les œstrogènes, est augmentée ce qui pourrait diminuer localement la biodisponibilité des œstrogènes et contribuer à l'aggravation de l'intolérance au glucose.

Dans cette étude, nous avons démontré que de faibles doses de polluants de l'ordre des doses considérées sans effet pour l'homme ne sont en fait pas sans effet lorsque plusieurs polluants sont administrés en mélange dans un contexte d'obésité. Nous mettons en évidence sur des souris adultes, que les effets de ce mélange sont dépendant du sexe de l'animal. En particulier, nos résultats suggèrent l'hypothèse d'un lien entre l'intolérance au glucose et l'altération de la signalisation œstrogénique observée chez les femelles dans un contexte d'obésité. L'exposition aux contaminants alimentaires pourrait ainsi se traduire par une baisse de la protection exercée par les œstrogènes sur les maladies métaboliques.

## Low-dose food contaminants trigger sex-specific, hepatic metabolic changes in the progeny of obese mice

Danielle Naville,<sup>\*,†,‡</sup> Claudie Pinteur,<sup>\*,†,‡,1</sup> Nathalie Vega,<sup>\*,†,‡,1</sup> Yoan Menade,<sup>\*,†,‡</sup> Michèle Vigier,<sup>\*,†,‡</sup> Alexandre Le Bourdais,<sup>\*,†,‡</sup> Emmanuel Labaronne,<sup>\*,†,‡</sup> Cyrille Debard,<sup>\*,†,‡</sup> Céline Luquain-Costaz,<sup>\*,†,‡,§</sup> Martine Bégeot,<sup>\*,†,‡</sup> Hubert Vidal,<sup>\*,†,‡,§</sup> and Brigitte Le Magueresse-Battistoni<sup>\*,†,‡,2</sup>

\*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U1060, Cardiovasculaire, Métabolisme, Diabétologie, et Nutrition (CarMeN) Laboratory, Oullins, France; †Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) U1362, Oullins, France; ‡Université Lyon 1, Villeurbanne, France; and §Institut National des Sciences Appliquées (INSA)-Lyon, Institut Multidisciplinaire de Biochimie des Lipides (IMBL), Villeurbanne, France

**ABSTRACT** Environmental contaminants are suspected to be involved in the epidemic incidence of metabolic disorders, food ingestion being a primarily route of exposure. We hypothesized that life-long consumption of a high-fat diet that contains low doses of pollutants will aggravate metabolic disorders induced by obesity itself. Mice were challenged from pre-conception throughout life with a high-fat diet containing pollutants commonly present in food (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, polychlorinated biphenyl 153, diethylhexyl phthalate, and bisphenol A), added at low doses in the tolerable daily intake range. We measured several blood parameters, glucose and insulin tolerance, hepatic lipid accumulation, and gene expression in adult mice. Pollutant-exposed mice exhibited significant sex-dependent metabolic disorders in the absence of toxicity and weight gain. In males, pollutants increased the expression of hepatic genes (from 36 to

88%) encoding proteins related to cholesterol biosynthesis and decreased (40%) hepatic total cholesterol levels. In females, there was a marked deterioration of glucose tolerance, which may be related to the 2-fold induction of estrogen sulfotransferase and reduced expression of estrogen receptor  $\alpha$  (25%) and estrogen target genes (>34%). Because of the very low doses of pollutants used in the mixture, these findings may have strong implications in terms of understanding the potential role of environmental contaminants in food in the development of metabolic diseases.—Naville, D., Pinteur, C., Vega, N., Menade, Y., Vigier, M., Le Bourdais, A., Labaronne, E., Debard, C., Luquain-Costaz, C., Bégeot, M., Vidal, H., Le Magueresse-Battistoni, B. Low-dose food contaminants trigger sex-specific, hepatic metabolic changes in the progeny of obese mice. *FASEB J.* 27, 3860–3870 (2013). [www.fasebj.org](http://www.fasebj.org)

*Key Words:* BPA • DEHP • persistent organic pollutant • estrogen sulfotransferase • cholesterol biosynthesis

Abbreviations: ABC, ATP-binding cassette; ACACA, acetyl-CoA carboxylase 1; AHR, aryl hydrocarbon receptor; AUC, area under the curve; BPA, bisphenol A; CAR, constitutive androstane receptor; CE, cholesteryl ester; CYP, cytochrome P450; CYP7A1, cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase; DEHP, di-[2-ethylhexyl] phthalate; DGAT, diacylglycerol *O*-acyltransferase; DMSO, dimethyl sulfoxide; ER, estrogen receptor; EST, estrogen sulfotransferase; FA, fatty acid; FASN, fatty acid synthase; FC, free cholesterol; GTT, glucose tolerance test; HFSD, high-fat, high-sucrose diet; HMGCR, 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase; HRP, horseradish peroxidase; IGF1, insulin-like growth factor 1; IST, insulin sensitivity test; LXR, liver X receptor; NOAEL, no-observed-adverse-effect level; NQO1, NAD(P)H-dehydrogenase quinone 1; PCB, polychlorinated biphenyl; POP, persistent organic pollutant; PPAR $\alpha$ , peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ ; PXR, pregnane X receptor; SEPP1, selenoprotein P; SREBF1, sterol regulatory element binding protein 1c; SREBF2, sterol regulatory element binding protein 2; SULT1E1, sulfotransferase family 1E, estrogen-preferring, member 1; TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin; TDI, tolerable daily intake; TG, triglyceride; UGT1A1, UDP-glucuronyltransferase 1a1

OBESITY IS A SIGNIFICANT health problem because of its association with increased risks for metabolic disorders including type 2 diabetes, and the current prevalence of these chronic diseases has reached epidemic proportions worldwide (1). Apart from genetic alterations and behavior linked to excessive food intake and low physical activity, which do not explain the magnitude of the disease or its kinetics, environmental pollutants have emerged as new “actors” for their suspected endocrine and metabolic disruption activity (2).

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

<sup>2</sup> Correspondence: INSERM U1060 (CarMeN), Faculté Médecine Lyon-Sud, 165 Chemin du Grand Revoyet, F-69921 Oullins, France. E-mail: [brigitte.lemagueresse@inserm.fr](mailto:brigitte.lemagueresse@inserm.fr)  
doi: 10.1096/fj.13-231670

This article includes supplemental data. Please visit <http://www.fasebj.org> to obtain this information.

This assumption was based on epidemiological studies, which associated the prevalence of type 2 diabetes with elevated body burdens of chemicals (3–6), and experimental studies in rodents, which established a causal relationship between exposure to chemicals and obesity-related metabolic dysfunction such as insulin resistance (7, 8). Based on their resistance to biodegradation, pollutants are classified as persistent organic pollutants (POPs) or short-lived pollutants. POPs are chemicals created by industrial activities either intentionally [polychlorinated biphenyls (PCBs)] or as by-products (dioxins). They are lipophilic and accumulate higher up the food chain through processes of bioaccumulation, being present in virtually all categories of foods and especially in fatty foods (9). Bisphenol A (BPA) and phthalates are short-lived chemicals, but because of their massive production in the manufacture of plastic goods, as well as epoxy resins for BPA, they are omnipresent and can leach from food and beverage containers and packaging to cause contamination (10, 11). Consequently, exposure in the general population is characterized by lifetime exposure to a complex mixture of various chemical agents, the resulting effects of which could not be predicted from the effects of individual pollutant (12). In addition, pollutants can transfer from mother to fetus through the placenta during pregnancy and through breast feeding (13).

However, human health risk assessments have focused primarily on single chemicals by setting up tolerable daily intake (TDI) reference doses defined by international agencies, such as the U.S. Environmental Protection Agency (EPA) or the European Food Safety Agency (EFSA), which are based on no-observed-adverse-effect levels (NOAELs) or lowest-observed-adverse-effect levels in animal studies (14). Furthermore, the mean exposures for the general population were found to be below the current levels determined to be safe for chemicals, as demonstrated for BPA and phthalates (10), but adverse effects of BPA were shown for doses lower than the TDI reference dose (15, 16). Finally, interactions between obesity and POPs on the prevalence of type 2 diabetes in the U.S. general population were seen (17), and experimental studies showed that intake of a high-fat diet could be a trigger initiating adverse metabolic effects, as shown with BPA in rats (18) and PCB 153 in mice (19).

These data prompted us to explore the hypothesis that during their life course, obese populations ex-

posed to a mixture of low doses of food contaminants are particularly at risk of developing metabolic disorders, especially from exposure to contaminants defined to be of great concern for human health (2, 6). The choice of the mixture for this study was based on the persistence of pollutants, their recognized endocrine-disrupting properties, the large extent of their occurrence in food, the broad range of activated signaling pathways (2, 13, 16), and their link with metabolic diseases in epidemiological and experimental studies (3, 6). Accordingly, in the present study, we determined the effect on metabolism of a mixture composed of representative persistent [2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) and PCB 153] and short-lived pollutants (di-[2-ethylhexyl] phthalate [DEHP] and BPA) added at low doses (in the TDI range) to a high-fat diet provided lifelong to mice of both sexes.

## MATERIALS AND METHODS

### Diets and animals

All procedures were performed with the approval of the Regional Committee of Ethics for Animal Experiments.

C57BL/6J mice were fed a high-fat, high-sucrose diet (HFSD; Harlan, Le Marcoulet, France; Supplemental Table S1) containing 36.1% fat (20). This diet was supplemented with a mixture of TCDD (LGC-Promochem, Molsheim, France), PCB 153, BPA, and DEHP (Sigma-Aldrich, Lyon, France) dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). Each pollutant was used at a dose grossly corresponding to the TDI reference dose of either the pollutant itself (BPA, ref. 16; and DEHP, ref. 21) or representative congeners of dioxins and dioxin-like PCBs with TCDD (22) and nondioxin-like PCBs with PCB 153 (23). The mixture was referred to as TDIA (Table 1). In preliminary studies, we also exposed animals to higher doses, as reported in Table 1. An equal volume of DMSO, either containing or not containing the mixture of pollutants, was added to the HFSD in corn oil (30 ml/1000 g of diet). Therefore, all animals fed the HFSD received the same amount of DMSO and corn oil. To ensure that animals ingested the correct amount of polluted food, we distributed 1 g of contaminated food/17 g of body weight/d, and extra pollutant-free HFSD was provided to animals *ad libitum*.

The protocol was as follows. Female C57BL/6J mice, 4 wk old, were purchased from Harlan and housed in separated polypropylene cages (to avoid BPA leaching from polycarbonate cages) at 21°C with a normal light-dark cycle and free access to water (polypropylene bottles) and standard chow. After a 1-wk acclimatization, mice were randomized and divided into 5 groups, a group fed the HFSD without pollut-

TABLE 1. Reference dose of the pollutants used in the mixture and doses added to the HFSD

Dosage group	TCDD	PCB153	BPA	DEHP
TDI	1–4 pg/kg	20 ng/kg	50 µg/kg	50 µg/kg
TDIA	2 pg/kg	80 ng/kg	5 µg/kg	50 µg/kg
M1	2 ng/kg	40 µg/kg	5 mg/kg	25 mg/kg
M10	20 ng/kg	400 µg/kg	50 mg/kg	250 mg/kg

In addition to the TDIA mixture dosage group, 2 dosages higher than the TDIA were tested, referred to as mixture 1 (M1) and 10 times M1 (M10) in preliminary studies.



ant [F0-obese (F0-Ob)] and groups fed the HFSD containing the mixture of pollutants at TDIA (F0-ObTDIA) and higher doses than TDIA as specified in Table 1. The fifth group of mice was fed standard chow. These diets were maintained 5 wk before mating with 8-wk-old standard chow-fed males and then during gestation and lactation. After weaning, F1 descendants were fed the same diet as their dams until 12 wk of age (Supplemental Fig. S1). Body weight and food intake were recorded weekly, and total energy expenditure was measured in 10-wk-old F1 mice by indirect calorimetry (24).

### Metabolic tests

Glucose tolerance tests (GTTs) and insulin sensitivity tests (ISTs) were performed in F1 mice at 11 wk of age exactly as described previously (25). GTTs were also performed in F0 dams after 5 wk of the HFSD with or without pollutants (*i.e.*, before mating) and 12 wk of the HFSD with or without pollutants (*i.e.*, 1 wk postweaning).

### Blood and tissue collection

After 6 h of food withdrawal, 12-wk-old mice were euthanized. Blood was collected, and liver was removed and snap-frozen in liquid nitrogen. A small piece of liver was fixed in 4% formaldehyde and frozen in liquid nitrogen. Sections were stained with Oil Red O for lipid visualization, and nuclei were colored by using hematoxylin staining. We measured blood glucose concentrations (OneTouchUltra glucometer; Lifescan, Issy-Les-Moulineaux, France) and plasma levels of insulin (Alpco; Eurobio, Courtaboeuf, France), leptin (RayBio; CliniSciences, Nanterre, France), triglycerides (TGs; BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France), total cholesterol and cholesteryl esters (CEs; Abcam, Paris, France), testosterone, and 17 $\beta$ -estradiol (Interchim, Montluçon, France).

TG, free cholesterol (FC), and CE levels were measured in liver samples after lipid extraction by the method of Bligh and Dyer (26). For FC and CEs, lipids were separated by TLC (silica gel) using the solvent system hexane-diethylether-acetic acid (80:20:1, v/v). FC was extracted with hexane-diethylether (1:1, v/v). The samples were dried and derivatized with *N,O*-bis-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide. The resulting sterol derivatives were resuspended in hexane and were analyzed by gas chromatography/tandem mass spectrometry using an Econo-Cap EC-5 capillary column with helium as the carrier gas and quantified using stigmaterol as the internal standard. CEs were transmethylated by heating at 100°C for 90 min in methanol containing 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The resulting fatty acid (FA) methyl esters were analyzed by gas chromatography, and the percentage and mass of each FA were calculated using the internal standard (pentadecanoic acid methyl ester) as described previously (27).

### Quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from the frozen liver tissue samples. RNA was analyzed by real-time PCR exactly as described previously (28) in the presence of specific primer pairs (Supplemental Table S2) with data normalized relative to  $\beta$ -glucuronidase mRNA expression levels.

### Western blotting analysis

Proteins (10  $\mu$ g) prepared from mouse liver were separated by SDS-10% polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane. Immunoblotting was performed using rabbit polyclonal antibodies

directed against estrogen receptor (ER)  $\alpha$  (sc-542; Santa Cruz Biotechnology, CliniSciences, Nanterre, France), estrogen sulfotransferase (EST; sc-292049; Santa Cruz Biotechnology), or mouse monoclonal antibodies directed against  $\alpha$ -tubulin (sc-5286; Santa Cruz Biotechnology). After incubation with either anti-rabbit or anti-mouse IgG horseradish peroxidase (HRP) conjugate (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), blots were revealed using Luminata Classico Western HRP substrate (Millipore, Molsheim, France), detected using the ChemiDoc XRS+ imaging system (Bio-Rad), and analyzed with Image Lab software (Bio-Rad). EST and ER $\alpha$  data were normalized relative to  $\alpha$ -tubulin.

### Statistics

All statistical analyses were performed using 1-way ANOVA, followed by *post hoc* testing with Fisher's protected least significant difference test. Results are expressed as means  $\pm$  SE, and differences were considered significant at values of  $P < 0.05$  using the Ob group as reference.

## RESULTS

### Determination of the pollutant dosage resulting in no or little toxicity in offspring

F0 females fed the HFSD were heavier than standard chow-fed females, and their pups were also heavier than pups from standard chow-fed dams (Table 2). Consistent with pollutant contamination, the activating drug-metabolizing enzymes cytochrome P450 (CYP) 1A1 and CYP4A14 showed enhanced hepatic gene expression in dams exposed to the 2 highest doses of the mixtures tested (referred to as M1 and M10 in Table 2). The TDIA mixture dosage did not affect the body weight of F0 females at mating (Table 2). It also did not affect glucose tolerance of F0 females according to GTTs performed either before mating (5 wk of diet) or at 1 wk postweaning (12 wk of diet; data not shown). Glycemia measured in F0 females exposed to pollutants (either dosage) was in the normal range, and the sex ratio was normal among litters. However, depending on the mixture dosage, litter size, pup survival, and weight at 10 d were found to be altered (Table 2). We therefore studied the metabolic phenotype of the F1 progeny exposed to the TDIA mixture dosage because of no apparent toxicity that could result in nonspecific metabolic effects.

### Pollutant-induced metabolic alterations in adult offspring are sex dependent

With the HFSD, the onset of obesity was gradual (Fig. 1), and 12-wk-old mice were obese with high levels of blood glucose and enhanced levels of plasma insulin, leptin, and cholesterol but no change in plasma TGs (Table 3). Metabolic profiles were completed with GTTs and ISTs consistently showing that obese mice were less glucose tolerant than lean mice and that obese males (but not females) were less sensitive to insulin than lean males (Fig. 1). Pollutants did not affect the plasma param-

TABLE 2. Reproductive parameters and characterization of F0 females and F1 offspring before weaning

Parameter	Standard	Ob	ObTDIA	ObM1	ObM10
F0 females ( <i>n</i> )	13	32	32	41	9
F0 female weight (g) <sup>a</sup>	19.2 ± 0.3*	21.3 ± 0.4	21.9 ± 0.4	23.6 ± 0.5*	20.2 ± 1.0
Liver gene expression <sup>b</sup>					
<i>Cyp1a1</i>	1.44 ± 0.29	0.71 ± 0.06	0.64 ± 0.19	22.9 ± 8.2*	1029 ± 83*
<i>Cyp4a14</i>	44.2 ± 10.2*	129.3 ± 12.0	129.0 ± 25.6	236.6 ± 34.4*	467.5 ± 64.7*
Pups/mouse [ <i>n</i> (range)]	6.5 ± 0.5 (4–9)	7.3 ± 0.2 (4–9)	8.0 ± 0.2 (5–10)	5.9 ± 0.3 (4–9)*	6.1 ± 0.3 (5–7)*
Sex ratio	0.48 ± 0.06	0.52 ± 0.04	0.53 ± 0.04	0.53 ± 0.04	0.50, <i>n</i> = 2
F1 survivors/mouse (%)	95 ± 3	86 ± 5	75 ± 5*	65 ± 9*	22 ± 13*
Glycemia in F0 females (mM) <sup>c</sup>	6.8 ± 0.2	7.7 ± 0.4	8.2 ± 0.5	8.3 ± 0.6	7.4 ± 0.5
F1 offspring weight (g) <sup>d</sup>					
Females	4.5 ± 0.2*	4.9 ± 0.1	4.8 ± 0.1	5.4 ± 0.1*	ND
Males	4.4 ± 0.2*	4.9 ± 0.1	4.9 ± 0.1	5.1 ± 0.1	ND

Results are means ± SE. Ob, obese; ND, not determined.<sup>a</sup>Weight at mating.<sup>b</sup>Liver gene expression at mating (specific gene/Gusb mRNA ratio).<sup>c</sup>Glycemia measured 1 wk after F1 weaning, 6 h food withdrawal.<sup>d</sup>F1 weight at d 10 after birth, *n* ≥ 12. \**P* < 0.05 vs. Ob.

ters studied (Table 3), body weight (Fig. 1), and daily food intake or energy expenditure (data not shown). Examination of liver slices indicated no gross modifications in Oil Red O staining between samples recovered from mice fed the HFSD and the HFSD plus pollutants within each sex (Supplemental Fig. S2). In pollutant-exposed females but not males, there was a marked deterioration of glucose tolerance, with a significant increase (25%, *P*=0.002) in the area under the curve (AUC) during GTTs without an indication of extrahepatic insulin resistance assessed by ISTs (Fig. 1). These data indicated that lifelong consumption of a TDIA dose of pollutants added to the HFSD further aggravated glucose metabolic disorders of obese 12-wk-old female but not male mice. Because liver is the major site of detoxification, we focused hereafter on this organ. Furthermore, drug disposition is known to be altered in fatty liver (29) and dependent on sex (30).

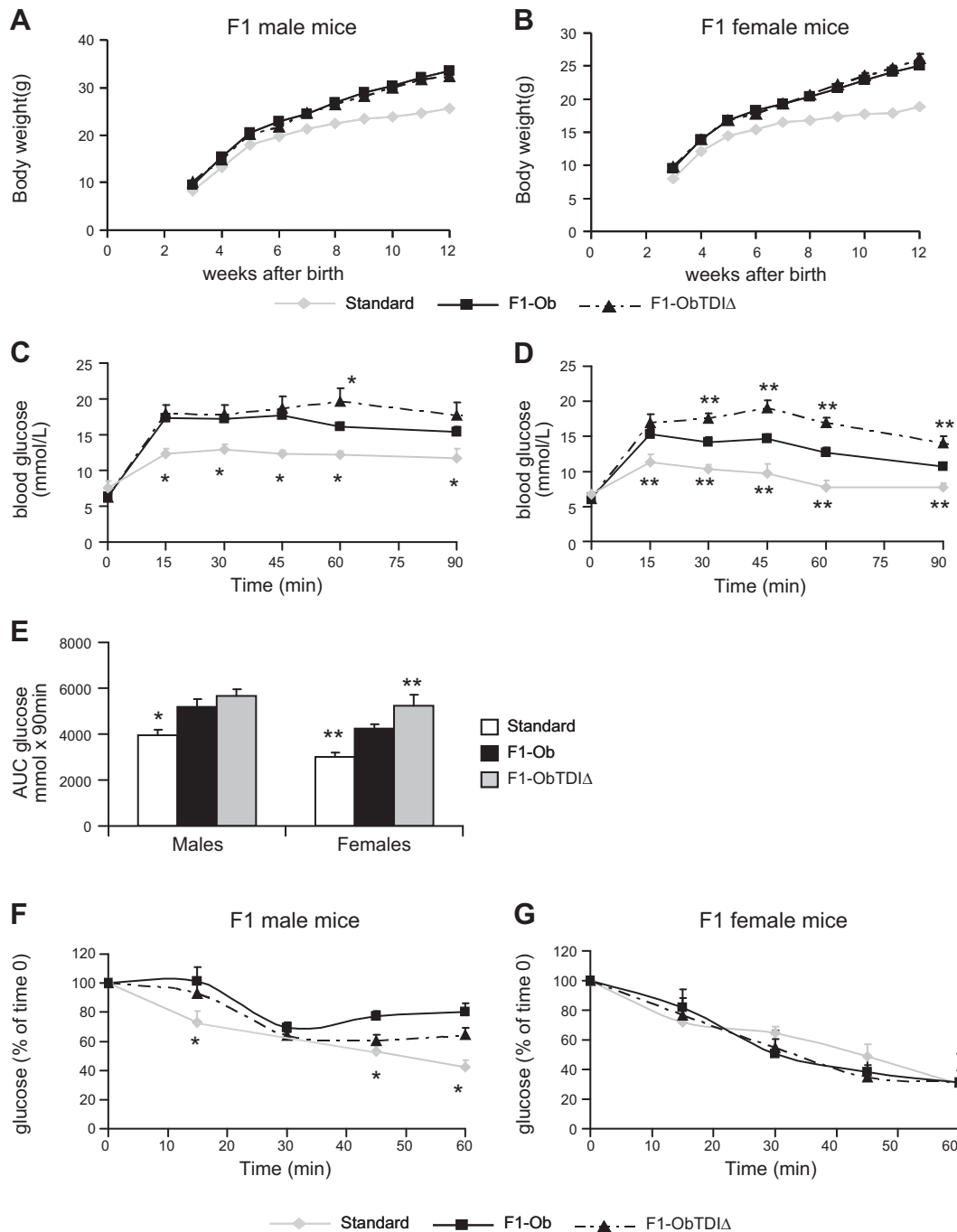
#### Hepatic expression of transcription factors/nuclear receptors in response to pollutants in an obesity context is sex dependent

Because transcription factors/nuclear receptors are known to control hepatic lipid metabolism and drug disposition (31), we measured the expression of xenosensors [aryl hydrocarbon receptor (AHR), constitutive androstane receptor (CAR; *Nr1i3*), and pregnane X receptor (PXR; *Nr1i2*), lipid sensors *Nr1h3* and *Nr1h2* encoding liver X receptors (LXR) α and β, respectively, and *Nr1c1* encoding peroxisome proliferator-activated receptor α (PPARα). We showed sex-dimorphic expression of these genes with globally higher levels in chow-fed females than in males. LXRs, CAR, PPARα, and PXR (in males only) showed significant (*P*<0.05) enhanced gene expression levels in the HFSD-fed mice (Fig. 2A). In males but not in females, AHR, PPARα, and LXRα mRNA expression levels were significantly up-regulated in the presence of pollutants by 160% (*P*=0.007), 60% (*P*=0.005), and 36% (*P*=0.036), respectively (Fig. 2A), whereas the LXRβ mRNA level was down-regulated in

females by 32% (*P*=0.02). These data suggested that pollutants interacted with the expression of hepatic genes controlling lipogenesis, cholesterol homeostasis, and AHR signaling in males but not in females.

#### Cholesterol metabolism-related genes are altered in males but not in females exposed to pollutants

Because pollutants affected PPARα and LXRα mRNA levels in male liver, we measured expression of target genes, including sterol regulatory element binding protein 1c (*SrebF1*), a master regulator of *de novo* lipogenesis, and several genes involved in lipid metabolism including *de novo* FA synthesis, such as FA synthase (*Fasn*), acetyl-CoA carboxylase 1 (*Acaca*), and diacylglycerol *O*-acyltransferases (*Dgat1* and *Dgat2*); in fat uptake and transport (*Cd36*); and in cholesterol metabolism [sterol response element binding protein 2 (*SrebF2*), 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase (*Hmgcr*), cholesterol 7α-hydroxylase (*Cyp7a1*), and ATP-binding cassette (ABC) transporters (*Abca1*, *Abcg5*, and *Abcg8*; refs. 31, 32)]. As for nuclear receptors, most genes displayed sex-dimorphic expression with globally higher expression in females than in males in chow-fed conditions, and most genes had their expression levels altered with diet depending on sex (Fig. 2B, C). In pollutant-exposed males, no modification was observed in the expression levels of *SrebF1*, *Fasn*, *Dgat1*, and *Dgat2*. However, *Cd36*, a target of LXRα, PPARα, and AHR (33), had its expression levels enhanced by 86% (*P*=0.047); *Acaca* expression levels were also enhanced (+46%, *P*=0.01; Fig. 2B). Notably, several genes related to cholesterol metabolism had their expression levels significantly increased on pollutant exposure (Fig. 2C). These included *SrebF2* (+64%, *P*=0.006), its downstream target gene *Hmgcr* (+65%, *P*=0.007) encoding the rate-limiting enzyme for cholesterol synthesis, and *Cyp7a1* (+88%, *P*=0.03), *Abca1* (+48%, *P*=0.03), and *Abcg8* (+49%, *P*=0.04), which are known LXRα target genes (34). These modifications, indicative of altered cholesterol biosynthesis and efflux, were not



**Figure 1.** *A, B*) Body weight curves from weaning to 12 wk of age for F1 male (*A*) and female (*B*) mice fed either the HFSD (F1-Ob) or the HFSD containing the mixture of pollutants at the TDIΔ dose (F1-ObTDIΔ). Results are means ± SE with  $n \geq 9$  for each point. *C, D*) GTTs performed on F1 male (*C*) and female (*D*) mice. *E*) AUCs calculated from curves corresponding to GTTs (*C, D*). Results are expressed as means ± SE;  $n \geq 6$  in F1-Ob and F1-Ob TDIΔ groups and  $n = 3$  for standard mice. *F, G*) ISTs performed on F1 male (*F*) and female (*G*) mice. Results are expressed as means ± SE;  $n \geq 5$ . \* $P < 0.05$  vs. male F1-Ob; \*\* $P < 0.05$  vs. female F1-Ob.

observed in pollutant-exposed females. In contrast, these exhibited reduced levels of *SrebF1* (28%,  $P=0.02$ ) and *Dgat2* (44%,  $P=0.003$ ), 2 genes related to FA metabolism, and a trend of 33% was observed for *Cd36* (although it did not reach significance with  $P=0.07$ ; Fig. 2*B*). Finally, expression of genes involved in glucose metabolism (glucose 6-phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase) or encoding inflammatory markers (tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-6)

remained unaltered by the mixture of pollutants in either sex (data not shown).

### Sex-related differences in hepatic lipid content of pollutant-exposed animals

To evaluate the consequences of modified expression of genes related to cholesterol metabolism, we quantified the hepatic concentrations of FC and CEs. We

TABLE 3. Biochemical characterization of F1 mice

Parameter	Standard		F1-Ob		F1-ObTDIA	
	Value	<i>n</i>	Value	<i>n</i>	Value	<i>n</i>
<b>Females</b>						
Glycemia (mM)	8.4 ± 0.4*	13	10.4 ± 0.5	22	10.0 ± 0.5	16
Insulinemia (ng/ml)	0.4 ± 0.1*	13	1.3 ± 0.5	11	0.6 ± 0.1	11
HOMA-IR	3.6 ± 0.8*		15.3 ± 6.0		7.5 ± 1.2	
Leptin (ng/ml)	0.9 ± 0.3*	5	4.0 ± 0.7	8	4.6 ± 0.8	8
TGs (mM)	1.3 ± 0.1	6	1.1 ± 0.1	6	1.2 ± 0.1	6
Total cholesterol (mg/ml)	1.0 ± 0.1*	11	1.4 ± 0.1	11	1.5 ± 0.2	10
CE (mg/ml)	0.7 ± 0.1*	11	1.0 ± 0.1	11	1.1 ± 0.1	10
Estradiol (pg/ml)	24.1 ± 10.1	4	30.9 ± 7.2	7	23.7 ± 3.5	4
<b>Males</b>						
Glycemia (mM)	9.6 ± 0.6*	8	11.5 ± 0.4	18	12.5 ± 0.4	16
Insulinemia (ng/ml)	0.6 ± 0.1*	8	1.2 ± 0.2	14	1.2 ± 0.2	10
HOMA-IR	5.8 ± 0.9*		15.4 ± 2.1		18.0 ± 3.0	
Leptin (ng/ml)	0.9 ± 0.2*	5	4.0 ± 0.9	9	5.8 ± 0.8	8
TGs (mM)	1.4 ± 0.1	6	1.4 ± 0.1	6	1.3 ± 0.1	6
Total cholesterol (mg/ml)	1.1 ± 0.1*	6	2.0 ± 0.2	11	1.9 ± 0.2	11
CE (mg/ml)	0.8 ± 0.1*	6	1.5 ± 0.2	11	1.4 ± 0.1	11
Testosterone (ng/ml)	ND		6.8 ± 4.2	5	6.7 ± 2.6	6

Results are means ± SE. Ob, obese; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; ND, not determined. \* $P < 0.05$  vs. F1-Ob.

observed a decrease in the hepatic FC level and a trend for CEs, resulting in a significant decrease in total cholesterol levels by 40% ( $P=0.02$ ) in F1-ObTDIA male mice (Fig. 3A). In females, total cholesterol levels were not affected despite a significant reduction in hepatic CE levels (Fig. 3B). Hepatic TG accumulation (greater in the HFSD-fed than in standard chow-fed mice) was not affected by pollutants in either sex (Fig. 3C), and there were no marked changes in liver weight (not shown). These data are consistent with the absence of changes in Oil Red O staining between pollutant-exposed and nonexposed animals (Supplemental Fig. S2).

### Estrogen signaling and metabolism are altered in pollutant-exposed females but not in males

Because estrogens regulate hepatic insulin sensitivity positively (35) with ER $\alpha$  having a central role in energy homeostasis (36), we hypothesized that the marked alteration of glucose tolerance in pollutant-exposed females may be related to alterations in the estrogen signaling pathway. We therefore surveyed the expression of ER $\alpha$  at both mRNA (*Esr1*) and protein levels and found a significant down-regulation of 25% ( $P=0.007$ ) and 20% ( $P=0.01$ ), respectively (Fig. 4A, C). Effects on *Esr1* gene expression were liver specific and were not observed in adipose tissues (not shown). In addition, the expression levels of 2 estrogen-regulated genes, selenoprotein P (*Sepp1*; ref. 37) and insulin-like growth factor 1 (*Igf1*; ref. 38), were decreased by 51% ( $P=0.02$ ) and 34% ( $P=0.03$ ), respectively (Fig. 4A). We also measured the expression levels of drug-metabolizing enzymes involved in estrogen metabolism (39). These included NAD(P)H-dehydrogenase quinone 1 (*Nqo1*), UDP-glucuronyltransferase 1a1 (*Ugt1a1*), and the EST encoded by sulfotransferase family 1E, estro-

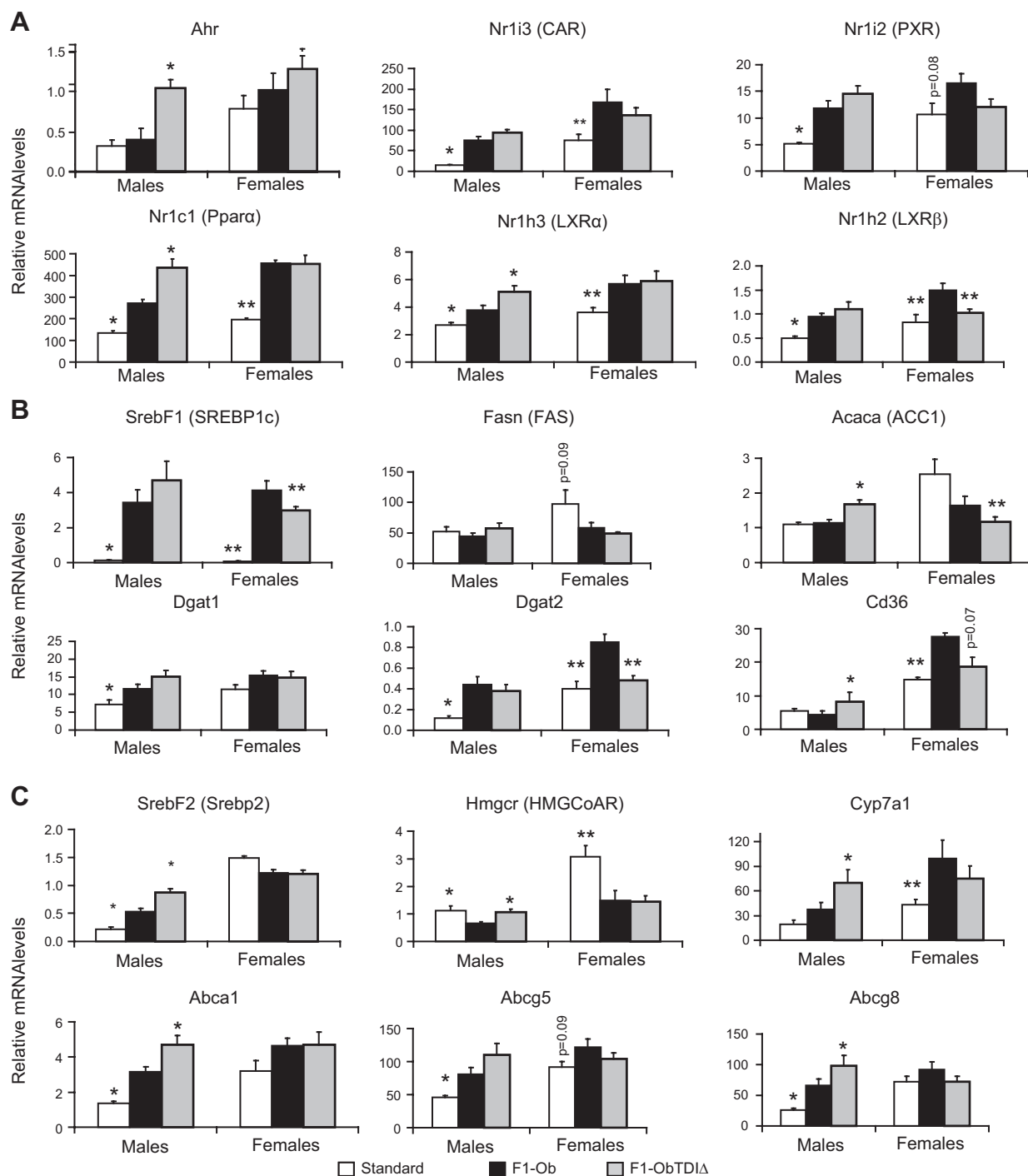
gen-preferring, member 1 (*Sult1e1*), which is the primary enzyme responsible for the inactivation of estrogens (40). In contrast with *Nqo1* and *Ugt1a1*, whose expression levels were down-regulated by 45% ( $P=0.01$ ) and 33% ( $P=0.03$ ), respectively, both *Sult1e1* mRNA expression and protein levels were significantly up-regulated 150%,  $P=0.02$  and 120%,  $P=0.02$ , respectively; Fig. 4B, C), indicating that EST may contribute to reducing hepatic insulin responsiveness in females.

Finally, these genes, whose expression levels were significantly higher in female than in male mice fed standard chow, were not altered in pollutant-exposed males except for *Esr1* encoding ER $\alpha$ , whose expression was up-regulated by 57% ( $P=0.01$ ; Fig. 4A, B).

### DISCUSSION

In the present study, we developed a model allowing exploration of the effects of a mixture of low doses of food pollutants on metabolic disorders in the progeny of obese adult mice, under conditions of life-long contamination encompassing maternal exposure (gestation and lactation). Within this model, exposed females but not males exhibited aggravated glucose intolerance. We also found hepatic gene alterations targeting cholesterol biosynthesis in males and estrogen metabolism in females. These events were observed in the absence of weight gain and apparent toxicity.

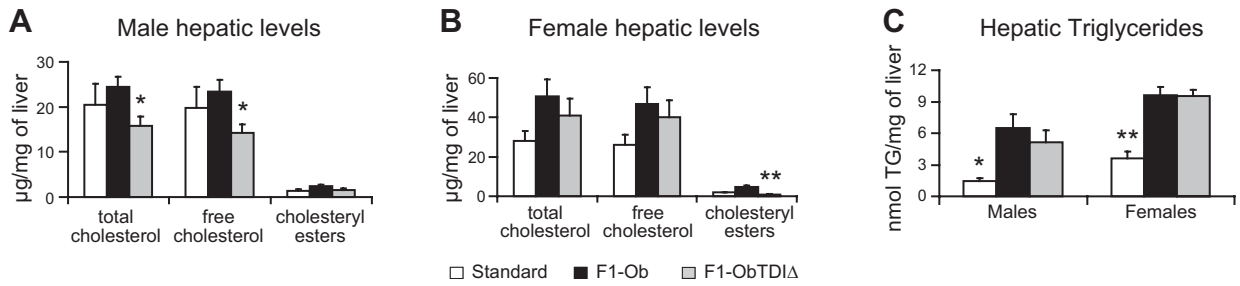
Because the human population is widely exposed to low levels of chemicals, it is necessary to examine the effects of pollutants not only as unique compounds but also in a mixture of persistent and short-lived chemicals activating a broad range of signaling pathways in an attempt to mimic real-world exposure. However, not all combinations could be assessed. Thus, we have chosen



**Figure 2.** Effects of the mixture of pollutants at the TDI $\Delta$  dose on male and female hepatic expression of transcription factors and nuclear receptors [AHR (*Ahr*), CAR (*Nr1i3*), PXR (*Nr1i2*), PPAR $\alpha$  (*Nr1c1*), LXR $\alpha$  (*Nr1h3*), and LXR $\beta$  (*Nr1h2*); A], genes encoding proteins related to lipogenesis [sterol regulatory element 1c (*Srebf1*), fatty acid synthase (*Fasn*), acetyl-CoA carboxylase 1 (*Acaca*), and diacylglycerol *O*-acyltransferase (*Dgat1* and *Dgat2*)] and fat uptake and transport (*Cd36*) (B), and cholesterol metabolism [sterol regulatory element 2 (*Srebf2*), 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase (*Hmgcr*), and cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (*Cyp7a1*)] and transport (ABC transporters *Abca1*, *Abcg5*, and *Abcg8*) (C). Results are means  $\pm$  SE;  $n = 5-8$ . \* $P < 0.05$  vs. male F1-Ob; \*\* $P < 0.05$  vs. female F1-Ob.

a mixture of persistent and nonpersistent food pollutants already described as endocrine disruptors and known to activate different signaling pathways with established links with metabolic diseases in epidemiological and experimental studies (2, 3, 6, 13, 16). We therefore dissected the metabolic phenotypes of ani-

mals exposed to a very low dose of pollutants (TDI $\Delta$ ), which grossly corresponded to the TDI supposedly "safe dose" for humans. Accordingly, our data constitute a proof-of-concept model addressing the hypothesis of possible cumulative metabolic adverse effects of a pollutant mixture as suggested with reprotoxicity stud-

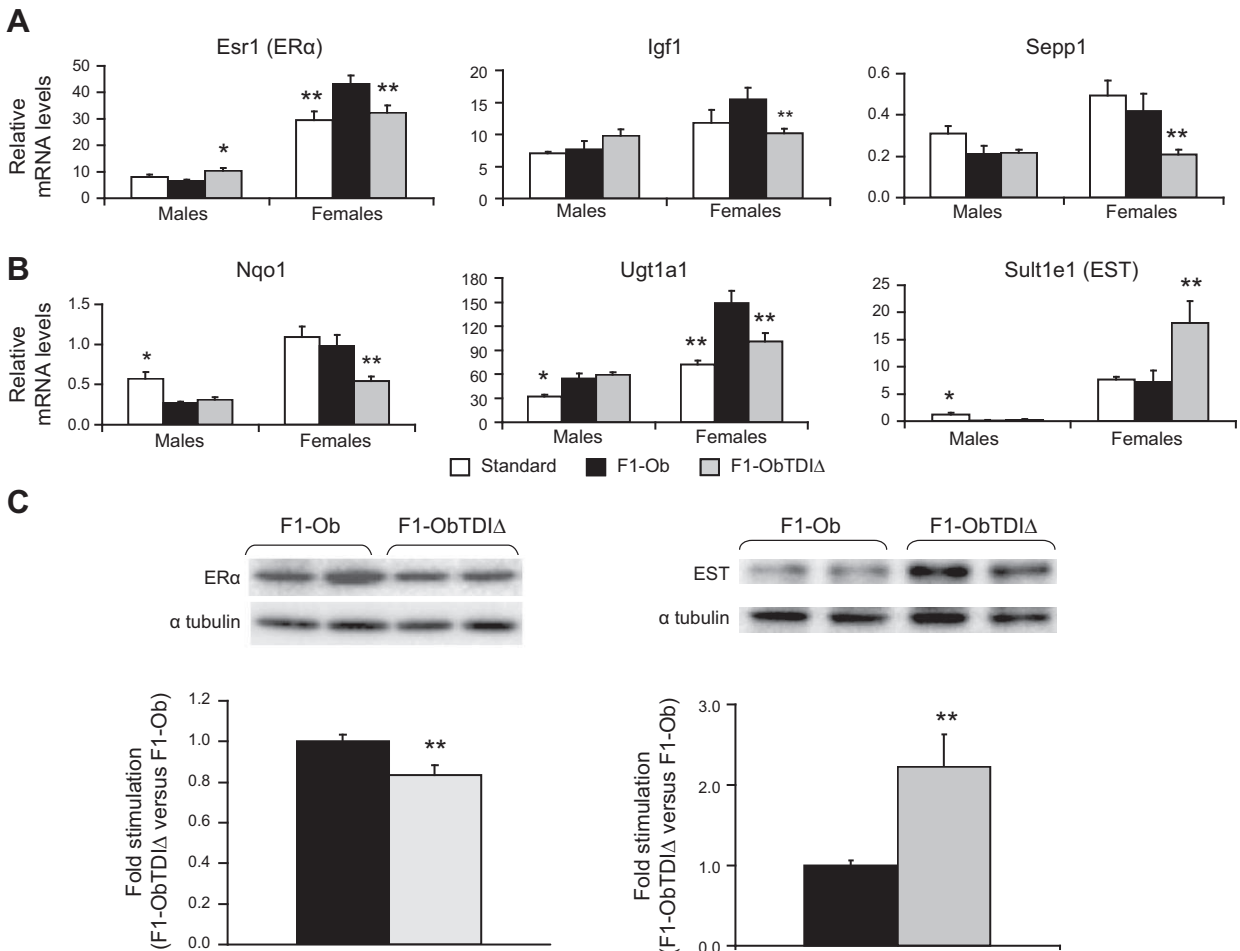


**Figure 3.** Hepatic cholesterol and CE levels (A, males; B, females), and TG levels (C). Results are means  $\pm$  SE;  $n = 5-8$ . \* $P < 0.05$  vs. male F1-Ob; \*\* $P < 0.05$  vs. female F1-Ob.

ies (41, 42). This is especially important considering the doses used in the present study, which are  $\geq 3$  orders of magnitude lower than doses commonly used in toxicological studies with the exception of BPA (2, 19, 43-45) and relatively close to the doses that human beings may be exposed to (16, 21, 23, 46).

This study focused on the liver because it is the major site of detoxification, and it is known that drug dispo-

sition is altered in fatty liver (29). Because metabolic disruption could result from inappropriate activation of transcription factors and nuclear receptors (2, 5), we reasoned that they may be primary targets under conditions of exposure to the HFSD, pollutants orchestrating phenotypic changes through alterations in the expression of downstream genes. Notably, we found a sex-dimorphic metabolic response to the pollutant mix-



**Figure 4.** A, B) Effect of the mixture of pollutants at the TDIΔ dose on hepatic expression of ERα (*Esr1*) and genes encoding proteins under estrogen regulation, including selenoprotein P (*Sepp1*) and insulin-like growth factor 1 (*Igf1*) (A) and phase II detoxification enzymes: NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1 (*Nqo1*), UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1 (*Ugt1a1*), and *Sult1e1* (B). Results are means  $\pm$  SE;  $n = 5-8$ . C) Western blotting analysis of the effect of pollutant exposure on ERα and EST protein expression in the female liver. For histograms, results are means  $\pm$  SE;  $n = 7$ /group for ERα,  $n = 4$ /group for EST. \* $P < 0.05$  vs. male F1-Ob; \*\* $P < 0.05$  vs. female F1-Ob.

ture in an obesity context. Furthermore, most genes shown to be altered by the mixture of pollutants were expressed in a sex-dimorphic manner with higher levels in females than in males under standard chow conditions (this last point extends previous data; ref. 47). This finding highlights the necessity for conducting toxicological experiments on the 2 sexes.

In males, although pollutants did not alter glucose and insulin metabolic tests or plasma cholesterol levels, several genes were stimulated in liver including LXR $\alpha$  and PPAR $\alpha$  and their target genes, HMGCoAR encoding the rate-limiting enzyme in cholesterol synthesis and SREBP2 (31, 32), together with enhanced expression of genes encoding CYP7A1 and ABC transporters (*Abca1* and *Abcg8*). There was also a decrease in hepatic total cholesterol. It is noteworthy that all genes altered converged to cholesterol synthesis and efflux directed toward the bile salt pathway. Therefore, further studies will be needed to distinguish between adverse and adaptive effects in liver, particularly focusing on older animals because deleterious effects may appear later in life. Finally, the meaning of the induced expression of ER $\alpha$  will have to be explored in that scheme.

Contrasting with males, females became more glucose intolerant in the presence of pollutants at the TDIA dose than the unexposed females with no changes in the expression of genes involved in hepatic glucose production or inflammation. It is known that estrogens protect females from obesity and diabetes, probably acting through ER $\alpha$  in the liver because it is the dominant ER in this organ (48). We therefore postulated that the metabolic alteration could result from the observed down-regulation of *Esr1* expression, which would provoke a reduction in estrogen signaling. Indeed, disruption of the estrogen signaling pathway results in metabolic dysregulation and hepatic insulin resistance (36, 49–51). One well-described mechanism is conjugation of a sulfonate group to estrogens by EST, thereby inactivating them and preventing their binding to the ER (40, 52). Notably, induction of hepatic *Sult1e1* is a common feature of type 2 diabetes (35, 40), and loss of *Sult1e1* in female but not male mice has recently been shown to improve metabolic function in diabetic mice (40). Because plasma levels of estrogens were not altered, these data prompted us to investigate EST expression. The observation of its enhanced mRNA and protein levels in the liver of female mice was thus consistent with decreased estrogenic signaling. We can therefore suggest that pollutant-related induction of EST may reduce estrogen bioavailability, specifically in the liver, hence down-regulating ER $\alpha$  and the expression of target genes, including *Igf1* and *Sepp1*.

The sex-dependent action of the mixture of pollutants in the liver is probably related to the endocrine-disrupting activity of the pollutants, with dioxins having proestrogen or antiestrogen activity, depending on the hormonal context, phthalates generally being described as antiandrogens and BPA and PCBs bearing estrogen-mimetic activities (2–5, 53). This emphasized the advantage of using a combination of pollutants

rather than pollutants individually to unravel the resulting endocrine/metabolic-disrupting activity of the mixture in the biological model investigated. In our experimental model, no alteration in body weight of the adult progeny was observed, thus indicating that the mixture was not obesogenic under our experimental conditions. The term obesogen was coined by Grün and Blumberg (54) to design chemicals that generate obesity. Notably, each pollutant of the mixture has been described as potentially adipogenic (2, 55). For example, increased body weight is observed in rats with low concentrations of dioxins, whereas high doses resulted in decreased body weight (43). Moreover, Taxvig *et al.* (55) demonstrated differential effects of food contaminants on adipogenesis using the *in vitro* model of 3T3-L1 with BPA, PCB 153, and the DEHP major metabolite, mono-(2-ethylhexyl) phthalate, increasing adipogenesis. Because it was shown that intake of a high-fat diet could be a trigger initiating the adverse metabolic effects of BPA (18) or PCB 153 (19), it will be relevant in future studies to determine whether similar alterations could be generated with standard chow-fed animals or if obese populations are particularly sensitive to pollutants. It will also be interesting to explore the adipose tissue even though we did not observe any weight changes in fat pads, at least in males (unpublished results), because it is a storage tissue for pollutants.

The protocol we chose did not allow us to discriminate among the different windows of exposure to which animals were the most susceptible, because animals have experienced life-long exposure. This is an extremely complex issue because it is highly endpoint and pollutant dependent as reported previously (2–4, 56). In addition, it is known from Barker's hypothesis (57) on the developmental origins of health and diseases that the developmental period is a period of high vulnerability, and exposure to pollutants during gestation and lactation may be responsible for an increase in the outcome of metabolic disorders later in life as discussed by Barouki *et al.* (58).

Moreover, males and females probably show different effects because pollutants have been described as endocrine disruptors. To circumvent these differences, we exposed animals life-long to a high-fat diet containing a mixture of food pollutants widely distributed in our environment at doses considered to be safe for humans because they were grossly equal to the TDI (and even lower for BPA) and relatively close to the environmental doses to which humans may be exposed, as mentioned above. With this worst case scenario, we demonstrated for the first time sex-specific metabolic alterations in the absence of general toxicity and body weight gain.

However, pollutants in the mixture have not been tested individually, making it difficult to conclude whether the effects of the mixture are additive, synergic, or antagonist. To overcome this problem and avoid excessive animal use in experiments, *in vitro* experiments will be required. Nonetheless, we here demon-

strated the lack of zero effect when using a mixture of very low doses of food pollutants. This study therefore fuels the concept of rethinking the way to address the question of risk assessment used to date, based on NOAELs for single chemicals, and may have strong implications in terms of recommendations for food market security. It also adds new information for understanding the effect of environmental contaminants in food in the development of metabolic diseases. **[F]**

The authors thank Michel Beylot for the indirect calorimetry measurement. This work was supported by grants from Institut Benjamin Delessert (2010), Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES; Programme National Environnement-Environnement-Santé-Travail, EST-2010/2/2007), and the European Foundation of the Study of Diabetes (EFSD/Novo Nordisk, program 2011). The authors declare no conflicts of interest.

## REFERENCES

- Friedman, J. M. (2000) Obesity in the new millennium. *Nature* **404**, 632–634
- Casals-Casas, C., and Desvergne, B. (2011) Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annu. Rev. Physiol.* **73**, 135–162
- Alonso-Magdalena, P., Quesada, I., and Nadal, A. (2011) Endocrine disruptors in the etiology of type 2 diabetes mellitus. *Nat. Rev.* **7**, 346–353
- Carpenter, D. O. (2008) Environmental contaminants as risk factors for developing diabetes. *Rev. Environ. Health* **23**, 59–74
- Diamanti-Kandaraki, E., Bourguignon, J. P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., Zoeller, R. T., and Gore, A. C. (2009) Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr. Rev.* **30**, 293–342
- Thayer, K. A., Heindel, J. J., Bucher, J. R., and Gallo, M. A. (2012) Role of environmental chemicals in diabetes and obesity: a national toxicology program workshop review. *Environ. Health Perspect.* **120**, 779–789
- Ibrahim, M. M., Fjaere, E., Lock, E. J., Naville, D., Amlund, H., Meugnier, E., Le Magueresse Battistoni, B., Froyland, L., Madsen, L., Jessen, N., Lund, S., Vidal, H., and Ruzzin, J. (2011) Chronic consumption of farmed salmon containing persistent organic pollutants causes insulin resistance and obesity in mice. *PLoS One* **6**, e25170
- Ruzzin, J., Petersen, R., Meugnier, E., Madsen, L., Lock, E. J., Lillefosse, H., Ma, T., Pesenti, S., Sonne, S. B., Marstrand, T. T., Malde, M. K., Du, Z. Y., Chavey, C., Fajas, L., Lundebye, A. K., Brand, C. L., Vidal, H., Kristiansen, K., and Froyland, L. (2010) Persistent organic pollutant exposure leads to insulin resistance syndrome. *Environ. Health Perspect.* **118**, 465–471
- Schafer, K. S., and Kegley, S. E. (2002) Persistent toxic chemicals in the US food supply. *J. Epidemiol. Commun. Health* **56**, 813–817
- Koch, H. M., and Calafat, A. M. (2009) Human body burdens of chemicals used in plastic manufacture. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **364**, 2063–2078
- Vandenberg, L. N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., and Welshons, W. V. (2007) Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod. Toxicol.* **24**, 139–177
- Silins, I., and Hogberg, J. (2011) Combined toxic exposures and human health: biomarkers of exposure and effect. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **8**, 629–647
- Heindel, J. J., and vom Saal, F. S. (2009) Role of nutrition and environmental endocrine disrupting chemicals during the perinatal period on the aetiology of obesity. *Mol. Cell. Endocrinol.* **304**, 90–96
- Dorne, J. L. (2010) Metabolism, variability and risk assessment. *Toxicology* **268**, 156–164
- Marmugi, A., Ducheix, S., Lasserre, F., Polizzi, A., Paris, A., Priymenko, N., Bertrand-Michel, J., Pineau, T., Guillou, H., Martin, P. G., and Mselli-Lakhal, L. (2011) Low doses of bisphenol A induce gene expression related to lipid synthesis and trigger triglyceride accumulation in adult mouse liver. *Hepatology* **55**, 395–407
- Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs, D. R., Jr., Lee, D. H., Shioda, T., Soto, A. M., Vom Saal, F. S., Welshons, W. V., Zoeller, R. T., and Myers, J. P. (2012) Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr. Rev.* **33**, 378–455
- Lee, D. H., Lee, I. K., Song, K., Steffes, M., Toscano, W., Baker, B. A., and Jacobs, D. R., Jr. (2006) A strong dose-response relation between serum concentrations of persistent organic pollutants and diabetes: results from the National Health and Examination Survey 1999–2002. *Diabetes Care* **29**, 1638–1644
- Wei, J., Lin, Y., Li, Y., Ying, C., Chen, J., Song, L., Zhou, Z., Lv, Z., Xia, W., Chen, X., and Xu, S. (2011) Perinatal exposure to bisphenol A at reference dose predisposes offspring to metabolic syndrome in adult rats on a high-fat diet. *Endocrinology* **152**, 3049–3061
- Wahlang, B., Falkner, K. C., Gregory, B., Ansert, D., Young, D., Conklin, D. J., Bhatnagar, A., McClain, C. J., and Cave, M. (2013) Polychlorinated biphenyl 153 is a diet-dependent obesogen that worsens nonalcoholic fatty liver disease in male C57BL6/J mice. [E-pub ahead of print] *J. Nutr. Biochem.* doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.01.009
- Moraes, R. C., Blondet, A., Birkenkamp-Demtroeder, K., Tirard, J., Orntoft, T. F., Gertler, A., Durand, P., Naville, D., and Begeot, M. (2003) Study of the alteration of gene expression in adipose tissue of diet-induced obese mice by microarray and reverse transcription-polymerase chain reaction analyses. *Endocrinology* **144**, 4773–4782
- European Food Safety Authority Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids, and Materials in Contact with Food (2005) Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) for use in food contact materials. Question N° EFSA-Q-2003-191. *EFSA J.* **2**, 1–20; doi: 10.2903/j.efsa.2005.243
- Van Leeuwen, F. X., Feeley, M., Schrenk, D., Larsen, J. C., Farland, W., and Younes, M. (2000) Dioxins: WHO's tolerable daily intake (TDI) revisited. *Chemosphere* **40**, 1095–1101
- World Health Organization. (2003) *Polychlorinated biphenyls: human health aspects*. Concise International Chemical Assessment Document 55. World Health Organization, Geneva, Switzerland
- Beylot, M., Neggazi, S., Hamlat, N., Langlois, D., and Forcheron, F. (2012) Perilipin 1 ablation in mice enhances lipid oxidation during exercise and does not impair exercise performance. *Metabolism* **61**, 415–423
- Gout, J., Sarafian, D., Mutel, E., Vigier, M., Rajas, F., Mithieux, G., Begeot, M., and Naville, D. (2010) Metabolic and melanocortin gene expression alterations in male offspring of obese mice. *Mol. Cell. Endocrinol.* **319**, 99–118
- Bligh, E. G., and Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911–917
- Pageaux, J. F., Bechoua, S., Bonnot, G., Fayard, J. M., Cohen, H., Lagarde, M., and Laugier, C. (1996) Biogenesis and metabolic fate of docosahexaenoic and arachidonic acids in rat uterine stromal cells in culture. *Arch. Biochem. Biophys.* **327**, 142–150
- Naville, D., Rebouret, D., Chauvin, M. A., Vega, N., Jalabert, A., Vigier, M., Loizon, E., Begeot, M., and Le Magueresse-Battistoni, B. (2011) Direct and indirect impact of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on adult mouse Leydig cells: an in vitro study. *Toxicol. Lett.* **207**, 251–257
- Fromenty, B. (2013) Drug-induced liver injury in obesity. *J. Hepatol.* **58**, 824–826
- Zanger, U. M., and Schwab, M. (2013) Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol. Ther.* **138**, 103–141
- Wagner, M., Zollner, G., and Trauner, M. (2011) Nuclear receptors in liver disease. *Hepatology* **53**, 1023–1034
- Martens, K., Ver Loren van Themaat, E., van Batenburg, M. F., Heiniemi, M., Huyghe, S., Van Hummelen, P., Carlberg, C., Van Veldhoven, P. P., Van Kampen, A., and Baes, M. (2008)



- Coordinate induction of PPAR $\alpha$  and SREBP2 in multifunctional protein 2 deficient mice. *Biochim. Biophys. Acta* **1781**, 694–702
33. He, J., Lee, J. H., Febbraio, M., and Xie, W. (2011) The emerging roles of fatty acid translocase/CD36 and the aryl hydrocarbon receptor in fatty liver disease. *Exp. Biol. Med.* **236**, 1116–1121
  34. Zhao, C., and Dahlman-Wright, K. (2010) Liver X receptor in cholesterol metabolism. *J. Endocrinol.* **204**, 233–240
  35. Leiter, E. H., and Chapman, H. D. (1994) Obesity-induced diabetes (diabesity) in C57BL/KsJ mice produces aberrant trans-regulation of sex steroid sulfotransferase genes. *J. Clin. Invest.* **93**, 2007–2013
  36. Mauvais-Jarvis, F. (2011) Estrogen and androgen receptors: regulators of fuel homeostasis and emerging targets for diabetes and obesity. *Trends Endocrinol. Metab.* **22**, 24–33
  37. Zhou, X., Smith, A. M., Failla, M. L., Hill, K. E., and Yu, Z. (2012) Estrogen status alters tissue distribution and metabolism of selenium in female rats. *J. Nutr. Biochem.* **23**, 532–538
  38. Della Torre, S., Rando, G., Meda, C., Stell, A., Chambon, P., Krust, A., Ibarra, C., Magni, P., Ciana, P., and Maggi, A. (2011) Amino acid-dependent activation of liver estrogen receptor  $\alpha$  integrates metabolic and reproductive functions via IGF-1. *Cell Metab.* **13**, 205–214
  39. Hevir, N., Ribic-Pucelj, M., and Lanisnik Rizner, T. (2013) Disturbed balance between phase I and II metabolizing enzymes in ovarian endometriosis: a source of excessive hydroxy-estrogens and ROS? *Mol. Cell. Endocrinol.* **367**, 74–84
  40. Gao, J., He, J., Shi, X., Stefanovic-Racic, M., Xu, M., O'Doherty, R. M., Garcia-Ocana, A., and Xie, W. (2012) Sex-specific effect of estrogen sulfotransferase on mouse models of type 2 diabetes. *Diabetes* **61**, 1543–1551
  41. Jacobsen, P. R., Axelstad, M., Boberg, J., Isling, L. K., Christiansen, S., Mandrup, K. R., Berthelsen, L. O., Vinggaard, A. M., and Hass, U. (2012) Persistent developmental toxicity in rat offspring after low dose exposure to a mixture of endocrine disrupting pesticides. *Reprod. Toxicol.* **34**, 237–250
  42. Xi, W., Wan, H. T., Zhao, Y. G., Wong, M. H., Giesy, J. P., and Wong, C. K. (2011) Effects of perinatal exposure to bisphenol A and di(2-ethylhexyl)-phthalate on gonadal development of male mice. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **19**, 2515–2527
  43. Crutch, C. R., Lebofsky, M., Schramm, K. W., Terranova, P. F., and Rozman, K. K. (2005) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and 1,2,3,4,7,8-hexachlorodibenzo-p-dioxin (HxCDD) alter body weight by decreasing insulin-like growth factor I (IGF-I) signaling. *Toxicol. Sci.* **85**, 560–571
  44. Nault, R., Kim, S., and Zacharewski, T. R. (2013) Comparison of TCDD-elicited genome-wide hepatic gene expression in Sprague-Dawley rats and C57BL/6 mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **267**, 184–191
  45. Boutros, P. C., Yan, R., Moffat, I. D., Pohjanvirta, R., and Okey, A. B. (2008) Transcriptomic responses to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in liver: comparison of rat and mouse. *BMC Genomics* **9**, 419
  46. Baars, A. J., Bakker, M. I., Baumann, R. A., Boon, P. E., Freijer, J. I., Hoogenboom, L. A., Hoogerbrugge, R., van Klaveren, J. D., Liem, A. K., Traag, W. A., and de Vries, J. (2004) Dioxins, dioxin-like PCBs and non-dioxin-like PCBs in foodstuffs: occurrence and dietary intake in The Netherlands. *Toxicol. Lett.* **151**, 51–61
  47. Waxman, D. J., and Holloway, M. G. (2009) Sex differences in the expression of hepatic drug metabolizing enzymes. *Mol. Pharmacol.* **76**, 215–228
  48. Gao, H., Falt, S., Sandelin, A., Gustafsson, J. A., and Dahlman-Wright, K. (2008) Genome-wide identification of estrogen receptor alpha-binding sites in mouse liver. *Mol. Endocrinol.* **22**, 10–22
  49. Barros, R. P., Machado, U. F., and Gustafsson, J. A. (2006) Estrogen receptors: new players in diabetes mellitus. *Trends Mol. Med.* **12**, 425–431
  50. Riant, E., Waget, A., Cogo, H., Arnal, J. F., Burcelin, R., and Gourdy, P. (2009) Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. *Endocrinology* **150**, 2109–2117
  51. Stubbins, R. E., Najjar, K., Holcomb, V. B., Hong, J., and Nunez, N. P. Oestrogen alters adipocyte biology and protects female mice from adipocyte inflammation and insulin resistance. *Diabetes Obes. Metab.* **14**, 58–66
  52. Mauvais-Jarvis, F. (2012) Estrogen sulfotransferase: intracrinology meets metabolic diseases. *Diabetes* **61**, 1353–1354
  53. Schug, T. T., Janesick, A., Blumberg, B., and Heindel, J. J. (2011) Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **127**, 204–215
  54. Grün, F., and Blumberg, B. (2007) Perturbed nuclear receptor signaling by environmental obesogens as emerging factors in the obesity crisis. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **8**, 161–171
  55. Taxvig, C., Dreisig, K., Boberg, J., Nellemann, C., Schelde, A. B., Pedersen, D., Boergesen, M., Mandrup, S., and Vinggaard, A. M. (2012) Differential effects of environmental chemicals and food contaminants on adipogenesis, biomarker release and PPAR $\gamma$  activation. *Mol. Cell. Endocrinol.* **361**, 106–115
  56. Nadal, A. (2013) Obesity: fat from plastics? Linking bisphenol A exposure and obesity. *Nat. Rev. Endocrinol.* **9**, 9–10
  57. Barker, D. J. (2005) The developmental origins of insulin resistance. *Horm. Res.* **64**(Suppl. 3), 2–7
  58. Barouki, R., Gluckman, P. D., Grandjean, P., Hanson, M., and Heindel, J. J. (2012) Developmental origins of non-communicable disease: implications for research and public health. *Environ. Health* **11**, 42

Received for publication March 21, 2013.

Accepted for publication May 20, 2013.

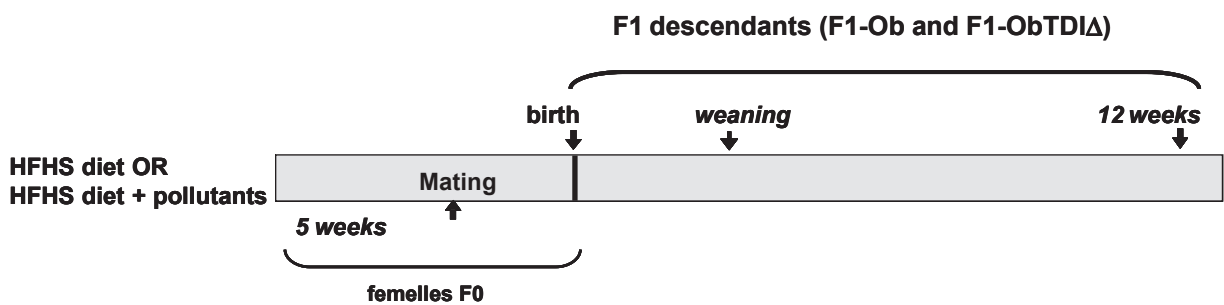
## Supplemental Material

### Legends of Supplemental figures

**Supplemental Figure. 1:** Experimental protocol to generate F1 offspring.

**Supplemental Figure. 2:** Oil Red O staining of liver sections obtained from F1 mice. Each picture is representative of three different sections of livers obtained from three different mice (original magnification x400)

### Supplemental Figure 1

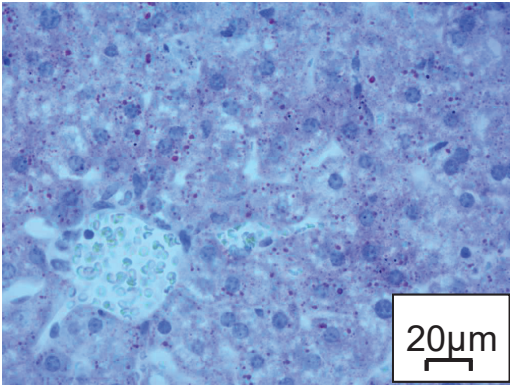
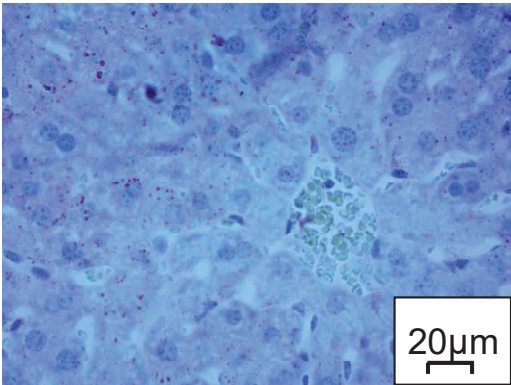


Supplemental Figure 2

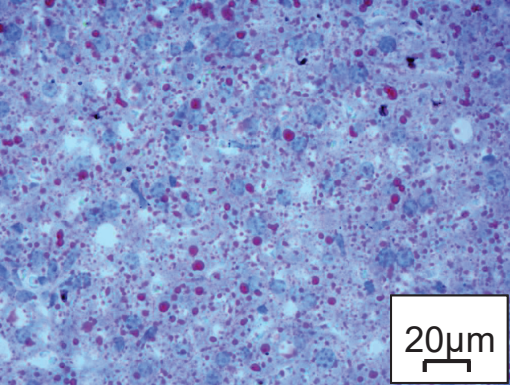
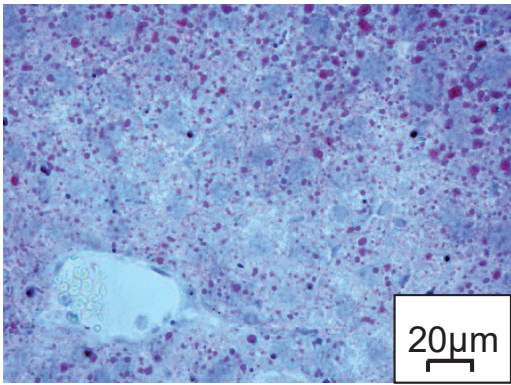
**Males**

**Females**

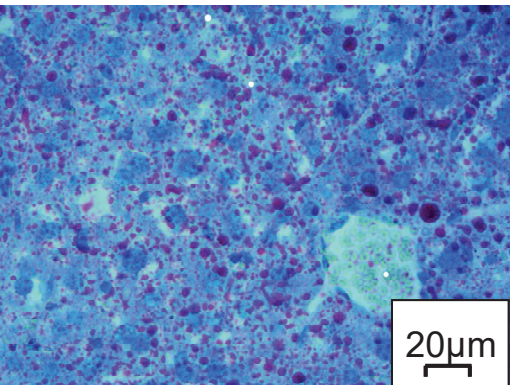
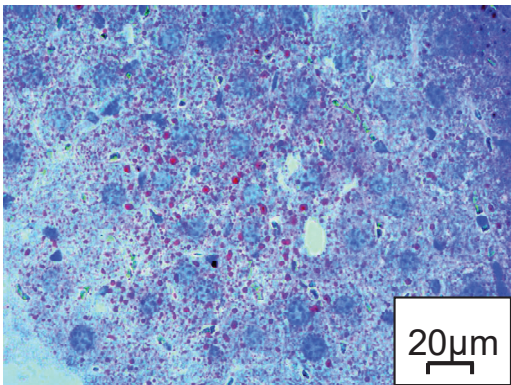
**Standard**



**F1-Ob**



**F1-ObTDIΔ**



**Supplemental Table 1: Composition of the diets used in the present study.**

	TD.99249 (Harlan)		Standard	
	% of mass	% kcal	% of mass	% kcal
<b>Fat</b>	36.1	58.7	5	12.2
<b>Carbohydrate</b>	35 (maltodextrin 50% + sucrose 50%)	25.5	60 (maltodextrin + starch)	65.3
<b>Protein</b>	19.8	15.7	18.9	22.5
<b>kCal/g</b>	5.4		3.3	

**Supplemental Table 2: Primers used for RT-qPCR**

gene	RefSeq Accession Number	sequences: 5'→3'	
		sense	antisense
Abca1	NM_013454	CAG-GAG-GTG-ATG-TTT-CTG-ACC-A	TTG-GCT-GTT-CTC-CAT-GAA-GGT-C
Abcg5	NM_031884	AGC-CTC-GCT-CTG-AGC-TCT-TC	TTC-AGG-ACA-GGG-GTA-ACC-AC
Abcg8	NM_026180	AGC-CTC-GCT-CTG-ACA-TCT-TC	GTC-AAG-TCC-ACG-TAG-AAG-TC
Acaca	NM_022193	GAG-CAA-GGG-ATA-AGT-TTG-AG	AGG-TGC-ATC-TTG-TGA-TTA-GC
Ahr	NM_013464.4	TCA-TCT-GGT-TTC-CTG-GCA-ATG-AAT	ATA-AGC-TGC-CCT-TTG-GCA-TC
Cd36	NM_001159558.1	AAG-ATC-CAA-AAC-TGT-CTG-TA	GTC-CTG-GCT-GTG-TTT-GGA-GG
Cyp7a1	NM_007824.2	TAC-AGA-GTG-CTG-GCC-AAG-AG	AGT-GAA-GTC-CTC-CTT-AGC-TG
Dgat1	NM_010046	ACC-GCG-AGT-TCT-ACA-GAG-ATT-GGT	ACA-GCT-GCA-TTG-CCA-TAG-TTC-CCT
Dgat2	NM_026384	TGG-GTC-CAG-AAG-AAG-TTC-CAG-AAG-TA	ACC-TCA-GTC-TCT-GGA-AGG-CCA-AAT
Esr1	NM_000125;NM_001122740;NM_001122741;NM_00112742	TGT-TTG-CTC-CTA-ACT-TGC-TC	CCT-TCT-CTT-CCA-GAG-ACT-TC
Fasn	NM_017332	GTG-CAC-CCC-ATT-GAA-GGT-TCC	GGT-TTG-GAA-TGC-TGT-CCA-GGG
Gusb	NM_010368	CTT-CAT-GAC-GAA-CCA-GTC-AC	GCA-ATC-CTC-CAG-TAT-CTC-TC
Hmgcr	NM_008255	CCG-GCC-TGT-GTG-TCG-CTG-GT	CCA-GCG-ACT-ATG-AGC-GTG-AA
Igf1	NM_001111276;NM_001111274;NM_184052	ACC-AAA-ATG-ACC-GCA-CCT-GC	AAC-ACT-CAT-CCA-CAA-TGC-CTG-TC
Nqo1	NM_008706	GGC-CGA-TTC-AGA-GTG-GCA-TCC-TG	TCT-GCA-TGC-GGG-CAT-CTG-GTG
Nr1h2	NM_007121	AGG-ACC-AGA-TCG-CCC-TCC-TG	GGT-GGA-AGT-CGT-CCT-TGC-TGT-AGG
Nr1h3	NM_005693;NM_001130101;NM_001130102	CCG-GGA-AGA-CTT-TGC-CAA-AGC	GGA-GCT-GGT-CCT-GCA-CGT-TG
Nr1i2	NM_010936.3	AGG-AGG-AGT-ATG-TGC-TGA-TG	CTT-CAG-GAA-CAG-GAA-CCT-GTG
Nr1i3	NM_001243063;NM_001243062;NM_009803	GTC-CCA-TCT-GTC-CGT-TTG-C	AGG-GCT-TCT-GAC-AGT-ATC
Nr1c1	NM_011144; NM_001113418.1	AAG-GGC-TTC-TTT-CGG-CGA-AC	GTT-CAT-GTT-GAA-GTT-CTT-CAG
Sepp1	NM_009155.3	ATG-ACA-GAT-GTG-GCC-GTC-TTG-TGT	GCC-TCT-GAG-GGC-TCC-GCA-GT
SrebF1	NM_011480	ACG-GAG-CCA-TGG-ATT-GCA-CA	AAG-GGT-GCA-GGT-GTC-ACC-TT
SrebF2	NM_033218	CCT-GTG-ATG-ATG-GGG-CAA-CAG	CCT CAG AAC GCC AGA CTT G
Sult1e1	NM-023135.2	TCT-TGG-CAA-GGC-CAG-ATG-AC	TCC-CAA-AAT-GAT-GCT-GGA-AGG
Ugt1a1	NM_201645.2	GCA-TCT-ATC-TCG-CTG-ATG-AG	CAG-AGG-CGT-TGA-CAT-AGG



## **Impacts métaboliques de souris femelles exposées à un mélange de polluants faiblement dosé dans un contexte d'obésité**

*Plos One, 2015*

### **Article 2: Metabolic outcome of female mice exposed to a mixture of low-dose pollutants in a diet-induced obesity model**

*Naville D.\**, *Labaronne E.\**, *Vega N.<sup>§</sup>*, *Pinteur C.<sup>§</sup>*, *Canet-Soulas E.*, *Vidal H.*, *Le Magueresse-Battistoni B*

\* These authors contributed equally to the work.

## **Résumé :**

Plusieurs données épidémiologiques et expérimentales étayent l'hypothèse d'un rôle des polluants dans l'épidémie d'obésité et ses complications métaboliques. Au laboratoire, nous avons montré qu'une exposition chronique à une mixture de polluants classiquement retrouvés dans l'alimentation et faiblement dosés provoque chez la souris femelle obèse adulte (12 semaines), une aggravation de l'intolérance au glucose possiblement liée à une altération hépatique de la signalisation œstrogénique (**Article 1**).

Pour comprendre l'origine des défauts, nous avons dans ce travail étudié des souris de 7 semaines en surpoids mais non obèses et présentant des taux sériques d'œstrogènes immatures.

Brièvement, les mères puis leur descendance après sevrage sont nourries avec le régime enrichi en gras et en sucre contenant le mélange de polluants (BPA, DEHP, PCB153 et TCDD) à des doses résultant en une exposition correspondant environ aux doses journalières tolérables définies chez l'homme. Parallèlement, un groupe de souris est nourri avec le régime obésogène sans polluant.

Les animaux étant nourris avec le régime obésogène sont intolérants au glucose. Mais, de manière intéressante, nous observons que les femelles exposées présentent à 7 semaines une intolérance au glucose moins prononcée que les souris non exposées au mélange de polluants. Le profil métabolique diffère totalement de celui observé à l'âge de 12 semaines puisque à 12 semaines, nous avons observé une aggravation de l'intolérance au glucose en réponse aux polluants. En revanche, nous n'observons pas de modification du poids, de la glycémie ou de l'insulinémie de l'animal de 7 semaines.

Comme le foie, le muscle et le tissu adipeux sont les trois principaux organes sensibles à l'insuline participant à l'homéostasie glucidique, nous avons analysé la sensibilité à l'insuline de chacun de trois tissus. Pour cela, les souris ont reçu une injection intra-péritonéale d'insuline ou de son véhicule (contrôle). Après 15 min, les souris ont été euthanasiées et les tissus rapidement récupérés et congelés dans l'azote liquide. Les protéines ont été extraites et nous avons suivi par Western blot la phosphorylation de la protéine AKT, un marqueur de sensibilité à l'insuline.

Dans le foie, nous observons une tendance à l'augmentation mais qui est non significative. Par ailleurs, comme le foie est le principal organe de détoxification, nous avons également suivi

l'expression génique de plusieurs récepteurs nucléaires importants pour l'homéostasie glucidique et lipidique ainsi que de plusieurs récepteurs aux xénobiotiques. Nous observons une augmentation de l'expression génique de PPAR $\alpha$  et d'un certain nombre de ses gènes cibles impliqués dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras. En revanche, la signalisation œstrogénique ne semble pas affectée, contrairement aux observations faites sur les femelles de 12 semaines.

Comme nous observons une amélioration de la tolérance au glucose sans modification du poids, nous avons également déterminé le rapport masse maigre/masse grasse des animaux par IRM (imagerie à résonance magnétique réalisée au CERMEP, Lyon). Ainsi, l'exposition aux polluants entraîne une augmentation significative de la masse maigre et une diminution significative de la masse grasse. De plus, l'expression génique de différents marqueurs de l'inflammation et notamment du TNF $\alpha$ , de CCL5 et d'IL1 $\beta$  est significativement diminuée dans le tissu adipeux sous-cutané des souris de 7 semaines exposées aux polluants. Une situation inverse est observée sur les femelles de 12 semaines avec une augmentation significative d'IL6, de CCL5 et d'IL1 $\beta$ . Ces résultats suggèrent donc de meilleurs paramètres métaboliques du tissu adipeux sous cutané à 7 semaines.

Au niveau du muscle, qui est le principal tissu assurant la capture du glucose sanguin, nous observons une augmentation significative du rapport pAKT/AKT 15 min après une injection d'insuline chez les femelles exposées au mélange de polluants en comparaison des femelles non exposées. Ces résultats suggèrent également une amélioration de la sensibilité à l'insuline dans le muscle.

Au bilan, ces travaux soulignent la complexité de l'impact d'une exposition à un mélange de polluants puisque les effets diffèrent avec l'âge. Ces résultats suggèrent que les polluants exercent un effet biphasique qui pourrait être lié au contexte hormonal et à l'activité œstrogéno-mimétique des polluants du mélange. En effet, dans nos conditions expérimentales et à 7 semaines, les souris obèses ont des niveaux d'œstrogènes en deçà du seuil de détection et inférieurs aux niveaux dosés à 12 semaines. Or, les polluants présents dans le mélange sont œstrogéno-mimétiques. Comme les œstrogènes sont connus pour avoir un effet protecteur sur la sensibilité à l'insuline, les effets œstrogéno-mimétiques des polluants pourraient s'ajouter aux effets propres des œstrogènes sériques et ainsi renforcer la protection apportée par les œstrogènes. En conséquence, on observerait une amélioration de la sensibilité de l'insuline des tissus métaboliques. En revanche, à 12 semaines lorsque les animaux sont sexuellement matures, la présence d'une activité de type œstrogéno-mimétique apportée par les polluants



provoquerait la mise en place d'une régulation négative pour limiter les effets œstrogéniques. Cela s'exercerait via une augmentation de la sulfotransférase SULT1E1 comme montré dans Naville et al. (Faseb 2013) et aboutirait à une baisse de la protection exercée par les œstrogènes sur la sensibilité à l'insuline.

Une autre hypothèse non-exclusive serait liée à l'accumulation des polluants, et notamment des persistants (PCB153 et TCDD) avec l'âge dans le tissu adipeux et à leur activité proinflammatoire comme observé à 12 semaines. En effet, les polluants lipophiles s'accumulent dans le tissu adipeux. L'augmentation de l'adiposité avec l'âge de la souris pourrait modifier la pharmacocinétique et la toxicité de ces polluants.

Ce travail confirme et renforce le travail précédent montrant que l'exposition à un mélange de polluants, même à faibles doses, n'est pas sans effet sur l'organisme.

RESEARCH ARTICLE

# Metabolic Outcome of Female Mice Exposed to a Mixture of Low-Dose Pollutants in a Diet-Induced Obesity Model

Danielle Naville<sup>‡</sup>, Emmanuel Labaronne<sup>‡</sup>, Nathalie Vega<sup>‡</sup>, Claudie Pinteur<sup>‡</sup>, Emmanuelle Canet-Soulas, Hubert Vidal, Brigitte Le Magueresse-Battistoni\*

CarMeN Laboratory, INSERM U1060, Lyon-1 University, INRA UMR1397, INSA-Lyon, Oullins, France

<sup>‡</sup> DN and EL contributed equally to this work. NV and CP also contributed equally to this work.

\* [brigitte.lemagueresse@inserm.fr](mailto:brigitte.lemagueresse@inserm.fr)



 OPEN ACCESS

**Citation:** Naville D, Labaronne E, Vega N, Pinteur C, Canet-Soulas E, Vidal H, et al. (2015) Metabolic Outcome of Female Mice Exposed to a Mixture of Low-Dose Pollutants in a Diet-Induced Obesity Model. *PLoS ONE* 10(4): e0124015. doi:10.1371/journal.pone.0124015

**Academic Editor:** Michael Müller, University of East Anglia, UNITED KINGDOM

**Received:** November 17, 2014

**Accepted:** March 9, 2015

**Published:** April 24, 2015

**Copyright:** © 2015 Naville et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** The authors declare that this research project was supported by grants from the European Foundation of the Study of Diabetes (EFSD/Novo Nordisk, program 2011) and the Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES; Programme National Environnement-Santé-Travail, EST-2010/2/2007). Emmanuel Labaronne is a recipient of "Région Rhône-Alpes", France. The funders had no role in

## Abstract

Pollutants are suspected to contribute to the etiology of obesity and related metabolic disorders. Apart from occupational exposure which concerns a subset of chemicals, humans are mostly exposed to a large variety of chemicals, all life-long and at low doses. Food ingestion is a major route of exposure and it is suggested that pollutants have a worsened impact when combined with a high-fat diet. In the experimental studies described herein, we aimed to add further evidence on the metabolic impact of food pollutants using a recently set up model in which mice are life-long fed a high-fat/high-sucrose diet (HFSD) with/without common food pollutants shown to exhibit metabolic disrupting activities. Specifically, this mixture comprised bisphenol A, dioxin, polychlorobiphenyl PCB153, and phthalate and was added in HFSD at doses resulting in mice exposure at the Tolerable Daily Intake dose range for each pollutant. We herein focused on the 7-week-old females which exhibited early signs of obesity upon HFSD feeding. We observed no signs of toxicity and no additional weight gain following exposure to the mixture but alleviated HFSD-induced glucose intolerance in the absence of alteration of gluconeogenesis and steatosis. It suggested that the observed metabolic improvement was more likely due to effects on muscle and/or adipose tissues rather than on the liver. Consistently, female mice exhibited enhanced lean/fat mass ratio and skeletal muscle insulin sensitivity. Moreover, expression levels of inflammatory markers were reduced in adipose tissue at 7 but enhanced at 12 weeks of age in agreement with the inverse alterations of glucose tolerance observed at these ages upon pollutant exposure in the HFSD-fed females. Collectively, these data suggest apparent biphasic effects of pollutants upon HFSD feeding along with obesity development. These effects were not observed in males and may depend on interactions between diet and pollutants.

study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Introduction

Diabetes and obesity are the major public health challenge of the 21<sup>st</sup> century, with prevalence reaching epidemic proportions worldwide. Because of the exponential production and usage of synthetic chemicals that have paralleled the disease epidemic, it was hypothesized that pollutants could interact with physiological mechanisms regulating glucose and lipid metabolism [1]. The term of metabolic disruptors was next proposed [2] to encompass chemicals with endocrine disrupting activity and for which exposure has been linked to diabetes and obesity in epidemiologic studies [2–4] as well as in experimental studies [5–8].

Based on their resistance to biodegradation, synthetic chemicals are classified in persistent organic pollutants (POPs) and short-lived pollutants. POPs are widespread environmental pollutants that comprise intentionally manufactured products (e.g., the polychlorinated biphenyls, PCBs) or by-products of various industrial processes (e.g. dioxins). POPs are lipophilic and biomagnified up the food chain. Thus, diet is the main route of exposure [9, 10]. Non-persistent pollutants include, among others, bisphenols and phthalates. They are produced at high volumes and have numerous applications, notably in the plastics industry [11, 12]. Hence, they are found in daily consumables and measurable in urines of most individuals [13]. In addition, pollutants can transfer from mother to fetus through the placenta during pregnancy and through breast feeding [14]. Consequently, humans are exposed to a huge variety of potentially harmful pollutants, the overall impact of which cannot be predicted from the effects of each individual pollutant [15]. Yet, human health risk assessment is based on individual chemicals, with the determination of a Tolerable Daily Intake (TDI) [16]. Consequently, health risk assessment does not consider the mixture effect and dose addition may underestimate cumulative risk evaluation. To add to the complexity of the studies, some adverse effects for BPA occurred in rodents with doses lower than the TDI reference dose [17], and experimental studies showed that a high fat diet could amplify the adverse metabolic effects of BPA in rats [18] and PCB153 in mice [19].

In the present study, we set up an experimental model of exposure to a chemical mixture. Our originality stems from the use of a diet-induced obesity rodent model coupled with a life-long exposure to pollutants covering the early vulnerable periods of life (gestation and lactation) [20], and an artificial mixture combining persistent (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine, TCDD and PCB153) and non-persistent pollutants (BPA and diethylhexylphthalate, DEHP) in the TDI range. These pollutants could be found in a Western-diet and are archetypal examples of endocrine disrupting compounds that may either affect the metabolism or action of hormones, or receptors involved in the etiology of obesity and with suspected links with metabolic diseases in humans [3, 21–24].

Using this model of exposure to a mixture of pollutants, we recently demonstrated that metabolic changes were highly dependent on sex in the absence of toxicity and weight change [25]. Notably, there was a marked deterioration of glucose tolerance in 12 week-old exposed mice females compared with age-matched non-exposed females, associated with the induction of hepatic expression of the estrogen sulfotransferase (EST/SULT1E1), a major estrogen-inactivating enzyme, and a reduced expression of the receptor alpha for estrogens (ER $\alpha$ ) and of several estrogen-regulated genes, indicative of an impaired hepatic estrogen signalling in females exposed to low-dose food pollutants [25]. In the present study, we aimed at investigating the metabolic profile and liver functions in female mice fed HFSD at the earlier age of 7 weeks corresponding to the beginnings of obesity [25].

## Materials and Methods

### Diets and mice

All procedures were performed with the approval of the CECCAPP (C2EA-15; Comité d'Evaluation Commun au PBES, à AniCan, au laboratoire P4, à l'animalerie de transit de l'ENS, à l'animalerie de l'IGFL, au PRECI, à l'animalerie du Cours Albert Thomas, au CARRTEL INRA Thonon-les-Bains et à l'animalerie de transit de l'IBCP [http://www.ifr128.prd.fr/pbes/site\\_web%20ceccapp/Accueil\\_CECCAPP.html](http://www.ifr128.prd.fr/pbes/site_web%20ceccapp/Accueil_CECCAPP.html)) which is the regional Committee of Ethics for Animal Experiments. Four week (wk) old female C57Bl/6J mice (Harlan, Le Marcoulet, France) were housed individually in polypropylene cages at 21°C with normal light/dark cycle and free access to water and standard chow. After one-wk acclimatization, females were randomly assigned to treatment groups, and they were fed a high fat-high sucrose diet (HFSD) containing or not a mixture of pollutants, as described in a recent study [25]. The mixture of pollutants was made of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD, CAS n° 1746-01-6; LGC-Promochem, Molsheim, France), Polychlorinated biphenyl (PCB) 153 (CAS n°35065-27-1), Bisphenol A (BPA, CAS n°80-05-7) and Di-[2-ethylhexyl]-phthalate (DEHP, CAS n°117-81-7) (all from Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Each pollutant was used at a dose grossly corresponding to the TDI reference dose of either the pollutant itself (BPA, [26]; DEHP, [27]) or representative congeners of dioxins and dioxin-like PCBs with TCDD [28] and non-dioxin-like PCBs with PCB 153 [29] (S1 Table). The mixture was referred to as TDIA [25]. To ensure that animals received the correct amount of polluted food and were fed *ad libitum*, 1g of contaminated food /17 g body weight (bw) was distributed per day and completed by pollutant-free diet. To prepare contaminated food, pollutants dissolved in DMSO were diluted in corn oil to ensure good distribution in the food. Pollutant-free diet was prepared exactly as the pollutant-containing diet except that no pollutants were dissolved in DMSO. The compositions of the diets are indicated in the supporting information (S2 Table). The diet containing or not the mixture of pollutants was given to 5-wk old females for 5 wks before mating with adult standard chow-fed males and then along gestation and lactation. After weaning, F1 descendants were fed the same diet than their dams (S1 Fig). Mice fed HFSD without pollutant were designated as F0-HF0 for the dams and F1-HF0 for their offspring, and mice fed HFSD containing the mixture of pollutants were designated as F0-HFp for the dams and F1-HFp for their offspring. A control group corresponded to female mice and their offspring fed a classical standard chow diet that contained no corn oil or DMSO (referred as Standard).

### Metabolic tests and insulin injection

F1 mice were tested for glucose tolerance (GT Test) at 7 wks as described [30]. To test for tissue insulin sensitivity, mice were intra-peritoneally (IP) infused with insulin (Insulatard 2mU/g body weight) or saline after 6 h of food withdrawal. After 15 min, insulin sensitive tissues including the liver and the gastrocnemius muscle were rapidly dissected and snap frozen in liquid nitrogen.

### Blood and tissue collection

Seven- and 12-wk-old F1 mice were euthanized after 6 h of food withdrawal. Blood was collected and liver and adipose tissues (visceral: periovarian + parametrial, vAT and subcutaneous inguinal depots, scAT) were removed and snap frozen in liquid nitrogen. We measured blood glucose concentrations (glucometer OneTouchUltra, Lifescan, Issy-Les-Moulineaux, France) and plasma levels of insulin (ALPCO insulin ultrasensitive ELISA, Eurobio, Courtaboeuf, France), adiponectin (R&D Systems Europe Quantikine, Lille, France), free fatty acids (FFA) (Sunred Biological Technology, Clinisciences), triglycerides (TG) (BioMérieux, Marcy-l'Étoile,

France), and 17 $\beta$ -estradiol (Interchim, Cayman EIA kit, Montluçon, France). Triglycerides (TG) were also measured in liver samples after lipid extraction by the method of Bligh and Dyer [31]. All relevant comparisons were made within the same assay.

### Quantitative RT-PCR (RT-qPCR)

Total RNA was extracted from the frozen liver and ATs samples. RNA was analysed by real-time PCR as described previously [32] in the presence of specific primer pairs (S3 Table) with data normalized relatively to Gusb (beta-glucuronidase, for liver) or Hpvt (hypoxanthine ribosyl transferase, for AT) mRNA expression levels.

### Western-Blotting analyses

Ten micrograms of proteins prepared from mouse liver and gastrocnemius muscle were separated by SDS-10% polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane, as described [25]. Immunoblotting was performed using rabbit polyclonal antibodies directed against ER $\alpha$  (sc-542, Santa Cruz Biotechnology, CliniSciences, Nanterre, France), EST (sc-292049, Santa Cruz Biotechnology), phospho-AKT/PKB (Ser473) (#4060, Cell Signaling Technology Europe, Leiden, The Netherlands) and total AKT/PKB (#9272, Cell Signaling Technology Europe), or mouse monoclonal antibodies directed against  $\alpha$ -tubulin (sc-5286, Santa Cruz Biotechnology). After incubation with either anti-rabbit or anti-mouse IgG Horseradish peroxidase conjugate (BioRad, Marnes-la-Coquette, France), blots were revealed using the Luminata *Classico* Western HRP substrate (Millipore, Molsheim, France). Detection was performed using the *ChemiDocXRS+* Imaging system (BioRad) and results were analysed with Image Lab software (BioRad). Data yielded for each protein were normalized relatively to  $\alpha$ -tubulin.

### *In-vivo* Magnetic Resonance (MR) Imaging protocol

Experiments were conducted on anesthetized 7 wk-old females fed either standard chow diet or HFSD, containing or not the mixture of pollutants (n = 6 per group) using a 7T small animal Bruker system (Bruker, Ettlingen, Germany). The detailed procedure is described in the supporting information (S1 Materials and Methods).

### Statistics

All statistical analyses were performed using one-way ANOVA, followed by post hoc testing with Fisher's protected least square difference test (PLSD). Results were expressed as mean  $\pm$  SE and differences were considered significant at  $p < 0.05$  using the group not exposed to pollutants as reference. The number of samples is given for each figure.

## Results

### Metabolic impact of low dose pollutants in 7-wk old exposed females fed HFSD. Comparison with the 12-wk old exposed females

By week 7, females fed HFSD were 24% heavier than standard chow fed mice with higher glycaemia values (+33%,  $p = 0.001$ ) and plasma insulin levels (+134%,  $p = 0.02$ ) (Table 1). TG levels were unchanged (not shown) and plasma estradiol levels were below the detection threshold of the assay (<6.6 ng/ml; not shown) and lower than values (ranging from 24 to 31 pg/ml) measured in 12-wk old HFSD-fed females [25]. As for 12-wk old mice [25], pollutant exposure did not impact blood glucose or plasma levels of insulin (Table 1), adiponectin, FFA, triglyceride (not shown). Plasma estradiol levels remained below the detection threshold of the

**Table 1. Body weight and biochemical parameters.**

Parameters	7 wk-old mice					
	Standard		F1-HF0		F1-HFp	
	value	n	value	n	value	n
body weight (g)	15.3 ± 0.7 *	5 litters (7 mice)	19.8 ± 0.5	11 litters (22 mice)	18.8 ± 0.3	9 litters (21 mice)
glycaemia (mmol/L)	6.7 ± 0.6 *	5 litters (7 mice)	8.9 ± 0.4	11 litters (22 mice)	10.0 ± 0.5	9 litters (21 mice)
insulinemia (ng/ml)	0.29 ± 0.04 *	5 litters (7 mice)	0.68 ± 0.10	10 litters (21 mice)	0.76 ± 0.10	9 litters (18 mice)

Results are means ± SE of n litters as indicated; \* p<0.05 versus F1-HF0

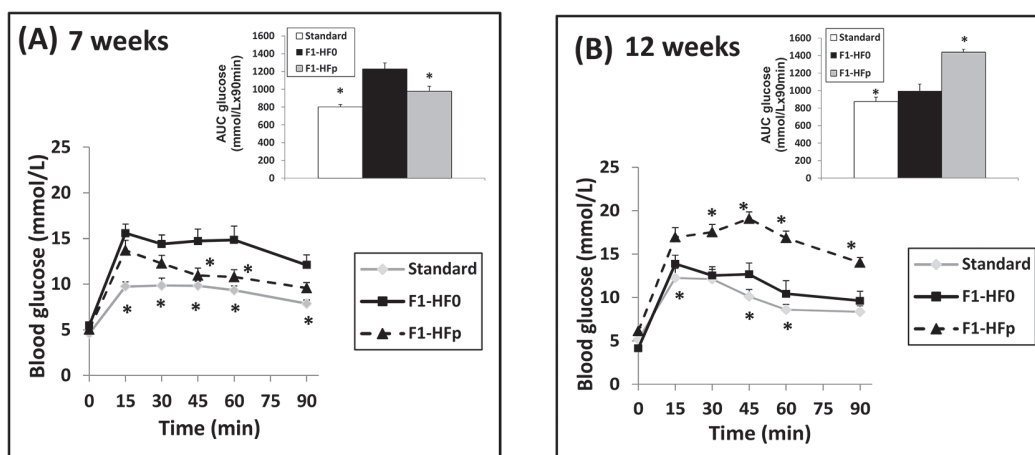
doi:10.1371/journal.pone.0124015.t001

assay (<6.6 ng/ml; not shown). Body weight (Table 1) or food intake (not shown) were also not modified by pollutants in 7wk-old female mice, as previously shown for the 12-wk old exposed females fed HFSD [25].

Metabolic profiles were completed with GTTs. We observed that 7 wk-old exposed females had a better glucose tolerance with a significant decrease (-20%, p = 0.01) in the area under the curve (AUC) compared to age-matched females fed pollutant-free HFSD. Thus, pollutant-exposed mice fed HFSD ranged between mice fed standard chow and mice fed pollutant-free HFSD (Fig 1). These data are the compilation of the glycaemia values of 7 litters of HF0 females and 9 litters of HFp females from 4 independent experiments. A subset of mice (3 litters per group) were maintained until 12 wks of age and shown to have an aggravated glucose intolerance when exposed to pollutants compared to females fed pollutant-free HFSD (Fig 1), consistent with data previously reported and expressed per female mice [25]. Thus, these data suggested an age-dependent metabolic effect of the pollutants.

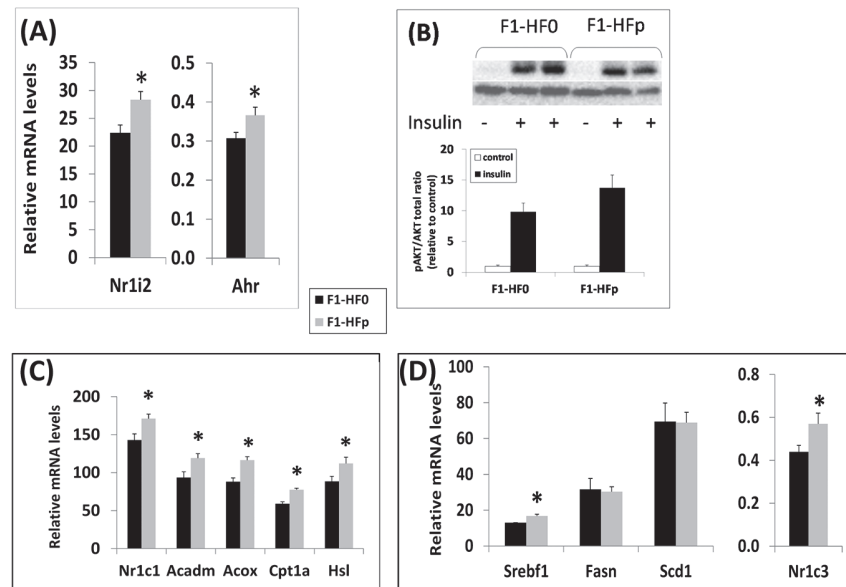
### Pollutant-exposed females had enhanced fatty acid oxidation in liver by week 7

The liver being the major site of detoxification, it is a primary target upon pollutant exposure. At 7 wks of age, the expression of genes encoding the aryl hydrocarbon receptor, AhR and the



**Fig 1. Glucose Tolerance Tests (GTTs) performed on 7 wk-old (A) and 12 wk-old (B) F1 female mice fed HFS diet containing (F1-HFp) or not (F1-HF0) the mixture of pollutants, or standard chow (Standard).** Above each GTT curve, are shown the AUCs calculated from the GTT curves. Results are means ± SE of n = 5 (Standard), 7 (HF0) and 9 (HFp) litters in (A) and n = 3 litters in B; \*p<0.05 relatively to the F1-HF0 group.

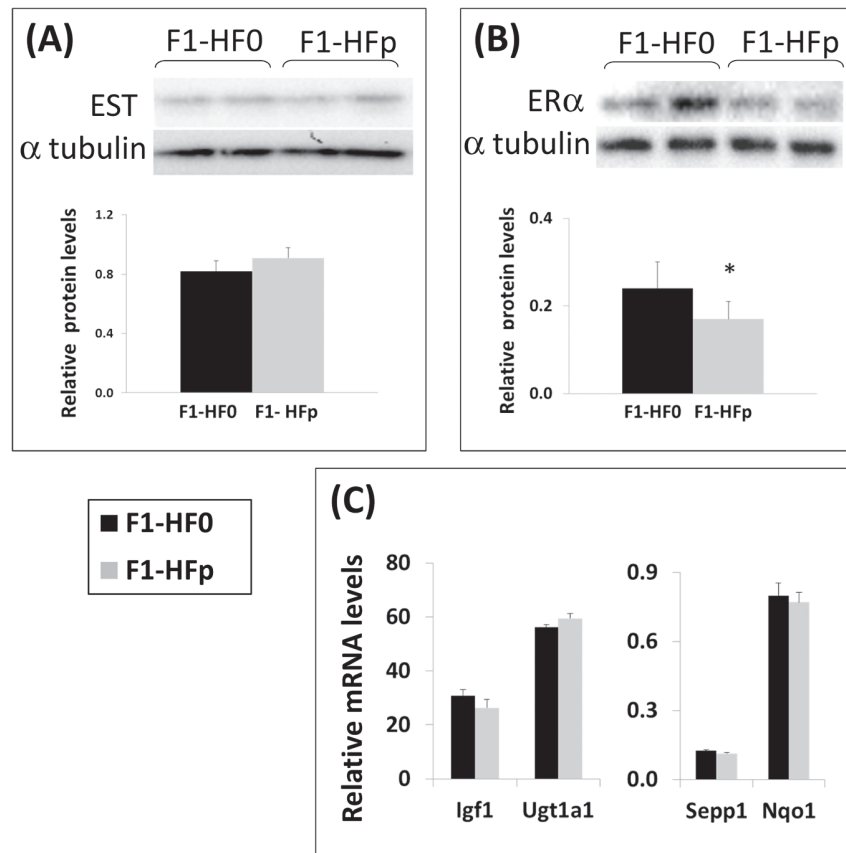
doi:10.1371/journal.pone.0124015.g001



**Fig 2. (A)** Effect of the mixture of pollutants on hepatic mRNA expression of xenobiotic nuclear receptors; **(B)** Analysis by Western blot of the ratio between phosphorylated PKB/AKT versus total PKB/AKT in liver removed from F1-HF0 and F1-HFp mice stimulated or not by insulin. For quantification, each blot has been hybridized to  $\alpha$ -tubulin and the graphs below represent means  $\pm$  SE;  $n = 7-8$  mice. **(C)** and **(D)** Hepatic expression of *Nr1c1* and of several PPAR $\alpha$ -regulated genes **(C)** and of genes encoding proteins involved in lipogenesis **(D)**. Results are means  $\pm$  SE; \* $p < 0.05$  relatively to the F1-HF0 group;  $n = 7$  mice in **(A)**, **(C)** and **(D)**.

doi:10.1371/journal.pone.0124015.g002

pregnane X receptor, PXR (*Nr1i2*) (Fig 2A), known xenobiotic nuclear receptors were found significantly enhanced in the liver of exposed females fed HFSD, indicating patent response to pollutants. We then investigated in more details insulin action and glucose metabolism in the liver of these animals. Mice were infused with insulin and insulin action was monitored through measuring AKT/PKB serine phosphorylation levels as described [33, 34]. There was a 40% albeit not significant ( $p = 0.28$ ) increase of AKT/PKB phosphorylation in the liver of the pollutant-exposed females (Fig 2B). In addition, we observed a significant higher expression levels of *Nr1c1* encoding peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ; + 20%;  $p = 0.02$ ). There was as well an increased expression of several PPAR $\alpha$ -regulated genes (Fig 2C) coding key proteins and enzymes involved in mitochondrial fatty acid import (Carnitine palmitoyltransferase 1 $\alpha$ , *Cpt1a*; +31%,  $p < 0.002$ ), oxidation (medium-chain-acyl-Coenzyme A dehydrogenase, *Acadm*; +27%,  $p < 0.02$ ), and peroxisomal beta-oxidation (AcylCoA oxidase, *Acox*; +32%;  $p = 0.001$ ). The expression of the gene encoding the hormone sensitive-lipase (HSL, + 27%;  $p = 0.04$ ; Fig 2C), *Nr1c3* (encoding PPAR $\gamma$ ; + 29%,  $p < 0.05$ ) and *Srebf1* (encoding SREBP1c; + 29%,  $p < 0.05$ ) were also significantly increased without any change in the levels of mRNA encoding stearoyl-CoA-desaturase-1 (*Scd1*) and fatty acid synthase (*Fas*) (Fig 2D). These results suggested some modifications in lipid metabolism, with increased fatty acid oxidation but without major change in lipogenesis. In agreement, hepatic triglycerides levels were not modified by pollutant exposure (not shown). We also found that the mRNA expression of genes encoding Glucose-6-phosphatase (*G6pc*) and phosphoenolpyruvate carboxykinase (*Pepck*) was unaffected (not shown), suggesting that gluconeogenesis was probably not impacted.



**Fig 3. EST/Sult1e1 (A) and ER $\alpha$  (B) were studied by Western blotting analyses.** The graphs below correspond to the quantification and represent means  $\pm$  SE; \* $p < 0.05$  relatively to the F1-HFO;  $n = 7-8$  mice. (C) mRNA expression of some estrogen-regulated genes in 7wk-old female mice fed HFS diet containing (F1-HFp) or not (F1-HFO) the mixture of pollutants. Results are means  $\pm$  SE ( $n = 7$  mice).

doi:10.1371/journal.pone.0124015.g003

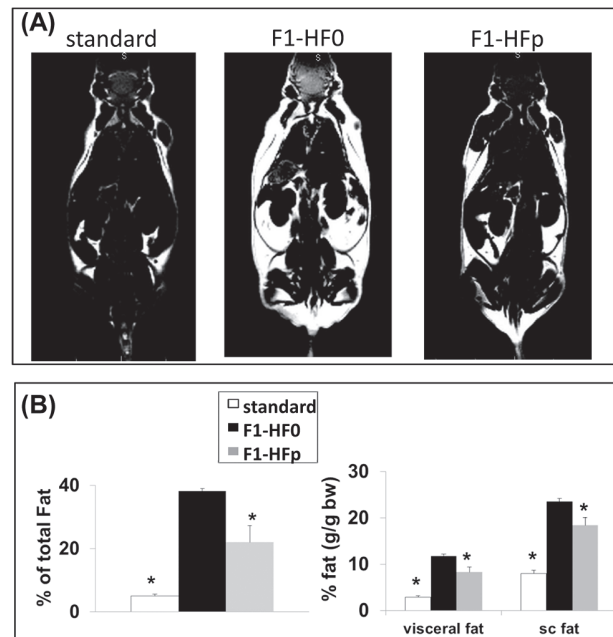
### Hepatic Sult1e1 expression is not altered in 7-wk old exposed females

We next determined if estrogen signalling was impaired in the liver of pollutant-exposed females by week 7 as previously observed at 12 wks of age [25]. However and contrasting with 12-wk old mice fed HFSD exposed to the mixture of pollutants, we did not detect any change in the protein levels of EST/SULT1E1 (Fig 3A). In addition, although a significant ( $p = 0.02$ ) decrease in estrogen receptor (ER $\alpha$ ) protein content was observed (Fig 3B), the mRNA levels of the estrogen-regulated genes *Igf1*, *Sepp1*, *Nqo1* and *Ugt1a1*, which expressions decreased in the liver of 12-wk old exposed females fed HFSD [25], were not affected by pollutant exposure at 7 wks of age (Fig 3C). These results suggested therefore different effects of pollutant exposure on hepatic estrogen signalling which may depend on the duration of the exposure to the pollutant-containing HFSD and /or on the age at which the female mice are studied.

### Pollutant exposed females exhibited enhanced lean mass and reduced fat mass by week 7

To get further insight into the metabolic characterization of the 7-wk old exposed female mice fed HFSD, we carried out whole-body magnetic resonance imaging (MRI) analysis. Interestingly, we observed a significant increase (+ 20%;  $p = 0.02$ ) of lean mass in these pollutant-exposed





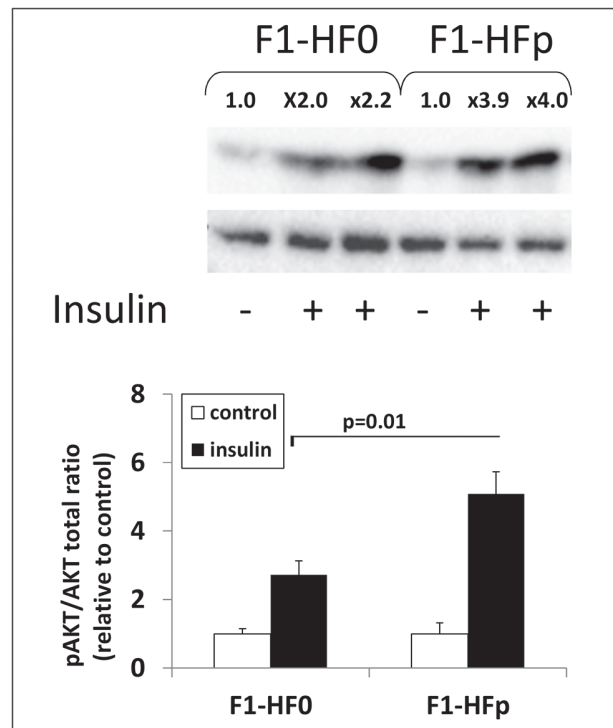
**Fig 4. MRI figures and graphs.** (A) Representative coronal fat image of females fed standard chow and from F1-HF0 and F1-HFp groups, showing the relatively less important fat mass in the F1-HFp group, especially in the subcutaneous localization. These differences were confirmed by the whole-body spectrum analysis, and by the subcutaneous (sc) and visceral fat mass quantification in both groups (B). Results are means  $\pm$  SE (n = 6 mice/group). \*p<0.05 relatively to the F1-HF0 group.

doi:10.1371/journal.pone.0124015.g004

obese females, while both visceral and subcutaneous fat tissues were significantly decreased (Fig 4). This effect was not observed in age- and treatment-matched male mice (S2 Fig) nor was glucose tolerance affected by pollutant exposure in these males (not shown). Because the skeletal muscle is the primary tissue for glucose disposal [35], insulin sensitivity was monitored by measuring AKT/PKB serine phosphorylation in muscles sampled 15 min after insulin infusion, as described for the liver. We found a significant enhancement of AKT/PKB phosphorylation (+ 80%; p = 0.02) in the muscles recovered from pollutant-exposed mice as compared to age-matched non-exposed females (Fig 5), indicating a clear improvement of insulin sensitivity in the muscle of exposed animals.

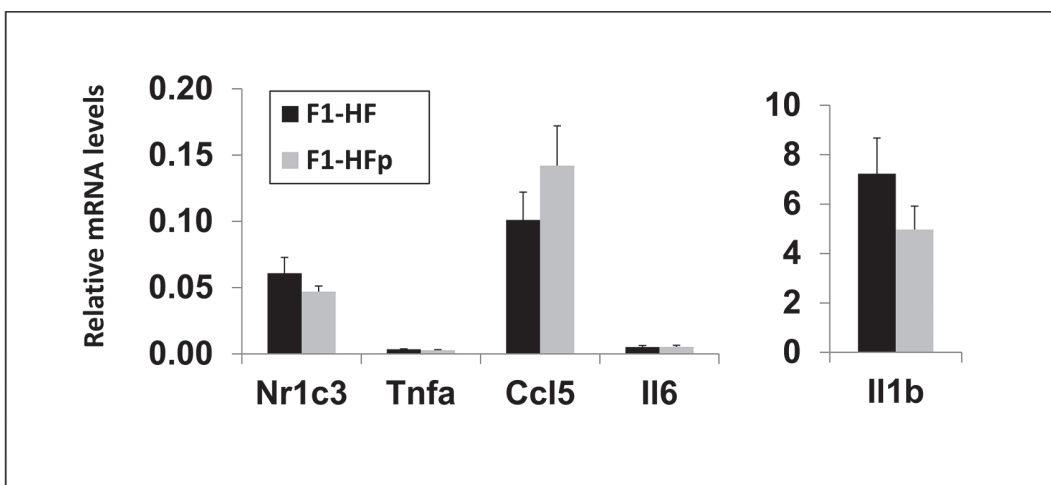
### Expression levels of inflammatory markers in the adipose tissues

Since pollutants have been described to induce the inflammatory pathway in various tissues [36, 37] including the adipose cells [38], and considering the importance of the inflammatory phenotype in metabolic diseases [39], we monitored the expression levels of genes encoding various inflammatory markers in visceral (vAT; Fig 6) and subcutaneous (scAT; Fig 7) adipose tissues. We first found that the expression level of *Nr1c3*, encoding PPAR $\gamma$ , was not modified (Figs 6, and 7) indicating that exposure to pollutants did not probably have a major impact on adipose differentiation. The expression of genes encoding tumor necrosis factor  $\alpha$  (*Tnfa*), CCL5/Rantes (*Ccl5*) and interleukin 1 $\beta$  (*Il1b*) all known inflammatory markers, while significantly decreased in the scAT (Fig 7) was not impacted in the vAT of 7-wk old F1-HFp females (Fig 6). These data suggested a reduced inflammation at least in the scAT consistent with an improvement of glucose intolerance in 7-wk old female mice exposed to pollutants and fed a HFS diet.



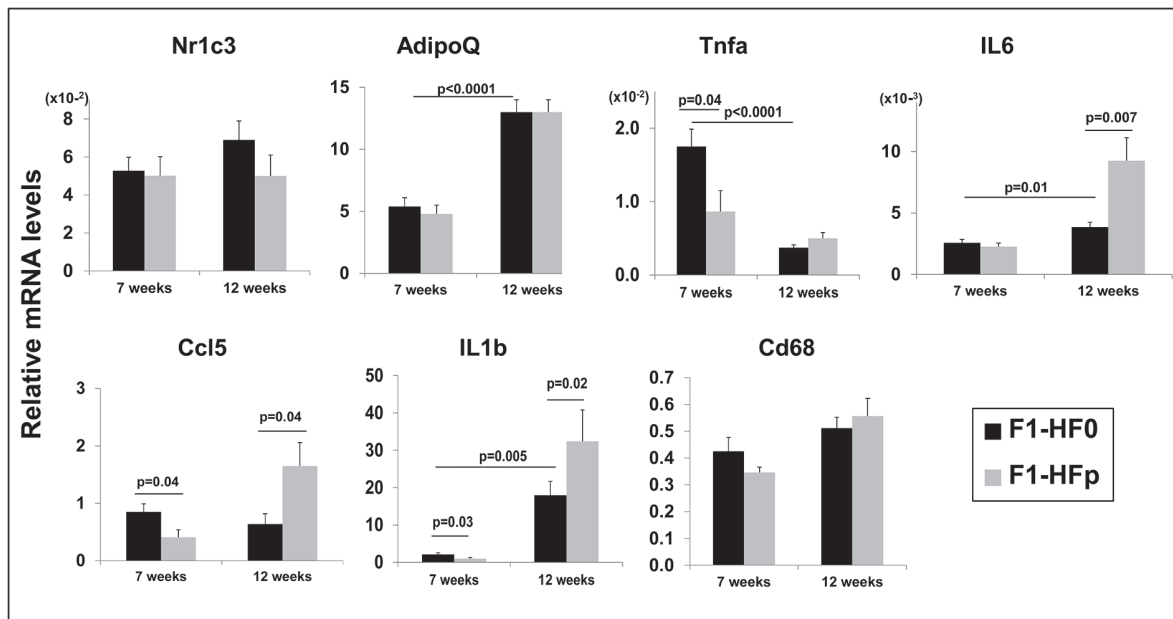
**Fig 5. Western blot analysis of the ratio between phosphorylated PKB/AKT versus total PKB/AKT in the gastrocnemius muscle removed from F1-HF0 and F1-HFp mice stimulated or not by insulin (the fold stimulation by insulin, relative to the mean of the corresponding control without insulin was assigned above each band shown).** For quantification, each blot has been hybridized to  $\alpha$ -tubulin and the graphs below represent means  $\pm$  SE; \* $p < 0.05$  relatively to the F1-HF0 group;  $n = 7-8$  mice.

doi:10.1371/journal.pone.0124015.g005



**Fig 6. mRNA expression of Nr1c3 and genes encoding inflammatory markers in visceral adipose tissues in 7 wk-old female mice fed HFSD.** Results are means  $\pm$  SE; \* $p < 0.05$  relatively to the F1-HF0 group;  $n = 9-10$  mice for Nr1c3, Tnfa and Il6;  $n = 5$  mice for Ccl5 and Il1b.

doi:10.1371/journal.pone.0124015.g006



**Fig 7. mRNA expression of Nr1c3, AdipoQ, CD68 and genes encoding inflammatory markers in the subcutaneous adipose tissues of 7 and 12 wk-old female mice fed HFSD.** Results are means  $\pm$  SE; *p* values are reported in the figure for significance; *n* = 8–12 mice for Nr1c3, Tnfa, CD68, AdipoQ and Il6 and *n* = 5 mice for Ccl5 and Il1b in the samples from 7-wk old mice; *n* = 5–6 mice for Nr1c3 and *n* = 9–14 mice for the other genes in the samples from 12-wk old mice.

doi:10.1371/journal.pone.0124015.g007

To get further evidences of a link between the metabolic phenotypes observed at 7 and 12 wks and the inflammatory state of the adipose tissues, we monitored the expression levels of genes encoding CCL5, IL1 $\beta$ , and TNF $\alpha$  in the scAT and vAT of the 12-week old F1-HF0 and F1-HFp groups. Interleukin 6 (*Il6*) was also surveyed at both ages. None of the cytokines had their expression level impacted by pollutant exposure in vAT at both ages surveyed (Fig 6 and not shown). Interestingly, we observed a significant enhancement in the expression levels of genes encoding CCL5, IL6 and IL1 $\beta$  in the scAT of the 12-wk old F1-HFp females, while *Il6* expression was not altered by wk 7 (Fig 5). In addition, genes encoding inflammatory cytokines IL6, IL1 $\beta$  and CCL5 (in the F1-HFp mice) showed expression levels significantly higher in scATs at 12- than at 7-wks (Fig 7). On the contrary, expression levels of the gene encoding TNF $\alpha$  decreased strongly between the ages of 7 and 12 together with the lack of impact of the pollutant exposure by wk 12 (Fig 7). Finally, we monitored the expression levels of the gene encoding CD68, a marker of macrophage infiltration in ATs [40]. However, we found no impact in pollutant-exposed females versus their time-matched unexposed females (Fig 7). Of note, the expression levels of *AdipoQ* (encoding adiponectin) in scAT were more than doubled between the ages of 7 and 12 although not impacted by pollutant exposure (Fig 7) again suggesting that adipose differentiation was not targeted by the pollutant mixture in scAT.

## Discussion

The present study illustrates the complexity of the impact of a life course exposure to low-dose pollutants on metabolic disorders induced by HFSD in female mice. The model of exposure recently developed in our laboratory [25] is original because of life-long exposure, encompassing maternal life (preconception, gestation and lactation). In addition, animals are exposed to a mixture of classical environmental pollutants in the range of the tolerable daily intake (TDI),

thus without expected adverse health impact when each pollutant is considered individually. Pollutants of the mixture comprised endocrine disruptors with different modes of actions, and of high concern for human health because of their links with metabolic diseases in epidemiological and experimental studies [20–22, 24].

With HFSD, the onset of obesity was gradual in our experimental model and was set up by week 12 in females with a 40% increase in body weight, enhanced levels of fasting glycaemia and plasma insulin levels [25]. While exposure to pollutants did not impact these parameters, we have observed significant sex-dependent metabolic changes by week 12, in absence of toxicity and weight modifications. Specifically, there was a marked deterioration of HFSD-induced glucose intolerance in females that was not observed in males [25]. Within the present study, we aimed at further characterizing exposed HFSD-fed female mice by week 7 when first signs of obesity could be observed. Surprisingly, the glucose intolerance induced by the HFS diet was improved in pollutant exposed females, and a reduced fat mass and increased lean body mass (without any weight change) was observed. It indicated that the aggravation of glucose intolerance, observed in 12-wk old pollutant-exposed obese mice, was preceded by a period of improvement of glucose tolerance. Consistent with the alleviation of glucose tolerance by week 7, we observed enhanced insulin sensitivity in the gastrocnemius muscle and a reduced expression of inflammatory markers in subcutaneous adipose tissue that was not observed at 12 weeks of age (i.e., there was even a significant increased expression of several inflammatory markers at this age). In addition, gene expression analysis in the liver suggested higher oxidation of fatty acids but no alteration of gluconeogenesis and no effect on steatosis. These data occurred with no concomitant alteration of hepatic estrogen metabolism and no change in the expression of the estrogen-regulated genes studied despite a reduction of the hepatic ER $\alpha$  protein content. These data also suggested that the observed metabolic improvement was more likely due to effects on muscle and/or adipose tissue, rather than on the liver. Moreover, they pointed to a possible key role of the adipose tissues in the kinetics of the described events especially if considering the enhanced expression of inflammatory markers in the subcutaneous adipose tissue by week 12 (this study) together with the concomitant and previously reported aggravation of glucose intolerance [25].

Collectively, our data fit the hypothesis of a biphasic metabolic impact of pollutants: a first apparent positive impact that is followed by a negative impact on glucose intolerance upon aging. One explanation could well be linked to body fatness taking into consideration that the adipose tissue acts as a reservoir for lipophilic pollutants and consequently may modulate their pharmacokinetics and toxicity [10]. Indeed, it was demonstrated that mouse size is achieved around 5–6 weeks of age [41], which means that the 29% extra-weight taken up between the 7 and 12 week-old HFSD fed females [25] grossly corresponds to fat mass, mostly in the white adipose tissues. Increases in the adipose tissue mass will result in an enhanced storage of the lipophilic TCDD and PCB153 thereby prolonging their half-life length as described [42, 43]. Therefore, as mice get older their POPs body burden will enhance. However, based on the measurement of adipocyte differentiation markers, it does not seem that adipocyte differentiation is targeted by pollutants in our experimental model. These data are consistent with the lack of gain weight under pollutant exposure contrasting with obesogen compounds which elicit enhanced expression of PPAR $\gamma$  and increased weight gain in the exposed animals [44]. Interestingly, we evidenced significant changes in the inflammatory state of the subcutaneous adipose tissue in response to the exposure to pollutants with a decrease by week 7 and an increase by week 12, in the absence of any variations in *Cd68* expression levels suggesting no massive macrophage infiltration. These data further strengthen the hypothesis that inflammation is one way by which pollutants can disrupt adipose tissue function and contribute to metabolic diseases [38, 39]. Further studies will help to understand if the kinetics of the induction of

inflammation in the subcutaneous adipose tissue plays a role in triggering the kinetics of changes of glucose intolerance (i.e., alleviation at 7 weeks and aggravation at 12 weeks), and its link with the hepatic insulin resistance in the 12 week-old HFSD females lifelong exposed to pollutants [25]. Nonetheless, this study highlights that dysfunction of the subcutaneous adipose tissue may also (and not only the visceral adipose tissue) possibly trigger metabolic abnormalities [45]. Whether it is related to a differential distribution of the pollutants within the fat pads remain to be explored. Collectively, our data are consistent with the conclusions of experimental studies with BPA in rats [18] and PCB153 in mice [19] suggesting that intake of a high-fat diet could be a trigger initiating adverse metabolic effects. Certainly, measurement of pollutants and their metabolites within the fat pads of the exposed females as well as feeding mice with a standard chow diet containing or not the mixture of pollutants will help to better comprehend this intriguing biphasic metabolic impact of pollutants. It may as well be of interest to study intestinal permeability whom integrity has been shown to be altered by BPA [46] and PCBs including PCB153 [47], and intestinal microflora because these parameters strongly influence lipid metabolism and metabolic health [48, 49].

A not mutually exclusive explanation for this apparent biphasic effect of pollutants may rely on plasma E2 levels. Indeed, E2 levels varied from 24 to 31 pg/ml in 12-week old females fed HFSD [25], which is consistent with values reported in the literature for standard C57BL/6 strain mice [50, 51] while they were below detectable levels at 7 weeks of age in females fed HFSD. It was indicative of differences in the hormonal environment between obese mice at 7 and 12 weeks of age in our experimental conditions. Besides, it is known that estrogens protect against diet-induced hepatic insulin resistance and glucose intolerance [33, 52, 53]. Hence, models of estrogen deficiency in both humans and rodents well illustrated the importance of estrogens in regulating energy homeostasis and insulin sensitivity when estrogens concentrations stay within a tight physiological range [54]. Thus, one could hypothesize that the estrogeno-mimetic effect of some of the pollutants (or their metabolites) might occur in a context of low estradiol levels, protecting the 7-week old animals against the deleterious metabolic effects of HFSD. In contrast, at 12 weeks of age, when circulating levels of estrogens are higher, pollutants may contribute to the induction of EST/SULT1E1 reducing estrogen signalling. Under such conditions, liver would no more benefit from the protective action of estrogens and, consequently, insulin resistance would be aggravated.

While additional works are thus needed to validate this hypothesis, it is important to note that interplay between metabolism, pollutants and estrogen action is already well documented. There have been several reports indicating that the adverse effects of endocrine disruptors depend on the estrogenic context. Actually, a large number of genes involved in energy metabolism present ER $\alpha$ -binding sites in their promoters [55] and the pleiotropic actions of estrogens are mediated through interactions with many signalling pathways [56]. Consistently, it was shown that PPAR $\alpha$  functions on obesity could be enhanced in estrogen-deficient states e.g. ovariectomized females [57]. Another example is given with the dioxins. Indeed, there is an extensive crosstalk between the ER and the aryl hydrocarbon receptor AhR, resulting in dioxins altering estrogen regulated genes and modulation of AhR activity by ER $\alpha$  [58, 59]. Noteworthy, the expression of the genes encoding AhR and PPAR $\alpha$  was enhanced in the liver of 7-week pollutant-exposed females while such modification was only observed in the liver of 12 week-old males (not females) exposed to the same mixture of pollutants [25]. But, contrary to what was observed in 7-week pollutant-exposed females, genes encoding proteins related to fatty acid oxidation had their expression levels unchanged in 12 week-old exposed males, again supporting the hypothesis of a dialog, involving the estrogens, with the pathways activated by pollutants.

The pollutants present in the mixture have not been tested individually in our experimental model, making it difficult to conclude whether the effects of the mixture are additive, synergic

or antagonist. We think however that the enhanced expression of genes encoding AhR and PPARs may result from exposure to dioxin and phthalate, respectively, on the basis of the reported actions of these compounds [2, 12, 24]. It may thus indicate that high estrogen levels such as those present in 12 week-old adult female mice interfere with the ability of pollutants present in the mixture to induce higher expression levels of genes encoding AhR and PPAR $\alpha$ . Further studies are warranted to challenge this hypothesis. In addition, interactions of dioxin and phthalate with the other pollutants present in the mixture may be considered as well, specifically regarding BPA which has been shown to activate the estrogenic pathway but also the PPAR pathway [12, 24]. In conclusion, we here confirmed and extended our previous findings [25] demonstrating that exposure to a mixture of food pollutants at doses around the Tolerable Daily Intake range does indeed have metabolic consequences in a rodent model, and that effects are not only sex-dependent but also age-dependent.

## Supporting Information

**S1 Fig. Experimental protocol developed in the present study.**  
(TIF)

**S2 Fig. MRI graphs for male mice.** Whole-body spectrum analysis, and subcutaneous (sc) and visceral fat mass quantification in 7-wk old standard chow fed mice and mice fed HFSD without (F1-HF0) or with the mixture of pollutants (F1-HFp). Results are means  $\pm$  SE (n = 6 mice/group). \*p<0.05 relatively to the F1-HF0 group.  
(TIF)

**S1 Materials and Methods. MRI procedure.**  
(DOCX)

**S1 Table. Reference doses of the pollutants present in the mixture and doses added to the high fat high sucrose diet.**  
(DOCX)

**S2 Table. Composition of the diets used in the present study (modified from TD.99249, Harlan).**  
(DOCX)

**S3 Table. List of primers used for quantitative PCR.**  
(DOCX)

## Acknowledgments

The authors are very grateful to E. Meugnier, E. Loizon and S. Pesenti for technical help with the design of PCR primers. Part of the experiments was performed on the “Animage” platform of CERMEP Imagerie du Vivant, Lyon, France. The authors would specially like to thank R. Bolbos and J-B Langlois from CERMEP for performing Magnetic Resonance acquisitions in mice. We also thank Patrick Manas for animal care.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: DN HV BLMB. Performed the experiments: EL DN NV CP ECS BLMB. Analyzed the data: EL DN ECS BLMB. Wrote the paper: DN HV BLMB.

## References

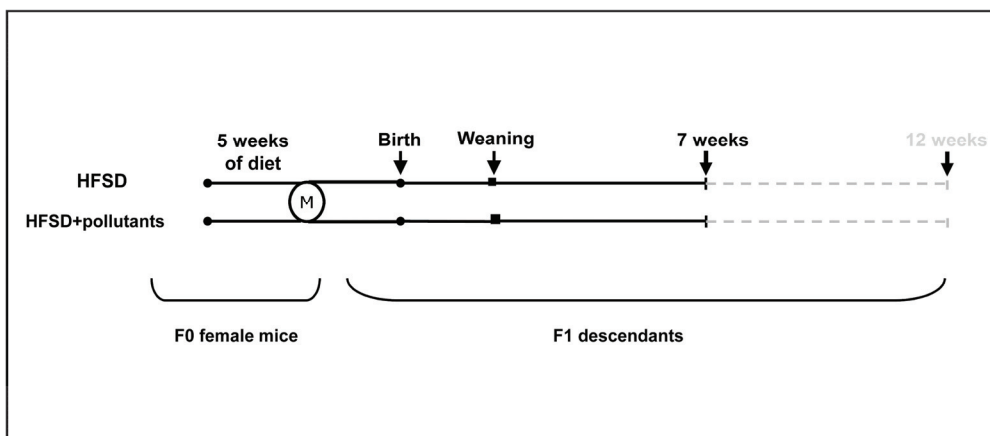
1. Baillie-Hamilton PF. Chemical toxins: a hypothesis to explain the global obesity epidemic. *J Altern Complement Med*. 2002; 8(2):185–92. Epub 2002/05/15. PMID: [12006126](#)
2. Casals-Casas C, Desvergne B. Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annual review of physiology*. 2011; 73:135–62. doi: [10.1146/annurev-physiol-012110-142200](#) PMID: [21054169](#)
3. Thayer KA, Heindel JJ, Bucher JR, Gallo MA. Role of environmental chemicals in diabetes and obesity: a National Toxicology Program workshop review. *Environmental health perspectives*. 2012; 120(6):779–89. Epub 2012/02/03. doi: [10.1289/ehp.1104597](#) PMID: [22296744](#)
4. Sun Q, Cornelis MC, Townsend MK, Tobias DK, Eliassen AH, Franke AA, et al. Association of urinary concentrations of bisphenol A and phthalate metabolites with risk of type 2 diabetes: a prospective investigation in the Nurses' Health Study (NHS) and NHSII cohorts. *Environmental health perspectives*. 2014; 122(6):616–23. Epub 2014/03/19. doi: [10.1289/ehp.1307201](#) PMID: [24633239](#)
5. Ibrahim MM, Fjaere E, Lock EJ, Naville D, Amlund H, Meugnier E, et al. Chronic consumption of farmed salmon containing persistent organic pollutants causes insulin resistance and obesity in mice. *PLoS one*. 2011; 6(9):e25170. doi: [10.1371/journal.pone.0025170](#) PMID: [21966444](#)
6. Miyawaki J, Sakayama K, Kato H, Yamamoto H, Masuno H. Perinatal and postnatal exposure to bisphenol a increases adipose tissue mass and serum cholesterol level in mice. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2007; 14(5):245–52. Epub 2007/10/17. PMID: [17938543](#)
7. Ruzzin J, Petersen R, Meugnier E, Madsen L, Lock EJ, Lillefosse H, et al. Persistent organic pollutant exposure leads to insulin resistance syndrome. *Environmental health perspectives*. 2010; 118(4):465–71. Epub 2010/01/13. doi: [10.1289/ehp.0901321](#) PMID: [20064776](#)
8. Alonso-Magdalena P, Morimoto S, Ripoll C, Fuentes E, Nadal A. The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic beta-cell function in vivo and induces insulin resistance. *Environmental health perspectives*. 2006; 114(1):106–12. Epub 2006/01/06. PMID: [16393666](#)
9. Norstrom K, Czub G, McLachlan MS, Hu D, Thorne PS, Hornbuckle KC. External exposure and bioaccumulation of PCBs in humans living in a contaminated urban environment. *Environment international*. 2010; 36(8):855–61. Epub 2009/04/28. doi: [10.1016/j.envint.2009.03.005](#) PMID: [19394084](#)
10. La Merrill M, Emond C, Kim MJ, Antignac JP, Le Bizec B, Clement K, et al. Toxicological function of adipose tissue: focus on persistent organic pollutants. *Environmental health perspectives*. 2013; 121(2):162–9. Epub 2012/12/12. doi: [10.1289/ehp.1205485](#) PMID: [23221922](#)
11. Zota AR, Calafat AM, Woodruff TJ. Temporal trends in phthalate exposures: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey, 2001–2010. *Environmental health perspectives*. 2014; 122(3):235–41. Epub 2014/01/16. doi: [10.1289/ehp.1306681](#) PMID: [24425099](#)
12. Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR Jr., Lee DH, et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocrine reviews*. 2012; 33(3):378–455. Epub 2012/03/16. doi: [10.1210/er.2011-1050](#) PMID: [22419778](#)
13. Calafat AM, Ye X, Wong LY, Reidy JA, Needham LL. Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003–2004. *Environmental health perspectives*. 2008; 116(1):39–44. Epub 2008/01/17. doi: [10.1289/ehp.10753](#) PMID: [18197297](#)
14. Heindel JJ, vom Saal FS. Role of nutrition and environmental endocrine disrupting chemicals during the perinatal period on the aetiology of obesity. *Molecular and cellular endocrinology*. 2009; 304(1–2):90–6. Epub 2009/05/13. doi: [10.1016/j.mce.2009.02.021](#) PMID: [19433254](#)
15. Silins I, Hogberg J. Combined toxic exposures and human health: biomarkers of exposure and effect. *International journal of environmental research and public health*. 2011; 8(3):629–47. Epub 2011/05/11. doi: [10.3390/ijerph8030629](#) PMID: [21556171](#)
16. Dorne JL. Metabolism, variability and risk assessment. *Toxicology*. 2010; 268(3):156–64. Epub 2009/11/26. doi: [10.1016/j.tox.2009.11.004](#) PMID: [19932147](#)
17. Marmugi A, Ducheix S, Lasserre F, Polizzi A, Paris A, Priymenko N, et al. Low doses of bisphenol A induce gene expression related to lipid synthesis and trigger triglyceride accumulation in adult mouse liver. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2012; 55(2):395–407. doi: [10.1002/hep.24685](#) PMID: [21932408](#)
18. Wei J, Lin Y, Li Y, Ying C, Chen J, Song L, et al. Perinatal exposure to bisphenol A at reference dose predisposes offspring to metabolic syndrome in adult rats on a high-fat diet. *Endocrinology*. 2011; 152(8):3049–61. Epub 2011/05/19. doi: [10.1210/en.2011-0045](#) PMID: [21586551](#)
19. Wahlang B, Falkner KC, Gregory B, Ansert D, Young D, Conklin DJ, et al. Polychlorinated biphenyl 153 is a diet-dependent obesogen that worsens nonalcoholic fatty liver disease in male C57BL6/J mice. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2013; 24(9):1587–95. Epub 2013/04/27. doi: [10.1016/j.jnutbio.2013.01.009](#) PMID: [23618531](#)

20. Barouki R, Gluckman PD, Grandjean P, Hanson M, Heindel JJ. Developmental origins of non-communicable disease: Implications for research and public health. *Environ Health*. 2012; 11(1):42.
21. Alonso-Magdalena P, Quesada I, Nadal A. Endocrine disruptors in the etiology of type 2 diabetes mellitus. *Nature reviews Endocrinology*. 2011; 7(6):346–53. Epub 2011/04/07. doi: [10.1038/nrendo.2011.56](https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.56) PMID: [21467970](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21467970/)
22. Janesick A, Blumberg B. Obesogens, stem cells and the developmental programming of obesity. *International journal of andrology*. 2012; 35(3):437–48. Epub 2012/03/01. doi: [10.1111/j.1365-2605.2012.01247.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2012.01247.x) PMID: [22372658](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22372658/)
23. Carpenter DO. Environmental contaminants as risk factors for developing diabetes. *Rev Environ Health*. 2008; 23(1):59–74. PMID: [18557598](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18557598/)
24. Lee DH, Porta M, Jacobs DR, Jr., Vandenberg LN. Chlorinated Persistent Organic Pollutants, Obesity, and Type 2 Diabetes. *Endocrine reviews*. 2014;er20131084. Epub 2014/02/04.
25. Naville D, Pinteur C, Vega N, Menade Y, Vigier M, Le Bourdais A, et al. Low-dose food contaminants trigger sex-specific, hepatic metabolic changes in the progeny of obese mice. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2013; 27(9):3860–70. Epub 2013/06/13.
26. The Scientific Panel on Food Additives F, Processing Aids and Materials in Contact with Food. Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to 2,2-BIS(4-HYDROXYPHENYL)PROPANE (Bisphenol A). Question number EFSA-Q-2005-100 EFSA J. 2006(428):1–75.
27. The Scientific Panel on Food Additives F, Processing Aids and Materials in Contact with Food (AFC). Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food (AFC) on a request from the Commission related to Bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) for use in food contact materials. Question N° EFSA-Q-2003-191 EFSA J. 2005; 243:1–20.
28. van Leeuwen FX, Feeley M, Schrenk D, Larsen JC, Farland W, Younes M. Dioxins: WHO's tolerable daily intake (TDI) revisited. *Chemosphere*. 2000; 40(9–11):1095–101. Epub 2000/03/30. PMID: [10789985](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10789985/)
29. WHO. Polychlorinated biphenyls: human health aspects. Concise International Chemical Assessment Document 55. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2003.
30. Gout J, Sarafian D, Mutel E, Vigier M, Rajas F, Mithieux G, et al. Metabolic and melanocortin gene expression alterations in male offspring of obese mice. *Molecular and cellular endocrinology*. 2010; 319(1–2):99–108. Epub 2010/01/26. doi: [10.1016/j.mce.2010.01.027](https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.01.027) PMID: [20109524](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20109524/)
31. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*. 1959; 37(8):911–7. PMID: [13671378](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13671378/)
32. Naville D, Rebourcet D, Chauvin MA, Vega N, Jalabert A, Vigier M, et al. Direct and indirect impact of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on adult mouse Leydig cells: an in vitro study. *Toxicology letters*. 2011; 207(3):251–7. doi: [10.1016/j.toxlet.2011.09.019](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.09.019) PMID: [21979172](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21979172/)
33. Riant E, Waget A, Cogo H, Arnal JF, Burcelin R, Gourdy P. Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. *Endocrinology*. 2009; 150(5):2109–17. Epub 2009/01/24. doi: [10.1210/en.2008-0971](https://doi.org/10.1210/en.2008-0971) PMID: [19164473](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19164473/)
34. Tubbs E, Theurey P, Vial G, Bendridi N, Bravard A, Chauvin MA, et al. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAM) integrity is required for insulin signaling and is implicated in hepatic insulin resistance. *Diabetes*. 2014; 63(10):3279–94. Epub 2014/06/21. doi: [10.2337/db13-1751](https://doi.org/10.2337/db13-1751) PMID: [24947355](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24947355/)
35. Turner N, Cooney GJ, Kraegen EW, Bruce CR. Fatty acid metabolism, energy expenditure and insulin resistance in muscle. *The Journal of endocrinology*. 2014; 220(2):T61–79. Epub 2013/12/11. doi: [10.1530/JOE-13-0397](https://doi.org/10.1530/JOE-13-0397) PMID: [24323910](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24323910/)
36. Magre S, Rebourcet D, Ishaq M, Wargnier R, Debard C, Meugnier E, et al. Gender differences in transcriptional signature of developing rat testes and ovaries following embryonic exposure to 2,3,7,8-TCDD. *PloS one*. 2012; 7(7):e40306. Epub 2012/07/19. doi: [10.1371/journal.pone.0040306](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040306) PMID: [22808131](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22808131/)
37. Rebourcet D, Odet F, Verot A, Combe E, Meugnier E, Pesenti S, et al. The effects of an in utero exposure to 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin on male reproductive function: identification of Ccl5 as a potential marker. *International journal of andrology*. 2010; 33(2):413–24. Epub 2010/01/12. doi: [10.1111/j.1365-2605.2009.01020.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2009.01020.x) PMID: [20059583](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20059583/)
38. Kim MJ, Pelloux V, Guyot E, Tordjman J, Bui LC, Chevallier A, et al. Inflammatory pathway genes belong to major targets of persistent organic pollutants in adipose cells. *Environmental health perspectives*. 2012; 120(4):508–14. Epub 2012/01/21. doi: [10.1289/ehp.1104282](https://doi.org/10.1289/ehp.1104282) PMID: [22262711](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22262711/)



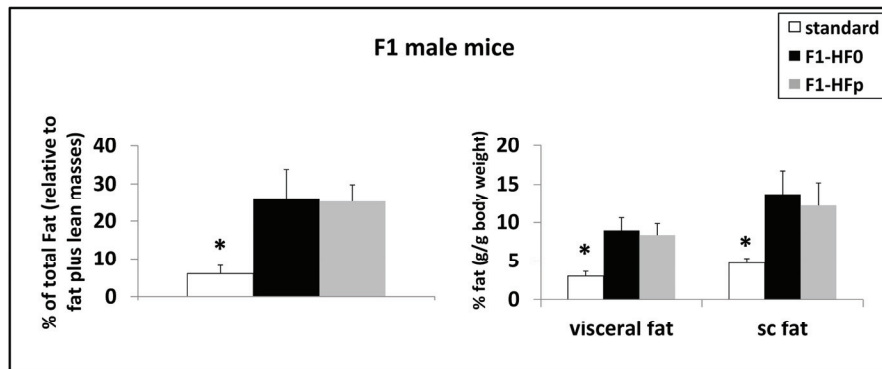
39. Maury E, Brichard SM. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Molecular and cellular endocrinology*. 2010; 314(1):1–16. Epub 2009/08/18. doi: [10.1016/j.mce.2009.07.031](https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.07.031) PMID: [19682539](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19682539/)
40. Di Gregorio GB, Yao-Borengasser A, Rasouli N, Varma V, Lu T, Miles LM, et al. Expression of CD68 and macrophage chemoattractant protein-1 genes in human adipose and muscle tissues: association with cytokine expression, insulin resistance, and reduction by pioglitazone. *Diabetes*. 2005; 54(8):2305–13. Epub 2005/07/28. PMID: [16046295](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16046295/)
41. List EO, Sackmann-Sala L, Berryman DE, Funk K, Kelder B, Gosney ES, et al. Endocrine parameters and phenotypes of the growth hormone receptor gene disrupted (GHR<sup>-/-</sup>) mouse. *Endocrine reviews*. 2011; 32(3):356–86. Epub 2010/12/03. doi: [10.1210/er.2010-0009](https://doi.org/10.1210/er.2010-0009) PMID: [21123740](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21123740/)
42. Emond C, Birnbaum LS, DeVito MJ. Use of a physiologically based pharmacokinetic model for rats to study the influence of body fat mass and induction of CYP1A2 on the pharmacokinetics of TCDD. *Environmental health perspectives*. 2006; 114(9):1394–400. Epub 2006/09/13. PMID: [16966094](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16966094/)
43. Milbrath MO, Wenger Y, Chang CW, Emond C, Garabrant D, Gillespie BW, et al. Apparent half-lives of dioxins, furans, and polychlorinated biphenyls as a function of age, body fat, smoking status, and breast-feeding. *Environmental health perspectives*. 2009; 117(3):417–25. Epub 2009/04/02. doi: [10.1289/ehp.11781](https://doi.org/10.1289/ehp.11781) PMID: [19337517](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19337517/)
44. Grun F, Blumberg B. Perturbed nuclear receptor signaling by environmental obesogens as emerging factors in the obesity crisis. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. 2007; 8(2):161–71. Epub 2007/07/28.
45. Alligier M, Gabert L, Meugnier E, Lambert-Porcheron S, Chanseaux E, Pilleul F, et al. Visceral fat accumulation during lipid overfeeding is related to subcutaneous adipose tissue characteristics in healthy men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2013; 98(2):802–10. Epub 2013/01/04. doi: [10.1210/jc.2012-3289](https://doi.org/10.1210/jc.2012-3289) PMID: [23284008](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23284008/)
46. Braniste V, Jouault A, Gaultier E, Polizzi A, Buisson-Brenac C, Leveque M, et al. Impact of oral bisphenol A at reference doses on intestinal barrier function and sex differences after perinatal exposure in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010; 107(1):448–53. Epub 2009/12/19. doi: [10.1073/pnas.0907697107](https://doi.org/10.1073/pnas.0907697107) PMID: [20018722](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20018722/)
47. Choi YJ, Seelbach MJ, Pu H, Eum SY, Chen L, Zhang B, et al. Polychlorinated biphenyls disrupt intestinal integrity via NADPH oxidase-induced alterations of tight junction protein expression. *Environmental health perspectives*. 2010; 118(7):976–81. Epub 2010/03/20. doi: [10.1289/ehp.0901751](https://doi.org/10.1289/ehp.0901751) PMID: [20299304](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20299304/)
48. Nieuwdorp M. Faecal microbiota transplantation. *The British journal of surgery*. 2014; 101(8):887–8. Epub 2014/05/23. doi: [10.1002/bjs.9549](https://doi.org/10.1002/bjs.9549) PMID: [24844698](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24844698/)
49. Kerr CA, Grice DM, Tran CD, Bauer DC, Li D, Hendry P, et al. Early life events influence whole-of-life metabolic health via gut microflora and gut permeability. *Critical reviews in microbiology*. 2014. Epub 2014/03/22.
50. Couse JF, Korach KS. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocrine reviews*. 1999; 20(3):358–417. Epub 1999/06/16. PMID: [10368776](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10368776/)
51. Vandormael-Pourmin S, Guigon CJ, Ishaq M, Coudouel N, Ave P, Huerre M, et al. Oocyte-specific inactivation of Omcg1 leads to DNA damage and c-Abl/TAp63-dependent oocyte death associated with dramatic remodeling of ovarian somatic cells. *Cell death and differentiation*. 2014. Epub 2014/08/30.
52. Faulds MH, Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA. The diversity of sex steroid action: regulation of metabolism by estrogen signaling. *The Journal of endocrinology*. 2012; 212(1):3–12. Epub 2011/04/23. doi: [10.1530/JOE-11-0044](https://doi.org/10.1530/JOE-11-0044) PMID: [21511884](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21511884/)
53. Zhu L, Brown WC, Cai Q, Krust A, Chambon P, McGuinness OP, et al. Estrogen treatment after ovariectomy protects against fatty liver and may improve pathway-selective insulin resistance. *Diabetes*. 2013; 62(2):424–34. Epub 2012/09/12. doi: [10.2337/db11-1718](https://doi.org/10.2337/db11-1718) PMID: [22966069](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22966069/)
54. Mauvais-Jarvis F, Clegg DJ, Hevener AL. The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. *Endocrine reviews*. 2013; 34(3):309–38. Epub 2013/03/06. doi: [10.1210/er.2012-1055](https://doi.org/10.1210/er.2012-1055) PMID: [23460719](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23460719/)
55. Gao H, Falt S, Sandelin A, Gustafsson JA, Dahlman-Wright K. Genome-wide identification of estrogen receptor alpha-binding sites in mouse liver. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2008; 22(1):10–22. Epub 2007/09/29. PMID: [17901129](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17901129/)
56. Lai K, Harnish DC, Evans MJ. Estrogen receptor alpha regulates expression of the orphan receptor small heterodimer partner. *The Journal of biological chemistry*. 2003; 278(38):36418–29. Epub 2003/07/05. PMID: [12842887](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12842887/)
57. Yoon M. PPARalpha in Obesity: Sex Difference and Estrogen Involvement. *PPAR research*. 2010; 2010. Epub 2010/09/28.

58. Guyot E, Chevallier A, Barouki R, Coumoul X. The AhR twist: ligand-dependent AhR signaling and pharmaco-toxicological implications. *Drug discovery today*. 2013; 18(9–10):479–86. Epub 2012/12/12. doi: [10.1016/j.drudis.2013.08.019](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.08.019) PMID: [23999374](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23999374/)
59. Matthews J, Gustafsson JA. Estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. *Nuclear receptor signaling*. 2006; 4:e016. Epub 2006/07/25. PMID: [16862222](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16862222/)



S1 Fig.

S1 Fig. Experimental protocol developed in the present study.



S2 Fig.

**S2 Fig. MRI graphs for male mice.**

Whole-body spectrum analysis, and subcutaneous (sc) and visceral fat mass quantification in 7-wk old standard chow fed mice and mice fed HFSD without (F1-HF0) or with the mixture of pollutants (F1-HFp). Results are means  $\pm$  SE (n = 6 mice/group). \* $p < 0.05$  relatively to the F1-HF0 group.

## **S1 Materials and Methods: MRI procedure**

The procedure is derived from Ranefall and collaborators (Ranefall et al., 2009). Anesthesia was induced by inhalation of a mixture of air and 3% isoflurane and maintained by a mixture of air containing 1.5% isoflurane. Body temperature was maintained using a circulating water circuit and respiration was continuously monitored over the entire protocol. Experiments were performed on a 7T small animal Bruker system (Bruker, Ettlingen, Germany) equipped with a 12-cm actively shielded bore and 400 mT/m gradient set. A pressure sensor was used for the respiratory signal and respiratory triggering was achieved with the Rapid Biomed system (RapidBiomedical, GmbH, Rimpfing, Germany). MR acquisitions were performed with the whole-body emission-reception mouse coil (72 mm). First, a reference scan (3 directions) was acquired to adjust shim and frequency parameters over the entire body and to position the coronal stack for whole body fat analysis (subcutaneous and visceral fat, respectively). For the water image, a 2D T1-weighted respiratory gated spin echo sequence (MSME) with fat suppression was acquired with the following parameters: TR/TE= 700/8.1 msec, a matrix size of 256\*128 for a voxel size of 350x350x750  $\mu\text{m}^3$ . Fat images were acquired using the cloned MSME sequence of the water image with a B1 shift frequency of 1050 Hz (the water-fat frequency difference at 7T). A whole body spectrum (SinglePulse, with the following parameters TR=1000 ms, NA 120, TA 2 min) was then acquired to determine fat and water ratio. Spectrum analysis was done with Topspin (Bruker). After phase and baseline correction, areas of the water and fat peaks were measured and expressed as a % of sum of peak integrals. Image analysis of intra-abdominal and subcutaneous fat volumes were performed with Amira® (FEI Visualization Sciences Group, Merignac, France) using a semi-automatic segmentation tool and standard anatomic landmarks (Ranefall et al, 2009) after exclusion of the head, the inferior legs and the tail. Weights are derived using a fat density of 0.9255.

RANEFALL P, BIDAR AW, HOCKINGS PD. 2009. Automatic segmentation of intra-abdominal and subcutaneous adipose tissue in 3D whole mouse MRI. *J Magn Reson Imaging*. Sep;30(3):554-60.

**S1 Table:** Reference doses of the pollutants present in the mixture and doses added to the high fat high sucrose diet

values/kg bw/d	TDI	TDI $\Delta$
TCDD	1-4 pg	2 pg
PCB153	20 ng	80 ng
BPA	50 $\mu$ g	5 $\mu$ g
DEHP	50 $\mu$ g	50 $\mu$ g

**S2 Table: Composition of the diets used in the present study (modified from TD.99249, Harlan).**

	<b>High Fat diet (TD.99249, Harlan)</b>		<b>HFSD</b>	
	% mass	%kcal	% mass	%kcal
diet fat	36.1		34.3	
added corn oil			5.1	
<b>Total fat</b>	36.1	58.7	39.4	63.0
<b>Carbohydrate</b>	35 (maltodextrin 50% + sucrose 50%)	25.5	33.2 (maltodextrin 50% + sucrose 50%)	23.6
<b>Protein</b>	19.8	15.7	18.8	13.4
<b>kcal/g</b>	5.4		5.6	



**S3 Table:** List of primers used for quantitative PCR

gene	RefSeq Accession Number	sequences: 5'→3'	
		sense	antisense
<i>Acadm</i>	NM_007382	CAT-TTG-GAA-AGC-TGC-TAG-TG	CCA-TAG-CCT-CCG-AAA-ATC-TG
<i>Acox1</i>	NM_015729;NM_001271898	TGA-GGG-CGC-CAG-TCT-GAA-ATC	TGA-AGC-TCA-GGC-AGC-TCA-CTC
<i>AdipoQ</i>	NM_004797; NM_001177800	AGG-CCG-TGA-TGG-CAG-AGA-TG	CTT-CTC-CAG-GTT-CTC-CTT-TCC-TGC
<i>Ahr</i>	NM_013464.4, NM_013149.2	TCA-TCT-GGT-TTC -CTG-GCA-ATG-AAT	ATA-AGC-TGC-CCT-TTG-GCA-TC
<i>Ccl5</i>	NM_031116.3	CTT-GCA-GTC-GTC-TTT-GTC-AC	GAC-TAG-AGC-AAG-CAA-TGA-CAG
<i>Cd68</i>	NM_009853	AGC-ATA-GTT-CTT-TCT-CCA-GC	ATG-ATG-AGA-GGC-AGC-AAG-AG
<i>Cpt1a</i>	NM_013495	TCT-GAG-CCA-TGG-AGG-TTG-TC	CATCATGGCTTGTCTCAAGTGC
<i>Esr1</i>	NM_000125;NM_001122740;NM_001122741;NM_001122742	TGT-TTG-CTC-CTA-ACT-TGC-TC	CCT-TCT-CTT-CCA-GAG-ACT-TC
<i>Fasn</i>	NM_07988	GTG-CAC-CCC-ATT-GAA-GGT-TCC	GGT-TTG-GAA-TGC-TGT-CCA-GGG
<i>Gusb</i>	NM_010368	CTT-CAT-GAC-GAA-CCA-GTC-AC	GCA-ATC-CTC-CAG-TAT-CTC-TC
<i>Hprt</i>	NM_000194	TTG-CTG-ACC-TGC-TGG-ATT-AC	AGT-TGA-GAG-ATC-ATC-TCC-AC
<i>Hsl</i>	NM_001039507;NM_010719	GTG-TGT-CAG-TGC-CTA-TTC-AG	GTC-AGC-TTC-TTC-AAG-GTA-TC
<i>Igf1</i>	NM_001111276;NM_001111274;NM_184052	ACC-AAA-ATG-ACC-GCA-CCT-GC	AAC-ACT-CAT-CCA-CAA-TGC-CTG-TC
<i>Il1b</i>	NM_008361	ACT-GTT-CCT-GAA-CTC-AAC-TG	CTT-GTT-GAT-GTG-CTG-CTG-CG
<i>Il6</i>	NM_031168	AGT-TGC-CTT-CTT-GGG-ACT-GAT	TCC-ACG-ATT-TCC-CAG-AGA-AC
<i>Nqo1</i>	NM_008706	GGC-CGA-TTC-AGA-GTG-GCA-TCC-TG	TCT-GCA-TGC-GGG-CAT-CTG-GTG
<i>Nr1c1</i>	NM_011144; NM_001113418.1	AAG-GGC-TTC-TTT-CGG-CGA-AC	GTT-CAT-GTT-GAA-GTT-CTT-CAG
<i>Nr1c3</i>	NM_001127330;NM_011146	TCT-CTC-CGT-AAT-GGA-AGA-CC	GCA-TTA-TGA-GAC-ATC-CCC-AC
<i>Nr1i2</i>	NM_010936.3	AGG-AGG-AGT-ATG-TGC-TGA-TG	CTT-CAG-GAA-CAG-GAA-CCT-GTG
<i>Scd1</i>	NM_009127	GAT-ACA-CTC-TGG-TGC-TCA-AC	AAC-GTG-GTG-AAG-TTG-ATG-TG
<i>Sepp1</i>	NM_009155.3	ATG-ACA-GAT-GTG-GCC-GTC-TTG-TGT	GCC-TCT-GAG-GGC-TCC-GCA-GT
<i>SrebF1</i>	NM_011480	ACG-GAG-CCA-TGG-ATT-GCA-CA	AAG-GGT-GCA-GGT-GTC-ACC-TT
<i>Sult1e1</i>	NM-023135.2	TCT-TGG-CAA-GGC-CAG-ATG-AC	TCC-CAA-AAT-GAT-GCT-GGA-AGG
<i>Tnfa</i>	NM_013693.2	CCT-CAC-ACT-CAG-ATC-ATC-TTC	TGG-CAC-CAC-TAG-TTG-GTT-GTC
<i>Ugt1a1</i>	NM_201645.2	GCA-TCT-ATC-TCG-CTG-ATG-AG	CAG-AGG-CGT-TGA-CAT-AGG

**L'exposition à un mélange de polluants faiblement dosés  
entraîne des altérations métaboliques chez la souris  
femelle dont certains sont communs à ceux induits par le  
régime obésogène**

*Article soumis au The Journal of Nutritional Biochemistry*

**Article 3: Low-dose pollutant mixture triggers metabolic disturbances in  
female mice leading to common and specific features as compared to  
a high-fat-diet**

*Emmanuel Labaronne<sup>1</sup>, Claudie Pinteur<sup>1,§</sup>, Nathalie Vega<sup>1,§</sup>, Sandra Pesenti<sup>1</sup>, Benoit Julien<sup>1</sup>, Emmanuelle Meugnier-Fouilloux<sup>1</sup>, Hubert Vidal<sup>1</sup>, Danielle Naville<sup>1,\*</sup> and Brigitte Le Magueresse-Battistoni,<sup>1,\*</sup>*

§NV and CP contributed equally to this work; \*DN and BLMB share the last authorship

## **Résumé:**

Certains polluants interfèrent avec le métabolisme des lipides et peuvent stimuler la différenciation des adipocytes et le stockage des graisses, entraînant obésité et maladies métaboliques associées. On parle alors de polluants obésogènes. Cependant, nos résultats précédents (**article 1 et 2**) montrent que l'exposition à un mélange de polluants peut entraîner des désordres métaboliques sans modification du poids des souris exposées. De plus, il a été montré que des polluants pouvaient aggraver les effets métaboliques liés à l'obésité (Ibrahim et al., 2011; Ruzzin et al., 2010; Wahlang et al., 2013; Wei et al., 2011). Enfin, des études épidémiologiques montrent que la quantité de polluants est moins élevée chez les patients obèses métaboliquement sains que chez les patients obèses présentant des complications métaboliques (Gauthier et al., 2014). Cependant, ces données ne permettent pas de définir si ces effets sont médiés via des mécanismes distincts ou représentent une action combinée entre les polluants et le régime alimentaire.

Dans cette étude, les souris ont été exposées depuis la préconception jusqu'à l'âge adulte (12 semaines) à un mélange de polluants faiblement dosés via un régime alimentaire standard et nous avons comparé l'effet observé avec celui induit par un régime gras. Le protocole utilisé est similaire à celui utilisé dans les études précédentes (**article 1 et 2**), à l'exception du régime alimentaire.

Les souris femelles exposées aux polluants via un régime standard (*STpol*) ne présentent pas de différence au niveau du poids corporel, de la glycémie, de l'insulinémie ou des taux d'acides gras libres circulants comparées aux femelles non exposées (*STveh*). Les tests métaboliques de tolérance au glucose et de sensibilité à l'insuline ne montrent pas d'impact de l'exposition aux polluants, contrairement aux observations faites dans un contexte d'obésité (**article 1**). En revanche, les souris *STpol* présentent un doublement du taux des TAG hépatiques, une tendance à la diminution du cholestérol total et une diminution significative des esters de cholestérol dans le plasma. Aucun de ces paramètres n'est affecté chez les mâles issus des mêmes portées.

Nous avons également analysé le phénotype des souris nourries avec un régime gras (*HFHSveh*). Comme attendu, elles présentent à 12 semaines d'âge une augmentation pondérale, une intolérance au glucose et une augmentation de la glycémie, de l'insulinémie, de la cholestérolémie. Dans le foie, on note une augmentation de la quantité de TAG, sans modification des taux de cholestérol ou des esters de cholestérol.

Ces résultats montrent que les polluants et le régime gras n'induisent pas les mêmes perturbations métaboliques en traitement seul. Pour mieux comprendre les effets engendrés par chacun des deux traitements, nous avons caractérisé le transcriptome hépatique des souris femelles exposées aux polluants via le régime standard et il a été comparé à celui de souris nourries avec le régime gras. L'étude a porté sur le foie puisqu'il est le principal organe de détoxification et qu'il joue un rôle majeur dans l'homéostasie énergétique et dans la sensibilité à l'insuline.

Les analyses des transcriptomes hépatiques indiquent que l'exposition aux polluants dans nos conditions expérimentales affecte l'expression de 1473 gènes annotés tandis que le régime gras perturbe l'expression de 1360 gènes. Parmi ces gènes, 599 sont communs aux deux traitements. Une analyse fonctionnelle des différents groupes via le logiciel DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) permet de mettre en évidence quatre grandes voies métaboliques issues des bases de données de KEGG pathways (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) qui sont impactées par les deux traitements. Ces voies métaboliques ont été implémentées par une analyse manuelle des gènes.

- **Le métabolisme des xénobiotiques** : Les deux traitements affectent l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques. Cependant, le patron des gènes impactés est différent selon le traitement. Le métabolisme des xénobiotiques est contrôlé par les trois xénosenseurs (CAR, PXR et AhR), et nous montrons que l'exposition aux polluants et le régime obésogène entraînent l'augmentation de l'expression de CAR. De fait, 33 des 48 gènes dont l'expression est modifiée par les polluants sont des gènes cibles de CAR.
- **Le métabolisme du cholestérol** : En réponse aux polluants, tous les gènes impliqués dans la biosynthèse du cholestérol sont régulés négativement, à l'exception de Hmgcr, Sc4mol et Srebf2 dont leurs expressions ne sont pas modifiées. Chez les femelles obèses, nous observons également une diminution de l'expression de la quasi-totalité des gènes impliqués dans la biosynthèse du cholestérol dont Srebf2 et Hmgcr. L'expression de Cyp7a1, enzyme limitante de la voie de dégradation du cholestérol en acide biliaire est fortement augmentée par les deux traitements.
- **Le métabolisme des acides gras** : L'analyse des gènes du métabolisme des acides gras montre que les deux traitements induisent une diminution de l'expression des gènes de la synthèse *de novo* des acides gras, et une augmentation de l'expression des gènes constituant les gouttelettes lipidiques ainsi que des gènes impliqués dans la  $\beta$ -

oxydation. Une augmentation de l'expression de PPAR $\alpha$  (qui contrôle la  $\beta$ -oxydation) est observée chez les souris obèses, mais pas chez les souris exposées aux polluants.

- **Le rythme circadien** : les polluants modifient l'expression de tous les gènes composant le noyau de l'horloge moléculaire (Per, Clock, Arntl, Nr1d1, Nr1d2, Cry et Rorc). Les souris HFHS $veh$  présentent également une perturbation de l'expression de l'ensemble des gènes de l'horloge à l'exception de Per1, Nr1d2 et Cry2.
- Enfin, l'analyse manuelle des gènes modifiés par les polluants montre que certains gènes de la signalisation à l'insuline et de la néoglucogenèse, (Insr, Irs1, Irs2, Vnn1, Pck1), sont modifiés lorsque les souris sont exposées aux polluants.

Au bilan, l'analyse comparative des deux transcriptomes nous montre que le régime gras et les polluants peuvent avoir des cibles communes dans le métabolisme hépatique. Cependant, certaines différences dans le patron des gènes impactés font supposer que ces perturbations sont dues à des mécanismes différents, mais qui se recoupent.

En conclusion, cette étude montre une certaine similarité entre les effets des polluants et du régime gras au niveau transcriptomique et apporte de nouvelles connaissances sur l'effet combiné entre les deux traitements décrits dans la littérature. De plus, nous mettons en évidence que le rythme circadien peut être une cible du mélange de polluants qui pourrait expliquer les modifications observées au niveau des autres voies métaboliques. Ainsi nous montrons un nouveau mécanisme par lesquels les polluants pourraient induire les effets *in vivo*.

**Low-dose pollutant mixture triggers metabolic disturbances in female mice without any body weight change, and pinpoints to both common and specific features as compared to a high-fat diet challenge**

Emmanuel Labaronne<sup>1</sup>, Claudie Pinteur<sup>1,§</sup>, Nathalie Vega<sup>1,§</sup>, Sandra Pesenti<sup>1</sup>, Benoit Julien<sup>1</sup>, Emmanuelle Meugnier-Fouilloux<sup>1</sup>, Hubert Vidal<sup>1</sup>, Danielle Naville<sup>1,\*</sup> and Brigitte Le Magueresse-Battistoni,<sup>1,\*</sup>

<sup>§</sup>NV and CP contributed equally to this work; <sup>\*</sup>DN and BLMB share the last authorship

**Affiliations:**

<sup>1</sup>Univ-Lyon, CarMeN laboratory, INSERM U1060, INRA U1397, Université Claude Bernard Lyon1, INSA Lyon, Charles Mérieux Medical School, F-69600 Oullins, France

**Corresponding author:**

Dr. B. Le Magueresse-Battistoni, PhD

CarMeN laboratory, INSERM U1060, Faculté de Médecine Lyon-Sud, Chemin du Grand Revoyet, 69600 Oullins, France

Phone 33 (0)426235919, Fax 33 (0)426235916

E-mail : [brigitte.lemagueresse@inserm.fr](mailto:brigitte.lemagueresse@inserm.fr)

**Short title:** Metabolic disorders induced by pollutant mixture

**Abbreviations:** AUC, area-under-curve; BPA, bisphenol A; CE, cholesteryl ester; DEHP, diethylhexyl phthalate; DMSO, dimethylsulfoxide; FFA, free fatty acid; GTT, glucose tolerance test; HFHS, high- fat high sucrose; IST, insulin sensitivity test; PCB, polychlorinated biphenyl; POP, Persistent organic pollutant; TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin; TDI, Tolerable Daily Intake; TG, triglyceride.

## **ABSTRACT**

Environmental pollutants are potential etiologic factors of obesity and diabetes that reach epidemic proportions worldwide. However, it remains to determine if pollutants could exert metabolic defects without directly inducing obesity. To get more insight, the metabolic disturbances triggered in non-obese mice lifelong exposed to a mixture of low-dose pollutants (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine, polychlorinated biphenyl 153, diethylhexyl-phthalate, and bisphenol A) were compared with changes provoked by a high-fat high-sucrose (HFHS) diet not containing the pollutant mixture. A transcriptomic analysis was performed in liver for comparison. Interestingly, females exposed to pollutants did not gain weight, but they exhibited modifications in lipid homeostasis distinct from those observed in diet-induced obese mice. Furthermore, in addition to the xenobiotic/drug metabolism pathway, analysis of the hepatic signature illustrated that the steroid/cholesterol, fatty acid/lipid and circadian clock metabolic pathways were targeted in response to pollutants as observed in the diet-induced obese mice but that the specific sets of dysregulated annotated genes (>1300) did not overlap more than 40% between both challenges. Collectively, it shows that pollutants and HFHS diet affect common metabolic pathways, but by different, albeit overlapping, mechanisms. This is highly relevant for understanding the synergistic effects between pollutants and the obesogenic diet reported in the literature.

**Key words:** endocrine disruptors, metabolic disorders, hepatic transcriptome, dyslipidemia, cholesterol, circadian clock



## INTRODUCTION

Environmental pollutants are potential etiologic factors of obesity and diabetes, major chronic diseases that reach epidemic proportions worldwide (1, 2). The 2016 World Health Organization (WHO) update (3) indicates a doubling of obese people since 1980 with 1.9 billion overweight adults, and a fourfold increase in the number of people with diabetes since 1980, reaching 422 million in 2014. Pollutants are indeed now viewed as metabolic disruptors in addition to their endocrine disruption activities initially evidenced in reproductive organs (4). Accordingly, it has been demonstrated that a number of chemicals, which exponential manufacturing coincides with obesity trends (5) interfere with lipid metabolism and can promote adipocyte differentiation and fat storage leading to obesity and obesity-related metabolic dysfunctions (6-8). However, we recently demonstrated that exposure to a mixture of food pollutants could trigger metabolic disturbances in the progeny of obese mice without additional obesogenic effect (9-11), suggesting independent actions of chemicals on metabolic parameters. In this model of lifelong exposure (ie from pre-conception to 12 weeks of age) to a mixture of low-dose pollutants (2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxine, TCDD; Bisphenol A, BPA; Diethylhexyl-phthalate, DEHP and Polychlorinated biphenyl, PCB153) in mice fed a high-fat high-sucrose (HFHS) diet, we demonstrated a marked deterioration of glucose intolerance and liver insulin resistance associated with impaired hepatic estrogen signaling in females. Importantly, mice exhibited no extra-weight gain in addition to the HFHS diet and this metabolic phenotype was restricted to the females (9, 12). This suggests that under some circumstances, pollutants could exert metabolic defects without directly inducing obesity.

Consistently, metabolically unhealthy obese patients had higher plasma levels of persistent organic pollutants (POPs) than metabolically healthy obese subjects (13). In addition, epidemiological studies evidence strong relations between high circulating levels of POPs and insulin resistance, prevalence of metabolic syndrome or diabetes, after adjusting for obesity, in the US general population of the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2002 (2). The association is even higher among the most obese persons suggesting interactions between POPs and obesity on the risk of type 2 diabetes (2). In line with these epidemiological findings, experimental studies demonstrate a worsening of metabolic consequences with a high-fat diet compared with standard diet, in rodent models of exposure to chemicals (7, 8, 14, 15). Altogether, this important bulk of recent data pinpoints specific actions of chemicals on metabolic parameters in a context of obesity. However, it is

not clear whether effects of pollutants and high-fat diet are mediated by common or distinct mechanisms.

Therefore, to get more insight in this important issue, we herein characterized the transcriptomic signature of the liver of mice fed a standard diet containing the mixture of pollutants (9), because the liver is the major site of detoxification and a critical organ for energy homeostasis and insulin sensitivity. The pollutant signature was compared to the list of genes dysregulated in the liver of mice fed a HFHS diet but not exposed to pollutants. This study mostly focused on females because of their strong phenotypic response to pollutant exposure previously described in an obesity context (9, 12).

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Diets and Animals**

Mouse studies were performed with the approval of the Regional Committee of Ethics for Animal Experiments. Four week (wk) old C57BL/6J female mice (Envigo, Gannat, France) were housed in polypropylene cages with a normal light-dark cycle and free access to water (polypropylene bottles) and standard chow (LASQCDiet® Rod16-A, Genobios, Laval, France). After an acclimation period of one week, mice were randomly divided into 2 groups fed a standard diet supplemented (ST<sub>pol</sub> group) or not (ST<sub>veh</sub> group) with a mixture of TCDD (LGC-Promochem, Molsheim, France), BPA, DEHP and PCB153 (all from Sigma-Aldrich, Lyon, France) used at doses in the range of the TDI reference dose of each pollutant as previously described (9). In practice, powdered standard diet (Envigo) was thoroughly mixed in the presence of a solution of gelatin (12g in 600ml of water, for 1kg of powder) to obtain a soft paste. The four DMSO-dissolved pollutants were then added in a small volume of corn oil to facilitate uniform homogenization and make the polluted standard diet. The same amount of DMSO and corn oil was added to the standard diet as vehicle (Suppl. Data 1). To ensure that mice were exposed to the similar amounts of polluted food, 1g of contaminated diet for 17g of body weight was added each day, completed with the standard diet containing vehicle provided *ad libitum*. Female mice were fed these diets for 5 wks before mating with 8 wk-old standard-fed male mice and then during the periods of gestation and lactation. After weaning, the progeny was fed the same diet than their dam until 12 wks of age. Body weight and food intake was recorded weekly. An additional group of females, following the same

experimental design described above, was fed a HFHS diet (Envigo) (Suppl. Data 1) without pollutant but containing the same amount of DMSO and corn oil used as vehicle (HFHS $_{veh}$ ).

### **Metabolic tests**

Glucose tolerance test (GTT) and Insulin sensitivity test (IST) were performed on the female progeny of 11 wks as previously described (16).

### **Tissue collection and biochemical assays**

By wk 12, the female progeny was euthanized after 6 h of fasting. Blood was collected, liver removed and quickly frozen in liquid nitrogen. Blood glucose concentration was measured (OneTouchUltra glucometer, Lifescan, Issy-les-Moulineaux, France) as well as plasma levels of insulin (Mouse Ultrasensitive ELISA, Eurobio, Courtaboeuf, France). Triglycerides (Biolabo, Maizy, France), Free Fatty Acid, total cholesterol and cholesteryl esters (Sigma-Aldrich) were also assessed in plasma.

Lipids were extracted from frozen liver samples using a Lipid Extraction kit chloroform-free (BioVision, Clinisciences) to measure hepatic triglycerides and total cholesterol.

### **Microarray and transcriptomic data analyses**

RNA profiling in mice liver was performed using a Mouse GE 4x44K v2 Microarray Kit (Agilent Technologies, Massy, France). Briefly, 100 ng of total RNA isolated from frozen liver samples were labeled using the Low Input Quick Amp Labeling kit (CY3) (Agilent Technologies). Samples from 3 ST $_{veh}$ , 5 ST $_{pol}$  and 5 HFHS $_{veh}$  female mice were used in the study. Microarrays were then hybridized and scanned following the manufacturer's instructions. Data extraction was performed using Agilent Feature Extraction Software 11.5.1.1. Quality analysis and treatment of the data were performed with bioconductor using Agi4x44PreProcess and Limma packages (17). Background subtraction was performed using the Normexp correction with offset =50. Quantile normalization was then applied. Features

flagged in Feature Extraction as control, as Non-uniform outliers, saturating or too weak were excluded. Statistical analysis was performed on 26,082 probes with the Limma package. Datasets are available from the GEO database (GSE86582). Then for further analyses probes from the *STpol* and the *HFHSveh* groups with *p*-value less than 0.05 and with a fold change greater than 1.2 compared to *STveh* were retrieved. The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (*DAVID* v6.7) (<https://david.ncifcrf.gov/>) was used to identify enrichments in biological functions and pathways in the list of regulated genes.

### **Real-time PCR analyses**

Total RNA was extracted from frozen liver samples, reverse transcribed and analyzed by real-time quantitative PCR in the presence of specific primer pairs (Suppl. Data 1) as previously described (18). Data were normalized using *Gusb* (encoding  $\beta$ -glucuronidase) as a reference gene.

### **Statistical analyses**

Statistical analyses were performed using One-way ANOVA followed, when appropriate, by *post hoc* testing with Fisher's protected least significant difference test, to assess differences between groups. Mann-Whitney tests were applied when values were not normally distributed. Results are expressed as means  $\pm$  SEM and differences were considered significant at *p*-value <0.05.

## **RESULTS**

### **Metabolic alterations in lifelong pollutant-exposed female mice**

Upon feeding the standard diet, the mixture of pollutants did not induce any gain weight in the female progeny (Fig.1A) nor changes in food intake (data not shown), similar to previous data described in a context of obesity (9). Pollutants did not affect fasting blood glucose or fasting plasma insulin, free fatty acids (FFA) and triglyceride (TG) levels (Fig. B-

E). In contrast, plasma cholesterol levels showed a tendency towards a decrease ( $p=0.06$ ) while cholesteryl esters (CEs) were significantly decreased ( $p=0.03$ ) (Fig 1F). In the liver, there was a significant doubling of the TG level (Fig. 1G) but total cholesterol concentration was not affected (Fig. 1H). Metabolic profiles were completed with GTTs and ISTs (Fig. 1I, 1J) showing no modifications in glucose tolerance but a tendency towards a decrease of insulin sensitivity in *STpol* females. Interestingly, none of these metabolic parameters was affected in the *STpol* male siblings (except blood glucose level, Suppl. Data 2), indicating a sex-dependency of these effects. Of note and as reported (9), females fed the HFHS diet exhibited strong changes of their metabolic parameters with enhanced body weight, higher blood glucose, increased plasma insulin, cholesterol and CE concentrations as well as marked increase in hepatic TG levels coupled to significant degradation of glucose tolerance but no apparent deterioration of insulin sensitivity (Suppl. Data 3). Collectively, these data indicated that, when provided separately, the mixture of pollutants and the HFHS diet did not induce the same metabolic disturbances. This experimental situation should therefore allow us to characterize and compare the metabolic pathways impacted specifically upon exposure to pollutants or by a HFHS diet.

### **Transcriptomic signatures of liver in the *STpol* and HFHSveh groups**

Analysis of the microarray data performed in the liver of fasted mice exposed to the different challenges revealed that 2006 probes corresponding to 1473 unique annotated genes show significant changes ( $p\text{-value} < 0.05$ , fold change (FC)  $> 1.2$ ) in response to pollutants (*STpol* genes), and there were 1825 dysregulated probes corresponding to 1360 annotated genes in response to the HFHS diet (HFHSveh genes). Importantly, 599 genes were found to be commonly regulated (Fig. 2). When applying the Benjamini–Hochberg procedure to more stringently control for false discovery rate, 251 genes remained significantly regulated in the liver of the *STpol* group (adjusted  $p\text{-value} < 0.05$ ), 174 in HFHSveh with 52 common genes (Fig. 2).

Using the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis, the *STpol* genes were significantly enriched in genes related to “drug and xenobiotic metabolism” (KEGG pathways mmu00982, mmu00980, mmu00480), “steroid biosynthesis” (KEGG pathways mmu00100, mmu00900), fatty acid metabolism (KEGG pathways mmu01040, mmu00071, mmu03320) and to the “circadian rhythm” (KEGG pathway mmu04710) (Fig. 2).

Rather unexpectedly, the same 4 general pathways were also enriched in the HFHS*veh* gene list (Fig. 2). Importantly, when analyzing the list of 599 genes commonly regulated, the pathways retrieved were again identical suggesting that the two treatments globally affected the same metabolic pathways in the liver. Of note, when taking into account only the genes with a significant Benjamini–Hochberg adjusted *p*-value, « steroid biosynthesis » still appeared as a major regulated pathways in the 2 groups, while « circadian rhythm » was found only in the ST*pol* gene list (Fig. 2).

Half of the genes which expression was modified in ST*pol* and HFHS*veh* mice were up-regulated, and the KEGG pathway analysis revealed that the up-regulated list was enriched in genes belonging to “fatty acid metabolism” and “PPAR signaling” pathways while the down-regulated list contained genes more related to “steroid biosynthesis” and “drug metabolism” (Suppl. Data 4). Of note, more than 100 common genes were regulated in opposite manner, but there was no significant enriched pathway in this gene list. However, 2 interesting genes related to triglyceride deposition, encoding LIPIN 1 (*Lpin1*) and the adipose tissue triglyceride lipase ATGL (*Pnpla2*) were regulated in an opposite way (up-regulated in ST*pol* and down-regulated in HFHS*veh*, respectively).

Despite the fact that the same KEGG pathways were enriched in the ST*pol* and the HFHS*veh* list of genes, this did not demonstrate that the same genes or sets of genes were affected by the two challenges. Therefore, and also to complete the characterization of the impacted pathways, we manually implemented the functional gene lists by PubMed and databases searches.

### **Drug and xenobiotic metabolism**

Table 1 presents the list of genes related to “drug and xenobiotic metabolism” retrieved from the ST*pol* and HFHS*veh* genes. It contains Phase-I cytochromes P450 xenobiotic-metabolizing enzymes (Cyp450 XMEs), *Por*, encoding the Cytochrome P450 oxidoreductase (which is essential for CYP activities) and other phase I genes such as alcohol and aldehyde metabolizing enzymes (ALDHs), carboxyesterases, dehydrogenases, reductases, flavin-containing monooxygenase (FMOs). Genes were split into 3 grossly equal groups, with genes regulated in both conditions and genes regulated by one but not the other condition (Table 1). Phase II metabolizing enzymes include conjugating enzymes, such as

methyltransferases, glutathione S-transferases, sulfotransferases, or UDP-glucuronosyltransferases. All genes regulated under pollutant exposure were down-regulated and most of them were also down-regulated in HFHS<sup>veh</sup> females (Table 1). Phase III transport genes include solute carrier proteins (SLC) and ATP-binding cassette (ABC) transporters among which several ABC transporters were significantly modified by pollutant exposure (Table 1).

Drug metabolism in response to xenobiotics is mainly controlled by 3 nuclear receptors (called xenosensors), the aryl hydrocarbon receptor AHR, the pregnane X receptor PXR (*Nr1i2*) and the constitutive androstane receptor CAR (*Nr1i3*). The PPARs may also be activated by some xenobiotics such as phthalates including *Nr1c1* (encoding PPAR $\alpha$ ). Interestingly, *Nr1i3* (encoding CAR) was the only xenosensor significantly induced in ST<sup>pol</sup> mice. *Nr1i3* had also its expression level increased in HFHS-fed mice in addition to *Nr1c1* (Table 1). Of note, 33 of the 48 “drug and xenobiotic metabolism”- related genes belonging to the ST<sup>pol</sup> list of dysregulated genes have been reported as CAR target genes (19).

### 3.4. Steroid biosynthesis

In contrast to the “drug and xenobiotic metabolism” pathways that were characterized by only 30% of genes commonly regulated by pollutants and HFHS, 65% of the genes belonging to “steroid biosynthesis” were similarly regulated, mainly down-regulated, in the two experimental conditions. Indeed, the KEGG pathways with the strongest association to both pollutants and HFHS exposure were steroid biosynthesis (mmu00100) and terpenoid backbone biosynthesis (mmu00900) (Fig. 2). Terpenoids, also called isoprenoids, are the most abundant lipids and both steroids and sterols are produced from terpenoid precursors in mammals via the mevalonate pathway. Nineteen genes, all down-regulated by either one of the two challenges encoded proteins and enzymes directly involved in cholesterol and steroid backbone synthesis, from the initial steps (*Hmgcs1*, *Mvk*, *Pmvk*, *Mvd*) to the final steps of the biosynthesis pathway (*Dhcr7*). In addition, several genes encoding key regulators of this pathway were also down-regulated in the 2 conditions, such as *Scap*, *Insig 1* and *Insig 2* that control the activity of the transcription factors SREBPs (sterol regulatory element binding proteins) (20) and *Soat2* encoding the sterol O-acyltransferase 2 which regulates the excess of intracellular free cholesterol (Table 2). Few genes from Table 2 were up-regulated and they mainly encoded cholesterol and steroid transporters, such as *Osbpl5*, *Npc1* and sterol

transporters from of the ABC family, depending on treatments. Altogether, this strongly argued for a major impact of the 2 challenges on the hepatic cholesterol synthesis.

However, there were also strong differences in the sets of targeted genes. Specifically, *Acat2* encoding the Acyl-CoA:cholesterol O-acyl-transferase 2, *Ebp* encoding the sterol isomerase Emopamil binding protein which is a key enzyme involved in the terminal reactions of the sterol biosynthesis pathway and *Lipa* encoding a cholesterol ester hydrolase, involved in cholesterol esterification and storage, showed decreased expression only upon pollutant exposure (Table 2). Conversely, there was a down-regulation of the genes encoding the rate-limiting enzyme hydroxymethylglutaryl-CoA-reductase (*Hmgcr*) and the sterol regulatory element binding factor 2 (*Srebf2*) and a slight but significant enhanced expression of *Nr1h3* (encoding LXR  $\alpha$ ), only in HFHS $veh$  females (Table 2). The intake of cholesterol from the HFHS diet is known to induce a negative feedback regulatory mechanism on *de novo* cholesterol synthesis which is consistent with the reduced expression of *Srebf2* and *Hmgcr* observed in HFHS $veh$  mice.

Another important regulatory pathway of the hepatic cholesterol balance relies on its conversion to bile acids. Although the DAVID analyses did not identify significant KEGG pathways related to bile acid synthesis, it is important to note that *Cyp7a1*, which encodes the rate limiting enzyme of the classic pathway of bile acid synthesis, had its expression markedly up-regulated both in ST $pol$  and HFHS $veh$  (Table 2; Fig. 3), indicative of an increased efflux of cholesterol directed toward the bile salt excretion. There was also an enhancement of the expression of *Nr1h4* (encoding Farnesoid X receptor) and a down-regulation of *Fgfr4* (encoding Fibroblast growth factor receptor 4) with both challenges (Table 2).

### **Fatty acid metabolism**

The list of genes related to the fatty acid metabolism pathway (Fig. 2) was implemented according to both systematic PubMed search and previously identified hepatic PPAR $\alpha$ -regulated genes (21). The main feature is a down-regulation, by both conditions, of the key genes related to the *de novo* fatty acid synthesis including *Acly* (encoding fatty acid synthesis ATP citrate lyase) and *Fasn* (encoding Fatty acid synthase) (Table 3). In contrast, several genes related to lipid droplet deposition such as *Plin4* (encoding Perilipin 4), *Cidec* (encoding cell death-inducing DFFA-like effector c, involved in lipid sequestration, which



overexpression promotes lipid accumulation in liver (22)), *Fitm2* (encoding fat storage-inducing transmembrane protein 2) were up-regulated in the liver only upon exposure to pollutants (Table 3), in line with the observed increased in hepatic triglycerides for *STpol* females (Fig. 1G). Notwithstanding, other genes encoding enzymes implicated in triglyceride synthesis were up-regulated only in response to HFHS diet, such as *Dgat2* (encoding the diacylglycerol O-acyltransferase 2), while *Lpin1* encoding a regulator of lipid metabolism was down-regulated in *HFHSveh* and induced in *STpol* (Table 3).

Genes related to fatty acid oxidation and lipid catabolism displayed both similarities and noticeable differences between the 2 groups. The expression of *Nr1c1* encoding PPAR $\alpha$  (one of the key transcriptional regulator of lipid oxidation genes (23)) and *Esrra* (encoding estrogen related receptor alpha, also known to regulate key beta-oxidation genes (24)), were both up-regulated in *HFHSveh*. *Esrra* expression was also enhanced in *STpol* when *Nr1c1* expression was not changed (Tables 1 and 3). In line with these results, several genes encoding enzymes involved in  $\beta$ -oxidation, either in peroxisome, such as the acetyl-Coenzyme A acyltransferases (*Acaal1a* and *Acaal1b*) or in mitochondria, such as some acyl-Coenzyme A dehydrogenases (*Acadm* and *Acad11*), were up-regulated in both conditions. However, pollutant exposure was specifically associated with an induction of the expression of genes encoding the carnitine palmitoyltransferase isoforms CPT1 $\alpha$  and CPT1 $\beta$ , the mitochondrial carnitine/acylcarnitine translocase (*Slc25a20*), the acyl-Coenzyme A oxidase 1 (*Acox1*), which is the first enzyme of the fatty acid beta-oxidation pathway, or two enoyl-Coenzyme A delta isomerases (*Eci2* and *Eci3*). It was also associated with an inhibition of the expression of *Crot* encoding the carnitine O-octanoyltransferase. Neither of these modifications was observed in the liver of *HFHSveh* mice (Table 3). Finally, also pointing out different regulatory mechanisms involved in the lipid metabolic adaptations to the 2 different dietary challenges, the gene expression of several key regulators of lipid metabolism was affected only in *HFHSveh* mice. These included *Nr1c3* (Peroxisome proliferator activated receptor gamma), *Pdk4* (pyruvate dehydrogenase kinase 4) and genes encoding fatty acid binding proteins (*Fabp2*, *Fabp7*) or trans-membrane transporter (*Cd36*) (Table 3).

Among other genes related to lipid metabolism, it should be noted that several genes involved in the lipoprotein metabolism, including *Lipc* (hepatic lipase) and *Gpihbp1* (that code for key regulators of circulating triglyceride hydrolysis) were down-regulated only in *STpol*. In contrast, *Vldlr* (very low density lipoprotein receptor) and *Lrp3* (low density lipoprotein receptor-related protein 3) were up-regulated only in HFHS-fed mice (Table 3).

Some genes induced by fasting such as *Angptl4* (angiopoietin-like 4) and *Mfsd2a* (major facilitator superfamily domain containing 2A) were also considered. Indeed, mice deleted for *Mfsd2a* exhibit decreased hepatic triglycerides and enhanced expression of hepatic *Fasn* (25), a situation that is opposite to *STpol* females which exhibited increased hepatic expression levels of *Mfsd2a*, reduced levels of *Fasn* and a doubling of hepatic triglyceride level. Finally, we spotted the prostaglandin D2 synthase (*Ptgds*), which has previously been identified as a dioxin target gene in gonads (26) (Table 3).

### **The Circadian clock metabolic pathway**

A list of genes encompassing the main core clock genes and several of their well-known regulators was generated, combining genes belonging to the KEGG pathway mmu04710 with genes described as member of the circadian clock system (27) (Table 4). Interestingly, the pollutant-induced alterations in the gene expression levels of the major canonical clock genes including *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Rorc*, *Arntl1* (encoding BMAL1) and *Clock*, were highly significant, even after Benjamini–Hochberg adjustment. Specifically, both CLOCK and BMAL1 encoding genes had their mRNA expression significantly down-regulated in the liver of *STpol* females whereas PER (*Per1*, *Per2*, *Per3*) and CRY2 (*Cry2*) encoding genes had their expression significantly up-regulated (Table 4). This is consistent with CRY and PER being negative elements of the CLOCK-BMAL1 heterodimer. CHRONO (encoded by *Ciart*) which is a recently described member of the circadian clock component (28) also participates to the negative circadian feedback loop like CRY2. Interestingly and similar to *Cry2*, the expression level of *Ciart* was strongly induced in *STpol* females. *Nr1d1* (encoding Rev-ERB $\alpha$ ) is also a member of the core clock system (29) and its expression is down-regulated by pollutants (Table 4). In addition to the core clock genes, the mRNA expression level of a number of their important regulators was also altered upon exposure to pollutants (Table 4). For instance, in the liver of *STpol* mice, there was a marked induction of the expression of *Usp2* (encoding the Ubiquitin specific peptidase 2, which deubiquitinates core clock components) (30) and a strong down-regulation of the expression of *Id2* (encoding the ID2 HLH transcriptional repressor and known to interact with the regulation of CLOCK and BMAL1) (31).

Consistently with the literature (32), the expression of the core clock genes was also changed in HFHS*veh*. Specifically, it is important to note that the exposure to either pollutants

or HFHS diet promoted similar modifications in the liver, except for *Per1* and *Cry2* genes that were up-regulated in *STpol* and not affected in *HFHSveh* mice (Table 4). Other differences in response to the 2 diet challenges were observed with known regulators of the core clock genes such as *Sik1*, *Adora1* and *Nr1d1*, only induced by pollutant exposure and *Atf4* down-regulated in HFHS-fed mice but not in *STpol* mice (Table 4).

### **Other important genes involved in metabolic pathways**

In addition to the genes related to the main pathways identified (Fig. 2), a manual analysis of the lists of regulated genes pointed out a set of genes related to insulin signaling and gluconeogenesis, important pathways classically altered in situation of metabolic disorders (33, 34). Regarding insulin signaling, the genes encoding the insulin receptor, its two main intracellular substrates (IRS1 and IRS2) and the p85 alpha subunit of phosphatidylinositol 3-kinase were all affected in the liver of mice exposed to pollutants (Table 5). The expression of genes encoding important negative regulators of insulin signaling (*Pten* and *Sik1*) were up-regulated in the *STpol* group. Down-regulation of *Irs2* and up-regulation of *Pik3r1* were also observed in the liver of the *HFHSveh* mice.

An increased expression of *Vnn1* (encoding Vanin1) (35) and a reduced expression of *Grb14* (encoding the growth factor receptor bound protein 14, which expression levels correlate with insulin resistance and liver TG homeostasis) (36) has been reported in the liver of obese and insulin resistant mice. Interestingly, a significant doubling of the expression of *Vnn1* and a 30% decrease of the expression of *Grb14* were observed with both diet challenges. In addition, the gene expression of other known regulators of insulin signaling, such as mitofusin 2 and tribbles homolog 3, were specifically modified upon HFHS diet (Table 5). This suggests that insulin action was likely perturbed in the liver of the 2 groups of animals, but that different overlapping mechanisms were involved.

Another interesting observation was the induction, specifically in the pollutant-exposed group, of *Pck1* and *Slc37a4* (Table 5) that encode key enzymes of the gluconeogenesis (phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucose-6-phosphate transporter, respectively), and also of *Cebpb*, encoding the transcription factor CCAAT/enhancer binding protein beta, a well-known regulator of the gluconeogenesis pathway (37). Although, we did not herein found any modification of the glycaemia or any measurable defect of glucose

tolerance in the exposed females (Figure 1B and 1I), these data on gene expression suggest that this pathway might be directly targeted by pollutants.

### **Validation of gene expression by RT-qPCR**

To support and extend the microarray data, real-time PCR was performed on some representative genes belonging to the different groups discussed above (Fig. 3). For some of them, a real-time PCR was also performed using samples from the liver of male sibling mice (Suppl. Data 2). Indeed, in mice fed a standard diet, pollutant-exposed females but not pollutant-exposed males had a significant decreased expression of *Cyp1a2*, *Sqle* and *Cyp51*. This sex-dependency was not observed in mice fed a HFHS diet where the expression of these genes was significantly decreased in both male and female livers (Fig.3 and Suppl. Data 2).

### **DISCUSSION**

In this study, we characterized global changes in hepatic gene expression induced by lifelong exposure to a mixture of pollutants in female mice fed a standard diet, along with sex-specific metabolic disturbances and compared this signature to the transcriptomic changes provoked by a high-fat high-sucrose diet in the absence of pollutant. Our data highlight 4 main pathways that were clearly targeted by both treatments: xenobiotic/drug metabolism, steroid/cholesterol metabolism, fatty acid/lipid metabolism and the circadian clock. Importantly, these pathways appeared to be affected by different, but overlapping mechanisms along with the treatment considered. Changes in gene expression levels may explain the subtle modifications in lipid homeostasis observed in females upon exposure to the pollutants. This result has important repercussions for our understanding of the combined deleterious effects of pollutants observed in situations of hypercaloric diet and obesity (7, 8, 14, 15). Furthermore, the discovery that a low-dose mixture of pollutants can markedly alter the circadian clock in the liver of the exposed animals provides a novel mechanism to explain the *in vivo* metabolic impacts of the chemicals.

Intending to approach a realistic scenario, the mixture of pollutants was made of low-dose chemicals in the range of the tolerable daily intake (TDI) doses defined by international agencies for humans (38). In addition, the chemicals included in the mixture are prototypes of widespread and persistent (TCDD, PCB153) or short-lived (BPA, DEHP)

pollutants. Specifically, dioxins and PCBs are lipophilic and even though their production is limited (dioxins) or banned (PCBs), they still biomagnified up the food chain; bisphenols and phthalates are found in daily consumables and can leach from food and beverage containers and packaging to cause contamination. Moreover, these chemicals have previously been reported as having estrogeno-mimetic activities and being of high concern for human health because of their links with metabolic diseases in epidemiological and experimental studies (1, 4, 10, 39). Thus, and although we did not monitor the impact of each chemical individually (impeding the demonstration of additive or synergistic effects between the chemicals of the mixture), our data provide strong evidence that low-dose pollutants when consumed in mixture all lifelong could markedly affect liver metabolism.

The protocol used herein was adapted from the previously described mouse model of lifelong exposure (9) with mice fed a standard diet containing the mixture of pollutants instead of a HFHS diet. Of note, in neither situation was body weight modified by pollutant exposure. Furthermore, the consumption of the pollutants added to a standard diet did not provoke the same metabolic defects than those observed when the mice were fed a HFHS diet (9). However, there was also a marked sex-dependency as it was previously the case in the presence of HFHS diet (9). This indicated that the low-dose mixture of pollutants used herein may potentially exert some selective effects on the estrogen pathway as it was suspected in our previous study (12). However, in the context of a standard diet, we did not find any modification of the hepatic estrogen signaling coupled to deterioration of glucose intolerance (not shown) as previously observed under HFHS diet (9). In contrast to the strong metabolic modifications induced by pollutants in an obesity context, we found herein more subtle alterations of lipid homeostasis. Specifically, there was a trend for enhanced TG levels in plasma and its significant doubling in liver; no change in cholesterol levels in the liver but a significant decrease of CEs in plasma. These changes were not detected in males born from the same dams fuelling the concept of a sex-dependency of the pollutant-induced effects. These modifications occurred in the absence of any change in glucose tolerance and fasting glycaemia or of any substantial significant alterations of insulin sensitivity. Despite this, several genes related to insulin signaling and glucose homeostasis exhibited a significant altered expression upon pollutant exposure. They included genes encoding the Insulin Receptor, its two main intracellular substrates (IRS1 and IRS2), the p85 alpha subunit of phosphatidylinositol 3-kinase, important negative regulators of insulin signaling (PTEN, SIK, GRB14) (36, 40, 41), but also *Pepck* encoding the rate-limiting enzyme of gluconeogenesis

and *Cebpb* encoding C/EBP $\beta$  its transcriptional regulator (37). These findings suggest that insulin signaling and glucose homeostasis might be directly targeted by pollutants. However, the mechanisms involved certainly differ from those induced with a HFHS diet because the set of genes targeted by both challenges did not fully overlap.

Nuclear receptors are the gatekeepers of the normal function of the liver and our data support the implication of at least CAR and PPAR $\alpha$  in the response to pollutant exposure. Interestingly, xenosensors well illustrate how xenobiotic metabolism and energy homeostasis are interrelated in that, on the one hand they bind with low-affinity to endobiotics (i.e., free fatty acids, eicosanoids, steroids) to regulate nutrient homeostasis between the fed and fasting states and, on the other hand, they can recognize some xenobiotics and drugs to metabolize them and promote their clearance through the regulation of phase I, II and III xenobiotic metabolizing genes (1, 42). The fact that there were few differences between both treatments (i.e. pollutant exposure and HFHS diet) regarding the list of genes related to the drug metabolizing pathway is consistent with the hypothesis that the chronic exposure to the mixture of low dosed pollutants resulted more in a metabolic disruption than in a toxicological response.

A number of genes involved in fatty acid oxidation were up-regulated in the liver of pollutant-exposed female mice which would globally indicate an activation of PPAR $\alpha$  even though its mRNA level did not change. Indeed, activation of PPAR $\alpha$  is normally related to an enhanced lipid clearance in the liver. Furthermore, *Esrra*, encoding a potent regulator of beta-oxidation genes (24), could as well be implicated. Its expression level was enhanced upon pollutant exposure and it was shown that BPA could modulate its expression and activity (43). However, mechanisms initiated upon pollutant exposure differ from those induced by the HFHS diet because *Nr1c1* (*Ppara*) mRNA expression level was significantly increased in HFHS $veh$  female livers and also because there were differences in the list of genes related to fatty acid oxidation between the treatments. Apart from fatty acid oxidation, genes related to fatty acid and triglyceride synthesis and to lipid droplet accumulation were markedly affected by pollutant exposure and, as expected, by HFHS feeding. Again, differences were observed in the specific gene lists, pointing distinct but partly overlapping mechanisms. For example, several genes related to lipid droplet deposition (*Lpin1*, *Cidec*, *Fitm2*) were up-regulated only upon exposure to pollutants, which is consistent with the observed doubling in hepatic TG measured in the liver of ST $pol$  female. More studies will aim at better defining the role of these genes in the cascade of events from pollutant exposure to the metabolic phenotype

observed. The transcription factors that may orchestrate the regulation of these genes remain also to be identified.

Another interesting result is related to cholesterol metabolism. Comparing the genes the most robustly induced by both treatments (ie, pollutant exposure and HFHS feeding), several genes commonly regulated were related to cholesterol biosynthesis, indicating that this pathway constitutes a strong common target, although the sets of altered genes were not fully identical. Regarding the *de novo* cholesterol biosynthetic pathway, it was remarkable that most key genes from this pathway were significantly down-regulated with both treatments, with one notable exception concerning *Hmgcr*, encoding the rate-controlling enzyme, which was down-regulated only in HFHS. In addition, the expression level of *Cyp7a1* was significantly increased with both treatments suggesting higher conversion into bile acids than in *STveh* female mice. These data are consistent with the reduction in circulating cholesteryl ester and total cholesterol observed in female mice exposed to pollutants. For *HFHSveh*, the intake of cholesterol from the diet probably stimulated the classical negative feedback regulation involving reduction in the expression of *Srebf2*, *Insig1 and 2*, *Scap* and several cholesterol transporters. However, the mechanisms leading to the inhibition of the cholesterol biosynthesis pathway upon pollutant exposure might be different. A comprehensive search of response elements present in the promoter of the down-regulated genes but not in *Hmgcr* may help at defining which transcriptional factor(s) could convey the inhibition of expression. Alternatively effects observed on this pathway might be the consequence of a strong deregulation of the circadian clock induced by pollutant exposure. Indeed, several studies pointed out the impact of the circadian clock on cholesterol and bile acid homeostasis (44, 45).

As a matter of fact, another new finding of the present study is the observation that lifelong exposure to a low-dose cocktail of pollutants impacts the clock genes in the liver of female mice. Circadian rhythms are generated by feedback loops in core clock gene expression. In mammals, the two helix-loop-helix transcription factors CLOCK and BMAL1 heterodimerize and drive the expression of downstream target genes among which are the *Per* (period) and *Cry* (cryptochrome) genes. Once PER and CRY proteins have reached a critical concentration, they attenuate the CLOCK/BMAL1-mediated activation of their own genes in a negative feedback loop (29). A number of studies have identified large lists of genes directly depending on the Clock genes and exhibiting rhythmic expression in the liver and other tissues (32, 46). Among these genes, many of them are related to the xenobiotic metabolism

as well as to lipid and steroid metabolisms that were found altered in response to pollutant exposure in the present study. These original findings confirm and extend prior studies describing the effects of pollutants and chemicals on several members of the circadian clock, such as dioxin (47) or DEHP (48) in rodent models. BPA was also shown to alter the circadian rhythmic pathway-associated genes, including *Clock*, in a fish model (49). It remains to be elucidated in future studies if the pollutant-induced changes observed herein in the mRNA expression of genes related to the xenobiotic metabolism as well as to lipid and steroid metabolisms may be downstream consequences of the regulation of the circadian clock. Notwithstanding, this study is the first report of a coordinated regulation of the main core clock genes in the liver of female mice exposed to a mixture of low-dose pollutants.

To conclude, we herein confirmed and extended our previous findings (9, 12), that demonstrated a metabolic impact of a lifelong exposure to a mixture of low-dosed food pollutants in a mouse model, in the absence of toxicological and obesogenic effects. Characterization of the sex-dependency and definition of the potential role of the adipose tissue in the hepatic TG accumulation in pollutant-exposed females will await further studies. Worthy of note, the present study originally gave a special emphasis on circadian clock as a critical target of pollutant exposure in the liver of female mice. Its alterations could be responsible for the modifications observed in the expression of genes related to xenobiotic, steroid and fatty acid metabolisms. It also clearly shows that pollutants and HFHS diet affect common metabolic pathways, but by different, albeit overlapping, mechanisms. This is highly relevant for understanding the synergistic effects between pollutants and the obesogenic diet reported in literature.



## References

1. Casals-Casas, C., and Desvergne, B. (2011) Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annual review of physiology* **73**, 135-162
2. Lee, D. H., Porta, M., Jacobs, D. R., Jr., and Vandenberg, L. N. (2014) Chlorinated persistent organic pollutants, obesity, and type 2 diabetes. *Endocrine reviews* **35**, 557-601
3. WHO (2016) World Health Organization, Diabetes, Fact sheet 312.  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>
4. Gore, A. C., Chappell, V. A., Fenton, S. E., Flaws, J. A., Nadal, A., Prins, G. S., Toppari, J., and Zoeller, R. T. (2015) EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocrine reviews* **36**, E1-E150
5. Baillie-Hamilton, P. F. (2002) Chemical toxins: a hypothesis to explain the global obesity epidemic. *J Altern Complement Med* **8**, 185-192
6. Grun, F., and Blumberg, B. (2009) Minireview: the case for obesogens. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* **23**, 1127-1134
7. Ruzzin, J., Petersen, R., Meugnier, E., Madsen, L., Lock, E. J., Lillefosse, H., Ma, T., Pesenti, S., Sonne, S. B., Marstrand, T. T., Malde, M. K., Du, Z. Y., Chavey, C., Fajas, L., Lundebye, A. K., Brand, C. L., Vidal, H., Kristiansen, K., and Froyland, L. (2010) Persistent organic pollutant exposure leads to insulin resistance syndrome. *Environmental health perspectives* **118**, 465-471
8. Ibrahim, M. M., Fjaere, E., Lock, E. J., Naville, D., Amlund, H., Meugnier, E., Le Magueresse Battistoni, B., Froyland, L., Madsen, L., Jessen, N., Lund, S., Vidal, H., and Ruzzin, J. (2011) Chronic consumption of farmed salmon containing persistent organic pollutants causes insulin resistance and obesity in mice. *PLoS one* **6**, e25170
9. Naville, D., Pinteur, C., Vega, N., Menade, Y., Vigier, M., Le Bourdais, A., Labaronne, E., Debard, C., Luquain-Costaz, C., Begeot, M., Vidal, H., and Le Magueresse-Battistoni, B. (2013) Low-dose food contaminants trigger sex-specific, hepatic metabolic changes in the progeny of obese mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **27**, 3860-3870
10. Le Magueresse-Battistoni, B., Vidal, H., and Naville, D. (2015) Lifelong consumption of low-dosed food pollutants and metabolic health. *Journal of epidemiology and community health* **69**, 512-515
11. Le Magueresse-Battistoni, B., Vidal, H., and Naville, D. (2016) [Impact of in utero exposure to pollutants on metabolic health in adults]. *Medecine sciences : M/S* **32**, 51-56
12. Naville, D., Labaronne, E., Vega, N., Pinteur, C., Canet-Soulas, E., Vidal, H., and Le Magueresse-Battistoni, B. (2015) Metabolic outcome of female mice exposed to a mixture of low-dose pollutants in a diet-induced obesity model. *PLoS one* **10**, e0124015
13. Gauthier, M. S., Rabasa-Lhoret, R., Prud'homme, D., Karelis, A. D., Geng, D., van Bavel, B., and Ruzzin, J. (2014) The metabolically healthy but obese phenotype is associated with lower plasma levels of persistent organic pollutants as compared to the metabolically abnormal obese phenotype. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **99**, E1061-1066
14. Wahlang, B., Falkner, K. C., Gregory, B., Ansert, D., Young, D., Conklin, D. J., Bhatnagar, A., McClain, C. J., and Cave, M. (2013) Polychlorinated biphenyl 153 is a diet-dependent obesogen that worsens nonalcoholic fatty liver disease in male C57BL6/J mice. *The Journal of nutritional biochemistry* **24**, 1587-1595
15. Wei, J., Sun, X., Chen, Y., Li, Y., Song, L., Zhou, Z., Xu, B., Lin, Y., and Xu, S. (2014) Perinatal exposure to bisphenol A exacerbates nonalcoholic steatohepatitis-like phenotype in male rat offspring fed on a high-fat diet. *The Journal of endocrinology* **222**, 313-325
16. Gout, J., Sarafian, D., Mutel, E., Vigier, M., Rajas, F., Mithieux, G., Begeot, M., and Naville, D. (2010) Metabolic and melanocortin gene expression alterations in male offspring of obese mice. *Molecular and cellular endocrinology* **319**, 99-108

17. Wettenhall, J. M., and Smyth, G. K. (2004) limmaGUI: a graphical user interface for linear modeling of microarray data. *Bioinformatics* **20**, 3705-3706
18. Naville, D., Rebourcet, D., Chauvin, M. A., Vega, N., Jalabert, A., Vigier, M., Loizon, E., Begeot, M., and Le Magueresse-Battistoni, B. (2011) Direct and indirect impact of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on adult mouse Leydig cells: an in vitro study. *Toxicology letters* **207**, 251-257
19. Cui, J. Y., and Klaassen, C. D. (2016) RNA-Seq reveals common and unique PXR- and CAR-target gene signatures in the mouse liver transcriptome. *Biochimica et biophysica acta*
20. Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (2015) A century of cholesterol and coronaries: from plaques to genes to statins. *Cell* **161**, 161-172
21. Montagner, A., Polizzi, A., Fouche, E., Ducheix, S., Lippi, Y., Lasserre, F., Barquissau, V., Regnier, M., Lukowicz, C., Benhamed, F., Iroz, A., Bertrand-Michel, J., Al Saati, T., Cano, P., Mselli-Lakhal, L., Mithieux, G., Rajas, F., Lagarrigue, S., Pineau, T., Loiseau, N., Postic, C., Langin, D., Wahli, W., and Guillou, H. (2016) Liver PPARalpha is crucial for whole-body fatty acid homeostasis and is protective against NAFLD. *Gut* **65**, 1202-1214
22. Langhi, C., and Baldan, A. (2015) CIDEF/FSP27 is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and plays a critical role in fasting- and diet-induced hepatosteatosis. *Hepatology (Baltimore, Md)* **61**, 1227-1238
23. Pawlak, M., Lefebvre, P., and Staels, B. (2015) Molecular mechanism of PPARalpha action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology* **62**, 720-733
24. Luo, J., Sladek, R., Carrier, J., Bader, J. A., Richard, D., and Giguere, V. (2003) Reduced fat mass in mice lacking orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha. *Molecular and cellular biology* **23**, 7947-7956
25. Berger, J. H., Charron, M. J., and Silver, D. L. (2012) Major facilitator superfamily domain-containing protein 2a (MFSD2A) has roles in body growth, motor function, and lipid metabolism. *PLoS one* **7**, e50629
26. Magre, S., Rebourcet, D., Ishaq, M., Wagnier, R., Debard, C., Meugnier, E., Vidal, H., Cohen-Tannoudji, J., and Le Magueresse-Battistoni, B. (2012) Gender differences in transcriptional signature of developing rat testes and ovaries following embryonic exposure to 2,3,7,8-TCDD. *PLoS one* **7**, e40306
27. Wang, Y., Viscarra, J., Kim, S. J., and Sul, H. S. (2015) Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology* **16**, 678-689
28. Goriki, A., Hatanaka, F., Myung, J., Kim, J. K., Yoritaka, T., Tanoue, S., Abe, T., Kiyonari, H., Fujimoto, K., Kato, Y., Todo, T., Matsubara, A., Forger, D., and Takumi, T. (2014) A novel protein, CHRONO, functions as a core component of the mammalian circadian clock. *PLoS biology* **12**, e1001839
29. Kojetin, D. J., and Burris, T. P. (2014) REV-ERB and ROR nuclear receptors as drug targets. *Nature reviews. Drug discovery* **13**, 197-216
30. Tong, X., Buelow, K., Guha, A., Rausch, R., and Yin, L. (2012) USP2a protein deubiquitinates and stabilizes the circadian protein CRY1 in response to inflammatory signals. *The Journal of biological chemistry* **287**, 25280-25291
31. Ward, S. M., Fernando, S. J., Hou, T. Y., and Duffield, G. E. (2010) The transcriptional repressor ID2 can interact with the canonical clock components CLOCK and BMAL1 and mediate inhibitory effects on mPer1 expression. *The Journal of biological chemistry* **285**, 38987-39000
32. Tahara, Y., and Shibata, S. (2016) Circadian rhythms of liver physiology and disease: experimental and clinical evidence. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* **13**, 217-226
33. Taniguchi, C. M., Emanuelli, B., and Kahn, C. R. (2006) Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nature reviews. Molecular cell biology* **7**, 85-96

34. Home, P. D., and Pacini, G. (2008) Hepatic dysfunction and insulin insensitivity in type 2 diabetes mellitus: a critical target for insulin-sensitizing agents. *Diabetes, obesity & metabolism* **10**, 699-718
35. Rakhshandehroo, M., Knoch, B., Muller, M., and Kersten, S. (2010) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *PPAR research* **2010**
36. Popineau, L., Morzyglod, L., Carre, N., Cauzac, M., Bossard, P., Prip-Buus, C., Lenoir, V., Ragazzon, B., Fauveau, V., Robert, L., Guilmeau, S., Postic, C., Komatsu, M., Canonne-Hergaux, F., Guillou, H., and Burnol, A. F. (2016) A novel Grb14-mediated cross-talk between insulin and p62/Nrf2 pathways regulates liver lipogenesis and selective insulin resistance. *Molecular and cellular biology*
37. Arizmendi, C., Liu, S., Croniger, C., Poli, V., and Friedman, J. E. (1999) The transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein beta regulates gluconeogenesis and phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription during diabetes. *The Journal of biological chemistry* **274**, 13033-13040
38. Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs, D. R., Jr., Lee, D. H., Shioda, T., Soto, A. M., vom Saal, F. S., Welshons, W. V., Zoeller, R. T., and Myers, J. P. (2012) Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocrine reviews* **33**, 378-455
39. Alonso-Magdalena, P., Quesada, I., and Nadal, A. (2011) Endocrine disruptors in the etiology of type 2 diabetes mellitus. *Nature reviews. Endocrinology* **7**, 346-353
40. Guo, S. (2014) Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. *The Journal of endocrinology* **220**, T1-T23
41. Nixon, M., Stewart-Fitzgibbon, R., Fu, J., Akhmedov, D., Rajendran, K., Mendoza-Rodriguez, M. G., Rivera-Molina, Y. A., Gibson, M., Berglund, E. D., Justice, N. J., and Berdeaux, R. (2016) Skeletal muscle salt inducible kinase 1 promotes insulin resistance in obesity. *Molecular metabolism* **5**, 34-46
42. Cave, M. C., Clair, H. B., Hardesty, J. E., Falkner, K. C., Feng, W., Clark, B. J., Sidey, J., Shi, H., Aqel, B. A., McClain, C. J., and Prough, R. A. (2016) Nuclear receptors and nonalcoholic fatty liver disease. *Biochimica et biophysica acta*
43. Cipelli, R., Harries, L., Okuda, K., Yoshihara, S., Melzer, D., and Galloway, T. (2014) Bisphenol A modulates the metabolic regulator oestrogen-related receptor-alpha in T-cells. *Reproduction* **147**, 419-426
44. Le Martelot, G., Claudel, T., Gatfield, D., Schaad, O., Kornmann, B., Lo Sasso, G., Moschetta, A., and Schibler, U. (2009) REV-ERBalpha participates in circadian SREBP signaling and bile acid homeostasis. *PLoS biology* **7**, e1000181
45. Ma, D., Liu, T., Chang, L., Rui, C., Xiao, Y., Li, S., Hogenesch, J. B., Chen, Y. E., and Lin, J. D. (2015) The Liver Clock Controls Cholesterol Homeostasis through Trib1 Protein-mediated Regulation of PCSK9/Low Density Lipoprotein Receptor (LDLR) Axis. *The Journal of biological chemistry* **290**, 31003-31012
46. Eckel-Mahan, K. L., Patel, V. R., de Mateo, S., Orozco-Solis, R., Ceglia, N. J., Sahar, S., Dilag-Penilla, S. A., Dyar, K. A., Baldi, P., and Sassone-Corsi, P. (2013) Reprogramming of the circadian clock by nutritional challenge. *Cell* **155**, 1464-1478
47. Wang, C., Zhang, Z. M., Xu, C. X., and Tischkau, S. A. (2014) Interplay between Dioxin-mediated signaling and circadian clock: a possible determinant in metabolic homeostasis. *International journal of molecular sciences* **15**, 11700-11712
48. Currie, R. A., Bombail, V., Oliver, J. D., Moore, D. J., Lim, F. L., Gwilliam, V., Kimber, I., Chipman, K., Moggs, J. G., and Orphanides, G. (2005) Gene ontology mapping as an unbiased method for identifying molecular pathways and processes affected by toxicant exposure: application to acute effects caused by the rodent non-genotoxic carcinogen diethylhexylphthalate. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **86**, 453-469

49. Rhee, J. S., Kim, B. M., Lee, B. Y., Hwang, U. K., Lee, Y. S., and Lee, J. S. (2014) Cloning of circadian rhythmic pathway genes and perturbation of oscillation patterns in endocrine disrupting chemicals (EDCs)-exposed mangrove killifish *Kryptolebias marmoratus*. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP* **164**, 11-20

### **Author Contributions**

BLMB and DN conceived the project and experimental design. EL, CP, NV, SP, BJ, DN and BLMB performed the experiments and BLMB, EL, EMF, HV, DN analyzed the data. BLMB, DN and HV wrote the paper. All authors discussed the results and commented on the manuscript.

### **Acknowledgments**

We gratefully acknowledge Emmanuelle Loizon for technical help with PCR primers and Patrick Manas for animal care.

This research project was supported by INSERM to InsermU1060. Emmanuel Labaronne is a recipient of “Région Rhône-Alpes”, France. Benoit Julien is supported by a research fellowship from the French “Ministère de l’Education Nationale, de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche”. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

### **Conflict of interest**

The authors have declared that no competing interests exist.

## Legends

**Figure 1:** (A) Body weight recorded from weaning in female mice fed standard diet plus vehicle or the mixture of pollutants (*STveh* or *STpol*, respectively). Solid lines correspond to *STveh* and dotted lines to *STpol* mice. Results are expressed as means  $\pm$  SEM;  $n \geq 10$  for each point. (B) Blood glucose and plasma insulin (C), FFA (D), triglycerides (E) and cholesterol levels (F) measured in the liver of 12 wk-old female mice. Results are means  $\pm$  SEM;  $n \geq 5$  \* $P < 0.05$  vs *STveh*. (G) Triglycerides (TG) and (H) total cholesterol level measured in liver of 12 wk-old female mice. Results are means  $\pm$  SEM;  $n = 5$ . \* $P < 0.05$  vs *STveh*. (I) Glucose Tolerance Test and (J) Insulin Sensitivity Test performed on 11 wk-old female mice. AUCs were calculated from each corresponding curve. Results are expressed as means  $\pm$  SEM;  $n \geq 6$  at each point.

**Figure 2:** Venn diagram from differentially expressed annotated genes in response to pollutants (*STpol*) and to high-fat (*HFHSveh*). KEGG pathway analyses were performed using *STpol* annotated genes (red), *HFHSveh* annotated genes (green) or common annotated genes (blue) according to the  $p$ -value (first numbers and arrows with solid lines) or to the adjusted  $p$ -value (numbers in brackets and dotted arrows).

**Figure 3:** Real-time PCR for genes belonging to the Drug related pathway (A), the Sterol related pathway (B), the Fatty acid and PPAR signaling pathways (C) and the Circadian rhythm (D). Results are expressed as means  $\pm$  SEM;  $n \geq 3$ .

Type of gene regulation	STPol vs STveh	HFHSveh vs STveh
<i>Phase-I cytochromes P450 xenobiotic-metabolizing enzymes</i>		
up-regulation by both treatments	<b>Cyp2a4</b> (1.39); <b>Cyp4a14</b> (2.06), <b>Cyp4a31</b> (1.81), <b>Cyp4a10</b> (1.82), <b>Fmo2</b> (1.82); <b>Aldh3a2</b> (1.58), <b>Fmo5</b> (1.39), <b>Ephx2</b> (1.39), <b>Akr1c14</b> (1.22); <b>Por</b> (1.82)	<b>Cyp2a4</b> (1.33); <b>Cyp4a14</b> (1.76), <b>Cyp4a31</b> (1.70), <b>Cyp4a10</b> (1.69); <b>Fmo2</b> (1.55), <b>Aldh3a2</b> (1.64), <b>Fmo5</b> (1.51), <b>Ephx2</b> (1.40), <b>Akr1c14</b> (1.34); <b>Por</b> (1.45)
down-regulation by both treatments	<b>Cyp1a2</b> (0.79); <b>Cyp2c29</b> (0.80), <b>Cyp2r1</b> (0.73), <b>Cyp2c54</b> (0.82); <b>Aox3</b> (0.77)	<b>Cyp1a2</b> (0.55); <b>Cyp2c29</b> (0.80), <b>Cyp2r1</b> (0.69), <b>Cyp2c54</b> (0.59); <b>Aox3</b> (0.81)
inverse regulation depending on treatments	<b>Cyp2u1</b> (1.26)	<b>Cyp2u1</b> (0.77)
regulation only by either one of the treatment	<b>Cyp2j5</b> (0.759), <b>Cyp2c68</b> (0.687), <b>Cyp2c67</b> (0.654), <b>Cyp2c70</b> (0.538); <b>Cyp4a32</b> (1.74), <b>Cyp4af14</b> (0.54); <b>Fmo3</b> (2.19), <b>Ephx1</b> (1.22), <b>Nqo2</b> (0.77), <b>Sdr9c7</b> (0.77), <b>Aldhb1</b> (0.74), <b>Ces2e</b> (0.70)	<b>Cyp2a22</b> (2.17), <b>Cyp2d40</b> (1.51), <b>Cyp2c38</b> (1.30), <b>Cyp2c39</b> (0.78), <b>Cyp2c44</b> (0.77), <b>Cyp2c50</b> (0.77), <b>Cyp2c37</b> (0.73), <b>Cyp2g1</b> (0.59), <b>Cyp2j9</b> (0.58); <b>Cyp3a13</b> (1.23); <b>Cyp4a12a</b> (0.54); <b>Cela1</b> (15.87), <b>Aldh1a1</b> (1.34), <b>Esd</b> (1.22), <b>Prdx6</b> (1.25), <b>Suox</b> (1.23), <b>Ces2a</b> (0.63), <b>Ces2c</b> (0.68)
<i>Phase-II metabolizing enzymes</i>		
up-regulation by both treatments	none	
down-regulation by both treatments	<b>Gstm1</b> (0.77), <b>Gstm2</b> (0.70), <b>Gstm3</b> (0.69), <b>Gstm7</b> (0.61), <b>Gstm6</b> (0.58), <b>Gstm4</b> (0.53); <b>Sult5a1</b> (0.64), <b>Sult2a7</b> (0.53)	<b>Gstm1</b> (0.69), <b>Gstm2</b> (0.67), <b>Gstm3</b> (0.59), <b>Gstm7</b> (0.76), <b>Gstm6</b> (0.41), <b>Gstm4</b> (0.664); <b>Sult5a1</b> (0.53), <b>Sult2a7</b> (0.46)
inverse regulation depending on treatments	none	
regulation only by either one of the treatment	<b>Tpmt</b> (0.80); <b>Gstm5</b> (0.76); <b>Sult1b1</b> (0.79); <b>Pgd</b> (0.75), <b>Ggct</b> (0.69)	<b>Gstk1</b> (1.26), <b>Gstp1</b> (0.67), <b>Gstp2</b> (0.68); <b>Sult1c2</b> (1.38), <b>Sult2a3</b> (2.15), <b>Sult3a1</b> (0.34); <b>Ugt3a1</b> (1.38)
<i>Phase-III xenobiotic transporters</i>		
up-regulation by both treatments	<b>Abcb1a</b> (1.70)	<b>Abcb1a</b> (1.53)
down-regulation by both treatments	none	
inverse regulation depending on treatments	none	
regulation only by either one of the treatment	<b>Abcb1b</b> (1.48), <b>Abcc4</b> (1.41), <b>Abcc3</b> (1.36), <b>Abcc6</b> (0.75), <b>Abcb11</b> (0.72)	<b>Abcb9</b> (1.66); <b>Slc47a1</b> (1.28), <b>Slco1b2</b> (1.20)
<i>Xenosensors</i>		
up-regulation by both treatments	<b>Nr1i3</b> (1.43)	<b>Nr1i3</b> (1.21)
down-regulation by both treatments	none	
inverse regulation depending on treatments	none	
regulation only by either one of the treatment	none	<b>Ppara</b> or <b>Nr1c1</b> (1.21)
no regulation	<b>Ahr</b> , <b>Nr1i2</b>	

**Table 1:** Differentially expressed genes linked to the Drug-related pathway. Numbers in brackets refer to the corresponding fold changes.

<i>Type of gene regulation</i>	<i>STpol vs STveh</i>	<i>HFHSveh vs STveh</i>
<b>Cholesterol synthesis</b>		
<i>up-regulation by both treatments</i>	none	
<i>down-regulation by both treatments</i>	<b>Cyb5r3</b> (0.68), <b>Hsd17b7</b> (0.67), <b>Fdft1</b> (0.65), <b>Sc5d</b> (0.56), <b>Pmvk</b> (0.46), <b>Cyp51</b> (0.44), <b>Lss</b> (0.44), <b>Mvk</b> (0.43), <b>Mvd</b> (0.40), <b>Hmgcs1</b> (0.39), <b>Dhcr7</b> (0.39), <b>Nsdhl</b> (0.38), <b>Sqle</b> (0.38), <b>Fdps</b> (0.37), <b>Idi1</b> (0.37)	<b>Cyb5r3</b> (0.69), <b>Hsd17b7</b> (0.47), <b>Fdft1</b> (0.48), <b>Sc5d</b> (0.63), <b>Pmvk</b> (0.35), <b>Cyp51</b> (0.24), <b>Lss</b> (0.36), <b>Mvk</b> (0.42), <b>Mvd</b> (0.26), <b>Hmgcs1</b> (0.27), <b>Dhcr7</b> (0.27), <b>Nsdhl</b> (0.36), <b>Sqle</b> (0.15), <b>Fdps</b> (0.24), <b>Idi1</b> (0.21)
<i>inverse regulation depending on treatments</i>	<b>Ebp</b> (0.79), <b>Acat2</b> (0.52)	<b>Hmgcr</b> (0.56), <b>Sc4mol</b> (0.35)
<i>regulation only by either one of the treatment</i>	none	
<b>Cholesterol regulation and transport</b>		
<i>up-regulation by both treatments</i>	<b>Osbpl5</b> (2.11)	<b>Osbpl5</b> (1.94)
<i>down-regulation by both treatments</i>	<b>Scap</b> (0.74), <b>Soat2</b> (0.68), <b>Sigmar1</b> (0.66), <b>Insig2</b> (0.63), <b>Abca2</b> (0.61), <b>Abca8b</b> (0.60), <b>Insig1</b> (0.60)	<b>Scap</b> (0.76), <b>Soat2</b> (0.83), <b>Sigmar1</b> (0.62), <b>Insig2</b> (0.61), <b>Abca2</b> (0.77), <b>Abca8b</b> (0.60), <b>Insig1</b> (0.50)
<i>inverse regulation depending on treatments</i>	<b>Abca17</b> (1.25)	<b>Abca17</b> (0.69)
<i>regulation only by either one of the treatment</i>	<b>Abca6</b> (1.23), <b>Abca3</b> (0.77); <b>Npc1</b> (1.27) <b>Lipa</b> (0.81)	<b>Scp2</b> (1.27), <b>Nr1h3</b> (1.16), <b>Npc2</b> (0.81), <b>Stard4</b> (0.72), <b>Srebf2</b> (0.64)
<b>Bile salt synthesis, regulation and transport</b>		
<i>up-regulation by both treatments</i>	<b>Cyp7a1</b> (2.14), <b>Nr1h4</b> (1.15)	<b>Cyp7a1</b> (3.84), <b>Nr1h4</b> (1.19)
<i>down-regulation by both treatments</i>	<b>Fgfr4</b> (0.87)	<b>Fgfr4</b> (0.84)
<i>inverse regulation depending on treatments</i>	<b>Cyp39a1</b> (1.37)	<b>Cyp39a1</b> (0.62)
<i>regulation only by either one of the treatment</i>	<b>Abcb11</b> (0.72), <b>Hsd3b7</b> (0.62)	<b>Hsd17b4</b> (1.26), <b>Cyp27a1</b> (0.70)

**Table 2:** Differentially expressed genes linked to the Sterol-related pathway. Numbers in brackets refer to the corresponding fold changes.



Type of gene regulation	STpol vs STveh	HFHSveh vs STveh
<b>Fatty acid and triglyceride synthesis and transport</b>		
up-regulation by both treatments	<b>Plin4</b> (2.44), <b>Acot3</b> (1.96), <b>Acot5</b> (2.44), <b>Acot4</b> (1.87), <b>Acsm3</b> (1.40), <b>Agpat1</b> (1.48), <b>Agpat9</b> (1.66), <b>Lpgat1</b> (1.50), <b>Acot8</b> (1.22)	<b>Plin4</b> (2.15), <b>Acot3</b> (2.14), <b>Acot5</b> (1.86), <b>Acot4</b> (1.55), <b>Acsm3</b> (1.47), <b>Agpat1</b> (1.45), <b>Agpat9</b> (1.37), <b>Lpgat1</b> (1.27), <b>Acot8</b> (1.26)
down-regulation by both treatments	<b>Tecr</b> (0.78), <b>Acly</b> (0.77), <b>Acs15</b> (0.66), <b>Fasn</b> (0.56), <b>Acss2</b> (0.38)	<b>Tecr</b> (0.78), <b>Acly</b> (0.74), <b>Acs15</b> (0.72), <b>Fasn</b> (0.51), <b>Acss2</b> (0.31)
inverse regulation depending on treatments	<b>Lpin1</b> (1.21)	<b>Lpin1</b> (0.58)
regulation only by either one of the treatment	<b>Acot1</b> (2.43), <b>Cidec</b> (2.07), <b>Acot2</b> (1.64), <b>Fitm2</b> (1.62), <b>Slc27a1</b> (1.34), <b>Lpin2</b> (1.29), <b>Slc27a2</b> (1.28), <b>Lpin3</b> (0.82), <b>Acot9</b> (0.82), <b>Acsm1</b> (0.76), <b>Gpat2</b> (0.74)	<b>Mogat1</b> (2.85), <b>Cd36</b> (1.85), <b>Acot11</b> (1.71), <b>Acbd4</b> (1.34), <b>Dgat2</b> (1.30), <b>Agpat6</b> (1.28), <b>Acot13</b> (1.26), <b>Acaca</b> (0.76), <b>Acs14</b> (0.65), <b>Aacs</b> (0.60)
<b>Fatty acid oxidation and lipid catabolism</b>		
up-regulation by both treatments	<b>Acadm</b> (1.43), <b>Acaa1b</b> (1.41), <b>Acaa1a</b> (1.33), <b>Mgll</b> (1.32), <b>Acad11</b> (1.25)	<b>Acadm</b> (1.37), <b>Acaa1b</b> (1.71), <b>Acaa1a</b> (1.30), <b>Mgll</b> (1.34), <b>Acad11</b> (1.22)
down-regulation by both treatments	none	
inverse regulation depending on treatments	<b>Pnpla2</b> (1.22)	<b>Pnpla2</b> (0.80)
regulation only by either one of the treatment	<b>Cpt1b</b> (1.46), <b>Cpt1a</b> (1.32), <b>Eci3</b> (1.29), <b>Slc25a20</b> (1.27), <b>Eci2</b> (1.27), <b>Acox1</b> (1.21), <b>Crot</b> (0.74)	<b>Hao2</b> (2.11), <b>Eci1</b> (1.34), <b>Hadh</b> (1.25), <b>Decr1</b> (1.25)
<b>Other fatty acid metabolism-related genes</b>		
up-regulation by both treatments	<b>Lrp4</b> (1.61), <b>Apoa4</b> (1.57), <b>Esrra</b> (1.41), <b>Apol7a</b> (1.32)	<b>Lrp4</b> (1.39), <b>Apoa4</b> (1.93), <b>Esrra</b> (1.45), <b>Apol7a</b> (1.66)
down-regulation by both treatments	<b>Apom</b> (0.77), <b>Pltp</b> (0.74), <b>Fabp12</b> (0.71), <b>Ptgds</b> (0.66)	<b>Apom</b> (0.75), <b>Pltp</b> (0.74), <b>Fabp12</b> (0.73), <b>Ptgds</b> (0.44)
inverse regulation depending on treatments	<b>Ldlrad3</b> (1.41)	<b>Ldlrad3</b> (0.73)
regulation only by either one of the treatment	<b>Mfsd2a</b> (3.51), <b>Angptl4</b> (1.41), <b>Mia2</b> (1.26), <b>Ppargc1b</b> (1.25), <b>Gpihbp1</b> (0.81), <b>Lipc</b> (0.80)	<b>Fabp2</b> (1.98), <b>Vldlr</b> (1.77), <b>Apol7c</b> (1.63), <b>Fabp7</b> (1.38), <b>Lrp3</b> (1.27), <b>Pparg</b> or <b>Nr1c3</b> (1.24), <b>Apo1d1</b> (0.72), <b>Pdk4</b> (0.54)

**Table 3:** Differentially expressed genes linked to the fatty acid-related pathway. Numbers in brackets refer to the corresponding fold changes.

<i>Type of gene regulation</i>	<i>STpol vs STveh</i>	<i>HFHSveh vs STveh</i>
<b>Core clock</b>		
<i>up-regulation by both treatments</i>	<b>Per2</b> (2.12), <b>Rorc</b> (1.86), <b>Per3</b> (1.64)	<b>Per2</b> (1.89), <b>Rorc</b> (1.53), <b>Per3</b> (1.51)
<i>down-regulation by both treatments</i>	<b>Clock</b> (0.72), <b>Nr1d1</b> (0.54), <b>Arntl</b> (0.42)	<b>Clock</b> (0.83), <b>Nr1d1</b> (0.64), <b>Arntl</b> (0.49)
<i>inverse regulation depending on treatments</i>	<b>none</b>	
<i>regulation only by either one of the treatment</i>	<b>Per1</b> (2.74), <b>Nr1d2</b> (1.37), <b>Cry2</b> (1.36)	<b>none</b>
<b>Clock regulators</b>		
<i>up-regulation by both treatments</i>	<b>Usp2</b> (5.84), <b>Ccrn4l</b> (3.47), <b>Ciart</b> (2.75)	<b>Usp2</b> (3.25), <b>Ccrn4l</b> (2.81), <b>Ciart</b> (1.73)
<i>down-regulation by both treatments</i>	<b>Pml</b> (0.79), <b>Id2</b> (0.44)	<b>Pml</b> (0.77), <b>Id2</b> (0.48)
<i>inverse regulation depending on treatments</i>	<b>none</b>	
<i>regulation only by either one of the treatment</i>	<b>Sik1</b> (2.02), <b>Adora1</b> (1.84), <b>Crem</b> (0.75)	<b>Prox1</b> (1.21), <b>Csnk1e</b> (0.83), <b>Atf4</b> (0.75)

**Table 4:** Differentially expressed genes linked to the Circadian rhythm pathway. Numbers in brackets refer to the corresponding fold changes.

<i>Type of gene regulation</i>	<i>STpol vs STveh</i>	<i>HFHSveh vs STveh</i>
<b><i>Insulin signaling and regulators</i></b>		
<i>up-regulation by both treatments</i>	<b>Pik3r1</b> (1.36), <b>Vnn1</b> (1.99)	<b>Pik3r1</b> (1.31), <b>Vnn1</b> (2.02)
<i>down-regulation by both treatments</i>	<b>Irs2</b> (0.76), <b>Grb14</b> (0.78)	<b>Irs2</b> (0.79), <b>Grb14</b> (0.73)
<i>inverse regulation depending on treatments</i>	<b>none</b>	
<i>regulation only by either one of the treatment</i>	<b>Sik1</b> (2.02), <b>Pten</b> (1.32), <b>Insr</b> (1.21), <b>Irs1</b> (0.81)	<b>Mfn2</b> (1.23), <b>Trib3</b> (0.51)
<b><i>Gluconeogenesis</i></b>		
<i>up-regulation by both treatments</i>	<b>none</b>	
<i>down-regulation by both treatments</i>	<b>none</b>	
<i>inverse regulation depending on treatments</i>	<b>none</b>	
<i>regulation only by either one of the treatment</i>	<b>Slc37a4</b> (1.64), <b>Pck1</b> (1.70), <b>Cebpb</b> (1.54)	<b>none</b>

**Table 5:** Other genes involved in metabolic pathways and differentially expressed genes. Numbers in brackets refer to the corresponding fold changes.

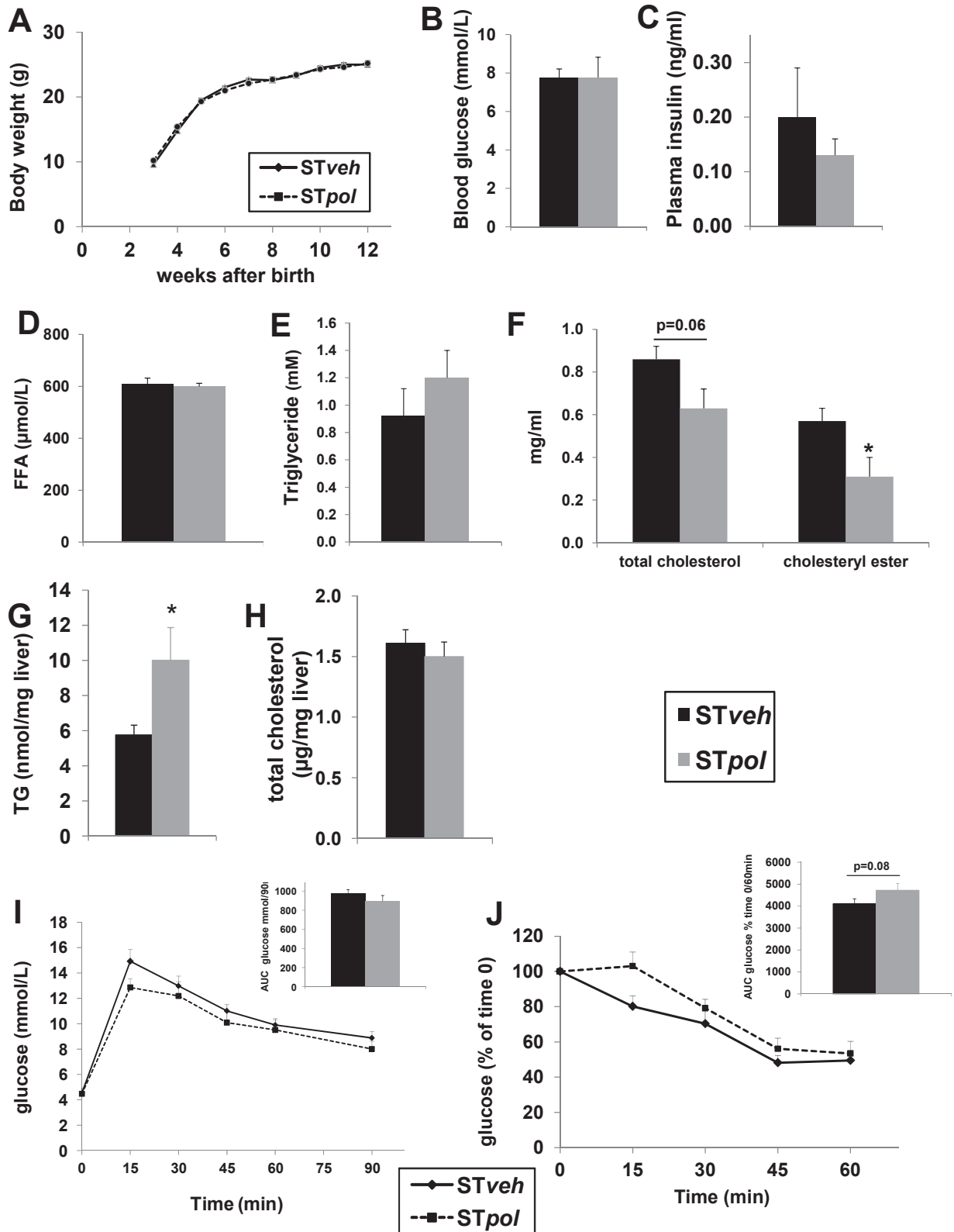


Figure 1

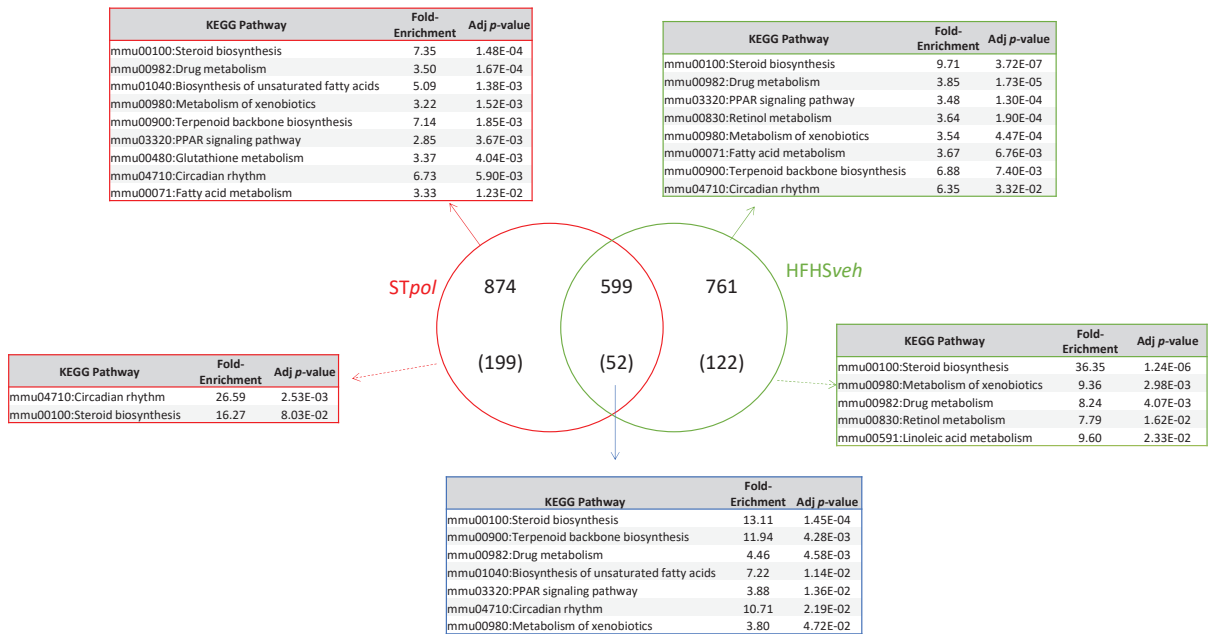


Figure 2

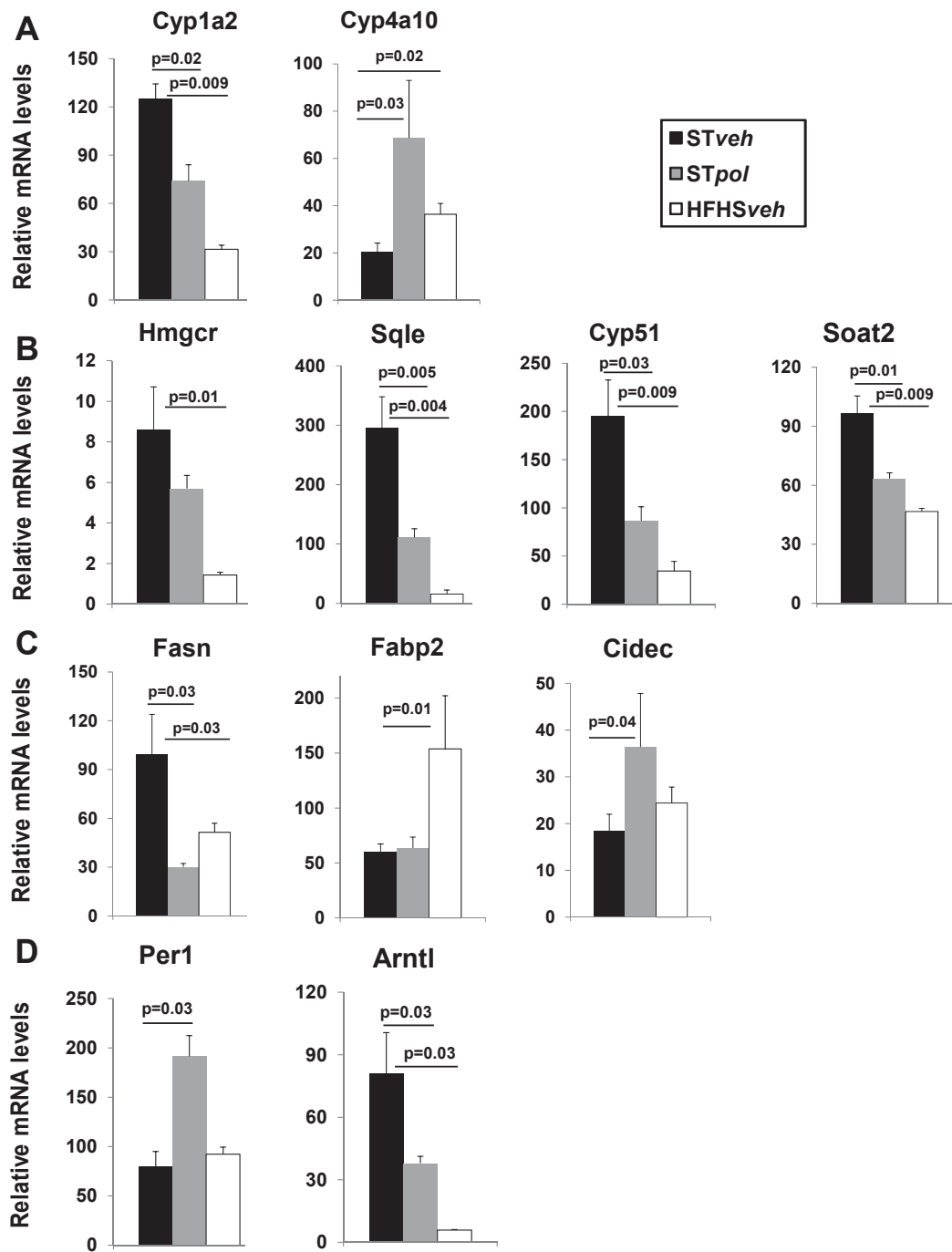


Figure 3

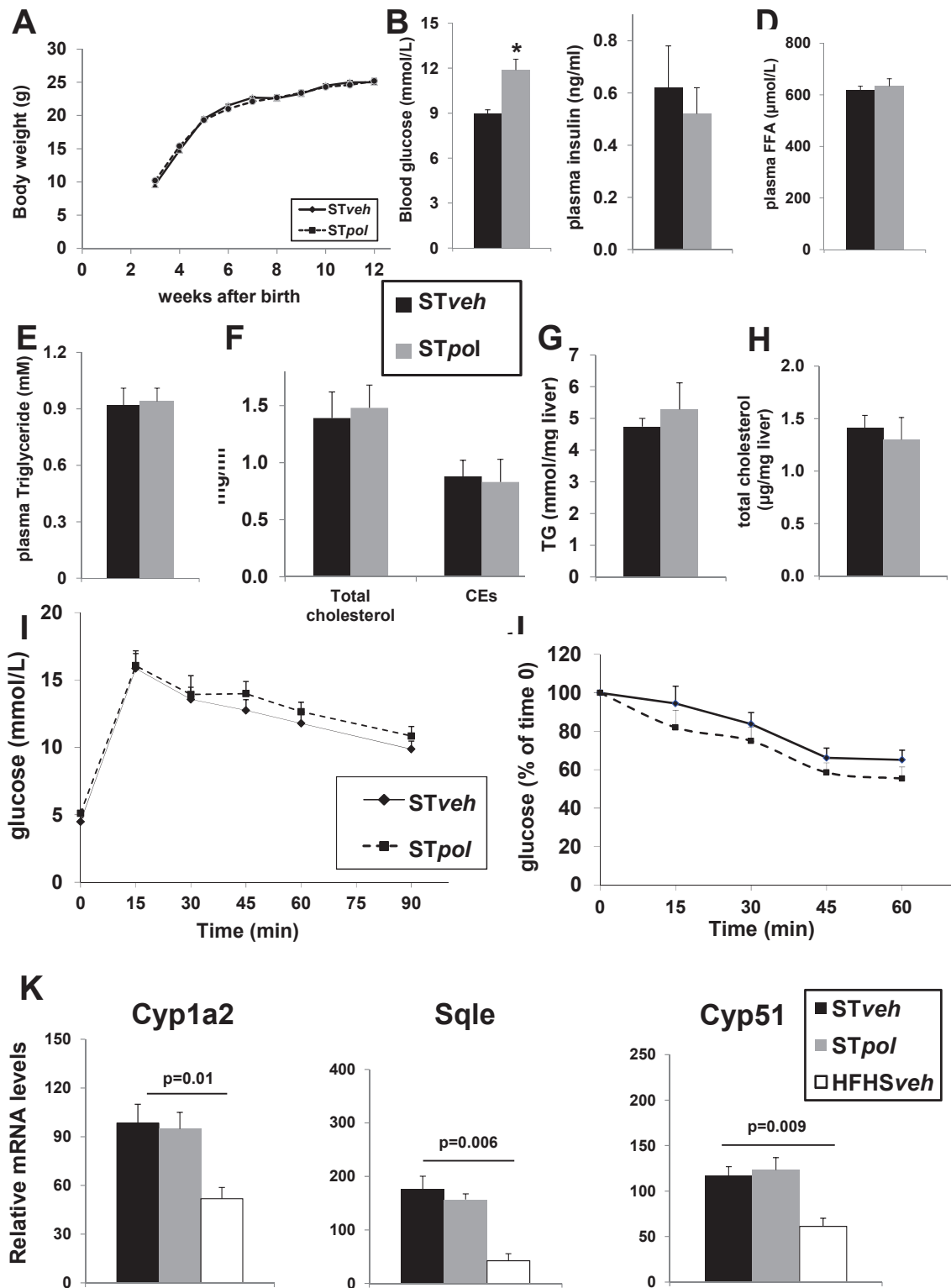
### Supplemental data 1

#### Composition of the diets:

	Standard + vehicle		High fat High sucrose diet + vehicle	
	% mass	%kcal	% mass	%kcal
diet fat	3.2		34.3	
added corn oil	7.0		5.1	
<b>Total fat</b>	10.2	31.2	39.4	63.0
<b>Carbohydrates</b>	35.6 (maltodextrin + starch)	48.2	33.2 (maltodextrin 50% + sucrose 50%)	23.6
diet protein	14.6		18.8	
protein from gelatin	0.7			
<b>Protein</b>	15.2	20.6	18.8	13.4
<b>kcal/g</b>	<b>3.0</b>		<b>5.6</b>	

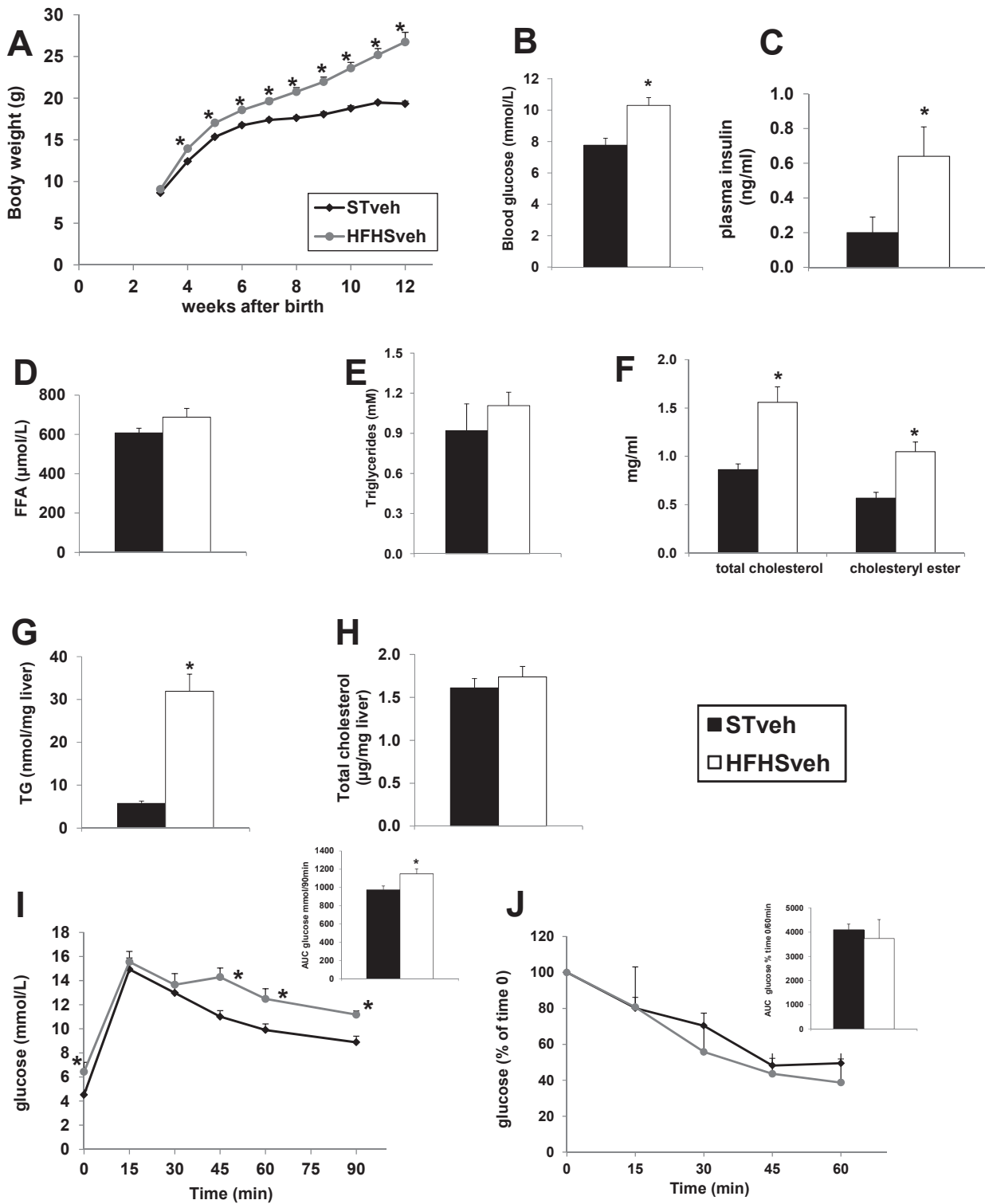
#### Primers used in RT-qPCR:

gene symbol	RefSeq Accession Number	sequences: 5'→3'	
		Forward	Reverse
<b>Arntl</b>	NM_007489	<b>CTG CCT GGA AGG AAG TTA CA</b>	<b>AAG GTC CAC AGG ATT TGA CT</b>
<b>Cidec</b>	NM_178373;NM_001301295	<b>TGG CAC AAT CGT GGA GAC AG</b>	<b>AGA GGG TTG CCT TCA CGT TC</b>
<b>Cyp1a2</b>	NM_009993	<b>TCA TCC TGG AGA TCT ACC GA</b>	<b>TGACCTGCCACTGGTTTATG</b>
<b>Cyp4a10</b>	NM_010011	<b>AAG AAG CTC CAC TGA TTC TG</b>	<b>ATG GAG AAA CTC GTG TGAGG</b>
<b>Cyp4a14</b>	NM_007822.2	<b>TGG GGG CAC CAT CTG AAG GAC A</b>	<b>TCC GCC GAT GCT GGA A</b>
<b>Cyp7a1</b>	NM_007824.2	<b>TAC AGA GTG CTG GCC AAG AG</b>	<b>AGT GAA GTC CTC CTT AGC TG</b>
<b>Cyp51</b>	NM_020010	<b>AGT GCC TGG ATG GGC TTC TT</b>	<b>GGA GGC CTC AGT CTT AGT GT</b>
<b>Fabp2</b>	NM_007980	<b>ACC TCT CGG ACA GCA ATC AG</b>	<b>CTT TCC CTA CAG TCT AGC AG</b>
<b>Fasn</b>	NM_017332	<b>GTG CAC CCC ATT GAA GGT TCC</b>	<b>GGT TTG GAA TGC TGT CCA GGG</b>
<b>Gusb</b>	NM_010368	<b>CTT CAT GAC GAA CCA GTC AC</b>	<b>GCA ATC CTC CAG TAT CTC TC</b>
<b>Hmgr</b>	NM_008255	<b>CCG GCC TGT GTG TCG CTG GT</b>	<b>CCA GCG ACT ATG AGC GTG AA</b>
<b>Per1</b>	NM_0011065;NM_001159367	<b>TGA GCC AGA GGC CAG ATT G</b>	<b>TGT ATG GCT GCT CTG ACT G</b>
<b>Soat2</b>	NM_146064	<b>GCT CTA TGC CTG CTT CAT CC</b>	<b>GTC TCC AAA CCG CAG CAT CT</b>
<b>Sqle</b>	NM_009270	<b>CTC AGT GAA CAA ACG AGG CG</b>	<b>TTT TCG GAG CTG ATG CAA GG</b>
<b>Stat5b</b>	NM_001113563;NM_011489	<b>GGC TAT GTG GAT ACA GGC TC</b>	<b>GCT GGG TGG CCT TAA TGT TC</b>



**Suppl. Data 2:** (A) Body weight recorded from weaning for male mice fed standard diet plus vehicle or the mixture of pollutants. Blood glucose (B) and plasma insulin (C), FFA (D), triglycerides (TG) (E), total cholesterol and cholesteryl ester (F) measured in male mice. (G) Hepatic total cholesterol and (H) TG measured in male mice. (I) Glucose Tolerance test and (J) Insulin sensitivity test performed on 11 wk-old male mice. Results are expressed as means  $\pm$  SE, \*P<0.05 vs STveh (n $\geq$ 6). (K) Real-time PCR performed on the liver of male mice. For an easier comparison with the hepatic expression in female mice, the same units than in Fig.3 have been used. Results are expressed as means  $\pm$  SEM, n $\geq$ 5.



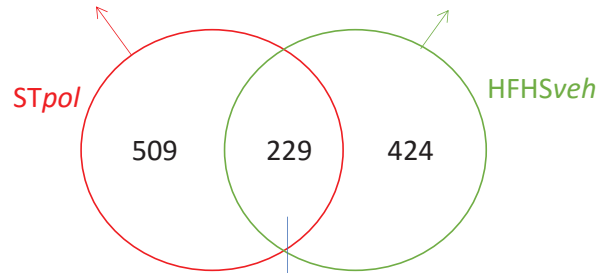


**Suppl. Data 3:** (A) Body weight recorded from weaning for female mice fed High Fat High Sucrose (HFHS) diet plus vehicle. Blood glucose (B) and plasma insulin (C), FFA (D), triglycerides (TG) (E), total cholesterol and cholesteryl ester (F) measured in HFHS-fed female mice. (G) Hepatic total cholesterol and (H) TG measured in HFHS-fed female mice. (I) Glucose Tolerance test and (J) Insulin sensitivity test performed on 11 wk-old HFHS-fed female mice. AUCs were calculated from each corresponding curve. Results are expressed as means  $\pm$  SE, \* $P$ <0.05 vs STveh ( $n \geq 5$ ).

**A**

KEGG Pathway	Fold-Enrichment	Adj <i>p</i> -value
mmu03320:PPAR signaling pathway	5.53	4.70E-05
mmu00071:Fatty acid metabolism	5.83	8.37E-03
mmu01040:Biosynthesis of unsaturated fatty acids	7.55	1.14E-02

KEGG Pathway	Fold-Enrichment	Adj <i>p</i> -value
mmu03320:PPAR signaling pathway	5.14	3.41E-04
mmu00561:Glycerolipid metabolism	4.93	3.72E-02

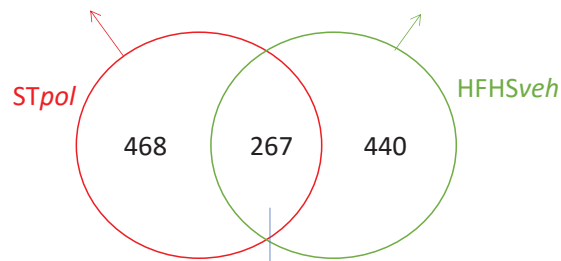


KEGG Pathway	Fold-Enrichment	Adj <i>p</i> -value
mmu03320:PPAR signaling pathway	8.38	1.02E-03
mmu01040:Biosynthesis of unsaturated fatty acids	13.62	1.60E-02
mmu00071:Fatty acid metabolism	9.81	1.76E-02

**B**

KEGG Pathway	Fold-Enrichment	Adj <i>p</i> -value
mmu00100:Steroid biosynthesis	12.88	2.13E-06
mmu00980:Metabolism of xenobiotics	4.31	1.38E-03
mmu00982:Drug metabolism	4.09	1.47E-03
mmu00900:Terpenoid backbone biosynthesis	10.95	1.53E-03
mmu00480:Glutathione metabolism	4.21	1.31E-02
mmu00260:Glycine, serine and threonine metabolism	5.48	1.55E-02

KEGG Pathway	Fold-Enrichment	Adj <i>p</i> -value
mmu00100:Steroid biosynthesis	16.95	1.20E-08
mmu00980:Metabolism of xenobiotics	5.95	8.77E-06
mmu00982:Drug metabolism	5.24	3.12E-05
mmu00900:Terpenoid backbone biosynthesis	11.23	4.33E-03
mmu00830:Retinol metabolism	3.85	2.93E-02
mmu00591:Linoleic acid metabolism	4.56	3.90E-02



KEGG Pathway	Fold-Enrichment	Adj <i>p</i> -value
mmu00100:Steroid biosynthesis	27.00	6.46E-07
mmu00900:Terpenoid backbone biosynthesis	20.49	3.79E-03
mmu00980:Metabolism of xenobiotics	6.96	4.31E-03
mmu00982:Drug metabolism	6.12	7.25E-03
mmu00480:Glutathione metabolism	6.62	3.86E-02

**Suppl. Data 4: Venn diagram from up-(A) or down-(B) regulated genes in response to pollutants (*STpol*) and to the high-fat high sucrose diet (HFHSveh). KEGG pathways analyses were performed using *STpol* annotated genes (red), HFHSveh annotated genes (green) or common annotated genes (blue).**



# Discussion Générale

Le problème des PE est un vrai défi pour les scientifiques mais aussi pour les autorités sanitaires et politiques en charge de l'évaluation du risque et de la prise de décisions, qui réglementent la fabrication et l'utilisation des produits. La problématique se complexifie encore lorsque les mélanges sont pris en considération. Or, dans notre environnement, que ce soit par les aliments, l'air, l'eau, ou même les cosmétiques, nous sommes exposés à une multitude de polluants, dont un certain nombre ont été décrits comme PE. Et même si cette exposition se fait rarement à forte dose, elle est chronique et passive, et couvre toutes les étapes de la vie depuis les premières phases du développement embryonnaire.

Le travail présenté dans cette thèse porte sur l'impact d'un mélange de polluants sur le métabolisme lipidique et glucidique dans un modèle souris. L'originalité de cette étude réside dans le développement d'un modèle d'exposition environnementale à un mélange de polluants permettant de s'approcher d'une exposition réaliste. En effet, nous avons utilisé un mélange hétérogène de polluants, qui ont chacun une activité PE identifiée et activent des voies de signalisation différentes, ce qui ne permet pas de prédire l'effet résultant. Les polluants du mélange incluent à la fois des polluants lipophiles et persistants et des polluants à courte demi-vie mais largement présents dans l'environnement. Ils ont été utilisés à des doses faibles, de l'ordre de la dose sans effet chez l'homme (DJT). L'exposition est chronique puisque les polluants sont ajoutés à la nourriture (obésogène ou standard) et les souris nourries trois fois par semaine. Enfin, l'exposition recouvre toute les périodes de la vie, incluant les phases de gestation et lactation qui sont connues pour être des périodes de vulnérabilité.

En utilisant ce modèle expérimental, les travaux présentés dans cette thèse ont permis d'apporter des éléments nouveaux sur la compréhension des effets d'un mélange de PE :

- Les polluants, lorsqu'ils sont administrés aux doses qui ont été déterminées sans effet chez l'animal (NOAEL) sont reprotoxiques en mélange, puisque nous avons observé une diminution du nombre de petits par portée et de leur survie dans les premiers jours de vie.
- Le mélange de polluants administrés aux doses DJT, qui sont 500 à 1000 fois inférieures à la dose NOAEL pour chacun des polluants du mélange, entraînent des effets métaboliques adverses en absence d'effet obésogène.

- L'impact métabolique résultant du mélange de PE à la dose DJT dépend de l'âge, du sexe et du contexte nutritionnel.
- L'analyse transcriptomique comparée des foies de femelles non-obèses exposées aux polluants et de femelles obèses non-exposées révèle que la réponse aux polluants est davantage une réponse métabolique qu'une réponse toxicologique.

De l'ensemble de ces résultats présentés et discutés dans les 3 articles de ma thèse, cinq points essentiels transversaux seront repris dans cette discussion générale :

1. La pertinence des doses des PE utilisées dans le mélange
2. L'intérêt d'étudier les deux sexes
3. Les effets du mélange : effets combinés ou propre à chaque PE ?
4. La comparaison des impacts métaboliques d'un régime obésogène avec ceux induits par une exposition au mélange de PE
5. Les limites de notre modèle expérimental

## **1. Pertinence des doses des PE utilisées dans le mélange**

Les doses environnementales auxquelles nous sommes exposés et la charge pondérale en polluants dépendent grandement de la localisation géographique (pays en voie d'industrialisation, milieu urbain ou rural) et des habitudes alimentaires (alimentation issue de préparations industrielles). Dans notre modèle expérimental, le choix a été fait d'utiliser des doses non-toxiques chez l'animal. A la suite de la mise en évidence d'effets toxiques à la dose NOAEL nous avons utilisé les doses DJT de chaque polluant qui sont 500 à 1000 fois inférieures. Nos données sont donc une preuve de concept que les polluants peuvent agir de manière cumulative ou synergique pour induire des effets métaboliques à des doses où ils n'ont individuellement pas d'effet. Nos résultats indiquent alors qu'il devient essentiel de

repenser l'évaluation des risques en considérant les effets cocktails pour mieux protéger les populations des effets métaboliques des polluants environnementaux.

Afin d'estimer la charge pondérale en polluants, un dosage par spectrométrie de masse a été réalisée au centre de recherche Men-Technology-Environment de l'université de Orebro (Suède). En raison des faibles doses administrées et de la sensibilité de la méthode, seul le PCB153 a pu être dosé dans le foie et le tissu adipeux. Le dosage montre que les souris non-obèses exposées ont en moyenne 30.9 ng/g de lipides dans le foie et 34.2 ng/g de lipides dans le tissu adipeux à 12 semaines de vie (**résultats non publiés**). Ce résultat peut être comparé aux valeurs retrouvées chez l'homme dans les différentes études épidémiologiques.

Ainsi, dans la cohorte NHANES, les valeurs rapportées sur 2016 participants issus de la population générale pour le PCB153 mesuré dans le tissu adipeux par spectrométrie de masse sont d'environ 48.5 ng/g de lipides (Lee et al., 2006). Dans une seconde cohorte comparant 886 participants adultes espagnols, 7 PCB (dont le PCB153 qui est le plus abondant) ont été mesurés et le taux cumulé de ces 7 PCB est de 1.76 ng/g de lipides (Gasull et al., 2012). Les taux mesurés dans une cohorte de 117 japonais sont de 0.15 ng/g de lipides (Tanaka et al., 2011). Enfin, l'analyse de 692 participants Inuits du Groenland, qui sont des grands consommateurs de poissons, a montré 808 ng de PCB153 par g de lipides (Jørgensen et al., 2008).

Ces données montrent donc la pertinence des doses utilisées dans le modèle développé, au moins pour le PCB153.

## 2. Pertinence à étudier les deux sexes

Si en toxicologie classique ce sont avant tout les mâles qui ont été étudiés, notamment pour s'affranchir des effets dus au cycle œstral, la compréhension des effets des PE nécessite de travailler également chez les femelles. En effet, il n'est plus à démontrer que l'homéostasie énergétique est régulée par les hormones sexuelles (Mauvais-Jarvis et al., 2013) et un très grand nombre de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique présentent des éléments de réponses aux œstrogènes dans leur promoteur (Gao et al., 2008). Par ailleurs, plus de 1000 gènes hépatiques ont des niveaux d'expression différents entre les mâles et les femelles chez les rongeurs et ceci est lié à la pulsativité de l'hormone de croissance chez les mâles (Waxman

and O'Connor, 2006). Il était donc attendu qu'en réponse au mélange de polluants, les effets soient fortement dépendants du sexe dans nos conditions expérimentales.

Enfin, chacun des 4 polluants constitutif du mélange a été décrit dans la littérature (selon le contexte hormonale) comme oestrogéno-mimétique (BPA, PCB, dioxine), anti-oestrogénique (dioxine) ou anti-androgénique (phtalates). Dans les conditions expérimentales développées, plusieurs des effets décrits du mélange de PE pourraient être imputables à une action de type œstrogénique :

- L'intolérance au glucose observée chez les femelles obèses de 12 semaines pourrait être liée à l'altération de la signalisation œstrogénique dans le foie.
- L'amélioration de l'intolérance au glucose observée chez les femelles de 7 semaines nourries au régime gras pourrait être liée à une augmentation de l'activité œstrogénique.
- L'altération du métabolisme du cholestérol et la diminution des expressions des gènes impliqué dans sa synthèse observée chez les femelles de 12 semaines nourries avec un régime standard pourrait être liée à une augmentation de l'activité œstrogénique. En effet, il a été montré que l'administration d'œstrogènes sur des rattes intactes induit une diminution du taux de cholestérol plasmatique (Parini et al., 2000) et de l'activité des enzymes hépatiques impliquées dans la synthèse du cholestérol (De Marinis et al., 2008). Les résultats de l'article 1 soulignent également que le métabolisme du cholestérol peut être impacté par l'exposition aux polluants chez les mâles obèses. Mais même si les deux modèles (mâles obèses et femelles non-obèses) présentent une diminution du taux de cholestérol, les mécanismes impliqués semblent différents. En effet, chez les mâles obèses, la diminution du taux de cholestérol semble liée à une augmentation de sa transformation en acide biliaire et non à une diminution de sa synthèse. La bile, en plus de son rôle majeur dans la digestion, permet l'élimination des xénobiotiques, au moins chez le rongeur. En effet, il a été montré que la dioxine TCDD (Jackson et al., 1998) et le BPA (Pottenger et al., 2000) pouvaient être éliminés via la bile chez le rat adulte, et de manière plus importante chez le mâle que chez la femelle.



- La perturbation du rythme circadien observée chez les femelles de 12 semaines peut être due à une activité œstrogéno-mimétique des polluants. En effet, des récepteurs aux œstrogènes ont été mis en évidence au niveau du noyau suprachiasmatique (responsable de la synchronisation des horloges cellulaires des organes périphériques) à des localisations et des niveaux d'expression différents selon le sexe (Bailey and Silver, 2014). Au niveau moléculaire, l'horloge est contrôlée essentiellement par l'action de PER, cible du complexe CLOCK-BMAL, qui inhibe la transcription de ce complexe. Il a été montré qu'un élément de réponse aux œstrogènes est présent dans le promoteur du gène *Per2* et qu'ER $\alpha$  pouvait induire l'expression de *Per2* *in vitro* (Gery et al., 2007).

### 3. Les effets du mélange : effets combinés ou propres à chaque PE ?

Les effets observés dans notre modèle résultent de l'exposition au mélange de PE, ce qui ne permet pas de déterminer si les effets sont dus à un polluant en particulier ou bien s'ils sont le résultat d'un effet additif, synergique ou antagoniste entre les polluants du mélange.

Même si certains résultats sont controversés (voir introduction), chacun des quatre polluants du mélange a été décrit comme obésogène *in vivo* ou adipogénique *in vitro* (Casals-Casas and Desvergne, 2011; Taxvig et al., 2012). Or, aucun effet obésogène n'est observé en réponse aux polluants que ce soit en condition obésogène ou en condition standard.

Dans le foie, un certain nombre de récepteurs nucléaires et de facteurs de transcription régulent l'homéostasie lipidique et glucidique et certains d'entre eux sont des cibles privilégiées des polluants. Il existe ainsi une liste de gènes cibles hépatiques, notamment pour la dioxine et les phtalates. Ainsi, la majorité des effets induits par les dioxines passent par l'activation d'AhR, puisque les effets d'une exposition aux dioxines ne sont généralement pas retrouvés chez la souris KO pour AhR. De même, les phtalates activent les voies PPAR. Dans le foie, l'isoforme majoritaire est PPAR $\alpha$  et son activation entraîne la stimulation de la  $\beta$ -oxydation. En revanche, le tissu adipeux exprime majoritairement PPAR $\gamma$ , qui stimule la lipogenèse (Feige et al., 2010). Les gènes cibles du BPA sont plus difficiles à définir. Il a été montré que le BPA peut activer les récepteurs ER, ERR, PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$  (Chevalier and Fénichel, 2015) menant à une diversité d'effets et de gènes cibles distincts. Enfin, le mécanisme d'action du PCB153 reste encore inconnu mais pourrait impliquer CAR et PXR (Wu et al., 2009).

Suivre l'expression de ces gènes cibles permet d'appréhender l'effet individuel du polluant du mélange. C'est d'ailleurs par ce biais que nous avons démontré que les souris étaient bien exposées aux polluants puisque nous avons observé une stimulation de l'expression de Cyp1a1 (gène cible de AhR) et de Cyp4a14 (gène cible de PPAR $\alpha$ ) en présence du mélange de polluants ajoutés à la dose NOAEL ou 10 fois la dose NOAEL (**article 1**).

Cependant, si l'induction de certains cytochromes P450 atteste que les souris sont bien exposées, l'analyse par qPCR dans le foie des animaux exposés révèle que les modifications de l'expression des xénosenseurs et des gènes cibles des 4 polluants du mélange identifiés dans la littérature fluctuent selon le sexe, l'âge et le contexte alimentaire, ne permettant pas de définir si un ou plusieurs polluant(s) impacte(nt) spécifiquement le paramètre étudié.

#### **4. Comparaison entre les impacts métaboliques d'un régime obésogène et ceux induits par une exposition au mélange de PE**

En condition physiologique, l'homéostasie lipidique et glucidique dans le foie est régulée par les phases d'alimentation et de jeûne. Dans cette situation, les endobiotiques activent des récepteurs nucléaires PPAR $\alpha$ , AhR, CAR et PXR, qui ont la capacité de reconnaître des endobiotiques et des xénobiotiques, et régulent le métabolisme énergétique et celui des xénobiotiques en réponse à l'apport alimentaire. L'expression de ces RN est également sous le contrôle de l'horloge hépatique, ce qui permet une anticipation de l'arrivée massive des nutriments et des polluants lors d'un repas (Oosterman et al., 2015). Réciproquement, les RN cités précédemment influencent l'expression des gènes du rythme circadien puisqu'il a été montré que lorsque des souris sont nourries la journée (alors que naturellement elles mangent la nuit), le rythme circadien des organes périphériques (foie, pancréas, reins et cœur) est inversé (Damiola et al., 2000).

Lors d'une obésité, l'hyperglycémie, l'hyperlipidémie et l'hyperinsulinémie peuvent entraîner une activation de ces RN qui n'est alors plus synchronisée avec les phases d'alimentation et de jeûne. De même, une activation inappropriée de ces RN peut avoir lieu à cause de la présence des polluants dans la circulation et peut perturber ces cycles physiologiques. Cette hypothèse pourrait expliquer la similarité des effets engendrés par les deux traitements (**article 3**). En effet, nous montrons que les quatre mêmes voies métaboliques sont impactées : le métabolisme du cholestérol, le métabolisme des acides gras, le métabolisme des xénobiotiques et le rythme circadien. Ainsi, les deux traitements, par

l'activation inappropriée de ces RN, pourraient entraîner une perturbation du rythme circadien et cet évènement pourrait être à l'origine de la perturbation des voies métabolismes affectées. Spécifiquement, nos résultats montrent que les deux traitements augmentent l'expression de CAR et active la voie de signalisation de PPAR $\alpha$ . De manière intéressante, il a été montré qu'une activation de CAR perturbe l'expression de Rev-Erba, gène clef de l'horloge (Eveillard et al., 2009a) et que l'activation de PPAR $\alpha$  modifie les rythmes d'alimentation chez la souris et donc du rythme circadien (Gutman et al., 2012). Il serait donc intéressant de développer l'hypothèse que ces deux récepteurs seraient à l'origine de la perturbation du rythme circadien dans notre modèle.

## 5. Limites du modèle expérimental

En toxicologie classique, différents modèles expérimentaux sont utilisés selon les paramètres étudiés, et chez les rongeurs, le rat est souvent préféré à la souris pour un certain nombre de caractéristiques liées au métabolisme des xénobiotiques. Cependant, la souris présente des avantages sur le plan métabolique et elle constitue un outil important pour la manipulation génétique. En effet, pour chaque RN ou presque, il existe des modèles de souris génétiquement modifiées dont le gène d'intérêt est soit totalement ou partiellement inactif soit surexprimé.

Cependant, l'extrapolation des données obtenues chez la souris à l'homme doit prendre en considération les nombreuses différences inter-espèces, notamment dans le domaine du métabolisme.

Ainsi, il a été montré que PPAR $\alpha$  et PXR fonctionnent différemment entre les deux espèces et certaines études mettent en avant des effets spécifiques des perturbateurs endocriniens chez la souris qui ne sont pas retrouvés chez l'homme ou inversement. Par exemple, des souris exposées à des fortes doses de DEHP sont protégées de l'obésité induite par un régime gras. Ces effets ne sont pas observés chez les souris KO pour PPAR $\alpha$ , ce qui démontre que ces effets sont imputables à l'activation de PPAR $\alpha$  et de la  $\beta$ -oxydation. Cependant, les souris qui expriment le gène humain de PPAR $\alpha$  et qui sont exposées aux mêmes doses de DEHP présentent un phénotype inverse, c'est-à-dire une prise de poids plus importante sous régime gras. Ces résultats montrent que la souris humanisée n'est pas protégée de l'obésité induite par un régime gras (Feige et al., 2010).

De même, le domaine de liaison au ligand de PXR présente de fortes divergences selon les espèces mammifères. Cette divergence est probablement à l'origine des différences d'affinité des agents pharmacologiques entre les espèces (Zhou et al., 2009). En utilisant une lignée de cellule hépatique humaine HepG2 transfectés avec le gène humain ou murin de PXR et en mesurant son activation à l'aide d'un gène rapporteur, il a été montré que le BPA pouvait activer le PXR humain mais pas son orthologue murin (Sui et al., 2012). La suite des travaux a montré que l'exposition au BPA a un effet pro-athérogène chez les souris huPXR-ApoE<sup>-/-</sup> (Sui et al., 2014). Il s'agit de souris invalidées pour le gène ApoE (ApoE<sup>-/-</sup>) - ce dernier permettant le développement spontané de plaques d'athérome et utilisées pour étudier le développement des maladies cardio-vasculaires - qui expriment le gène humain de PXR (huPXR). Cette étude confirme *in vivo* que le PXR humain est une cible du BPA et suggère également une spécificité des effets du BPA en fonction de l'espèce, au moins lorsqu'ils sont la conséquence de l'activation de PXR.

Au niveau du cholestérol, il existe également des différences majeures entre la souris et l'homme. Chez la souris, 80 % du cholestérol circulant se trouve dans les HDL. Il est donc recapté par le foie principalement via le récepteur SR-B1 et entraîne l'induction de l'expression de Cyp7a1, codant l'enzyme limitante dans la voie de synthèse des acides biliaires. En revanche, chez l'homme, seulement 20 % du cholestérol circulant se retrouve dans les HDL, la majorité étant présente dans les LDL. Le foie capte donc l'excès de cholestérol via les récepteurs aux LDL. De plus, chez l'homme, le promoteur de Cyp7a1 ne possède pas d'élément de réponse au LXR et l'expression de ce gène n'est donc pas induite par l'apport en cholestérol (Lee-Rueckert et al., 2016). Par ailleurs, la bile est une voie importante pour l'élimination des xénobiotiques chez les rongeurs, mais pas chez l'homme (Fenichel et al., 2013; Pottenger et al., 2000; Thayer et al., 2015).

## 6. Perspectives

Les perspectives de ce projet de thèse s'inscrivent dans un travail à court et à long terme.

1. Nous supposons que les effets observés, qui sont dépendants de l'âge et du sexe de l'animal, sont la conséquence d'une activité œstrogène-mimétique du mélange. L'analyse de souris ovariectomisées traitées ou non par de l'œstradiol et exposées ou non aux polluants permettra d'appréhender le rôle des œstrogènes endogènes dans les effets observés des polluants.

2. Nos résultats de l'**article 2 et 3** suggèrent que le tissu adipeux peut être une cible des PE. En effet, nous montrons dans l'**article 2** une modification de l'expression des marqueurs de l'inflammation dans le TAsc de manière dépendante de l'âge de la souris. Dans l'**article 3**, nous montrons un doublement des TAG hépatiques et une tendance à l'augmentation des TAG plasmatiques. Ces résultats sont associés avec une augmentation des gènes impliqués dans la  $\beta$ -oxydation dans le foie, ce qui suggère que l'excès des acides gras peut provenir d'une lipolyse du TA ou de son incapacité à incorporer les acides gras provenant de l'alimentation. Le niveau d'expression des marqueurs inflammatoires peut être mesuré dans le TAv et le TAsc des souris femelles non-obèse. Le dosage par Western Blot de la phosphorylation d'AKT après stimulation à l'insuline dans les deux conditions pourrait être réalisé dans le but d'observer si l'exposition aux polluants augmente l'insulino-résistance du TA indépendamment du contexte alimentaire pourrait expliquer l'origine de son dysfonctionnement. Pour cela, un nouveau protocole doit être répété, dans lequel les souris sont injectées à l'insuline 15 min avant l'euthanasie comme cela a été fait dans l'**article 2**. De plus, il a été montré que les POP peuvent entraîner une inflammation chronique dans le TA et que cette inflammation peut être à l'origine des effets métaboliques des POP (Ibrahim et al., 2011; Myre and Imbeault, 2014; Ruzzin et al., 2010). Nous savons déjà que les polluants aggravent ce paramètre dans le TAsc des souris obèses de 12 semaines. Le dosage de l'expression des marqueurs pro-inflammatoire dans le TAv et le TAsc pourrait expliquer alors l'origine de l'éventuelle insulino-résistance du TA et mettrait en évidence un mode d'action commun des polluants chez les souris femelles indépendamment du contexte nutritionnel.
  
3. Nos résultats ont mis en avant une perturbation du rythme circadien induit par l'ingestion d'un mélange de polluants. Cela met en évidence une nouvelle voie par laquelle les polluants pourraient induire des effets *in vivo* à faibles doses. Cependant, ceci est le résultat d'une étude transcriptomique et ces données préliminaires doivent être confirmées. De plus, notre protocole ne permet l'analyse du transcriptome qu'à un instant  $t$  donné, sans pouvoir avoir une appréciation globale du cycle circadien. A l'aide d'une collaboration, nous pourrions euthanasier à différents temps après une synchronisation des rythmes biologiques (temps Zeitgeber) pour avoir une appréciation globale du rythme circadien. A partir de ces

échantillons, une analyse fonctionnelle pourra être réalisée par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) pour mettre en évidence, d'une part, une différence au niveau temporel de la fixation du complexe CLOCK-BMAL sur la chromatine et d'autre part, une fixation des récepteurs aux œstrogènes sur le promoteur de Per2 chez les souris exposées aux polluants.

4. En comparant les effets des polluants et du régime alimentaires, nous avons montré que les deux traitements peuvent impacter les mêmes voies métaboliques, par des mécanismes distincts, mais se recoupant, probablement en activant les mêmes récepteurs nucléaires. Ceci pourrait être à l'origine des effets combinés des polluants et du régime gras. L'analyse fonctionnelle par ChIP nous permettrait dans un premier temps de mettre en évidence un ou plusieurs récepteurs nucléaires activé(s) par les deux traitements. Dans nos conditions expérimentales, nos animaux ont été euthanasiés à jeun. Ceci pourrait être un obstacle à l'identification des RN activés, du moins pour ceux activés par le régime gras. L'euthanasie d'animaux mis à jeun et re-nourris pourrait donc être nécessaire. Dans un second temps, à partir d'hépatocytes primaires de souris femelles exposées aux polluants ou soumis à un régime gras, nous pourrions soit en invalidant les gènes cibles soit en utilisant des gènes rapporteurs confirmer quel(s) RN est (sont) la(es) cible(s) du mélange de polluants et des acides gras, et mettre en évidences les RN communs.
5. Ce modèle nous permet d'observer les effets du mélange de polluants, sans savoir s'ils sont le résultat d'un effet additif, synergique ou antagoniste entre les polluants du mélange. Tester plusieurs combinaisons de polluants de notre mélange pour déterminer les acteurs des différents effets observés nous obligerait à sacrifier trop d'animaux, et ne peut être réalisé *in vivo* pour des raisons éthiques. Le développement d'un modèle cellulaire est donc nécessaire afin d'éclaircir ce point. Plusieurs modèles cellulaires pourraient être utilisés afin de reproduire des effets obtenus *in vivo*. Premièrement, nous avons récemment obtenus une lignée de cellules HepG2 transfectée de manière stable pour ER $\alpha$  (cette lignée n'exprime pas ce gène normalement). Ce dernier élément est important puisque nous supposons que notre mélange de polluants à un effet œstrogéno-mimétique. Cependant il est possible que nous ne puissions pas reproduire les effets observés chez la souris puisque l'exposition englobe les phases de développement. Dans ce cas, nous

pourrions utiliser la lignée cellulaire HepaRG à l'aide d'une collaboration avec l'université de Rennes. Cette lignée cellulaire est issue d'un hépatocarcinome humain, provenant d'une femme. Cette lignée a l'avantage de présenter très peu d'altérations génétiques et de répondre aux œstrogènes et à l'hormone de croissance. De plus, lorsqu'elles sont cultivées en faible quantité, ces cellules présentent les caractéristiques des cellules souches hépatiques, capable de se différencier (après prolifération) soit en hépatocytes soit en cholangiocytes (cellules biliaires). En exposant nos polluants lors de ces étapes, nous pourrions mimer l'exposition lors des phases maternelles *in vivo*.

# Références



Acimovic, J., Fink, M., Pompon, D., Bjorkhem, I., Hirayama, J., Sassone-Corsi, P., Golicnik, M., and Rozman, D. (2008). CREM modulates the circadian expression of CYP51, HMGCR and cholesterologenesis in the liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *376*, 206–210.

Adamovich, Y., Aviram, R., and Asher, G. (2015). The emerging roles of lipids in circadian control. *Biochim. Biophys. Acta* *1851*, 1017–1025.

Airaksinen, R., Rantakokko, P., Eriksson, J.G., Blomstedt, P., Kajantie, E., and Kiviranta, H. (2011). Association between type 2 diabetes and exposure to persistent organic pollutants. *Diabetes Care* *34*, 1972–1979.

Alberti, S., Schuster, G., Parini, P., Feltkamp, D., Diczfalusy, U., Rudling, M., Angelin, B., Björkhem, I., Pettersson, S., and Gustafsson, J.A. (2001). Hepatic cholesterol metabolism and resistance to dietary cholesterol in LXRbeta-deficient mice. *J. Clin. Invest.* *107*, 565–573.

Alexander, D.L., Ganem, L.G., Fernandez-Salguero, P., Gonzalez, F., and Jefcoate, C.R. (1998). Aryl-hydrocarbon receptor is an inhibitory regulator of lipid synthesis and of commitment to adipogenesis. *J. Cell Sci.* *111 (Pt 22)*, 3311–3322.

Alonso-Magdalena, P., Morimoto, S., Ripoll, C., Fuentes, E., and Nadal, A. (2006). The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic beta-cell function in vivo and induces insulin resistance. *Environ. Health Perspect.* *114*, 106–112.

Alonso-Magdalena, P., Ropero, A.B., Carrera, M.P., Cederroth, C.R., Baquié, M., Gauthier, B.R., Nef, S., Stefani, E., and Nadal, A. (2008). Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER alpha. *PloS One* *3*, e2069.

Alonso-Magdalena, P., Vieira, E., Soriano, S., Menes, L., Burks, D., Quesada, I., and Nadal, A. (2010). Bisphenol A exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring. *Environ. Health Perspect.* *118*, 1243–1250.

Anderson, R.G., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1977). Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts. *Cell* *10*, 351–364.

Appenzeller, B.M.R., and Tsatsakis, A.M. (2012). Hair analysis for biomonitoring of environmental and occupational exposure to organic pollutants: State of the art, critical review and future needs. *Toxicol. Lett.* *210*, 119–140.

Arner, P., Lithell, H., Wahrenberg, H., and Brönnegård, M. (1991). Expression of lipoprotein lipase in different human subcutaneous adipose tissue regions. *J. Lipid Res.* *32*, 423–429.

Arsenescu, V., Arsenescu, R.I., King, V., Swanson, H., and Cassis, L.A. (2008). Polychlorinated biphenyl-77 induces adipocyte differentiation and proinflammatory adipokines and promotes obesity and atherosclerosis. *Environ. Health Perspect.* *116*, 761–768.

Asakawa, A., Toyoshima, M., Harada, K.H., Fujimiya, M., Inoue, K., and Koizumi, A. (2008). The ubiquitous environmental pollutant perfluorooctanoic acid inhibits feeding behavior via peroxisome proliferator-activated receptor-alpha. *Int. J. Mol. Med.* *21*, 439–445.

Ashley-Martin, J., Dodds, L., Arbuckle, T.E., Ettinger, A.S., Shapiro, G.D., Fisher, M., Morisset, A.-S., Taback, S., Bouchard, M.F., Monnier, P., et al. (2014). A birth cohort study to investigate the association between prenatal phthalate and bisphenol A exposures and fetal markers of metabolic dysfunction. *Environ. Health Glob. Access Sci. Source* *13*, 84.

Auwerx, J. (1999). PPARgamma, the ultimate thrifty gene. *Diabetologia* *42*, 1033–1049.

Avissar-Whiting, M., Veiga, K.R., Uhl, K.M., Maccani, M.A., Gagne, L.A., Moen, E.L., and Marsit, C.J. (2010). Bisphenol A exposure leads to specific microRNA alterations in placental cells. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* *29*, 401–406.

Bailey, M., and Silver, R. (2014). Sex Differences in Circadian Timing Systems: Implications for Disease. *Front. Neuroendocrinol.* *35*, 111–139.

Barak, Y., Nelson, M.C., Ong, E.S., Jones, Y.Z., Ruiz-Lozano, P., Chien, K.R., Koder, A., and Evans, R.M. (1999). PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol. Cell* *4*, 585–595.

Barish, G.D., Narkar, V.A., and Evans, R.M. (2006). PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* *116*, 590–597.

Barker, D.J., Winter, P.D., Osmond, C., Margetts, B., and Simmonds, S.J. (1989). Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet Lond. Engl.* *2*, 577–580.

Barouki, R., Gluckman, P.D., Grandjean, P., Hanson, M., and Heindel, J.J. (2012a). Developmental origins of non-communicable disease: implications for research and public health. *Environ. Health Glob. Access Sci. Source* *11*, 42.

Barouki, R., Aggerbeck, M., Aggerbeck, L., and Coumoul, X. (2012b). The aryl hydrocarbon receptor system. *Drug Metabol. Drug Interact.* *27*, 3–8.

Bergman, Å., World Health Organization, and United Nations Environment Programme (2013). State of the science of endocrine disrupting chemicals - 2012: an assessment of the state of the science of endocrine disruptors prepared by a group of experts for the United Nations Environment Programme and World Health Organization (Genève; Nairobi: WHO ; UNEP).

Bertazzi, P.A., Bernucci, I., Brambilla, G., Consonni, D., and Pesatori, A.C. (1998). The Seveso studies on early and long-term effects of dioxin exposure: a review. *Environ. Health Perspect.* *106 Suppl 2*, 625–633.

Beydoun, H.A., Khanal, S., Zonderman, A.B., and Beydoun, M.A. (2014). Sex differences in the association of urinary bisphenol-A concentration with selected indices of glucose homeostasis among U.S. adults. *Ann. Epidemiol.* *24*, 90–97.

Bhandari, R., Xiao, J., and Shankar, A. (2013). Urinary bisphenol A and obesity in U.S. children. *Am. J. Epidemiol.* *177*, 1263–1270.

Bi, Y., Wang, W., Xu, M., Wang, T., Lu, J., Xu, Y., Dai, M., Chen, Y., Zhang, D., Sun, W., et al. (2016). Diabetes Genetic Risk Score Modifies Effect of Bisphenol A Exposure on Deterioration in Glucose Metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *101*, 143–150.

- Biddinger, S.B., Hernandez-Ono, A., Rask-Madsen, C., Haas, J.T., Alemán, J.O., Suzuki, R., Scapa, E.F., Agarwal, C., Carey, M.C., Stephanopoulos, G., et al. (2008). Hepatic insulin resistance is sufficient to produce dyslipidemia and susceptibility to atherosclerosis. *Cell Metab.* 7, 125–134.
- Boden, G. (2011). Obesity, insulin resistance and free fatty acids. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 18, 139–143.
- Boulias, K., Katrakili, N., Bamberg, K., Underhill, P., Greenfield, A., and Talianidis, I. (2005). Regulation of hepatic metabolic pathways by the orphan nuclear receptor SHP. *EMBO J.* 24, 2624–2633.
- Brosens, J.J., and Parker, M.G. (2003). Gene expression: Oestrogen receptor hijacked. *Nature* 423, 487–488.
- Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1974). Familial hypercholesterolemia: defective binding of lipoproteins to cultured fibroblasts associated with impaired regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71, 788–792.
- Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2008). Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. *Cell Metab.* 7, 95–96.
- Bryzgalova, G., Gao, H., Ahren, B., Zierath, J.R., Galuska, D., Steiler, T.L., Dahlman-Wright, K., Nilsson, S., Gustafsson, J.-A., Efendic, S., et al. (2006). Evidence that oestrogen receptor- $\alpha$  plays an important role in the regulation of glucose homeostasis in mice: insulin sensitivity in the liver. *Diabetologia* 49, 588–597.
- Bugge, A., Feng, D., Everett, L.J., Briggs, E.R., Mullican, S.E., Wang, F., Jager, J., and Lazar, M.A. (2012). Rev-erba and Rev-erb $\beta$  coordinately protect the circadian clock and normal metabolic function. *Genes Dev.* 26, 657–667.
- Byerly, M.S., Al Salayta, M., Swanson, R.D., Kwon, K., Peterson, J.M., Wei, Z., Aja, S., Moran, T.H., Blackshaw, S., and Wong, G.W. (2013). Estrogen-related receptor  $\beta$  deletion modulates whole-body energy balance via estrogen-related receptor  $\gamma$  and attenuates neuropeptide Y gene expression. *Eur. J. Neurosci.* 37, 1033–1047.
- Calandre, E.P., Rodriguez-Lopez, C., Blazquez, A., and Cano, D. (1991). Serum lipids, lipoproteins and apolipoproteins A and B in epileptic patients treated with valproic acid, carbamazepine or phenobarbital. *Acta Neurol. Scand.* 83, 250–253.
- Canaple, L., Rambaud, J., Dkhissi-Benyahya, O., Rayet, B., Tan, N.S., Michalik, L., Delaunay, F., Wahli, W., and Laudet, V. (2006). Reciprocal regulation of brain and muscle Arnt-like protein 1 and peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  defines a novel positive feedback loop in the rodent liver circadian clock. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 20, 1715–1727.
- Cariou, B., Postic, C., Boudou, P., Burcelin, R., Kahn, C.R., Girard, J., Burnol, A.-F., and Mauvais-Jarvis, F. (2004). Cellular and Molecular Mechanisms of Adipose Tissue Plasticity in Muscle Insulin Receptor Knockout Mice. *Endocrinology* 145, 1926–1932.

- Carrier, J.C., Deblois, G., Champigny, C., Levy, E., and Giguère, V. (2004). Estrogen-related Receptor  $\alpha$  (ERR $\alpha$ ) Is a Transcriptional Regulator of Apolipoprotein A-IV and Controls Lipid Handling in the Intestine. *J. Biol. Chem.* 279, 52052–52058.
- Casals-Casas, C., and Desvergne, B. (2011). Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annu. Rev. Physiol.* 73, 135–162.
- Castro, A.V.B., Kolka, C.M., Kim, S.P., and Bergman, R.N. (2014). Obesity, insulin resistance and comorbidities – Mechanisms of association. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 58, 600–609.
- Chen, J.-Q., Brown, T.R., and Russo, J. (2009). Regulation of Energy Metabolism Pathways by Estrogens and Estrogenic Chemicals and Potential Implications in Obesity Associated with Increased Exposure to Endocrine Disruptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 1128–1143.
- Chen, L., Chen, R., Wang, H., and Liang, F. (2015). Mechanisms Linking Inflammation to Insulin Resistance. *Int. J. Endocrinol.* 2015, 508409.
- Chevalier, N., and Fénichel, P. (2015). Bisphenol A: Targeting metabolic tissues. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 16, 299–309.
- Chiang, J.Y., Kimmel, R., and Stroup, D. (2001). Regulation of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene (CYP7A1) transcription by the liver orphan receptor (LXR $\alpha$ ). *Gene* 262, 257–265.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159.
- Cinti, S., Mitchell, G., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E., Wang, S., Fortier, M., Greenberg, A.S., and Obin, M.S. (2005). Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J. Lipid Res.* 46, 2347–2355.
- Clegg, D.J., Riedy, C.A., Smith, K.A.B., Benoit, S.C., and Woods, S.C. (2003). Differential sensitivity to central leptin and insulin in male and female rats. *Diabetes* 52, 682–687.
- Clegg, D.J., Brown, L.M., Woods, S.C., and Benoit, S.C. (2006). Gonadal hormones determine sensitivity to central leptin and insulin. *Diabetes* 55, 978–987.
- Clément, K., Vaisse, C., Lahlou, N., Cabrol, S., Pelloux, V., Cassuto, D., Gormelen, M., Dina, C., Chambaz, J., Lacorte, J.M., et al. (1998). A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 392, 398–401.
- Clodfelter, K.H., Holloway, M.G., Hodor, P., Park, S.-H., Ray, W.J., and Waxman, D.J. (2006). Sex-dependent liver gene expression is extensive and largely dependent upon signal transducer and activator of transcription 5b (STAT5b): STAT5b-dependent activation of male genes and repression of female genes revealed by microarray analysis. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 20, 1333–1351.
- Colborn, T., and Clement, C. (1992). Chemically-induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection. *Adv. Mod. Environ. Toxicol. USA.*

- Conforto, T.L., Zhang, Y., Sherman, J., and Waxman, D.J. (2012). Impact of CUX2 on the female mouse liver transcriptome: activation of female-biased genes and repression of male-biased genes. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 4611–4627.
- Cooke, P.S., and Naaz, A. (2004). Role of estrogens in adipocyte development and function. *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ *229*, 1127–1135.
- Czech, M.P. (2013). Obesity Notches up fatty liver. *Nat. Med.* *19*, 969–971.
- Damiola, F., Le Minh, N., Preitner, N., Kornmann, B., Fleury-Olela, F., and Schibler, U. (2000). Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* *14*, 2950–2961.
- Davis, K.E., D. Neinast, M., Sun, K., M. Skiles, W., D. Bills, J., A. Zehr, J., Zeve, D., D. Hahner, L., W. Cox, D., M. Gent, L., et al. (2013). The sexually dimorphic role of adipose and adipocyte estrogen receptors in modulating adipose tissue expansion, inflammation, and fibrosis. *Mol. Metab.* *2*, 227–242.
- Delfosse, V., Dendele, B., Huet, T., Grimaldi, M., Boulahtouf, A., Gerbal-Chaloin, S., Beucher, B., Roecklin, D., Muller, C., Rahmani, R., et al. (2015). Synergistic activation of human pregnane X receptor by binary cocktails of pharmaceutical and environmental compounds. *Nat. Commun.* *6*, 8089.
- Després, J.-P., and Lemieux, I. (2006). Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* *444*, 881–887.
- Dirinck, E.L., Dirtu, A.C., Govindan, M., Covaci, A., Jorens, P.G., and Van Gaal, L.F. (2016). Endocrine-disrupting polychlorinated biphenyls in metabolically healthy and unhealthy obese subjects before and after weight loss: difference at the start but not at the finish. *Am. J. Clin. Nutr.*
- Djouadi, F., Weinheimer, C.J., Saffitz, J.E., Pitchford, C., Bastin, J., Gonzalez, F.J., and Kelly, D.P. (1998). A gender-related defect in lipid metabolism and glucose homeostasis in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice. *J. Clin. Invest.* *102*, 1083–1091.
- Dobbs, R., Sawers, C., Thompson, F., Manyika, J., Woetzel, J., Child, P., McKenna, S., and Spatharou, A. (2014). How the world could better fight obesity. McKinsey Glob. Inst. <http://www.mckinsey.com/industries/healthcare-systems-and-services/our-insights/how-the-world-could-better-fight-obesity>.
- Dong, B., Saha, P.K., Huang, W., Chen, W., Abu-Elheiga, L.A., Wakil, S.J., Stevens, R.D., Ilkayeva, O., Newgard, C.B., Chan, L., et al. (2009). Activation of nuclear receptor CAR ameliorates diabetes and fatty liver disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 18831–18836.
- Dong, S.-S., Guo, Y., Zhu, D.-L., Chen, X.-F., Wu, X.-M., Shen, H., Chen, X.-D., Tan, L.-J., Tian, Q., Deng, H.-W., et al. (2016). Epigenomic elements analyses for promoters identify ESRRG as a new susceptibility gene for obesity-related traits. *Int. J. Obes.* *40*, 1170–1176.

Eckel-Mahan, K.L., Patel, V.R., de Mateo, S., Orozco-Solis, R., Ceglia, N.J., Sahar, S., Dilag-Penilla, S.A., Dyar, K.A., Baldi, P., and Sassone-Corsi, P. (2013). Reprogramming of the Circadian Clock by Nutritional Challenge. *Cell* 155, 1464–1478.

Espeland, M.A., Hogan, P.E., Fineberg, S.E., Howard, G., Schrott, H., Waclawiw, M.A., and Bush, T.L. (1998). Effect of postmenopausal hormone therapy on glucose and insulin concentrations. PEPI Investigators. Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions. *Diabetes Care* 21, 1589–1595.

Van Esterik, J.C.J., Verharen, H.W., Hodemaekers, H.M., Gremmer, E.R., Nagarajah, B., Kamstra, J.H., Dollé, M.E.T., Legler, J., and van der Ven, L.T.M. (2015). Compound- and sex-specific effects on programming of energy and immune homeostasis in adult C57BL/6JxFVB mice after perinatal TCDD and PCB 153. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 289, 262–275.

Eveillard, A., Mselli-Lakhal, L., Mogha, A., Lasserre, F., Polizzi, A., Pascussi, J.-M., Guillou, H., Martin, P.G.P., and Pineau, T. (2009a). Di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) activates the constitutive androstane receptor (CAR): a novel signalling pathway sensitive to phthalates. *Biochem. Pharmacol.* 77, 1735–1746.

Eveillard, A., Lasserre, F., de Tayrac, M., Polizzi, A., Claus, S., Canlet, C., Mselli-Lakhal, L., Gotardi, G., Paris, A., Guillou, H., et al. (2009b). Identification of potential mechanisms of toxicity after di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) adult exposure in the liver using a systems biology approach. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 236, 282–292.

Fan, W., Yanase, T., Nomura, M., Okabe, T., Goto, K., Sato, T., Kawano, H., Kato, S., and Nawata, H. (2005). Androgen receptor null male mice develop late-onset obesity caused by decreased energy expenditure and lipolytic activity but show normal insulin sensitivity with high adiponectin secretion. *Diabetes* 54, 1000–1008.

Feige, J.N., Gelman, L., Rossi, D., Zoete, V., Metivier, R., Tudor, C., Anghel, S.I., Grosdidier, A., Lathion, C., Engelborghs, Y., et al. (2007). The Endocrine Disruptor Monoethyl-hexyl-phthalate Is a Selective Peroxisome Proliferator-activated Receptor Modulator That Promotes Adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 282, 19152–19166.

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

Feinstein, R., Kanety, H., Papa, M.Z., Lunenfeld, B., and Karasik, A. (1993). Tumor necrosis factor-alpha suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. *J. Biol. Chem.* 268, 26055–26058.

Feng, D., Liu, T., Sun, Z., Bugge, A., Mullican, S.E., Alenghat, T., Liu, X.S., and Lazar, M.A. (2011). A circadian rhythm orchestrated by histone deacetylase 3 controls hepatic lipid metabolism. *Science* 331, 1315–1319.

Fenichel, P., Chevalier, N., and Brucker-Davis, F. (2013). Bisphenol A: An endocrine and metabolic disruptor. *Ann. Endocrinol.* 74, 211–220.

- Fernandez, M.F., Arrebola, J.P., Taoufiki, J., Navalón, A., Ballesteros, O., Pulgar, R., Vilchez, J.L., and Olea, N. (2007). Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women. *Reprod. Toxicol.* *24*, 259–264.
- Fernández, C., Lobo Md, M. del V.T., Gómez-Coronado, D., and Lasunción, M.A. (2004). Cholesterol is essential for mitosis progression and its deficiency induces polyploid cell formation. *Exp. Cell Res.* *300*, 109–120.
- Ferrell, J.M., and Chiang, J.Y. (2015). Short-term circadian disruption impairs bile acid and lipid homeostasis in mice. *CMGH Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* *1*, 664–677.
- Foryst-Ludwig, A., Clemenz, M., Hohmann, S., Hartge, M., Sprang, C., Frost, N., Krikov, M., Bhanot, S., Barros, R., Morani, A., et al. (2008). Metabolic Actions of Estrogen Receptor Beta (ER $\beta$ ) are Mediated by a Negative Cross-Talk with PPAR $\gamma$ . *PLoS Genet.* *4*, e1000108.
- Frederiksen, H., Skakkebaek, N.E., and Andersson, A.-M. (2007). Metabolism of phthalates in humans. *Mol. Nutr. Food Res.* *51*, 899–911.
- Gangwisch, J.E., Malaspina, D., Boden-Albala, B., and Heymsfield, S.B. (2005). Inadequate sleep as a risk factor for obesity: analyses of the NHANES I. *Sleep* *28*, 1289–1296.
- Gao, H., Fält, S., Sandelin, A., Gustafsson, J.-Å., and Dahlman-Wright, K. (2008). Genome-Wide Identification of Estrogen Receptor  $\alpha$ -Binding Sites in Mouse Liver. *Mol. Endocrinol.* *22*, 10–22.
- Gao, J., He, J., Zhai, Y., Wada, T., and Xie, W. (2009). The constitutive androstane receptor is an anti-obesity nuclear receptor that improves insulin sensitivity. *J. Biol. Chem.* *284*, 25984–25992.
- Gao, Q., Mezei, G., Nie, Y., Rao, Y., Choi, C.S., Bechmann, I., Leranth, C., Toran-Allerand, D., Priest, C.A., Roberts, J.L., et al. (2007). Anorectic estrogen mimics leptin's effect on the rewiring of melanocortin cells and Stat3 signaling in obese animals. *Nat. Med.* *13*, 89–94.
- Gasull, M., Pumarega, J., Téllez-Plaza, M., Castell, C., Tresserras, R., Lee, D.H., and Porta, M. (2012). Blood concentrations of persistent organic pollutants and prediabetes and diabetes in the general population of Catalonia. *Environ. Sci. Technol.* *46*, 7799–7810.
- Gauthier, M.-S., Rabasa-Lhoret, R., Prud'homme, D., Karelis, A.D., Geng, D., van Bavel, B., and Ruzzin, J. (2014). The Metabolically Healthy But Obese Phenotype Is Associated With Lower Plasma Levels of Persistent Organic Pollutants as Compared to the Metabolically Abnormal Obese Phenotype. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *99*, E1061–E1066.
- Gavrilova, O., Haluzik, M., Matsusue, K., Cutson, J.J., Johnson, L., Dietz, K.R., Nicol, C.J., Vinson, C., Gonzalez, F.J., and Reitman, M.L. (2003). Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. *J. Biol. Chem.* *278*, 34268–34276.
- Gery, S., Virk, R.K., Chumakov, K., Yu, A., and Koeffler, H.P. (2007). The clock gene Per2 links the circadian system to the estrogen receptor. *Oncogene* *26*, 7916–7920.
- Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1973). Familial hypercholesterolemia: identification of a defect in the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity associated with overproduction of cholesterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *70*, 2804–2808.

Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2015). A century of cholesterol and coronaries: from plaques to genes to statins. *Cell* *161*, 161–172.

Gore, A.C., Chappell, V.A., Fenton, S.E., Flaws, J.A., Nadal, A., Prins, G.S., Toppari, J., and Zoeller, R.T. (2015). EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocr. Rev.* *36*, E1–E150.

Gout, J., Sarafian, D., Mutel, E., Vigier, M., Rajas, F., Mithieux, G., Begeot, M., and Naville, D. (2010). Metabolic and melanocortin gene expression alterations in male offspring of obese mice. *Mol. Cell. Endocrinol.* *319*, 99–108.

Griffin, M.E., Marcucci, M.J., Cline, G.W., Bell, K., Barucci, N., Lee, D., Goodyear, L.J., Kraegen, E.W., White, M.F., and Shulman, G.I. (1999). Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C  $\theta$  and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* *48*, 1270–1274.

Grün, F., and Blumberg, B. (2009). Minireview: the case for obesogens. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *23*, 1127–1134.

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

Guerre-Millo, M., Rouault, C., Poulain, P., André, J., Poitout, V., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., Fruchart, J.C., Reach, G., and Staels, B. (2001). PPAR- $\alpha$ -null mice are protected from high-fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes* *50*, 2809–2814.

Guo, S. (2013). Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models to disease mechanisms. *J. Endocrinol.*

Gutman, R., Barnea, M., Haviv, L., Chapnik, N., and Froy, O. (2012). Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) activation advances locomotor activity and feeding daily rhythms in mice. *Int. J. Obes.* *2005* *36*, 1131–1134.

Halldorsson, T.I., Rytter, D., Haug, L.S., Bech, B.H., Danielsen, I., Becher, G., Henriksen, T.B., and Olsen, S.F. (2012). Prenatal exposure to perfluorooctanoate and risk of overweight at 20 years of age: a prospective cohort study. *Environ. Health Perspect.* *120*, 668–673.

Hao, C., Cheng, X., Xia, H., and Ma, X. (2012). The endocrine disruptor mono-(2-ethylhexyl) phthalate promotes adipocyte differentiation and induces obesity in mice. *Biosci. Rep.* *32*, 619–629.

Harley, K.G., Aguilar Schall, R., Chevrier, J., Tyler, K., Aguirre, H., Bradman, A., Holland, N.T., Lustig, R.H., Calafat, A.M., and Eskenazi, B. (2013). Prenatal and postnatal bisphenol A exposure and body mass index in childhood in the CHAMACOS cohort. *Environ. Health Perspect.* *121*, 514–520.

Hatch, E.E., Nelson, J.W., Qureshi, M.M., Weinberg, J., Moore, L.L., Singer, M., and Webster, T.F. (2008). Association of urinary phthalate metabolite concentrations with body mass index and waist circumference: a cross-sectional study of NHANES data, 1999-2002. *Environ. Health Glob. Access Sci. Source* *7*, 27.



- He, J., Gao, J., Xu, M., Ren, S., Stefanovic-Racic, M., O'Doherty, R.M., and Xie, W. (2013). PXR ablation alleviates diet-induced and genetic obesity and insulin resistance in mice. *Diabetes* 62, 1876–1887.
- He, W., Barak, Y., Hevener, A., Olson, P., Liao, D., Le, J., Nelson, M., Ong, E., Olefsky, J.M., and Evans, R.M. (2003). Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 15712–15717.
- Heine, P.A., Taylor, J.A., Iwamoto, G.A., Lubahn, D.B., and Cooke, P.S. (2000). Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 12729–12734.
- Henderson, G.C. (2014). Sexual dimorphism in the effects of exercise on metabolism of lipids to support resting metabolism. *Front. Endocrinol.* 5, 162.
- Henriksen, G.L., Ketchum, N.S., Michalek, J.E., and Swaby, J.A. (1997). Serum dioxin and diabetes mellitus in veterans of Operation Ranch Hand. *Epidemiol. Camb. Mass* 8, 252–258.
- Horton, J.D., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H. (2009). PCSK9: a convertase that coordinates LDL catabolism. *J. Lipid Res.* 50, S172–S177.
- Howell, G., and Mangum, L. (2011). Exposure to bioaccumulative organochlorine compounds alters adipogenesis, fatty acid uptake, and adipokine production in NIH3T3-L1 cells. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 25, 394–402.
- Hua, X., Nohturfft, A., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1996). Sterol resistance in CHO cells traced to point mutation in SREBP cleavage-activating protein. *Cell* 87, 415–426.
- Hugo, E.R., Brandebourg, T.D., Woo, J.G., Loftus, J., Alexander, J.W., 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.
- Husse, J., Eichele, G., and Oster, H. (2015). Synchronization of the mammalian circadian timing system: Light can control peripheral clocks independently of the SCN clock: alternate routes of entrainment optimize the alignment of the body's circadian clock network with external time. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 37, 1119–1128.
- Ibrahim, M.M., Fjære, E., Lock, E.-J., Naville, D., Amlund, H., Meugnier, E., Le Magueresse Battistoni, B., Frøyland, L., Madsen, L., Jessen, N., et al. (2011). Chronic Consumption of Farmed Salmon Containing Persistent Organic Pollutants Causes Insulin Resistance and Obesity in Mice. *PLoS ONE* 6, e25170.
- Ishida, A., Mutoh, T., Ueyama, T., Bando, H., Masubuchi, S., Nakahara, D., Tsujimoto, G., and Okamura, H. (2005). Light activates the adrenal gland: timing of gene expression and glucocorticoid release. *Cell Metab.* 2, 297–307.
- Jackson, J.A., Birnbaum, L.S., and Diliberto, J.J. (1998). Effects of age, sex, and pharmacologic agents on the biliary elimination of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in F344 rats. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 26, 714–719.

- Jørgensen, M.E., Borch-Johnsen, K., and Bjerregaard, P. (2008). A cross-sectional study of the association between persistent organic pollutants and glucose intolerance among Greenland Inuit. *Diabetologia* 51, 1416–1422.
- Kershaw, E.E., and Flier, J.S. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 2548–2556.
- Kim, J.K., Michael, M.D., Previs, S.F., Peroni, O.D., Mauvais-Jarvis, F., Neschen, S., Kahn, B.B., Kahn, C.R., and Shulman, G.I. (2000). Redistribution of substrates to adipose tissue promotes obesity in mice with selective insulin resistance in muscle. *J. Clin. Invest.* 105, 1791–1797.
- Klimentidis, Y.C., Beasley, T.M., Lin, H.-Y., Murati, G., Glass, G.E., Guyton, M., Newton, W., Jorgensen, M., Heymsfield, S.B., Kemnitz, J., et al. (2011). Canaries in the coal mine: a cross-species analysis of the plurality of obesity epidemics. *Proc. Biol. Sci.* 278, 1626–1632.
- Koch, H.M., Bolt, H.M., and Angerer, J. (2004). Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) metabolites in human urine and serum after a single oral dose of deuterium-labelled DEHP. *Arch. Toxicol.* 78, 123–130.
- Koch, H.M., Bolt, H.M., Preuss, R., and Angerer, J. (2005). New metabolites of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine and serum after single oral doses of deuterium-labelled DEHP. *Arch. Toxicol.* 79, 367–376.
- Korach-André, M., Parini, P., Larsson, L., Arner, A., Steffensen, K.R., and Gustafsson, J.-A. (2010). Separate and overlapping metabolic functions of LXRalpha and LXRbeta in C57Bl/6 female mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298, E167–178.
- Von Kries, R., Toschke, A.M., Wurmser, H., Sauerwald, T., and Koletzko, B. (2002). Reduced risk for overweight and obesity in 5- and 6-y-old children by duration of sleep--a cross-sectional study. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* 26, 710–716.
- Lahtela, J.T., Arranto, A.J., and Sotaniemi, E.A. (1985). Enzyme inducers improve insulin sensitivity in non-insulin-dependent diabetic subjects. *Diabetes* 34, 911–916.
- Lakind, J.S., Goodman, M., and Naiman, D.Q. (2012). Use of NHANES data to link chemical exposures to chronic diseases: a cautionary tale. *PLoS One* 7, e51086.
- Lang, I.A., Galloway, T.S., Scarlett, A., Henley, W.E., Depledge, M., Wallace, R.B., and Melzer, D. (2008). Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *JAMA* 300, 1303–1310.
- LaRocca, J., Binder, A.M., McElrath, T.F., and Michels, K.B. (2014). The impact of first trimester phthalate and phenol exposure on IGF2/H19 genomic imprinting and birth outcomes. *Environ. Res.* 133, 396–406.
- Lau, P., Fitzsimmons, R.L., Raichur, S., Wang, S.-C.M., Lechtken, A., and Muscat, G.E.O. (2008). The orphan nuclear receptor, RORalpha, regulates gene expression that controls lipid metabolism: staggerer (SG/SG) mice are resistant to diet-induced obesity. *J. Biol. Chem.* 283, 18411–18421.

- Lau, P., Fitzsimmons, R.L., Pearen, M.A., Watt, M.J., and Muscat, G.E.O. (2011). Homozygous staggerer (sg/sg) mice display improved insulin sensitivity and enhanced glucose uptake in skeletal muscle. *Diabetologia* 54, 1169–1180.
- Lee, D.-H., Lee, I.-K., Song, K., Steffes, M., Toscano, W., Baker, B.A., and Jacobs, D.R. (2006). A strong dose-response relation between serum concentrations of persistent organic pollutants and diabetes: results from the National Health and Examination Survey 1999-2002. *Diabetes Care* 29, 1638–1644.
- Lee, D.-H., Steffes, M.W., Sjödin, A., Jones, R.S., Needham, L.L., and Jacobs, D.R. (2010). Low dose of some persistent organic pollutants predicts type 2 diabetes: a nested case-control study. *Environ. Health Perspect.* 118, 1235–1242.
- Lee, D.-H., Lind, P.M., Jacobs, D.R., Salihovic, S., van Bavel, B., and Lind, L. (2011). Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in plasma predict development of type 2 diabetes in the elderly: the prospective investigation of the vasculature in Uppsala Seniors (PIVUS) study. *Diabetes Care* 34, 1778–1784.
- Lee, D.-H., Porta, M., Jacobs, D.R., and Vandenberg, L.N. (2014). Chlorinated Persistent Organic Pollutants, Obesity, and Type 2 Diabetes. *Endocr. Rev.* 35, 557–601.
- Lee, K.-I., Chiang, C.-W., Lin, H.-C., Zhao, J.-F., Li, C.-T., Shyue, S.-K., and Lee, T.-S. (2016). Maternal exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate exposure deregulates blood pressure, adiposity, cholesterol metabolism and social interaction in mouse offspring. *Arch. Toxicol.* 90, 1211–1224.
- Lee, K.Y., Russell, S.J., Ussar, S., Boucher, J., Vernochet, C., Mori, M.A., Smyth, G., Rourk, M., Cederquist, C., Rosen, E.D., et al. (2013). Lessons on conditional gene targeting in mouse adipose tissue. *Diabetes* 62, 864–874.
- Lin, Y., Wei, J., Li, Y., Chen, J., Zhou, Z., Song, L., Wei, Z., Lv, Z., Chen, X., Xia, W., et al. (2011). Developmental exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate impairs endocrine pancreas and leads to long-term adverse effects on glucose homeostasis in the rat. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 301, E527–538.
- Liu, J., Yu, P., Qian, W., Li, Y., Zhao, J., Huan, F., Wang, J., and Xiao, H. (2013). Perinatal bisphenol A exposure and adult glucose homeostasis: identifying critical windows of exposure. *PloS One* 8, e64143.
- Liu, L., Zhang, Y., Chen, N., Shi, X., Tsang, B., and Yu, Y.-H. (2007). Upregulation of myocellular DGAT1 augments triglyceride synthesis in skeletal muscle and protects against fat-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 117, 1679–1689.
- Lovejoy, J.C., Champagne, C.M., de Jonge, L., Xie, H., and Smith, S.R. (2008). Increased visceral fat and decreased energy expenditure during the menopausal transition. *Int. J. Obes.* 2005 32, 949–958.
- Luo, J., Sladek, R., Bader, J.-A., Matthyssen, A., Rossant, J., and Giguère, V. (1997). Placental abnormalities in mouse embryos lacking the orphan nuclear receptor ERR- $\beta$ . *Nature* 388, 778–782.

- Luo, J., Sladek, R., Carrier, J., Bader, J.-A., Richard, D., and Giguère, V. (2003). Reduced Fat Mass in Mice Lacking Orphan Nuclear Receptor Estrogen-Related Receptor  $\alpha$ . *Mol. Cell. Biol.* 23, 7947–7956.
- Ma, D., Liu, T., Chang, L., Rui, C., Xiao, Y., Li, S., Hogenesch, J.B., Chen, Y.E., and Lin, J.D. (2015). The Liver Clock Controls Cholesterol Homeostasis through Trib1 Protein-mediated Regulation of PCSK9/Low Density Lipoprotein Receptor (LDLR) Axis. *J. Biol. Chem.* 290, 31003–31012.
- Le Magueresse-Battistoni, B., Vidal, H., and Naville, D. (2016). Exposition maternelle aux polluants et altération de la santé métabolique à l'âge adulte. *Médecine/sciences* 32, 51–56.
- Manikkam, M., Tracey, R., Guerrero-Bosagna, C., and Skinner, M.K. (2012). Pesticide and insect repellent mixture (permethrin and DEET) induces epigenetic transgenerational inheritance of disease and sperm epimutations. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 34, 708–719.
- Manikkam, M., Tracey, R., Guerrero-Bosagna, C., and Skinner, M.K. (2013). Plastics Derived Endocrine Disruptors (BPA, DEHP and DBP) Induce Epigenetic Transgenerational Inheritance of Obesity, Reproductive Disease and Sperm Epimutations. *PLOS ONE* 8, e55387.
- De Marinis, E., Martini, C., Trentalancia, A., and Pallottini, V. (2008). Sex differences in hepatic regulation of cholesterol homeostasis. *J. Endocrinol.* 198, 635–643.
- Marmugi, A., Ducheix, S., Lasserre, F., Polizzi, A., Paris, A., Priymenko, N., Bertrand-Michel, J., Pineau, T., Guillou, H., Martin, P.G.P., et al. (2012). Low doses of bisphenol A induce gene expression related to lipid synthesis and trigger triglyceride accumulation in adult mouse liver. *Hepatol. Baltim. Md* 55, 395–407.
- Marmugi, A., Lasserre, F., Beuzelin, D., Ducheix, S., Huc, L., Polizzi, A., Chetivaux, M., Pineau, T., Martin, P., Guillou, H., et al. (2014). Adverse effects of long-term exposure to bisphenol A during adulthood leading to hyperglycaemia and hypercholesterolemia in mice. *Toxicology* 325, 133–143.
- Masuzaki, H., Paterson, J., Shinyama, H., Morton, N.M., Mullins, J.J., Seckl, J.R., and Flier, J.S. (2001). A Transgenic Model of Visceral Obesity and the Metabolic Syndrome. *Science* 294, 2166–2170.
- Matic, M., Bryzgalova, G., Gao, H., Antonson, P., Humire, P., Omoto, Y., Portwood, N., Pramfalk, C., Efendic, S., Berggren, P.-O., et al. (2013). Estrogen signalling and the metabolic syndrome: targeting the hepatic estrogen receptor alpha action. *PloS One* 8, e57458.
- Maudelonde, T., Solassol, J., Boulle, N., and Rey, J.-M. (2005). SERM et ciblages thérapeutiques: l'exemple du sein. *Médecine Thérapeutique* médecine Reprod. 7, 109–117.
- Mauvais-Jarvis, F. (2015). Sex differences in metabolic homeostasis, diabetes, and obesity. *Biol. Sex Differ.* 6.
- Mauvais-Jarvis, F., Clegg, D.J., and Hevener, A.L. (2013). The Role of Estrogens in Control of Energy Balance and Glucose Homeostasis. *Endocr. Rev.* 34, 309–338.

- Melzer, D., Rice, N.E., Lewis, C., Henley, W.E., and Galloway, T.S. (2010). Association of urinary bisphenol a concentration with heart disease: evidence from NHANES 2003/06. *PLoS One* 5, e8673.
- La Merrill, M., Emond, C., and Kim, M. (2012). Toxicological Function of Adipose Tissue: Focus on Persistent Organic Pollutants. *Environ. Health Perspect.* 121, 162–169.
- Michalik, L., and Wahli, W. (2007). Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in skin health, repair and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1771, 991–998.
- Milbrath, M.O., Wenger, Y., Chang, C.-W., Emond, C., Garabrant, D., Gillespie, B.W., and Jolliet, O. (2009). Apparent half-lives of dioxins, furans, and polychlorinated biphenyls as a function of age, body fat, smoking status, and breast-feeding. *Environ. Health Perspect.* 117, 417–425.
- Montague, C.T., Farooqi, I.S., Whitehead, J.P., Soos, M.A., Rau, H., Wareham, N.J., Sewter, C.P., Digby, J.E., Mohammed, S.N., Hurst, J.A., et al. (1997). Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 387, 903–908.
- Montes-Grajales, D., and Olivero-Verbel, J. (2013). Computer-aided identification of novel protein targets of bisphenol A. *Toxicol. Lett.* 222, 312–320.
- Moreau, A., Vilarem, M.J., Maurel, P., and Pascussi, J.M. (2008). Xenoreceptors CAR and PXR activation and consequences on lipid metabolism, glucose homeostasis, and inflammatory response. *Mol. Pharm.* 5, 35–41.
- Moreno-Aliaga, M.J., and Matsumura, F. (1999). Endrin inhibits adipocyte differentiation by selectively altering expression pattern of CCAAT/enhancer binding protein- $\alpha$  in 3T3-L1 cells. *Mol. Pharmacol.* 56, 91–101.
- Moreno-Aliaga, M.J., 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.
- Morishima, A., Grumbach, M.M., Simpson, E.R., Fisher, C., and Qin, K. (1995). Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80, 3689–3698.
- Moriyama, K., Tagami, T., Akamizu, T., Usui, T., Saijo, M., Kanamoto, N., Hataya, Y., Shimatsu, A., Kuzuya, H., and Nakao, K. (2002). Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 5185–5190.
- Motamed, M., Zhang, Y., Wang, M.L., Seemann, J., Kwon, H.J., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2011). Identification of luminal Loop 1 of Scap protein as the sterol sensor that maintains cholesterol homeostasis. *J. Biol. Chem.* 286, 18002–18012.
- Myre, M., and Imbeault, P. (2014). Persistent organic pollutants meet adipose tissue hypoxia: does cross-talk contribute to inflammation during obesity?: POP and hypoxia cross-talk. *Obes. Rev.* 15, 19–28.
- Nakamura, K., Moore, R., Negishi, M., and Sueyoshi, T. (2007). Nuclear pregnane X receptor cross-talk with FoxA2 to mediate drug-induced regulation of lipid metabolism in fasting mouse liver. *J. Biol. Chem.* 282, 9768–9776.

Nakamura, T., Ito, Y., Yanagiba, Y., Ramdhan, D.H., Kono, Y., Naito, H., Hayashi, Y., Li, Y., Aoyama, T., Gonzalez, F.J., et al. (2009). Microgram-order ammonium perfluorooctanoate may activate mouse peroxisome proliferator-activated receptor alpha, but not human PPARalpha. *Toxicology* 265, 27–33.

NCD Risk Factor Collaboration (2016). Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. *Lancet Lond. Engl.* 387, 1513–1530.

Nestor, C.C., Kelly, M.J., and Rønnekleiv, O.K. (2014). Cross-talk between reproduction and energy homeostasis: central impact of estrogens, leptin and kisspeptin signaling. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* 17, 109–128.

Newbold, R.R., Padilla-Banks, E., Snyder, R.J., and Jefferson, W.N. (2005). Developmental exposure to estrogenic compounds and obesity. *Birt. Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* 73, 478–480.

Nguyen, T.T., Mattick, J.S., Yang, Q., Orman, M.A., Ierapetritou, M.G., Berthiaume, F., and Androulakis, I.P. (2014). Bioinformatics analysis of transcriptional regulation of circadian genes in rat liver. *BMC Bioinformatics* 15, 83.

Nohara, K., Zhang, Y., Waraich, R.S., Laque, A., Tiano, J.P., Tong, J., Münzberg, H., and Mauvais-Jarvis, F. (2011). Early-life exposure to testosterone programs the hypothalamic melanocortin system. *Endocrinology* 152, 1661–1669.

Norris, A.W., Chen, L., Fisher, S.J., Szanto, I., Ristow, M., Jozsi, A.C., Hirshman, M.F., Rosen, E.D., Goodyear, L.J., Gonzalez, F.J., et al. (2003). Muscle-specific PPARgamma-deficient mice develop increased adiposity and insulin resistance but respond to thiazolidinediones. *J. Clin. Invest.* 112, 608–618.

Nunez, A.A., Kannan, K., Giesy, J.P., Fang, J., and Clemens, L.G. (2001). Effects of Bisphenol A on energy balance and accumulation in brown adipose tissue in rats. *Chemosphere* 42, 917–922.

Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., et al. (2003). Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* 423, 545–550.

Oosterman, J.E., Kalsbeek, A., la Fleur, S.E., and Belsham, D.D. (2015). Impact of nutrients on circadian rhythmicity. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 308, R337–350.

Pajvani, U.B., Qiang, L., Kangsamaksin, T., Kitajewski, J., Ginsberg, H.N., and Accili, D. (2013). Inhibition of Notch uncouples Akt activation from hepatic lipid accumulation by decreasing mTorc1 stability. *Nat. Med.* 19, 1054–1060.

Pal, D., Dasgupta, S., Kundu, R., Maitra, S., Das, G., Mukhopadhyay, S., Ray, S., Majumdar, S.S., and Bhattacharya, S. (2012). Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. *Nat. Med.* 18, 1279–1285.

Pang, C., Gao, Z., Yin, J., Zhang, J., Jia, W., and Ye, J. (2008). Macrophage infiltration into adipose tissue may promote angiogenesis for adipose tissue remodeling in obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295, E313–322.

- Parini, P., Angelin, B., Stavr us-Evers, A., Freyschuss, B., Eriksson, H., and Rudling, M. (2000). Biphasic Effects of the Natural Estrogen 17 $\beta$ -Estradiol on Hepatic Cholesterol Metabolism in Intact Female Rats. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *20*, 1817–1823.
- Pascussi, J.-M., Gerbal-Chaloin, S., Duret, C., Daujat-Chavanieu, M., Vilarem, M.-J., 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.
- Peet, D.J., Turley, S.D., Ma, W., Janowski, B.A., Lobaccaro, J.M., Hammer, R.E., and Mangelsdorf, D.J. (1998). Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* *93*, 693–704.
- Phillips, M.C. (2014). Molecular mechanisms of cellular cholesterol efflux. *J. Biol. Chem.* *289*, 24020–24029.
- Phillips, M., Enan, E., Liu, P.C., 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.
- Pirola, L., Johnston, A.M., and Van Obberghen, E. (2004). Modulation of insulin action. *Diabetologia* *47*, 170–184.
- Popineau, L., Morzyglod, L., Carr , N., Ca zac, M., Bossard, P., Prip-Buus, C., Lenoir, V., Ragazzon, B., Fauveau, V., Robert, L., et al. (2016). Novel Grb14-Mediated Cross Talk between Insulin and p62/Nrf2 Pathways Regulates Liver Lipogenesis and Selective Insulin Resistance. *Mol. Cell. Biol.* *36*, 2168–2181.
- Pottenger, L.H., Domoradzki, J.Y., Markham, D.A., Hansen, S.C., Cagen, S.Z., and Waechter, J.M. (2000). The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* *54*, 3–18.
- Quesada, I., Fuentes, E., Viso-Le n, M.C., Soria, B., Ripoll, C., and Nadal, A. (2002). Low doses of the endocrine disruptor bisphenol-A and the native hormone 17beta-estradiol rapidly activate transcription factor CREB. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *16*, 1671–1673.
- Ramirez, M.E., McMurry, M.P., Wiebke, G.A., Felten, K.J., Ren, K., Meikle, A.W., and Iverius, P.H. (1997). Evidence for sex steroid inhibition of lipoprotein lipase in men: comparison of abdominal and femoral adipose tissue. *Metabolism.* *46*, 179–185.
- Reinke, H., and Asher, G. (2016). Circadian Clock Control of Liver Metabolic Functions. *Gastroenterology* *150*, 574–580.
- Ren, H., Aleksunes, L.M., Wood, C., Vallanat, B., George, M.H., Klaassen, C.D., and Corton, J.C. (2010). Characterization of peroxisome proliferator-activated receptor alpha--independent effects of PPARalpha activators in the rodent liver: di-(2-ethylhexyl) phthalate also activates the constitutive-activated receptor. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* *113*, 45–59.
- Repa, J.J., Berge, K.E., Pomajzl, C., Richardson, J.A., Hobbs, H., and Mangelsdorf, D.J. (2002). Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J. Biol. Chem.* *277*, 18793–18800.

- Rhee, J.-S., Kim, B.-M., Lee, B.-Y., Hwang, U.-K., Lee, Y.S., and Lee, J.-S. (2014). Cloning of circadian rhythmic pathway genes and perturbation of oscillation patterns in endocrine disrupting chemicals (EDCs)-exposed mangrove killifish *Kryptolebias marmoratus*. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol. CBP* *164*, 11–20.
- Riant, E., Waget, A., Cogo, H., Arnal, J.-F., Burcelin, R., and Gourdy, P. (2009). Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. *Endocrinology* *150*, 2109–2117.
- Ribas, V., Nguyen, M.T.A., Henstridge, D.C., Nguyen, A.-K., Beaven, S.W., Watt, M.J., and Hevener, A.L. (2010). Impaired oxidative metabolism and inflammation are associated with insulin resistance in ER $\alpha$ -deficient mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *298*, E304–319.
- Ribas, V., Drew, B.G., Zhou, Z., Phun, J., Kalajian, N.Y., Soleymani, T., Daraei, P., Widjaja, K., Wanagat, J., de Aguiar Vallim, T.Q., et al. (2016). Skeletal muscle action of estrogen receptor  $\alpha$  is critical for the maintenance of mitochondrial function and metabolic homeostasis in females. *Sci. Transl. Med.* *8*, 334ra54.
- Rieusset, J. (2015). Contribution of mitochondria and endoplasmic reticulum dysfunction in insulin resistance: Distinct or interrelated roles? *Diabetes Metab.* *41*, 358–368.
- Rignell-Hydbom, A., Lidfeldt, J., Kiviranta, H., Rantakokko, P., Samsioe, G., Agardh, C.-D., and Rylander, L. (2009). Exposure to p,p'-DDE: a risk factor for type 2 diabetes. *PloS One* *4*, e7503.
- Romeo, G.R., Lee, J., and Shoelson, S.E. (2012). Metabolic syndrome, insulin resistance, and roles of inflammation--mechanisms and therapeutic targets. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *32*, 1771–1776.
- Roseboom, T.J., van der Meulen, J.H., Ravelli, A.C., Osmond, C., Barker, D.J., and Bleker, O.P. (2001). Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. *Mol. Cell. Endocrinol.* *185*, 93–98.
- Lee-Rueckert, M., Escola-Gil, J.C., and Kovanen, P.T. (2016). HDL functionality in reverse cholesterol transport - Challenges in translating data emerging from mouse models to human disease. *Biochim. Biophys. Acta* *1861*, 566–583.
- Ruzzin, J., Petersen, R., Meugnier, E., Madsen, L., Lock, E.-J., Lillefosse, H., Ma, T., Pesenti, S., Sonne, S.B., Marstrand, T.T., et al. (2010). Persistent organic pollutant exposure leads to insulin resistance syndrome. *Environ. Health Perspect.* *118*, 465–471.
- Vom Saal, F.S., Nagel, S.C., Coe, B.L., Angle, B.M., and Taylor, J.A. (2012). The estrogenic endocrine disrupting chemical bisphenol A (BPA) and obesity. *Mol. Cell. Endocrinol.* *354*, 74–84.
- Sakai, J., Nohturfft, A., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1998). Cleavage of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) at site-1 requires interaction with SREBP cleavage-activating protein. Evidence from in vivo competition studies. *J. Biol. Chem.* *273*, 5785–5793.



- Sargis, R.M., Johnson, D.N., Choudhury, R.A., and Brady, M.J. (2010). Environmental endocrine disruptors promote adipogenesis in the 3T3-L1 cell line through glucocorticoid receptor activation. *Obes. Silver Spring Md* 18, 1283–1288.
- Sato, M., Murakami, M., Node, K., Matsumura, R., and Akashi, M. (2014). The Role of the Endocrine System in Feeding-Induced Tissue-Specific Circadian Entrainment. *Cell Rep.* 8, 393–401.
- Sato, S., Shirakawa, H., Tomita, S., Ohsaki, Y., Haketa, K., Tooi, O., Santo, N., Tohkin, M., Furukawa, Y., Gonzalez, F.J., et al. (2008). Low-dose dioxins alter gene expression related to cholesterol biosynthesis, lipogenesis, and glucose metabolism through the aryl hydrocarbon receptor-mediated pathway in mouse liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 229, 10–19.
- Schmitt, J., Kong, B., Stieger, B., Tschopp, O., Schultze, S.M., Rau, M., Weber, A., Müllhaupt, B., Guo, G.L., and Geier, A. (2015). Protective effects of farnesoid X receptor (FXR) on hepatic lipid accumulation are mediated by hepatic FXR and independent of intestinal FGF15 signal. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* 35, 1133–1144.
- Schuster, G.U., Parini, P., Wang, L., Alberti, S., Steffensen, K.R., Hansson, G.K., Angelin, B., and Gustafsson, J.-A. (2002). Accumulation of foam cells in liver X receptor-deficient mice. *Circulation* 106, 1147–1153.
- Seckl, J.R. (2004). 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases: changing glucocorticoid action. *Curr. Opin. Pharmacol.* 4, 597–602.
- Silver, M.K., O'Neill, M.S., Sowers, M.R., and Park, S.K. (2011). Urinary bisphenol A and type-2 diabetes in U.S. adults: data from NHANES 2003-2008. *PLoS One* 6, e26868.
- Skinner, M.K. (2014). Endocrine disruptor induction of epigenetic transgenerational inheritance of disease. *Mol. Cell. Endocrinol.* 398, 4–12.
- Skinner, M.K., Manikkam, M., Tracey, R., Guerrero-Bosagna, C., Haque, M., and Nilsson, E.E. (2013). Ancestral dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) exposure promotes epigenetic transgenerational inheritance of obesity. *BMC Med.* 11, 228.
- Smith, E.P., Boyd, J., Frank, G.R., Takahashi, H., Cohen, R.M., Specker, B., Williams, T.C., Lubahn, D.B., and Korach, K.S. (1994). Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N. Engl. J. Med.* 331, 1056–1061.
- Song, Y., Chou, E.L., Baecker, A., You, N.-C.Y., Song, Y., Sun, Q., and Liu, S. (2015). Endocrine-Disrupting Chemicals, Risk of Type 2 Diabetes, and Diabetes-Related Metabolic Traits: A Systematic Review and Meta-analysis: Endocrine-disrupting chemicals and type 2 diabetes. *J. Diabetes* n/a–n/a.
- Soriano, S., Alonso-Magdalena, P., García-Arévalo, M., Novials, A., Muhammed, S.J., Salehi, A., Gustafsson, J.-A., Quesada, I., and Nadal, A. (2012). Rapid insulinotropic action of low doses of bisphenol-A on mouse and human islets of Langerhans: role of estrogen receptor  $\beta$ . *PLoS One* 7, e31109.
- Stahlhut, R.W., van Wijngaarden, E., Dye, T.D., Cook, S., and Swan, S.H. (2007). Concentrations of urinary phthalate metabolites are associated with increased waist

circumference and insulin resistance in adult U.S. males. *Environ. Health Perspect.* *115*, 876–882.

Strissel, K.J., Stancheva, Z., Miyoshi, H., Perfield, J.W., DeFuria, J., Jick, Z., Greenberg, A.S., and Obin, M.S. (2007). Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes* *56*, 2910–2918.

Sugathan, A., and Waxman, D.J. (2013). Genome-wide analysis of chromatin states reveals distinct mechanisms of sex-dependent gene regulation in male and female mouse liver. *Mol. Cell. Biol.* *33*, 3594–3610.

Sui, Y., Ai, N., Park, S.-H., Rios-Pilier, J., Perkins, J.T., Welsh, W.J., and Zhou, C. (2012). Bisphenol A and Its Analogues Activate Human Pregnane X Receptor. *Environ. Health Perspect.* *120*, 399–405.

Sui, Y., Park, S.-H., Helsley, R.N., Sunkara, M., Gonzalez, F.J., Morris, A.J., and Zhou, C. (2014). Bisphenol A increases atherosclerosis in pregnane X receptor-humanized ApoE deficient mice. *J. Am. Heart Assoc.* *3*, e000492.

Sun, L.-P., Seemann, J., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2007). Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Insig renders sorting signal in Scap inaccessible to COPII proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 6519–6526.

Sun, Q., Cornelis, M.C., Townsend, M.K., Tobias, D.K., Eliassen, A.H., Franke, A.A., Hauser, R., and Hu, F.B. (2014). Association of urinary concentrations of bisphenol A and phthalate metabolites with risk of type 2 diabetes: a prospective investigation in the Nurses' Health Study (NHS) and NHSII cohorts. *Environ. Health Perspect.* *122*, 616–623.

Tanaka, T., Morita, A., Kato, M., Hirai, T., Mizoue, T., Terauchi, Y., Watanabe, S., Noda, M., and SCOP Study Group (2011). Congener-specific polychlorinated biphenyls and the prevalence of diabetes in the Saku Control Obesity Program (SCOP). *Endocr. J.* *58*, 589–596.

Tang-Péronard, J.L., Heitmann, B.L., Andersen, H.R., Steuerwald, U., Grandjean, P., Weihe, P., and Jensen, T.K. (2014). Association between prenatal polychlorinated biphenyl exposure and obesity development at ages 5 and 7 y: a prospective cohort study of 656 children from the Faroe Islands. *Am. J. Clin. Nutr.* *99*, 5–13.

Tang-Péronard, J.L., Heitmann, B.L., Jensen, T.K., Vinggaard, A.M., Madsbad, S., Steuerwald, U., Grandjean, P., Weihe, P., Nielsen, F., and Andersen, H.R. (2015). Prenatal exposure to persistent organochlorine pollutants is associated with high insulin levels in 5-year-old girls. *Environ. Res.* *142*, 407–413.

Taxvig, C., Dreisig, K., Boberg, J., Nellemann, C., Schelde, A.B., Pedersen, D., Boergesen, M., Mandrup, S., and Vinggaard, A.M. (2012). Differential effects of environmental chemicals and food contaminants on adipogenesis, biomarker release and PPAR $\gamma$  activation. *Mol. Cell. Endocrinol.* *361*, 106–115.

Taylor, K.W., Novak, R.F., Anderson, H.A., Birnbaum, L.S., Blystone, C., Devito, M., Jacobs, D., Köhrle, J., Lee, D.-H., Rylander, L., et al. (2013). Evaluation of the association between persistent organic pollutants (POPs) and diabetes in epidemiological studies: a national toxicology program workshop review. *Environ. Health Perspect.* *121*, 774–783.

- Teitelbaum, S.L., Mervish, N., Moshier, E.L., Vangeepuram, N., Galvez, M.P., Calafat, A.M., Silva, M.J., Brenner, B.L., and Wolff, M.S. (2012). Associations between phthalate metabolite urinary concentrations and body size measures in New York City children. *Environ. Res.* *112*, 186–193.
- Tessier, S., Riesco, E., Lacaille, M., Pérusse, F., Weisnagel, J., Doré, J., and Mauriège, P. (2010). Impact of walking on adipose tissue lipoprotein lipase activity and expression in pre- and postmenopausal women. *Obes. Facts* *3*, 191–199.
- Thayer, K.A., Doerge, D.R., Hunt, D., Schurman, S.H., Twaddle, N.C., Churchwell, M.I., Garantziotis, S., Kissling, G.E., Easterling, M.R., Bucher, J.R., et al. (2015). Pharmacokinetics of bisphenol A in humans following a single oral administration. *Environ. Int.* *83*, 107–115.
- Tischkau, S.A., Jaeger, C.D., and Krager, S.L. (2011). Circadian clock disruption in the mouse ovary in response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol. Lett.* *201*, 116–122.
- Tohmé, M., Prud'homme, S.M., Boulahtouf, A., Samarut, E., Brunet, F., Bernard, L., Bourguet, W., Gibert, Y., Balaguer, P., and Laudet, V. (2014). Estrogen-related receptor  $\gamma$  is an in vivo receptor of bisphenol A. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *28*, 3124–3133.
- Trasande, L., Attina, T.M., and Blustein, J. (2012). Association between urinary bisphenol A concentration and obesity prevalence in children and adolescents. *JAMA* *308*, 1113–1121.
- Turek, F.W., Joshu, C., Kohsaka, A., Lin, E., Ivanova, G., McDearmon, E., Laposky, A., Losee-Olson, S., Easton, A., Jensen, D.R., et al. (2005). Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science* *308*, 1043–1045.
- Turnbaugh, P.J., Ridaura, V.K., Faith, J.J., Rey, F.E., Knight, R., and Gordon, J.I. (2009). The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci. Transl. Med.* *1*, 6ra14.
- Uysal, K.T., Wiesbrock, S.M., Marino, M.W., and Hotamisligil, G.S. (1997). Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- $\alpha$  function. *Nature* *389*, 610–614.
- Vague, J. (1947). La différenciation sexuelle; facteur déterminant des formes de l'obésité. *Presse Médicale* *55*, 339.
- Valentino, R., D'Esposito, V., Passaretti, F., Liotti, A., Cabaro, S., Longo, M., Perruolo, G., Oriente, F., Beguinot, F., and Formisano, P. (2013). Bisphenol-A impairs insulin action and up-regulates inflammatory pathways in human subcutaneous adipocytes and 3T3-L1 cells. *PloS One* *8*, e82099.
- Vandenberg, L.N., Colborn, T., Hayes, T.B., Heindel, J.J., Jacobs, D.R., Lee, D.-H., Shioda, T., Soto, A.M., vom Saal, F.S., Welshons, W.V., et al. (2012). Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocr. Rev.* *33*, 378–455.
- Wada, T., Gao, J., and Xie, W. (2009). PXR and CAR in energy metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* *TEM* *20*, 273–279.

- Wade, G.N. (1972). Gonadal hormones and behavioral regulation of body weight. *Physiol. Behav.* *8*, 523–534.
- Wahlang, B., Falkner, K.C., Gregory, B., Ansert, D., Young, D., Conklin, D.J., Bhatnagar, A., McClain, C.J., and Cave, M. (2013). Polychlorinated biphenyl 153 is a diet-dependent obesogen that worsens nonalcoholic fatty liver disease in male C57BL6/J mice. *J. Nutr. Biochem.* *24*, 1587–1595.
- Wang, S.-L., Tsai, P.-C., Yang, C.-Y., and Guo, Y.L. (2008). Increased risk of diabetes and polychlorinated biphenyls and dioxins: a 24-year follow-up study of the Yucheng cohort. *Diabetes Care* *31*, 1574–1579.
- Wang, T., Li, M., Chen, B., Xu, M., Xu, Y., Huang, Y., Lu, J., Chen, Y., Wang, W., Li, X., et al. (2012). Urinary bisphenol A (BPA) concentration associates with obesity and insulin resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *97*, E223–227.
- Wauthier, V., and Waxman, D.J. (2008). Sex-Specific Early Growth Hormone Response Genes in Rat Liver. *Mol. Endocrinol.* *22*, 1962–1974.
- Waxman, D.J., and O'Connor, C. (2006). Growth hormone regulation of sex-dependent liver gene expression. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *20*, 2613–2629.
- Wei, J., Lin, Y., Li, Y., Ying, C., Chen, J., Song, L., Zhou, Z., Lv, Z., Xia, W., Chen, X., et al. (2011). Perinatal Exposure to Bisphenol A at Reference Dose Predisposes Offspring to Metabolic Syndrome in Adult Rats on a High-Fat Diet. *Endocrinology* *152*, 3049–3061.
- Wu, B., Zhang, Y., Kong, J., Zhang, X., and Cheng, S. (2009). In silico predication of nuclear hormone receptors for organic pollutants by homology modeling and molecular docking. *Toxicol. Lett.* *191*, 69–73.
- Wu, H., Bertrand, K.A., Choi, A.L., Hu, F.B., Laden, F., Grandjean, P., and Sun, Q. (2013). Persistent organic pollutants and type 2 diabetes: a prospective analysis in the nurses' health study and meta-analysis. *Environ. Health Perspect.* *121*, 153–161.
- Xu, C.-X., Krager, S.L., Liao, D.-F., and Tischkau, S.A. (2010). Disruption of CLOCK-BMAL1 transcriptional activity is responsible for aryl hydrocarbon receptor-mediated regulation of Period1 gene. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* *115*, 98–108.
- Xu, Y., Nedungadi, T.P., Zhu, L., Sobhani, N., Irani, B.G., Davis, K.E., Zhang, X., Zou, F., Gent, L.M., Hahner, L.D., et al. (2011). Distinct hypothalamic neurons mediate estrogenic effects on energy homeostasis and reproduction. *Cell Metab.* *14*, 453–465.
- Yamada, M., Nagatomo, J., Setoguchi, Y., Kuroki, N., Higashi, S., and Setoguchi, T. (2000). Circadian rhythms of sterol 12alpha-hydroxylase, cholesterol 7alpha-hydroxylase and DBP involved in rat cholesterol catabolism. *Biol. Chem.* *381*, 1149–1153.
- Yu, C., Chen, Y., Cline, G.W., Zhang, D., Zong, H., Wang, Y., Bergeron, R., Kim, J.K., Cushman, S.W., Cooney, G.J., et al. (2002). Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J. Biol. Chem.* *277*, 50230–50236.
- Zaid, A., Roubtsova, A., Essalmani, R., Marcinkiewicz, J., Chamberland, A., Hamelin, J., Tremblay, M., Jacques, H., Jin, W., Davignon, J., et al. (2008). Proprotein convertase

subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration. *Hepatology*. Baltimore, Md 48, 646–654.

Zhang, L., Reue, K., Fong, L.G., Young, S.G., and Tontonoz, P. (2012). Feedback regulation of cholesterol uptake by the LXR-IDOL-LDLR axis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 2541–2546.

Zhang, L., Nichols, R.G., Correll, J., Murray, I.A., Tanaka, N., Smith, P.B., Hubbard, T.D., Sebastian, A., Albert, I., Hatzakis, E., et al. (2015). Persistent Organic Pollutants Modify Gut Microbiota-Host Metabolic Homeostasis in Mice Through Aryl Hydrocarbon Receptor Activation. *Environ. Health Perspect.* 123, 679–688.

Zhang, Y., Laz, E.V., and Waxman, D.J. (2011a). Dynamic, Sex-Differential STAT5 and BCL6 Binding to Sex-Biased, Growth Hormone-Regulated Genes in Adult Mouse Liver. *Mol. Cell. Biol.* 32, 880–896.

Zhang, Y., Klein, K., Sugathan, A., Nassery, N., Dombkowski, A., Zanger, U.M., and Waxman, D.J. (2011b). Transcriptional profiling of human liver identifies sex-biased genes associated with polygenic dyslipidemia and coronary artery disease. *PLoS One* 6, e23506.

Zhou, C., Verma, S., and Blumberg, B. (2009). The steroid and xenobiotic receptor (SXR), beyond xenobiotic metabolism. *Nucl. Recept. Signal.* 7, e001.

Zhou, J., Zhai, Y., Mu, Y., Gong, H., Uppal, H., Toma, D., Ren, S., Evans, R.M., and Xie, W. (2006). A novel pregnane X receptor-mediated and sterol regulatory element-binding protein-independent lipogenic pathway. *J. Biol. Chem.* 281, 15013–15020.

Zoeller, R.T., Bansal, R., and Parris, C. (2005). Bisphenol-A, an environmental contaminant that acts as a thyroid hormone receptor antagonist in vitro, increases serum thyroxine, and alters RC3/neurogranin expression in the developing rat brain. *Endocrinology* 146, 607–612.

# Annexes

# Annexe 1 : Liste des résumés des présentations

---

## **L'impact d'un cocktail de polluants alimentaires faiblement dosés dépend du sexe et du régime alimentaire. Etude dans un modèle murin.**

Emmanuel Labaronne, Nathalie Vega, Claudie Pinteur, Hubert Vidal, Danielle Naville, Brigitte Le Magueresse-Battistoni

INSERM U1060 CarMeN, Université de Lyon 1, INRA UMR 1235, F-69921 Oullins

**Introduction :** Des travaux de la littérature suggèrent l'implication des contaminants environnementaux dans l'épidémie d'obésité et l'incidence du diabète. Notre laboratoire a montré récemment que chez des souris rendues obèses par l'alimentation, une exposition chronique à un cocktail de polluants alimentaires faiblement dosés induisait des altérations métaboliques dépendantes du sexe (Naville et al., FASEB Journal 2013). Dans l'étude présentée ici, nous analysons les conséquences métaboliques du même cocktail de polluants sur des souris non-obèses.

**Méthodes :** Des souris C57Bl6/J sont nourries toute leur vie (depuis la préconception chez les mères) avec une alimentation standard additionnée (STP) ou non (ST0) du mélange des 4 polluants (2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine, PCB153, diéthylhexyl-phthalate, BisphénolA). Le statut métabolique et l'expression de gènes cibles précédemment identifiés dans le foie de souris obèses (i.e., métabolisme du cholestérol chez les mâles et signalisation estrogénique chez les femelles) sont étudiés sur les souris non-obèses de 12 semaines.

**Résultats :** Le phénotype (poids, statut métabolique) des souris STP est comparable à celui des souris ST0, hors une élévation significative de la glycémie à jeun chez les mâles (événement non observé en contexte d'obésité). Au niveau hépatique, les gènes du métabolisme du cholestérol ne sont pas altérés chez les mâles STP. Chez les femelles STP, nous observons une diminution significative de l'expression du récepteur-alpha des estrogènes (ER $\alpha$ ; mRNA et protéines) en comparaison des femelles ST0. Cependant, ER $\alpha$  est le seul gène trouvé altéré chez les femelles STP parmi les gènes de la signalisation estrogénique identifiés comme cibles des polluants chez des souris obèses.

**Conclusion :** L'exposition chronique à un cocktail de polluants alimentaires faiblement dosés entraîne des effets dépendants du sexe et de la qualité du régime alimentaire. Il est intéressant de noter que la diminution d'ER $\alpha$  chez les femelles est observée dans les 2 conditions de régime alimentaire (standard et gras).

**L'impact d'un cocktail de polluants alimentaires faiblement dosés dépend du sexe et du régime alimentaire. Etude dans un modèle murin.**

Emmanuel Labaronne, Nathalie Vega, Claudie Pinteur, Hubert Vidal, Danielle Naville, Brigitte Le Moigneresse-Rattistoni

INSERM U1060 CarMeN, Université de Lyon 1, INRA UMR 1235, F-69921 Oullins

**Introduction :** Des travaux de la littérature suggèrent l'implication des contaminants environnementaux dans l'épidémie d'obésité et l'incidence du diabète. Notre laboratoire a montré récemment que chez des souris rendues obèses par l'alimentation, une exposition chronique à un cocktail de polluants alimentaires faiblement dosés induisait des altérations métaboliques dépendantes du sexe (Naville et al., FASEB Journal 2013). Dans l'étude présentée ici, nous analysons les conséquences métaboliques du même cocktail de polluants sur des souris non-obèses.

**Méthodes :** Des souris C57Bl6/J sont nourries toute leur vie (depuis la préconception chez les mères) avec une alimentation standard additionnée (STP) ou non (ST0) du mélange des 4 polluants (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine, PCB153, diethylhexyl-phthalate, Bisphenol A). Le statut métabolique et l'expression de gènes cibles précédemment identifiés dans le foie de souris obèses (i.e., métabolisme du cholestérol chez les mâles et signalisation estrogénique chez les femelles) sont étudiés sur les souris non-obèses de 12 semaines.

**Résultats :** Le phénotype (poids, statut métabolique) des souris STP est comparable à celui des souris ST0, hors une élévation significative de la glycémie à jeun chez les mâles (événement non observé en contexte d'obésité). Au niveau hépatique, les gènes du métabolisme du cholestérol ne sont pas altérés chez les mâles STP. Chez les femelles STP, nous observons une diminution significative de l'expression du récepteur-alpha des estrogènes (ER $\alpha$ ; mRNA et protéines) en comparaison des femelles ST0. Cependant, ER $\alpha$  est le seul gène trouvé altéré chez les femelles STP parmi les gènes de la signalisation estrogénique identifiés comme cibles des polluants chez des souris obèses.



## Metabolic Outcome of Female Mice Exposed to a Mixture of Low-Dose Pollutants in a Diet-Induced Obesity Model

Emmanuel Labaronne<sup>☉</sup>, Danielle Naville<sup>☉</sup>, Nathalie Vega<sup>‡</sup>, Claudie Pinteur<sup>‡</sup>, Emmanuelle Canet-Soulas, Hubert Vidal, Brigitte Le Magueresse-Battistoni<sup>\*</sup>

CarMeN Laboratory, INSERM U1060, Lyon-1 University, INRA UMR1397, INSA-Lyon, Oullins, France

☉ These authors contributed equally to this work; ‡ These authors also contributed equally to this work.

Pollutants are suspected to contribute to the etiology of obesity and related metabolic disorders. Apart from occupational exposure which concerns a subset of chemicals, humans are mostly exposed to a large variety of chemicals, all life-long and at low doses. Food ingestion is a major route of exposure and it is suggested that pollutants have a worsened impact when combined with a high-fat diet. In the experimental studies described herein, we aimed to add further evidence on the metabolic impact of food pollutants using a recently set up model in which mice are life-long fed a high-fat/high-sucrose diet (HFSD) with/without common food pollutants shown to exhibit metabolic disrupting activities. Specifically, this mixture comprised bisphenol A, dioxin, polychlorobiphenyl PCB153, and phthalate and was added in HFSD at doses resulting in mice exposure at the Tolerable Daily Intake dose range for each pollutant. We herein focused on the 7-week-old females which exhibited early signs of obesity upon HFSD feeding. We observed no signs of toxicity and no additional weight gain following exposure to the mixture but alleviated HFSD-induced glucose intolerance in the absence of alteration of gluconeogenesis and steatosis. It suggested that the observed metabolic improvement was more likely due to effects on muscle and/or adipose tissues rather than on the liver. Consistently, female mice exhibited enhanced lean/fat mass ratio and skeletal muscle insulin sensitivity. Moreover, expression levels of inflammatory markers were reduced in adipose tissue at 7 but enhanced at 12 weeks of age in agreement with the inverse alterations of glucose tolerance observed at these ages upon pollutant exposure in the HFSD-fed females. Collectively, these data suggest apparent biphasic effects of pollutants upon HFSD feeding along with obesity development. These effects were not observed in males and may depend on interactions between diet and pollutants.

# 2èmes Assises Inter-régionales de Nutrition et Métabolisme

4-5 novembre 2015-Saint Galmier

## ABSTRACT

### TITRE

Impacts métaboliques d'un mélange de polluants faiblement dosés chez la souris femelle dans un contexte d'obésité

### AUTEURS

Labaronne E\*, Naville D\*, Vega N, Pinteur C, Canet-Soulas E, Vidal H, Le Magueresse-Battistoni B

\* : contribution équivalente

### LABORATOIRE

CarMeN Laboratory, INSERM U1060, Université de Lyon-1, INRA UMR1397, INSA Lyon, France

### RESUME

Plusieurs données épidémiologiques et expérimentales étayent l'hypothèse d'un rôle des polluants dans l'épidémie d'obésité et ses complications métaboliques. Au laboratoire, nous avons montré qu'une exposition chronique à une mixture de polluants classiquement retrouvés dans l'alimentation et faiblement dosés provoquait chez la souris femelle obèse adulte (12 semaines), une aggravation de l'intolérance au glucose possiblement liée à une altération hépatique de la signalisation œstrogénique. Pour comprendre l'origine des défauts, nous avons étudié des souris de 7 semaines en surpoids mais non obèses et présentant des taux sériques d'œstrogènes immatures. Brièvement, les mères puis leur descendance après sevrage sont nourries avec le régime enrichi en gras et en saccharose (REGS) contenant le mélange de polluants (le bisphénol A, le phtalate DEHP, le polychlorobiphényle PCB153, la dioxine 2,3,7,8-TCDD) à des doses résultant en une exposition correspondant environ aux doses journalières tolérables définies chez l'homme. Parallèlement, un groupe de souris est nourri avec du REGS sans polluant. Nous observons en absence de modifications du poids chez les souris exposées, une amélioration de la tolérance au glucose sans modification de la néoglucogénèse, un meilleur rapport masse maigre/masse grasse, une meilleure sensibilité à l'insuline dans le muscle squelettique par rapport aux souris non-exposées de même âge. De plus, l'expression génique de marqueurs de l'inflammation est diminuée dans le tissu adipeux sous-cutané des femelles de 7 semaines alors qu'elle est augmentée à 12 semaines en même temps qu'une aggravation de l'intolérance au glucose est observée. En conclusion, ces résultats suggèrent que les polluants exercent un effet biphasique qui pourrait être lié au contexte hormonal et à l'activité œstrogéno-mimétique des polluants du mélange. Une autre hypothèse non exclusive serait liée à l'accumulation des polluants, et notamment des persistants (PCB153 et 2,3,7,8-TCDD), avec l'âge dans le tissu adipeux et à leur activité proinflammatoire comme observé à 12 semaines.





## ABSTRACT FORM

### Exposure to a mixture of low-dose endocrine disruptors triggers insulin resistance in young adult male mice fed a diet-inducing obesity

LABARONNE, Emmanuel; PINTEUR, Claudie; VEGA, Nathalie ; VIDAL, Hubert ; NAVILLE, Danielle ; LE MAGUERESSE-BATTISTONI, Brigitte ;

CarMeN Laboratory, INSERM U1060, Lyon-1 University, INRA UMR1397, FRANCE

Contact: [Brigitte.lemaguereuse@inserm.fr](mailto:Brigitte.lemaguereuse@inserm.fr)

Tel: 0426235919

#### ABSTRACT

**Aim of the work:** Pollutants are suspected to contribute to the etiology of obesity and related metabolic disorders. However, while humans are life-long exposed to a large variety of chemicals at environmentally low dosage the current risk assessment does not take into account the cocktail effect. Recently, we demonstrated that a mixture of pollutants with endocrine disrupting activities, in the range of doses considered ineffective for humans could trigger sex-specific hepatic metabolic changes in the progeny of obese mice. Specifically in males, the expression levels of genes encoding proteins related to cholesterol metabolism were enhanced by week 12 [1]. Herein, we report the early signs of metabolic alterations in 7 week-old males.

**Materials and Methods:** The protocol [1, 2] consisted in feeding female C57B16/J mice for 5 weeks with a high-fat high-sucrose diet (HFSD) with/without a mixture of food pollutants made of 2,3,7,8-TCDD (dioxin), polychlorobiphenyl (PCB)153, DEHP (phthalate) and bisphenol A. Doses were adjusted resulting in mice exposure at the Tolerable Daily Intake dose range for each pollutant. Processing was continued at mating and throughout gestation and lactation. Offspring were fed the same diet than their dams after weaning until sacrifice. A control group was fed a standard diet (ST) throughout the experiment. Metabolic tests were carried out on 7-week old males and subsets of age- and treatment-matched males were euthanized. Other male mice were used for metabolic tests by week 11 and euthanized by week 12. Blood was recovered for biological assays. Liver and adipose tissues (AT) were rapidly dissected and frozen for RT-qPCR analyses. Data collected with 12-week old male mice have been published in [1].

**Key Results:** By week 7, HFSD-fed mice were heavier (24g) than ST-fed mice (20g) but they did not yet display all characteristics of obesity. For example, they had higher plasma

leptin than ST-fed mice, intolerance to glucose and resistance to insulin but normal 6h-fasting glycaemia and plasma insulin. Exposure to pollutants did not affect body weight, lean/fat mass ratio, food intake, glycaemia, plasma levels of insulin and leptin in HFSD-fed males by 7 weeks. However, metabolic tests indicated reduced insulin sensitivity ( $p < 0.05$  as compared to HFSD-fed mice) with no difference in glucose tolerance suggesting extra-hepatic insulin resistance. Consistently, we found enhanced expression levels of genes encoding inflammatory markers (IL1 $\beta$ : +68%; TNF $\alpha$ : +67%) in the subcutaneous AT (not the visceral AT) as compared to non-exposed HFSD males. None of these significant effects were observed by week 12. Besides, the expression levels of the hepatic genes encoding proteins involved in cholesterol metabolism were not altered in the 7-week old pollutant-exposed HFSD males.

**Conclusions:** In summary, this work provides new observations on the metabolic effects of a lifelong exposure to a mixture of pollutants with endocrine disrupting activities in a context of obesity. Because 12 week-old mice fed-HFSD are clearly obese (33g), it is possible that the effects of pollutants seen by week 7 are eclipsed by the deleterious metabolic impact of HFSD by week 12. In addition with animal aging, more pollutants accumulate in liver which may lead to alteration of cholesterol metabolism as seen by week 12 [1].

#### **References:**

- [1] Naville D et al., (2013) FASEB J 9:3860-70
- [2] Naville D et al., (2015) PLoS One 10(4):e0124015

## **L'exposition chronique de souris mâles à un mélange de polluants faiblement dosés dans un régime enrichi en lipides entraîne des effets métaboliques dépendants de l'âge.**

**Introduction :** Notre laboratoire a montré qu'une exposition chronique à un mélange de polluants à des doses considérées sans effet, induit des altérations métaboliques (dépendantes du sexe) dans des souris rendues obèses par l'alimentation. C'est l'effet cocktail. Précisément, chez les mâles adultes (12 semaines) nous avons observé une augmentation de l'expression hépatique des gènes du métabolisme du cholestérol (Naville et al., *Faseb Journal* 2013)(1). Nous illustrons ici l'effet « âge » avec le phénotypage des mâles de 7 semaines.

**Méthode :** Nous avons développé un modèle d'exposition chronique (1) à 4 polluants (dioxine, PCB153, BPA et phtalate) très faiblement dosés, présents dans l'alimentation et à large spectre d'action (scénario « réaliste »). Le mélange de polluants est introduit dans une alimentation riche en gras et saccharose. Le traitement est initié chez les mères 5 semaines avant accouplement. Il se poursuit jusqu'au sacrifice de la descendance.

**Résultats :** L'exposition aux polluants des mâles nourris avec le régime obésogène est sans incidence sur le poids, la prise alimentaire, la glycémie et l'insulinémie à 7 semaines. En revanche, l'examen des tests métaboliques indique une insulino-résistance (IR) aggravée sans modification des tests de tolérance au glucose suggérant une IR d'origine extra-hépatique. En accord avec ce résultat, nous observons une augmentation significative de l'expression de plusieurs gènes de l'inflammation dans le tissu adipeux sous-cutané. Ces effets ne sont pas observés à 12 semaines tandis qu'à 7 semaines, l'expression des gènes du métabolisme du cholestérol n'est pas modifiée.

**Conclusion :** Ces résultats renforcent l'hypothèse d'un rôle des polluants comme perturbateurs métaboliques. Nous pensons que les effets différentiels observés selon l'âge sont liés au degré d'obésité de la souris (marquée à 12 mais peu à 7 semaines). Ainsi, l'effet « polluant » sur l'IR à 7 semaines serait masqué à 12 semaines par l'impact fortement délétère du régime obésogène. Enfin, l'effet « polluant » sur le métabolisme du cholestérol pourrait dépendre de la quantité de polluants accumulés, supérieure chez l'animal plus âgé.

**LABARONNE, Emmanuel; VEGA, Nathalie PINTEUR, Claudie; VIDAL, Hubert ;  
NAVILLE, Danielle ; LE MAGUERESSE-BATTISTONI, Brigitte ;  
CarMeN Laboratory, INSERM U1060, Lyon-1 University, INRA UMR1397, FRANCE**

# Annexe 2 : Formation réalisée pendant la thèse

---

## BIOLOGIE INTEGRATIVE OU BIOLOGIE DES SYSTEMES

### OUTILS DE FOUILLE DE DONNEES ET DE TEXTES POUR LA RECONSTRUCTION DES RESEAUX BIOLOGIQUES

**Public** Chercheurs, ingénieurs biologistes

<b>Pré-requis</b>	Avoir une bonne expérience des outils bioinformatiques « généraux » (Entrez, Blast) – Niveau 1
<b>Objectifs</b>	Maîtriser des outils bioinformatiques disponibles sur le Web pour extraire des données de la littérature (text mining), les structurer et permettre la reconstruction de réseaux biologiques d'interaction et/ ou de régulation.
<b>Programme</b>	Gene Ontology : définitions, GO annotations, bases de données d'ontologies (GO, Amigo, OBO...), bases de données d'interactions (MINT, BIND, DIP, STRING ....) Principe des méthodes utilisées pour l'extraction des données bibliographiques. Différents réseaux biologiques : Réseaux de régulation (facteurs de transcription, miRNA), réseaux d'interaction (protéines-protéines, protéines-molécules), réseaux métaboliques, réseaux de signalisation Applications : Présentation des outils disponibles (PubGene, Cytoscape, STRING, GePS, LitInspector, PathwayStudio....) Problèmes rencontrés, Stratégies d'analyses (recherche par mots clefs, par groupe de gènes.....) Autres outils.
<b>Méthodes pédagogiques</b>	Alternance théorie et pratique.
<b>Nombre de stagiaires</b>	6-8 personnes maximum
<b>Date, horaires, lieu</b>	Du 26 au 30 Septembre 2016 - 34h sur 4.5j - DR Rhône-Alpes Auvergne LYON
<b>Intervenant</b>	Joëlle HENRY-BERGER (IR CNRS, Clermont-Ferrand)
<b>Inscription</b>	<a href="https://www.sirene.inserm.fr">https://www.sirene.inserm.fr</a> - Onglet : Agent Formation/ Demander une formation / Région : Rhône Alpes Auvergne / TS1 Biologie moléculaire [ ...] Bioinformatique Questionnaire préalable à remplir impérativement pour toute étude du dossier AVANT LE VENDREDI 4 MARS 2016

## Annexe 3 : Charte de la jeunesse scientifique réalisée lors de l'exposition universelle de Milan

---



# Charte de la jeunesse scientifique

DES RÉGIONS AUVERGNE  
& RHÔNE-ALPES





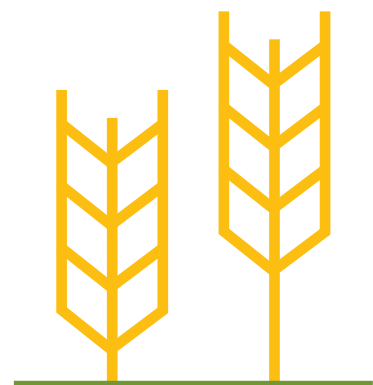
**N**ous, jeunesse scientifique des régions Auvergne et Rhône-Alpes, déclarons solennellement notre implication dans la création et le développement d'un système agricole et alimentaire adapté aux futurs enjeux nutritionnels mondiaux. Conscients que nous sommes dans une course perpétuelle à la productivité, génératrice d'un risque pour les écosystèmes et la santé des hommes, nous souhaitons l'avènement d'un modèle alimentaire pérenne et garant d'un accès universel à une nourriture saine et respectueuse de l'environnement. Ce modèle doit être le moteur d'une équité sociale sans compromis, d'une sécurité alimentaire sans exception, et le faire-valoir de notre Terre que nous jugeons riche mais fragile. S'il s'agit de notre utopie aujourd'hui, cela doit être notre réalité de demain.

Nous reconnaissons l'impasse devant laquelle notre modèle actuel de production, de distribution et de consommation se trouve. Le gaspillage colossal, les disparités croissantes et les problèmes de santé publique aujourd'hui à l'œuvre doivent cesser.

## DEVANT CE CONSTAT, NOUS DÉNONÇONS ●●●

- le fait qu'un tiers des produits alimentaires ne soit pas consommé et se transforme en déchet,
- les inégalités dans la répartition des ressources alimentaires et des capacités de production,
- le paradoxe existant entre les aires de surconsommation d'une part, et les aires de sous-nutrition et de malnutrition d'autre part,
- l'insuffisance qualitative et nutritionnelle des produits de grande consommation,
- l'intensité des systèmes de production, néfaste à notre patrimoine naturel commun,
- la concentration des zones de production dans un système d'échanges mondialisé au détriment des productions locales,
- le manque de compréhension et d'écoute entre les différents acteurs des filières alimentaires,
- la difficulté de transmettre les connaissances issues de la recherche aux citoyens.

LA DÉNONCIATION NE POUVANT ÊTRE  
À ELLE SEULE FERTILE,  
**NOUS FAISONS LE VŒU D'ACTER ENSEMBLE  
L'ÉDIFICATION DE CE SYSTÈME DE DEMAIN,  
QUE NOUS SOUHAITONS PLUS JUSTE,  
PLUS DURABLE ET PLUS NOURRICIER.**





CETTE VOLONTÉ PREND VIE DÈS À PRÉSENT  
DANS **NOTRE ENGAGEMENT À RESPECTER,  
SOUTENIR ET PROMOUVOIR**  
**LES ARTICLES SUIVANTS DÉFINIS SUR 3 PILIERS :**

## Nutrition Santé

- 1 Améliorer la diffusion, de façon pédagogique et didactique et à tous les publics, des connaissances scientifiques dans le domaine de la nutrition-santé.
- 2 Développer des solutions innovantes et durables pour optimiser la qualité nutritionnelle et la sécurité sanitaire des produits alimentaires.
- 3 Approfondir nos connaissances scientifiques des relations entre alimentation et santé à des fins de prévention nutritionnelle des pathologies et d'amélioration de l'offre alimentaire pour tous.
- 4 Encourager une production de proximité en apportant notre expertise scientifique pour identifier des ressources naturelles exploitables et mieux les valoriser pour la santé des populations.
- 5 Mobiliser tous les acteurs concernés par l'alimentation (politiques, médecins, industriels, producteurs, consommateurs) afin d'orienter les décisions et de promouvoir des actions collectives et interdisciplinaires pour améliorer l'accès à une alimentation saine pour tous.

## Agriculture de précision

- 6 Maîtriser les niveaux de production adaptés aux besoins de la population en enrichissant les connaissances des mécanismes du vivant.
- 7 Utiliser les concepts de l'agriculture de précision pour limiter l'impact négatif de l'homme sur son écosystème.
- 8 Prendre en compte l'humain dans les innovations technologiques pour les rendre accessibles intellectuellement et matériellement au plus grand nombre.
- 9 Rechercher des outils garantissant la santé des hommes et réduisant la pénibilité pour les acteurs de la filière.
- 10 Conserver l'esprit ouvert pour explorer toutes les possibilités d'amélioration dans les approches pluridisciplinaires.

# Systemes durables

**11** Optimiser l'utilisation de chaque ressource agricole produite en couvrant sans excès nos besoins nutritionnels et en valorisant au maximum les déchets afin de réduire le gaspillage alimentaire.

**12** Promouvoir des pratiques agricoles alternatives permettant de valoriser et enrichir la biodiversité, réduire les intrants chimiques et gérer de façon intégrée l'équilibre des écosystèmes afin d'améliorer leur capacité de résilience.

**13** Agir pour que s'instaure un nouvel ordre alimentaire mondial moins inégalitaire, à partir d'une co-construction par tous les acteurs, pour une juste répartition des ressources.

**14** Encourager et développer les initiatives locales en proposant un réseau structurant adapté au contexte local, qui simplifiera les procédures administratives et législatives, qui facilitera la concertation et la communication entre l'ensemble des acteurs, et qui priorisera la pédagogie et la médiation auprès du citoyen.

CHARTRE RÉALISÉE À L'INITIATIVE DES RÉGIONS AUVERGNE ET RHÔNE-ALPES,  
À L'OCCASION DES JOURNÉES SCIENTIFIQUES ORGANISÉES SUR LE PAVILLON FRANCE  
À L'EXPOSITION UNIVERSELLE MILAN 2015, LES 20 ET 21 MAI 2015.

## Signataires

### Étudiants et doctorants d'Auvergne et de Rhône-Alpes

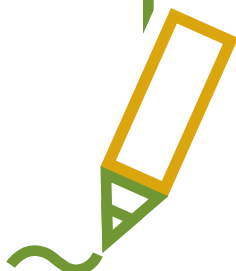
**Chloé TANKAM**, Laboratoire MetaFort / AUVERGNE - **Jean-Baptiste BRACONNIER**, Institut Pascal / AUVERGNE - **Cédric DARIE**, Laboratoire UNH / AUVERGNE - **Christelle PLANCHE**, Laboratoire QUAPA / AUVERGNE - **Clothilde VILLOT**, **Élodie GAUDIN**, **Giuseppe COPANI**, INRA-UMR Herbivores, Theix / AUVERGNE - **Alexandre PINEL**, Laboratoire UNH / AUVERGNE - **Benoît DARRIER**, Laboratoire GDEC / AUVERGNE - **Antoine VERNAY**, Laboratoire PIAF / AUVERGNE

**Manon LECOMTE**, **Emmanuel LABARONNE**, **Camille VILLEDIEU**, Laboratoire Carmen U1060 / RHÔNE-ALPES - **Jordan VACHERON**, UMR CNRS - UCBL / LEM / RHÔNE-ALPES - **Nicolas NAUDET**, ANSES LYON / RHÔNE-ALPES - **Chedia BEN AMARA**, **Lynda BOUARAB**, Laboratoire blodymia laboratoire de Bioingénierie Microbienne aux interfaces alimentaires / RHÔNE-ALPES

**Anaïs RAFALIMANANA**, **Anne-Marie MARCHAND**, **Émilie ANDRUSZAK**, **Juliette FASCINA**, **Margaux MICHAUD**, **Olivier DUCHENE**, **Thomas JOSSERAND**, ISARA Lyon / RHÔNE-ALPES - **Julien RIDOUARD**, **Julie RUELLE**, **Léna ROBERT**, **Léa DELERCE**, **Vincent BECHE**, **Manon BARDIN**, **Pierre CHIRSEN**, **Clément JULLIEN**, **Jean-Thomas AUBRY**, Université Stendhal / Grenoble / RHÔNE-ALPES - **Florian REVOL**, Université Joseph Fourier / Grenoble - RHÔNE-ALPES - **Marion MAZILLE**, Université Jean Moulin Lyon 3 / RHÔNE-ALPES - **Léo SINIGAGLIA**, Université Lumière Lyon 2 / RHÔNE-ALPES - **Yoann BAULAZ**, Université de la Rochelle

### Avec le parrainage des experts scientifiques

**Amandine GAUTIER-STEIN**, **Fabienne RAJAS**, INSERM - nutrition et cerveau - **Véronique COXAM**, **Cécile GLADINE**, INRA - nutrition humaine préventive - **Éric COMMELIN**, Université Jean Moulin Lyon 3 - système d'organisation de restauration collective secteur santé - **Étienne PAUX**, INRA- Génétique, Diversité et Ecophysiologie des Céréales - **Roland LENAIN**, IRSTEA - robotique et mobilité pour l'environnement et l'agriculture - **Bruno MARTIN**, **Brigitte PICARD**, INRA-UMR Herbivores, qualité des produits fromages et viande - **Pierre CAUMETTE**, Fondation ROVALTAIN - **Bernard PECQUEUR**, Université Joseph Fourier Grenoble - PACTE (Politiques publiques, Action politique, Territoires)



## Annexe 4 : Article en collaboration

# **At-risk profiles from imaging and tissue biomarkers combine inflammatory and anti-inflammatory features in non-human primates under cholesterol diet**

*DI CATALDO V.<sup>1</sup>, PIRAQUIVE J.<sup>2</sup>, GELOEN A.<sup>1</sup>, VERSET M.<sup>3</sup>, PATURET A.<sup>3</sup>, LABARONNE E.<sup>1</sup>, LOIZON, E.<sup>1</sup>, SERUSCLAT A.<sup>4</sup>, LAMBERTON F.<sup>2</sup>, IBAROLLA D.<sup>2</sup>, LAVENNE F.<sup>2</sup>, LE BARS D.<sup>2</sup>, CONTAMIN H.<sup>3</sup>, CANET-SOULAS E.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Univ Lyon, CarMeN Laboratory, INSERM U1060, INRA U1397, Université Lyon 1, INSA Lyon, F-69600, Oullins, France*

<sup>2</sup>*CERMEP, Groupement Hospitalier Est, Bron, France*

<sup>3</sup>*Cynbiose, VetAgroSup Campus, Marcy l'Etoile, France*

<sup>4</sup>*Departement of Radiology, Louis Pradel Hospital, Lyon, France*

## **Running title:**

## **Address for correspondence:**

Emmanuelle Canet-Soulas, DVM, PhD

Univ Lyon, CarMeN Laboratory, INSERM U1060, INRA U1397, Université Lyon 1, INSA Lyon, IHU OPERA Cardioprotection, U1060 CarMeN

bât. B13, Groupement Hospitalier Est

59 Boulevard Pinel

69 500 BRON, France

tel: (33) 4 72 68 49 09

emmanuelle.canet@univ-lyon1.fr

Word count for manuscript:

Word count for abstract: 250

Total number of figures:

Total number of tables: 1

TOC category: translational

TOC subcategory:

## **ABSTRACT:**

Atherosclerosis is a complex pathology leading to cardiovascular outcomes. Nowadays, individual risk stratification is still difficult. The aim of this study is to test the validity of multi-modal imaging focused on macrophage metabolism and phenotype combined with a biological analysis (lipid profile, inflammatory cytokines and genomic) in a Non-Human Primate model under atherogenic diet.

Sixteen *Cynomolgus* monkeys ( $13.1 \pm 4$  years) were fed with high cholesterol (23% fat, 0.5% cholesterol; n=13) (HC) or standard diet (n=3) during 24 months. Longitudinal blood sampling was performed for cholesterol and inflammatory cytokines assessments. Ultrasound follow-up of plaque progression (T+12 and T+18 months) and [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG, [ $^{11}\text{C}$ ]-PK11195 PET/CT and gadolinium-enhanced MRI imaging were performed. Vessels and tissues of interest were used for histology and genomic analysis.

High-risk lipidic profiles were noted as early as T+1 month, and T+18 months ultrasound session showed that most HC animals displayed lesions at similar location than humans. Three of these animals presented downstream events (myocardial fibrosis, small lacunar stroke) and PET/CT and MRI images confirmed vessel wall inflammation and plaques. Gene analysis further validated correlations between metabolic activity, inflammation and lymphocytes in carotid. Interestingly, anti-inflammatory M2 markers correlated with metabolic and M1 markers in carotids.

Animals graded at high-risk from gene analysis were the ones with downstream events, confirming vulnerable lesions in this model and the validity of combining inflammatory, metabolic and anti-inflammatory markers for stratification. These results open new biomarker combination possibilities for a better understanding of complex metabolic/inflammation interplay in the carotid plaque and adapted treatment in the clinical setting.

## **INTRODUCTION:**

Atherosclerosis is a complex inflammatory and lipidic pathology leading to plaque development. The paradigm for atherosclerosis diagnosis has evolved from the detection of lesion-induced artery stenosis to the subtler notions of vulnerable plaque and vulnerable patient (Naghavi, *Am J Cardiol* 2006). However, as this concept was primarily defined from anatomopathology analysis, it is still challenging in humans to stratify the cardio and cerebrovascular (CV) risk of atherosclerotic plaques. Indeed, morphologic imaging, i.e. magnetic resonance imaging of carotids or ultrasound imaging of coronaries have demonstrated that the status of plaques may evolve in both directions, stability or vulnerability depending on various local and systemic factors. In this dynamic situation, new biomarkers are therefore requested in order to propose the more appropriate treatment for each individual. More than a decade ago, [<sup>18</sup>F]-fluorodesoxyglucose ([<sup>18</sup>F]-FDG) PET/CT has been proposed to prospectively evaluate atherosclerosis inflammation and subsequently CV risk in patients (Rudd, *Circulation*, 2002). Recently developed medical imaging methods lead somehow to controversial results in various patient populations (Subramanian *JAMA* 2012; Figueroa *JACC* 2013, Knudsen, *J NuclCardiol* 2016). Most novel imaging biomarkers are targeting inflammation and macrophage imaging by evaluating alternatively macrophage phagocytic activity, glycolytic metabolism, macrophage mitochondrial proteins or M1/M2 receptors (Tarkin, *Nat Rev Cardiol*, 2014; Evans *CurrAthero Rep* 2016). But there is still an open debate on the most relevant association of circulating and imaging biomarkers to predict vulnerable plaque and future cardiovascular events, and to propose the best treatment to each specific situation (Duiveenvorden, *JACC*, 2013; Tarkin, *Circ Res* 2016). For example, it is not known whether [<sup>11</sup>C]-PK11195, a ligand targeting the mitochondrial translocator (18kDa) protein (TSPO) that is overexpressed in activated innate immune cells and was used for carotid imaging in patients (Gaemperli, *Eur Heart J* 2011), provides superior diagnosis of at-risk plaques over [<sup>18</sup>F]-FDG.

There is no accepted small animal model of vulnerable plaque and they are not fully relevant to establish imaging biomarkers in a translational way (Millon, *Vascular* 2012). The Cynomolgus macaque under atherogenic diet has been found invaluable to establish the protective effect of estrogen for coronary plaque development (Adams, *ATVB*, 1990). In this model, atherosclerosis develops with lipidic blood profile and multi-site progression as in humans and the carotid lesions reproduce the plaque morphology observed in clinical studies, as vessel geometry is very close (Shively, *ATVB*, 1990). Moreover, the innate immune system being a key player toward vulnerable plaque, this non-human primate (NHP) atherosclerosis model is the only one to display the same chemokine and cytokines armamentarium as in human atherosclerosis. The vascular lesions in the NHP atherosclerosis model and the peripheral inflammation status have been previously characterized by immunohistochemistry and blood biomarkers (Register, *Am J Primat*, 2009). Yet, it has never been explored using translational multimodal imaging techniques and inflammation imaging biomarkers.

Our aim is to show the added value of inflammation imaging markers and blood biomarkers to stratify cardiovascular risk in a NHP atherosclerosis model. To work out a stratification tool of vulnerable profiles in the non-human primates, we therefore used blood sampling (lipid profile, and inflammatory circulating biomarkers), PET/CT and MRI inflammation imaging using dual PET tracers imaging in NHP under atherogenic diet. We then, evaluated the gene expression risk profile from three vascular territories and compared with the *in vivo* biomarkers' risk assessment. The hypothesis of this study is that discriminant biomarkers for CV risk are a combination of metabolic, inflammatory and anti-inflammatory markers.

## **MATERIAL AND METHODS:**

### Animals:

All animal studies and experiments were approved by the French Ministry of Agriculture and carried out in accordance with the official regulation of the French Ministry of Agriculture after approval by the local Ethical Committee (N° 1367 & 1239). Every effort was done to minimize animal suffering and reduce the number of animals used in the experiments. Animals were acclimated for at least 10 days prior to the first day of study, and were housed collectively with the following ambient parameters: Ventilation with > 10 air changes/hour, and no air recirculation, 12-hour light/12-hour dark photoperiod, room temperature of 22 +/- 3°C, and a humidity of 55+/- 20%. Animal room and cage cleaning will be performed on a daily basis. Sixteen Cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*, Mauricius Island), 13.1 ±4 years-old (3 males and 13 ovariectomized females) were fed with high cholesterol (HC: 23% fat (w/w), 0.5% cholesterol (w/w), 11.3% (w/w) saturated fatty acids) (E39126-34, Sniff, Germany) diet (n=13) or standard diet (SD: 11% fat (w/w), saturated fatty acids < 1%, Sniff Pri V3944-000) (n=3, two females and one male) during 24 months. Food ration was adapted for each individual according to their body weight (100g per animal per day under 5 kg; 200g per animal per day over 5 kg). One fruit was provided daily to each animal. Delicacies were also occasionally given to the animals at the end of the day as part of the Testing Facility environmental enrichment program. Study duration was twenty-four months.



### Blood sampling:

For animals under standard diet, one blood sample was performed at the end of the study. For follow-up of lipid and cytokine plasma markers in HC animals, six blood samples were collected by venipuncture from the femoral vessel under anesthesia with ketamine (Imalgene® 1000, Merial, France) at 0, 1, 7, 12, 18 and 24 months, respectively (**see supplemental Figure S1 for study design**). The animals were fasted prior to blood collections. Blood was collected in EDTA tubes for plasma harvesting and inflammatory cytokine assay, citrate tubes for cholesterol/lipoprotein assay. EDTA and citrate tubes were centrifuged at 1500g during 10 minutes then supernatant were removed and stored at -80°C until further assays.

At the last time point, serum was used for high sensitive C-reactive protein (hs-CRP) measurement.

### *Cholesterol/lipoprotein and triglyceride assay:*

Total plasmatic cholesterol was measured using Accutrend Plus kit (Roche, France). Lipoprotein fractions in plasma were assessed using Lipoprint® LDL subfractions kit (Quantimetrix, California, USA) according to manufacturer instructions.

### *Peripheral inflammation:*

Hs-CRP was assessed in serum using commercial kit (CSB-E10035Mo, CUSABIO, Baltimore, MD, USA).

### **Multimodal imaging**

#### *Ultrasonography:*

Ultrasonography of vascular territories was performed jointly by a veterinarian and by a cardiologist, both experts in echography, using a Philipps CX 50 apparatus with a C8-5 microconvex probe according to a standardized imaging protocol: aorta, iliac bifurcation and carotid arteries. Results were expressed as presence or absence of lesion, and vessel wall and intima-media thickness (=IMT, when possible) in the related vascular territories. (in patients, IMT>0.7 mm can be considered). For longitudinal assessment of disease progression, a score was given at each ultrasound session: 1 for small lesion in a single location, 2 for multi-site small lesions, 3 for multi-site lesions with at least one large plaque.

### *PET/CT Scan:*

Images were acquired with the 64-multidetector PET/CT scanner BiographmCT (Siemens, Erlangen) with an axial field of view of 22 cm. The scanner is checked every day using established calibration procedures.

FDG imaging was performed in all animals 60 minutes after the intravenous [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG injection of a target dose of 5 MBq/kg ( $86.24 \pm 22.72$  MBq). Animals were placed in a supine position. 60 minutes after injection of the radiotracer, a whole body low dose CT (80kV, 20mAs, 1 mm slice thickness and a pitch of 0.5 sec) was acquired for attenuation correction. The CT scan dose is adjusted using the Care Dose 4D software (Siemens), with the animal body centered in the scanner to enable the whole-body coverage.

Three bed positions were used, the first one centered on the carotids encompassing the aortic arch and its branches, and the 2 others distally to cover the upper and lower part of the abdomen. Prior to FDG PET, the fasting blood glucose concentration was recorded to check for a level less than 200 mg/dL. For each bed position, acquisition duration was five minutes.

After the PET exam, a CT angiography was acquired with the same field of view. A bolus of 20ml of Iomeron 400 (Guerbet, Aulnay-sous-bois) was injected at a rate of 3.5ml/sec in the antecubital vein, followed by a flush of saline at the same rate. Acquisition parameters were: 80kV, 20mAs, FOV of 500mm, a30 sec B filter, slice thickness of 1 mm, and a pitch of 0.5 sec.

A subgroup of eight animals was also explored using the [ $^{11}\text{C}$ ]-PK11195 PET tracer ( $123.70 \pm 30.96$  MBq) targeting TSPO of activated macrophages. The [ $^{11}\text{C}$ ]-PK11195 exam was performed before the FDG exam. PET emission data of [ $^{11}\text{C}$ ]-PK11195 centered on the carotids were acquired over 60 min in list-mode format and rebinned into 18 temporal frames (background 56.42  $\pm$  11.16 s, 6x10s, 4x60s, 6x300s and 2x600s).

### *MRI:*

MR was performed on a 3-Tesla Siemens Prisma MR system (maximum gradient amplitude-80mT/m; slew rate-200mT/m/s).

For carotid imaging, a four-channel phased array receiver coil was used to optimize the signal-to-noise ratio. Subjects were positioned supine at the center of the magnet, with cardiac triggering and breathing monitoring. Localization of the carotid was obtained with time of flight (TOF) sequences. MRI images were centered on the bifurcation and acquired using turbo spin echo (TSE). Proton density weighted (PDW), T1 weighted (T1W) and T2-weighted (T2W) images were used. Relevant

imaging parameters were as follows : slice thickness 2mm; Repetition time 262 ms/260 ms/ 262ms (PDW/T1W/T2W images); Echo time 23.0 ms/ 5.8 ms/ 3.04 ms (PDW/T1W/T2W images); Field of view (FOV) 205 mm/ 205 mm/ 180 mm; echo train length 29/29 (PDW/T1W images); Receiver bandwidth 868 Hz/pixel/ 868 Hz/pixel/ 270 Hz/pixel and slices acquired 9/9/20.

Dynamic images were acquired with the TWIST (Time resolved angiography With Interleaved Stochastic Trajectories) pulse sequences. TWIST sequence was applied in the coronal orientation and acquired with a separation of 5 seconds between frames. A 10 ml bolus was administered intravenously at 0.1 mL/s. Imaging parameters were: TR/TE/Flip angle = 2.95 ms/ 1.10 ms/ 25° and voxel size 0.8 x 0.8 x 1.2 mm<sup>3</sup>.

Brain imaging was performed with the 40-channels phased-array head-neck coil (posterior part of the coil). The following sequences were acquired:

2D FLAIR (Fluid Attenuation Inversion Recovery) voxel 0.6x0.6x0.8 mm, slice thickness 0.80 mm, TR/TE 5000/346 msec, FOV 180 mm, inversion time TI 1800 msec, echo train length 926 msec, inter-echo time 3.81 msec, bandwidth 744 Hz/Px.

2D T2\* GE: 0.7x0.7x20 mm, slice thickness 2 mm, 20 slices, TR/TE 1200/3.04 msec, FOV 180 mm, flip angle 70° , bandwidth 270 Hz/Px.

3D T1 MPR (Multiplanar Reconstruction): voxel size 0.6x0.6x0.8 mm, temps de répétition TR/TE 2100 / 2.77 msec, FOV 180 mm, flip angle 8°, TI 1000 msec, inter-echo time 8 msec, bandwidth 210 Hz/Px

### ***Tissue analysis***

#### *Inflammation and oxidative stress:*

Vascular samples of the imaging location (carotids, aortic arch, and abdominal aorta) were kept frozen at -80°C and ground into powder using a mortar. Proteins were extracted from the powder using a PBS/EDTA (5mM) solution. Extract of proteins were then used to assess inflammatory cytokines and oxidative stress markers in the same way than in plasma (respectively IL-1  $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  and MDA).

#### *Gene expression study:*

mRNA were extracted from carotid, aortic arch, abdominal aorta, adipose tissues (visceral, pericardial and periarterial) and brain using the TRIZOL reagent procedure. Expression of 20 genes

corresponding to glycolytic metabolism (*Hkl1*), mitochondria metabolism (*Ppif*, *Tspo*), pan-macrophages (*Cd14*, *Cd68*), M1 (*Il-1 $\beta$* , *Tlr4*, *Ccl2*, *Il-6*, *Tnfa*, *Cxcl9*, *Il-17ra*, *IL-22ra*) and M2 (*Il-1ra*, *Ccr2*, *Il-10*, *Clec7a*, *Irf4*, *Cd163*) markers and lymphocyte infiltration (*Cd3 $\epsilon$* ) (list of primers on demand: [vanessa.dicataldo@universite-lyon.fr](mailto:vanessa.dicataldo@universite-lyon.fr)) were measured using the qPCR method. Actine  $\beta$  was used as the reference gene.

#### *Anatomo-pathology of vessel wall and heart*

Left carotid and parts of aortic arch and heart (apical area) were removed and stored in a 4% paraformaldehyde solution during 24 hours and then in 15% sucrose during 48h. After this, there were placed in histology cassette and frozen in liquid nitrogen, excepted for heart samples that were embedded in paraffin.

These samples were sliced in slices of 10 $\mu$ m using a cryostat (LEICA CM3050S) and then stained with Hematoxylin/Eosin (MHS32-1L & HT110232-1L, Sigma-Aldrich), Oil Red O (841K04010169, MERK) and Masson's trichoma (ab150686, AbCam) in order to visualize respectively the morphology of the sections, lipid presence and fibrosis. Photographs were acquired using the microscope ZEISS Scope A1 (ZEISS).

#### ***Data analysis:***

##### *Blood kinetics:*

To estimate the overall risk in the plasma profile over time for each animal, lipid and hsCRP levels were summarized by the maximal, the median and the final (at the imaging time point) values.

##### *Image analysis:*

MRI: vessel wall area was measured on the right and left carotids (3 slices / artery) by manual delineation of the inner and outer contours and given in mm<sup>2</sup>. MR angiography and CT angiography acquisition were then used to register the ROI on the PET/CT data (**supplemental Figure S2**).

<sup>18</sup>F-FDG image post-processing: All emission images were normalized using an inhomogeneity detector and corrected for dead time, random coincidences, diffusion and attenuation. Image reconstruction was performed with iterative Ordered-Subset Expectation Maximization (iterative OSEM method, TrueX + TOF UltraHD-PET) with 12 iterations and 21 subsets (effective number of

iterations, ENI of 252) and non-filtered according to recent recommendations for FDG analysis in atherosclerosis (Huet, J Nucl Med, 2015).

Spatial resolution at reconstruction was: voxel 0.82 x 0.91 x 0.4mm. Standardized Uptake Value (SUV mean and max, Bq/mL) and Target-to-background ratio (TBR: SUV max normalized by SUV mean of the superior vena cavae) were measured on three vascular locations (right and left carotids, aortic arch and abdominal aorta at the level of renal bifurcations) and in visceral adipose tissue in three regions-of-interest (ROIs) for each location. MR angiography and PDW images (for the carotids) were used to generate regions-of-interest at the different locations. For brain images, SUV max was evaluated for the ROIs defined using the NHP atlas (Ballanger, NeuroImage 2013) (see below).

[<sup>11</sup>C]-PK11195 analysis: Levels of translocator protein (18 KDa) expressed in active macrophages were assessed using [<sup>11</sup>C]-PK11195 kinetic analysis with an image arterial input function (descending aorta) and a 2-compartment reversible model (2TC-rev) or an equivalent graphical analysis (Logan).

The 2TC-rev allows the identification of the following kinetics rate constants: K1, k2 between vascular volume and non-specific tissue, and rate constants of association (k3) and dissociation (k4) for receptor-specific (Kropholler et al). Rate constants depend on local concentration in the region of interest (ROI), in arterial plasma and in tissue. The relationship between micro parameters (K1, k2, k3 and k4) allows us to estimate a macro parameter: volume distribution (Vt).

Logan plot is a linear method, which allows for the estimation of the Vt regardless of the number of compartments (Logan et al, 1990). This graphical method is based on observation of the portion of the reversible model which approaches a steady state after certain time following a linear trend whose slope can be related to the Vt. As performed in the clinical carotid study (Gaemperli), a simplified TBR(PK) was calculated using a static image reconstructed from the 20-35 minutes frames.

Vt, and SUVmax(PK) and TBR(PK) (calculated using a static image reconstructed from the 20-35 minutes frames) were then compared to FDG uptake levels (SUVmax [<sup>18</sup>F]-FDG) and TBR [<sup>18</sup>F]-FDG) at the same locations (right and left carotids).

### Brain PET/CT analysis

Based on anatomical-MRI and a maximum probability atlas (Ballanger et al., 2013), 88 ROIs were defined and used to measure [<sup>11</sup>C]-PK11195 binding potential (BP, with the Simplified Reference Tissue Model, SRTM, using the caudate nucleus as the reference region with minimal uptake) on PET-Scans for these regions; here we focused on the frontal cortex (7 ROIs) and the limbic system (6 ROIs).

### *Statistical analysis*

All values are expressed as mean +/- standard deviation or median with percentile ranges. Differences were tested using t test. Regression analysis was used for comparison between MR and PET parameters. A  $p < 0.05$  was considered significant. Heatmaps for genomic risk profile were generated by hierarchical clustering of samples using the ward.2 algorithm. Statistical analysis for longitudinal follow-up and for comparison between HC and SD measurements were performed with  $p < 0.05$  considered as significant. All statistical analyses were performed using R software.

### **RESULTS:**

During the 24 months of the study, 5 HC animals died: 2 abruptly early after the onset of the diet, 2 were euthanized because of acute kidney failure and 1 died prematurely because of an acute pancreatitis (important pancreas autolysis observed during the necropsy). In these animals, important atherosclerosis lesions were also observed in different vascular beds (data not shown).

#### **At-risk lipidic profiles**

Plasmatic cholesterol level of all HC animals were at basal values at the beginning of the study and showed a brutal increase since the first month of diet (1 month on HC diet compared to baseline value,  $p = 4.5 \cdot 10^{-4}$ ) and stayed at high values all along the 24 months (**Figure 1A**). The HDL/LDL ratio showed a parallel sudden decrease during the first month and remained low thereafter (1 month compared to baseline ratio,  $p = 1.2 \cdot 10^{-5}$ ; **Figure 1B**).

Lipoproteins profiles further exhibited the differences between HC and SD animals: a lower HDL concentration and “at-risk” LDL subfractions in HC animals corroborating the lipids dysregulation (**Figure 1C-D**).

#### **Multi-site active lesions using multimodal imaging in HC animals**

The presence of numerous atherosclerotic plaques in HC animals was visible with ultrasound imaging; at T+18 months of diet, 9 of 10 HC monkeys showed atherosclerotic lesions at similar location than human (common carotid and bulb, aortic arch, iliac arteries) confirmed by vessel histology. Plaque burden in the carotid was also shown by MRI measurements (**Figure 2A-C**). PET/CT imaging showed both [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG (**Figure 2D-E**) and [ $^{11}\text{C}$ ]-PK11195 (**Figure 2F-G**) carotids uptake in HC animals suggesting the presence of a low-grade inflammation. Carotid MRI showed vessel wall thickening in

the carotids (median wall area of 0.11 (interquartile 0.09 – 0.12) cm<sup>2</sup> in HC versus 0.04 cm<sup>2</sup> in SD animals,  $p < 0.001$ , **Figure 2A**, and **Supplemental Figure S3**) and gadolinium enhancement characteristics of advanced carotid plaques (**Figure 2B-C** and **Figure S3**) confirming the pathological status.

### **Longitudinal follow-up of inflammatory biomarkers and ultrasound for diagnosis of at-risk animals**

Longitudinal ultrasound showed presence of lesions at different locations at 12 months (score of 2 in 4 animals, **Figures 3 and S4**) with progression of atherosclerosis in 3 animals over 8 at 18 months (**Figure S4**). HsCRP levels confirmed the chronic low-grade inflammation persisting over time (**Figure 3B and S4**). LDL-C levels were also high in the same interval of time, but with no significant increase (**Figure 3C**). The animals with increasing US score have also hsCRP increase or maintained high level during follow-up (**Figure S4**).

For animals that didn't completed the study, there was a burst of circulating inflammation biomarkers in the blood sample prior to death (data not shown). Finally, the findings of downstream consequences in the heart (fibrosis on histology) and in brain (lacunar stroke by FLAIR MRI) in animals with advanced lesions (**Figure 4**) confirmed the overall vulnerable status with high-risk HC animals. It is worth noting that the 3 animals exhibiting myocardial fibrosis on histology were those with an increased ultrasound score at T+18 months, and either elevated hsCRP at baseline or with the stronger increase at T+18 months (**Figures S4 and 4**).

For HC animals, PET and MR inflammation marker levels were not correlated neither with the MR plaque burden nor between each other (data not shown,  $p = 0.3$  plaque with Gd,  $p = 0.9$  plaque with [<sup>18</sup>F]-FDG,  $p = 0.18$  plaque with [<sup>11</sup>C]-PK11195. Gd and [<sup>18</sup>F]-FDG were significantly related ( $p = 0.03$ ). Of note, in HC animals with the dual tracer injection, [<sup>11</sup>C]-PK11195 imaging positively correlated with [<sup>18</sup>F]-FDG findings (**Figure 5A**,  $r = 0.89$ ;  $p < 0.001$ ) in HC animals, and negatively in SD (**Figure 5B**,  $r = -0.78$ ,  $p = 0.036$ ), and there was a trend between Gd and [<sup>11</sup>C]-PK11195 in HD animals ( $p = 0.07$ ). For MR and PET inflammation markers, the left/right uptake difference was similar in HC, and not in SD animals (**Figure S3**).

Incidentally, SD animals presented relatively elevated hs-CRP level, (18 and 35 µg/ml respectively) and their corresponding inflammation imaging was also above normal values for both Gadolinium SI enhancement, [<sup>18</sup>F]-FDG SUV and [<sup>11</sup>C]-PK11195 TBR (**Figure 2B, D, F**). At histology, myocarditis with diffuse myocardial fibrosis was discovered in one animal (SD#2), confirming the *in vivo* inflammation findings.

## **Carotid at-risk profiles combine overexpression of metabolic, inflammatory and anti-inflammatory genes**

Genomic analysis of carotid arteries exhibited strong correlations between genes related to imaging biomarkers (*Hkl* for [<sup>18</sup>F]-FDG and *Tspo* for [<sup>11</sup>C]-PK11195) in carotid arteries and vulnerable plaque markers as *Ccl2* (p=0.009 and 0.001 respectively), *Il-1β* (p=0.001 and 0.006 respectively) and *Il-6* (p=0.044 for *Hkl*) (**Table 1**). These three markers were also intercorrelated and correlated with others inflammatory markers such as *Tlr4* (p=0.001 with *Ccl2*; p=0.002 with *Il-1β*), *Clec7a* (p<0.001 with *Ccl2*; p<0.001 with *Il-1β*), with *Cd3ε* (marker of lymphocytes infiltration: p=0.003 with *Ccl2*; p=0.044 with *Il-1β* and p=0.007 with *Il-6*). Interestingly, markers of vulnerable plaque are also associated with anti-inflammatory markers expression such as *Il-1ra* (p=0.003 with *Ccl2*, p=0.001 with *Il-1β* and p=0.009 with *Il-6*), *Il-10* (p=0.027 with *Il-6*), *Irf4* (p=0.001 with *Ccl2*) and *Cd163* (p=0.001 with *Ccl2*) (**Table 1**). Heat map of gene expression in carotid highlighted three distinct groups of NHP, according to level expression of these genes (**Figure 5C**). Of note, the 3 NHPs presenting downstream events (HC#1, 9 and 13) were regrouped by this analysis in the high-risk group, confirming the stratification made using ultrasound and circulating biomarkers such as LDL-C and hsCRP (**Figure 5C-D and supplemental S4**).

## **Other vascular trees, brain, and adipose and immune tissues**

HC animals with carotid [<sup>18</sup>F]-FDG uptake also showed increase signal in the aortic arch, as well as in hematopoietic organs (spleen and bone marrow) (**Figure S5**). Tissue analysis of three arterial walls (carotids, aortic arch and abdominal aorta) confirmed the at-risk status for the three NHP, as they were the only cases presenting higher values for more than one inflammatory/oxidative marker (over the four selected ones) (data not shown). Gene expression in the two aortic locations did not provide a complete similar stratification. However, the association between inflammatory/metabolic and anti-inflammatory was maintained (**Figure S6**).

Interestingly, brown fat activity was significantly decreased in HC animals compared to SD, whereas the increase activity of visceral and subcutaneous fat did not reach significance (**Figure S7**). In both perivascular and visceral adipose tissue, the association between inflammatory and anti-inflammatory gene expressions was also highly present (**Figure S7**).

Finally, the brain *in vivo* imaging using the dedicated NHP atlas segmentation showed higher [<sup>11</sup>C]-PK11195 uptake in regions of the limbic system and frontal cortex in HD animals compared to SD, and a corresponding lower [<sup>18</sup>F]-FDG uptake (**Figure S8**). Gene expression in the frontal cortex



showed correlation between imaging biomarkers and CCL2, IL-6 and CD3 $\epsilon$  and strikingly a negative correlation between with IL-1 $\beta$  and IL-1ra (**Figure S9**).

## **DISCUSSION:**

In this non-human primate model of vulnerable plaques, both metabolic and mitochondrial macrophage activity imaging markers were closely associated, as demonstrated by the correlation between [<sup>18</sup>F]-FDG and [<sup>11</sup>C]-PK11195 carotid measurements. The carotid gene analysis confirmed this finding, but found also a strong association with anti-inflammatory markers. This relationship was further used to stratify the at-risk profiles and diagnosed the same subjects presenting the evolutive lesions at follow-up and pathological downstream consequences of plaque rupture. The two aortic locations (arch and abdominal) confirmed the association of inflammatory/anti-inflammatory gene expressions. As in patients, [<sup>18</sup>F]-FDG whole body inflammation imaging in this model of advanced atherosclerosis confirmed abnormal uptake in hematopoietic organs and white adipose tissue, and a decrease metabolic activity of brown fat. Finally, in HC animals compared to SD, there was a decrease metabolic activity ([<sup>18</sup>F]-FDG uptake) in the limbic system, in parallel with increased TSPO mitochondrial activity in the same regions, i.e. an increase binding of [<sup>11</sup>C]-PK11195.

This last couple of years, the classical dichotomy of M1 (inflammatory) and M2 (anti-inflammatory/repair) macrophages has been seriously reconsidered (Tabas, *Circ Res* 2016).

A more comprehensive vision is emerging from the immunology community. Priming of the immune innate cells has now been demonstrated as an essential event for future response of monocyte/macrophages in cardiovascular diseases. It has also been recently postulated in resident macrophages, even in the brain (Holtmann, *ActaNeuropatholComm*, 2015). This priming promotes very different phenotypes that combined a delicate mixture between conventional M1/M2 markers. For clinical translation to atherosclerosis, this was very recently demonstrated by pathological analysis of the abdominal aorta from a tissue bank (van Dijk, 2016). Until now, analysis of carotid endarterectomy specimens has lead to somehow controversial results (de Gaetano, *Frontiers Immunol*, 2016 ; Jager, *Mol Imaging Biol* 2016). These results may be due to the fact that adventitia is missing in endarterectomy samples while it is an important supplier of macrophages in atherosclerosis (van Dijk, 2016).

Indeed, medical imaging of M2 markers for atherosclerosis imaging has also already been evaluated, with the following examples. The mannose receptor CD206 was imaged by direct targeting (Blykers et al, *JNM*, 2015, Cope,F, *NuclMed Biol* 2016),or by using its carboxylate ligand by FDM PET imaging

(Tahara, Nature Med), and indirect CD163 imaging was performed by targeting the somatostatin receptor with its ligand [<sup>64</sup>Cu]-DOTATATE that correlated with CD163 macrophages and symptomatic plaques (Pedersen, ATVB, 2015). Indeed, our gene analysis confirmed that M2 markers (IL-10, CD163, IRF4, IL-1ra) were closely associated to both metabolic and inflammatory markers (IL6, IL1 $\beta$ , CCL2) in the three studied vascular beds. In our study, IL-1ra is the anti-inflammatory marker more frequently associated to inflammatory markers (with CCL2 and IL-1 $\beta$  in carotid and aortic arch and with IL-6 in carotid).

In-vivo imaging in the carotids showed that [<sup>11</sup>C]-PK11195 and [<sup>18</sup>F]-FDG were correlated in HD animals. Therefore, these two tracers appeared equivalent in carotid and aortic arch atheroma, but were negatively correlated in the vessel wall and perivascular tissues of SD animals. The genomic analysis of metabolic and mitochondrial gene expression confirmed this association in the carotids and in the two aortic sites, but were only associated in pericardial adipose tissues and not in the other depots. Yet, in all adipose tissues, inflammatory and anti-inflammatory were still closely associated confirming the strength of this association in different microenvironment in this context of chronic low-grade chronic inflammation.

Conversely, [<sup>18</sup>F]-FDG and [<sup>11</sup>C]-PK11195 gave opposite results in the brain in the limbic and frontal cortex. The lower [<sup>18</sup>F]-FDG uptake in the limbic system may be related to a lower neuronal activity, as observed in Alzheimer's disease (Kato et al, Ageing Res Rev, 2016) and the increased [<sup>11</sup>C]-PK11195 uptake may represent a high cholesterol diet-induced neuroinflammation as previously demonstrated in mice (Mao et al, 2015; Lam et al, 2015).

In hypercholesterolemia, the central role of TSPO in mitochondria cholesterol trafficking may be disturbed and can be a therapeutic target (Lecanu, Steroids, 2013). It has indeed a major role for cholesterol trafficking and astrocyte homeostasis (Da Pozzo J Mol Science 2016). In the brain, TSPO increased expression is also linked to astrocyte and microglial activation and/or macrophage recruitment in acute and chronic inflammation (stroke, epilepsy) (Chauveau et al, Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2011; Yankam Njiwa et al, JCBFM, 2016).

Further studies in this advanced atherosclerosis model would be necessary to confirm these TSPO/FDG imaging findings in the brain, combining inflammation and neuron damage particularly in the limbic system. These mechanisms have already been explored in the ApoE<sup>-/-</sup> mouse model (Fullerton et al, 2001; Schwartz et al, 2013). In primate, TSPO imaging has also been recently performed in the context of acute neuro-inflammation evolving to neuro-degeneration (S Lavis, Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2015). It further confirms the relevance of the NHP model for translational neuro-inflammation imaging studies.

Compared to mouse models, this NHP model is unique as vulnerable plaque phenotypes were observed in both the carotids and coronary arteries, with pathological findings of down-stream events. The longitudinal follow-up using imaging of plaque progression in multiple sites and inflammation biomarkers provided a first read-out of at-risk profiles, very similar to the clinical set-up. In term of translation, the at-risk signature in the vessel wall combines metabolic, inflammatory and anti-inflammatory. Moreover, this gene association in the carotids was able to stratify the higher-risk animals. This finding appears very relevant for patient care after endarterectomy, but need to be further confirmed.

Another limitation of the present study is the single inflammation imaging session. Indeed, [<sup>18</sup>F]-FDG imaging has been successfully performed in phase II and III clinical trial where changes of carotid and aorta [<sup>18</sup>F]-FDG uptake were essential to show inflammation modulation with treatment and the overall more stable phenotype in the treated group (Tawakol, JACC 2013; Tarkin, Nature Rev Cardiol 2014).

In conclusion, we demonstrated here in the NHP vulnerable plaque model that the two imaging marker of inflammation that have been used for carotid exams in patients, i.e. [<sup>18</sup>F]-FDG and [<sup>11</sup>C]-PK11195, are closely linked in the context of atherosclerosis. Yet, they may provide additional results in the brain about respectively, locally impaired brain activity with [<sup>18</sup>F]-FDG and abnormal glial and /or macrophage mitochondrial with [<sup>11</sup>C]-PK11195.

More importantly, we showed for the first time in a translational model that the vulnerable plaque has increased expression of metabolic, inflammatory and anti-inflammatory genes, and in carotid plaques, this association enables to stratify high-risk subjects. Further studies in NHP and patients are needed to evaluate how this can impact care and future treatment.

## **ACKNOWLEDGEMENTS:**

*Acknowledgements:*

*Sources of funding:* This study was supported by the Institut Universitaire de France and the French Ministry of Research for PhD students.

*Disclosures:* None

## **REFERENCES:**

1. Naghavi M, Falk E, Hecht HS, et al, SHAPE Task Force. From vulnerable plaque to vulnerable patient—Part III: Executive summary of the Screening for Heart Attack Prevention and Education (SHAPE) Task Force report. *Am J Cardiol* 2006;98: 2H–15H.
2. Rudd JH, Warburton EA, Fryer TD, Jones HA, Clark JC, Antoun N, Johnström P, Davenport AP, Kirkpatrick PJ, Arch BN, Pickard JD, Weissberg PL. Imaging atherosclerotic plaque inflammation with [18F]-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Circulation*. 2002 Jun 11;105(23):2708-11.
3. Figueroa AL, Abdelbaky A, Truong QA, et al. Measurement of arterial activity on routine FDG PET/CT images improves prediction of risk of future CV events. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2013 Dec;6(12):1250-9.
4. Subramanian S, Tawakol A, Burdo TH, Abbara S, Wei J, Vijayakumar J, et al. Arterial inflammation in patients with HIV. *JAMA*. 2012;308:379-86.
5. Knudsen A, Hag AM, Loft A, von Benzon E, Keller SH, Møller HJ, Lebech AM, Ripa RS, Kjær A. HIV infection and arterial inflammation assessed by (18)F-fluorodeoxyglucose (FDG) positron emission tomography (PET): a prospective cross-sectional study. *J NuclCardiol*. 2015 Apr;22(2):372-80.
6. Tarkin JM, Joshi FR, Rudd JH. PET imaging of inflammation in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol* 2014;11:443-57.
7. Evans NR, Tarkin JM, Chowdhury MM, Warburton EA, Rudd JH. PET Imaging of Atherosclerotic Disease: Advancing Plaque Assessment from Anatomy to Pathophysiology. *CurrAtheroscler Rep*. 2016 Jun;18(6):30.
8. Duivenvoorden R, Mani V, Woodward M, Kallend D, Suchankova G, Fuster V, Rudd JH, Tawakol A, Farkouh ME, Fayad ZA. Relationship of serum inflammatory biomarkers with plaque inflammation assessed by FDG PET/CT: the dal-PLAQUE study. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2013 Oct;6(10):1087-94.
9. Tarkin JM, Dweck MR, Evans NR, Takx RA, Brown AJ, Tawakol A, Fayad ZA, Rudd JH. Imaging Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016 Feb 19;118(4):750-69.
10. Gaemperli O and al. Imaging intraplaque inflammation in carotid atherosclerosis with 11C-PK11195 positron emission tomography/computed tomography. *Eur Heart J* 2012;33:1902-10.
11. Millon A, Canet-Soulas E, Boussel L, Fayad Z, Douek P. Animal models of atherosclerosis and magnetic resonance imaging for monitoring plaque progression. *Vascular*. 2014 Jun;22(3):221-37.
12. Adams MR, Kaplan JR, Manuck SB, Koritnik DR, Parks JS, Wolfe MS, Clarkson TB. Inhibition of coronary artery atherosclerosis by 17-beta estradiol in ovariectomizedmonkeys. Lack of an effect of added progesterone. *Arteriosclerosis*. 1990 Nov-Dec;10(6):1051-7

13. Shively CA, Kaplan JR, Clarkson TB. Carotid artery atherosclerosis in cholesterol-fed female cynomolgus monkeys. Effects of oral contraceptive treatment, social factors, and regional adiposity. *Arteriosclerosis*. 1990 May-Jun;10(3):358-66.
14. Register TC. Primate models in women's health: inflammation and atherogenesis in female cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *Am J Primatol* 2009;71:766-775.
15. Cope FO, Abbruzzese B, Sanders J, et al. The inextricable axis of targeted diagnostic imaging and therapy: An immunological natural history approach. *Nucl Med Biol*. 2016 Mar;43(3):215-25.
16. Tahara N, Mukherjee J, de Haas HJ, et al. 2-deoxy-2-[18F]fluoro-D-mannose positron emission tomography imaging in atherosclerosis. *Nat Med*. 2014 ;20(2):215-9.
17. Pedersen SF, Sandholt BV, Keller SH, Hansen AE, Clemmensen AE, Sillesen H, Højgaard L, Ripa RS, Kjær A. 64Cu-DOTATATE PET/MRI for Detection of Activated Macrophages in Carotid Atherosclerotic Plaques: Studies in Patients Undergoing Endarterectomy. *ArteriosclerThrombVasc Biol*. 2015 Jul;35(7):1696-703.
18. Tabas I, Bornfeldt KE. Macrophage Phenotype and Function in Different Stages of Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016 Feb 19;118(4):653-67.
19. Inge R Holtman, Divya D Raj, Jeremy A Miller, Wandert Schaafsma, Zhuoran Yin, Nieske Brouwer, Paul D Wes, Thomas Möller, Marie Orre, Willem Kamphuis, Elly M Hol, Erik W G M Boddeke and Bart J L Eggen. Induction of a common microglia gene expression signature by aging and neurodegenerative conditions: a co-expression meta-analysis. *Acta Neuropathologica Communications* 2015. DOI: 10.1186/s40478-015-0203-5
20. J Am Heart Assoc. 2016 Jun 16;5(6). pii: e002860. doi: 10.1161/JAHA.115.002860. Systematic Evaluation of the Cellular Innate Immune Response During the Process of Human Atherosclerosis. van Dijk RA<sup>1</sup>, Rijs K<sup>1</sup>, Wezel A<sup>1</sup>, Hamming JF<sup>1</sup>, Kolodgie FD<sup>2</sup>, Virmani R<sup>2</sup>, Schaapherder AF<sup>3</sup>, Lindeman JH<sup>4</sup>.
21. **de Gaetano M**, Crean D, Barry M, Belton O. M1- and M2-Type Macrophage Responses Are Predictive of Adverse Outcomes in Human Atherosclerosis. *Front Immunol*. **2016** Jul 19;7:275. doi: 10.3389/fimmu.2016.00275. eCollection **2016**. PMID: 27486460
22. Jager NA<sup>1</sup>, Wallis de Vries BM<sup>2</sup>, Hillebrands JL<sup>3</sup>, Harlaar NJ<sup>2</sup>, Tio RA<sup>4</sup>, Slart RH<sup>5</sup>, van Dam GM<sup>2</sup>, Boersma HH<sup>5,6</sup>, Zeebregts CJ<sup>7</sup>, Westra J<sup>1</sup>. Distribution of Matrix Metalloproteinases in Human Atherosclerotic Carotid Plaques and Their Production by Smooth Muscle Cells and Macrophage Subsets. *Mol Imaging Biol*. 2016 Apr;18(2):283-91. doi: 10.1007/s11307-015-0882-0.
23. Lecanu L<sup>1</sup>, Yao ZX, McCourty A, Sidahmed el-K, Orellana ME, Burnier MN, Papadopoulos V. Control of hypercholesterolemia and atherosclerosis using the cholesterol recognition/interaction amino acid sequence of the translocator protein TSPO. *Steroids*. 2013 Feb;78(2):137-46. doi: 10.1016/j.steroids.2012.10.018. Epub 2012 Nov 23.

24. Da Pozzo E<sup>1</sup>, Giacomelli C<sup>2</sup>, Costa B<sup>3</sup>, Cavallini C<sup>4</sup>, Taliani S<sup>5</sup>, Barresi E<sup>6</sup>, Da Settimo F<sup>7</sup>, Martini C<sup>8</sup>. TSPO PIGA Ligands Promote Neurosteroidogenesis and Human Astrocyte Well-Being. *Int J Mol Sci*. 2016 Jun 29;17(7). pii: E1028. doi: 10.3390/ijms17071028.
25. Lavisse S<sup>1</sup>, Inoue K, Jan C, Peyronneau MA, Petit F, Goutal S, Dauguet J, Guillermier M, Dollé F, Rbah-Vidal L, Van Camp N, Aron-Badin R, Remy P, Hantraye P. [18F]DPA-714 PET imaging of translocator protein TSPO (18 kDa) in the normal and excitotoxically-lesioned nonhuman primate brain. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2015 Mar;42(3):478-94. doi: 10.1007/s00259-014-2962-9. Epub 2014 Dec 9.
26. Raggi P<sup>1</sup>, Baldassarre D<sup>2</sup>, Day S<sup>3</sup>, de Groot E<sup>4</sup>, Fayad ZA<sup>5</sup>. Non-invasive imaging of atherosclerosis regression with magnetic resonance to guide drug development. *Atherosclerosis*. 2016 Aug;251:476-82. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.06.028. Epub 2016 Jun 16.
27. Blykers A, Schoonooghe S, Xavier C, D'hoë K, Laoui D, D'Huyvetter M, Vaneycken I, Cleeren F, Bormans G, Heemskerk J, Raes G, De Baetselier P, **Lahoutte** T, Devoogdt N, Van Ginderachter JA, Caveliers V. PET Imaging of Macrophage **Mannose Receptor**-Expressing Macrophages in Tumor Stroma Using 18F-Radiolabeled Camelid Single-Domain Antibody Fragments. *J Nucl Med*. 2015 Aug;56(8):1265-71. doi: 10.2967/jnumed.115.156828. Epub 2015 Jun 11.
- 28.

**TABLES:****Table 1:** Correlations between RNA vulnerable markers in carotid artery.\* genes related to imaging (*Hkl* for [<sup>18</sup>F]-FDG and *Tspo* for [<sup>11</sup>C]-PK11195), \*\* anti-inflammatory markers

	Correlated with	r	p
<i>Ccl2</i>	<i>Il-1β</i>	0.9	0.001
	<i>Tlr4</i>	0.9	0.001
	<i>Il-1ra</i> **	0.9	0.003
	<i>Tspo</i> *	0.89	0.001
	<i>Cd163</i> **	0.88	0.001
	<i>Clec7a</i> **	0.87	<0.001
	<i>Cd3ε</i>	0.86	0.003
	<i>Cd68</i>	0.86	0.002
	<i>Cd14</i>	0.85	0.001
	<i>Ppif (CyD)</i>	0.81	0.006
	<i>Hkl</i> *	0.79	0.009
	<i>Il-6</i>	0.71	0.027
	<i>Irf4</i> **	0.7	0.001
<i>Il-1β</i>	<i>Cd14</i>	0.95	<0.001
	<i>Clec7a</i> **	0.95	<0.001
	<i>Ccl2</i>	0.9	0.001
	<i>Il-1ra</i> **	0.9	0.001
	<i>Hkl</i> *	0.89	0.001
	<i>Tlr4</i>	0.86	0.002
	<i>Tspo</i> *	0.82	0.006
	<i>Ppif (CyD)</i>	0.8	0.009
	<i>Il-6</i>	0.69	0.031
		<i>Cd3ε</i>	0.66
<i>Il-6</i>	<i>Cd3ε</i>	0,81	0,007
	<i>Il-1ra</i> **	0.75	0.009
	<i>Ccl2</i>	0,71	0,027
	<i>Cd14</i>	0.71	0.01
	<i>Il-1β</i>	0,69	0,031
	<i>Il-10</i> **	0.69	0.027
	<i>Hkl</i> *	0,66	0,044



## **FIGURES LEGENDS:**

**Figure 1:** Lipidic profiles. Plasmatic cholesterol level (A) and HDL/LDL ratio (B) of HC diet animals at 0, 1, 7, 12, 18 and 24 months after the start of the diet. Lipoprotein profile of one HC (C) and one control (D) NHP at T+24 months.

\*\*\* Significantly different from T0  $p < 0.001$ ; HC and SD: high cholesterol and standard diet

**Figure 2:** Carotid imaging. MRI plaque area (A) and gadolinium SI enhancement (B) of HC and SD animals. MRI carotid plaque measurement showed vessel wall thickening in HC animals compared to SD (A,  $p < 0.001$ ), but no difference in gadolinium SI measurement. Differential right and left enhancement was observed in HC NHP (C, arrow for the right enhanced carotid). [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG SUV of right and left carotid of HC (D) showed no difference between HC and SD animals. For the same HC NHP as in C, [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG uptake was also observed in the right carotid (E, arrow). There was also no difference between HC and SD for [ $^{11}\text{C}$ ]-PK1195 TBR of carotid arteries (F), but the right and left asymmetry was also observed for the same HD animal as in C and E (G, arrow).

\*\*\* Significantly different from SD  $p < 0.001$ ; SI: signal intensity; HC and SD: high cholesterol and standard diet; TBR: target-to-background ratio

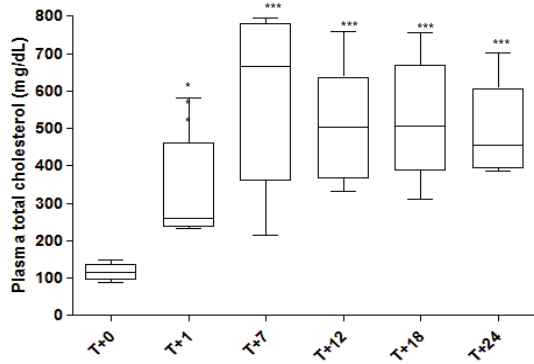
**Figure 3:** Longitudinal ultrasound and systemic biomarkers. Ultrasound score in the carotid arteries (A), hsCRP (B) and plasmatic LDL-C level (C) at T+12 and T+18 months.

**Figure 4:** At-risk Non-Human Primates with downstream events. Histological evidences of coronary stenosis (A,C), myocardial fibrosis (B) and severe and diffuse plaque (D) in three of our NHPs. These animals also present severe and diffuse plaque visible on the left carotid (E,H,J). MRI (F) showed the presence of a lacunar stroke in one of these two animals, and the PET/CT imaging showed that this area presents a high binding potential for [ $^{11}\text{C}$ ]-PK1195 (G) and the left carotid of this NHP showed a multifocal plaque in histology (I).

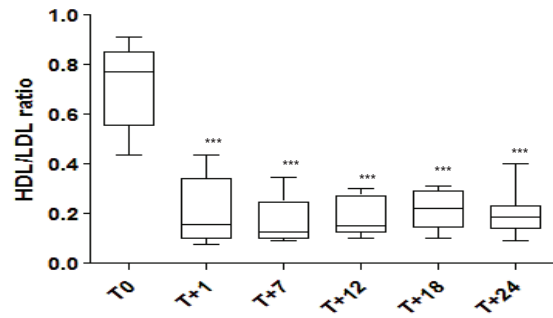
**Figure 5:** In HC animals, we observed a positive correlation between [ $^{11}\text{C}$ ]-PK1195 TBR and [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG SUVmax (A) but a negative one in SD animals (B). RNA expression of gene of vulnerable plaque markers in the carotid arteries enables division of NHP in three group of different

cardiovascular risk (C). To be noted: the three animals with downstream events are classified into the high cardiovascular risk group on the sole RNA expression analysis. PCA analysis confirmed the three groups of animals (D).

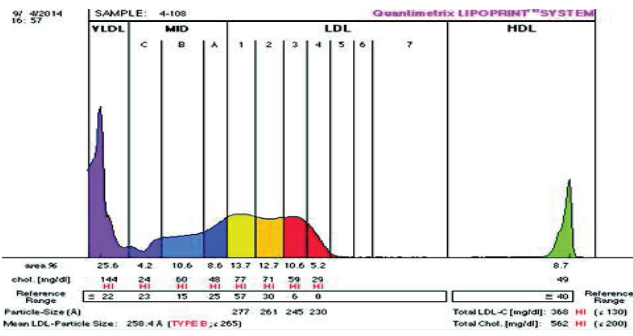
**A**



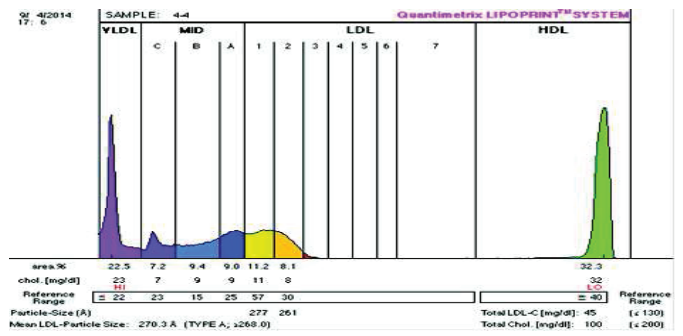
**B**

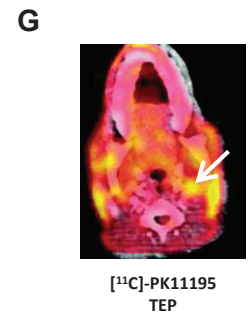
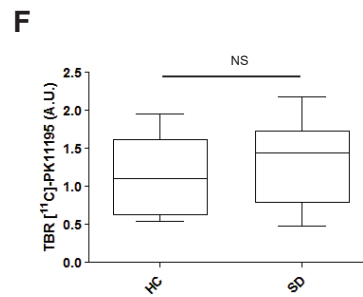
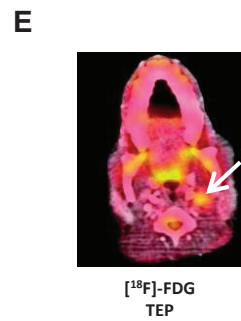
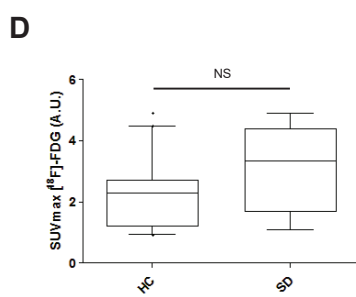
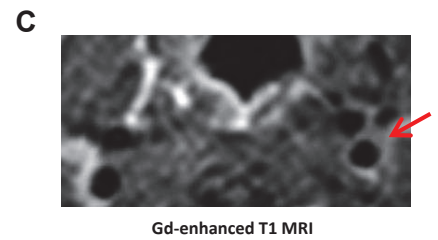
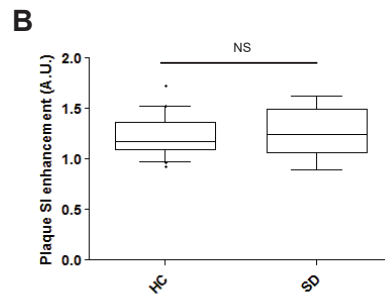
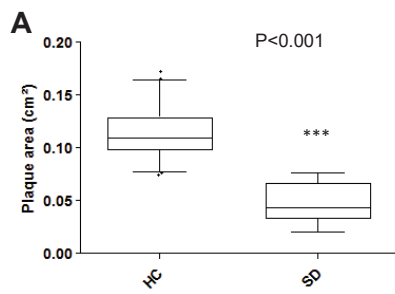


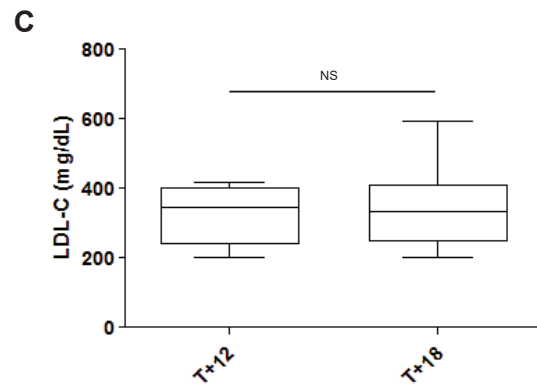
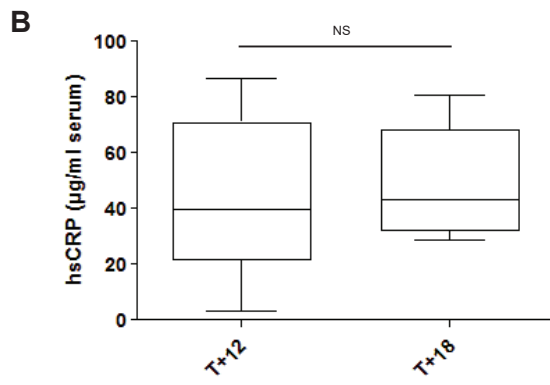
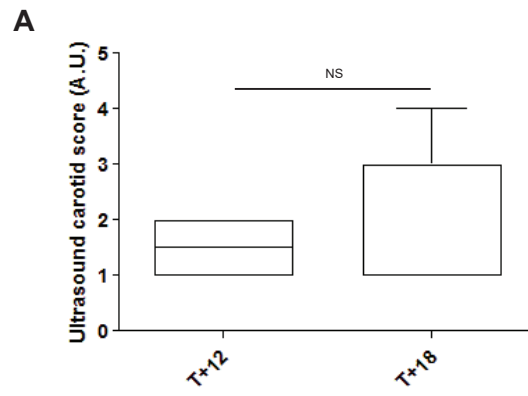
**C**



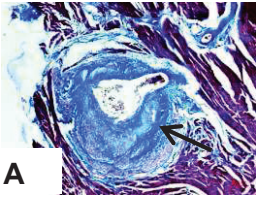
**D**



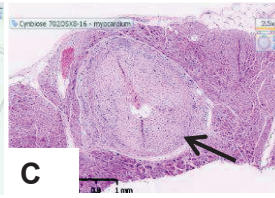
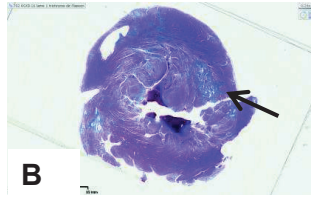




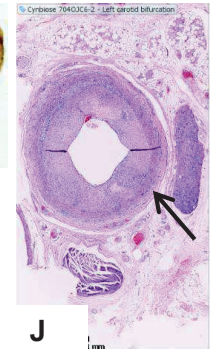
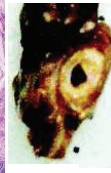
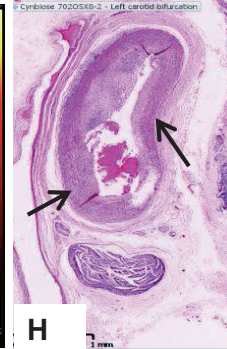
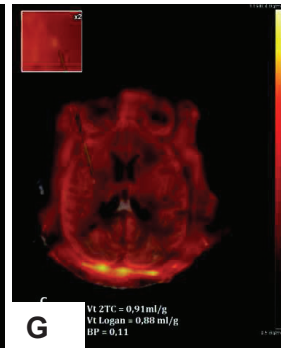
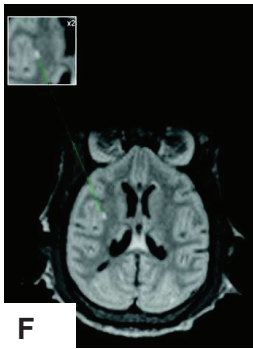
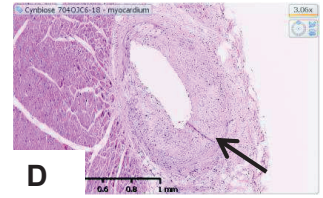
**HC#1**



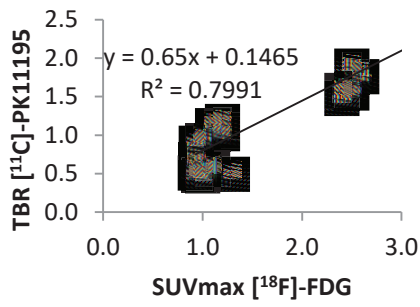
**HC#9**



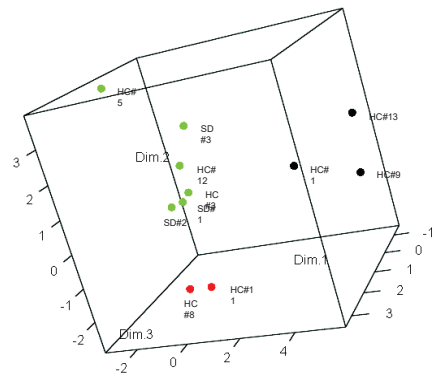
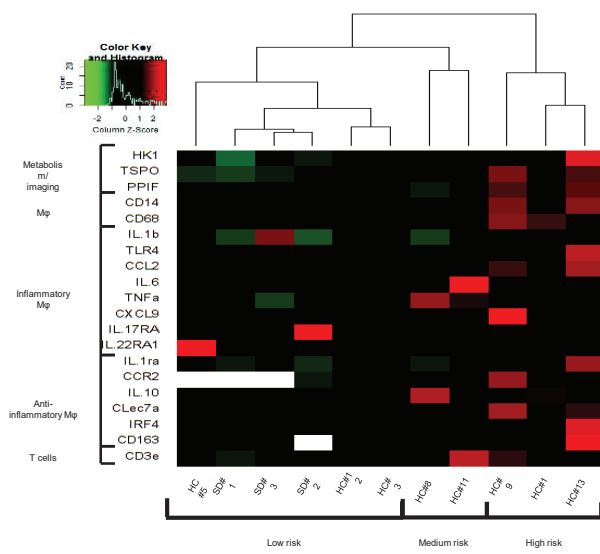
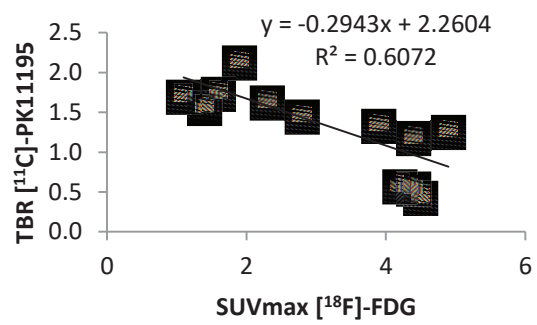
**HC#13**



HC



SD



## Supplemental data

- **Figure S1:** Experimental study design over the 24 months.
- **Figure S2:** MR and CT angiographies used for MR and PET/CT images registration for an accurate placing of ROI for carotid wall measurement.
- **Figure S3:** Right and left carotid individual values for MRI plaque surface (A, B), for gadolinium plaque SI enhancement (C, D), for SUVmax [18G]-FDG (E, F), [11C]-PK11195 (G, H) in HC and SD animals, respectively. Though PET inflammation biomarkers: and gadolinium MRI permeability marker levels are not directly correlated, there is a corresponding left/right difference in HC animals with the three imaging markers. In old SD animals, there was also elevated inflammation at the measurement time-point, illustrating the importance of longitudinal inflammation evaluation to discriminate between chronic atherosclerosis inflammation and acute unrelated inflammatory status.
- **Figure S4:** Individual values for ultrasound carotid scores (A), hsCRP (B) and LDL-C levels (C) at T+12 and T+18 months in HC animals At-risk cholesterol profile (low HDL, high LDL-C), chronic inflammation (hsCRP high or increasing) and lesion progression by US were found in 3 NHP (#1, #9, #13).
- **Figure S5:** Multi-site inflammation showing corresponding higher uptake in aortic arch, and hematopoietic organs (bone marrow and spleen) in an at-risk HD animal compared to a lower risk HD subject
- **Figure S6:** RNA expression of genes of vulnerable plaque markers and correlation between them in aortic arch (left) and abdominal aorta (right).
- **Figure S7:** Adipose tissue imaging of white subcutaneous and visceral fat, SAT and VAT respectively (A-B), and brown fat, BAT (C-D) and correlations from gene analysis in pericardic (E), periarterial (F) and visceral (G) adipose tissues. In HC animals, there was a higher FDG uptake in visceral adipose tissue and a lower in brown adipose tissue compared to SD .
- **Figure S8:** Brain PET/CT imaging. Higher uptake of <sup>11</sup>C-PK11195 in the frontal cortex (A) and limbic system (B) in HC animals. Lower metabolic activity (lower <sup>18</sup>F-FDG uptake) in the limbic system in HC animals (C).
- **Figure S9:** RNA expression of genes of vulnerable plaque markers in the brain.





Blood sampling



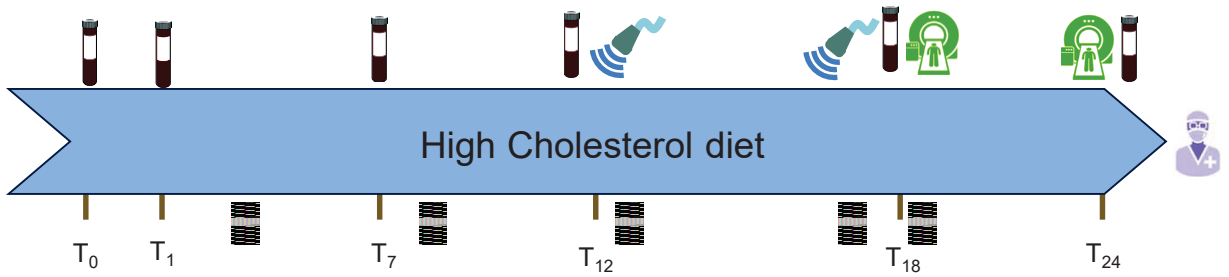
Ultrasonography



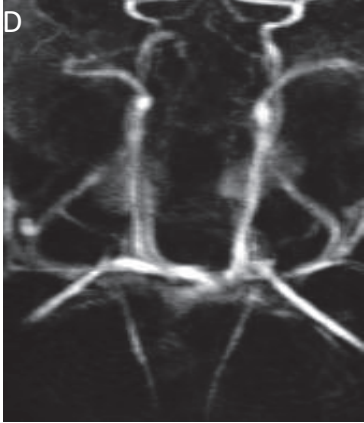
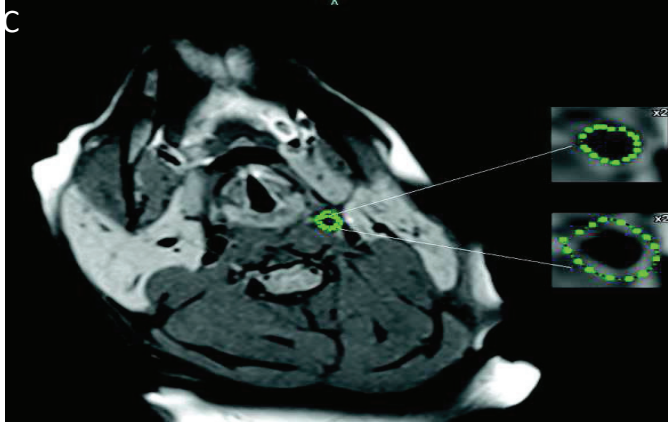
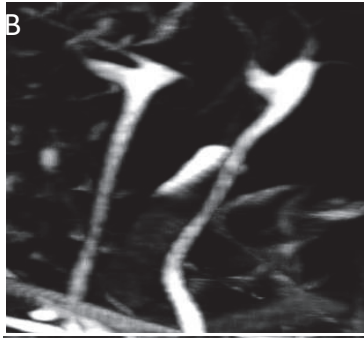
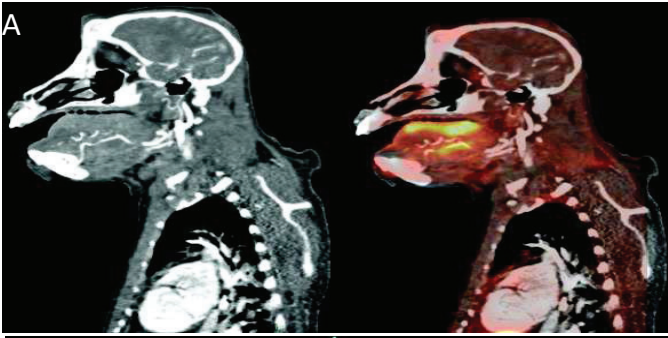
PET/CT scan  
MRI

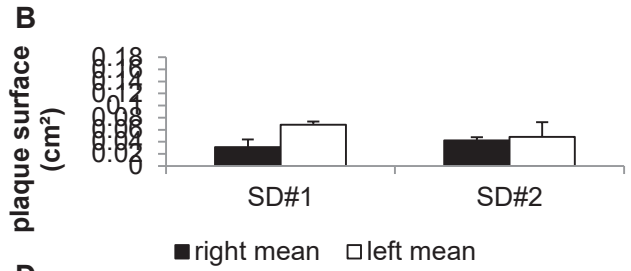
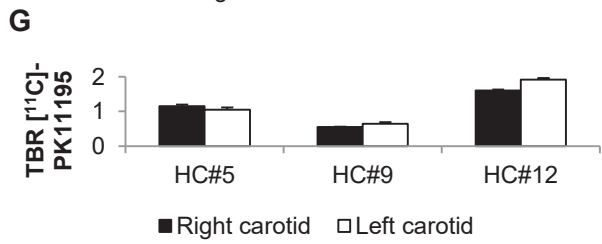
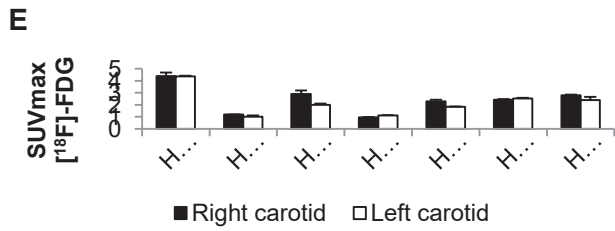
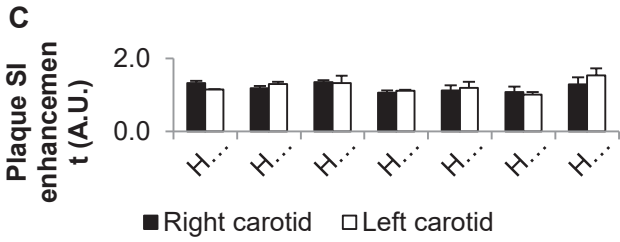
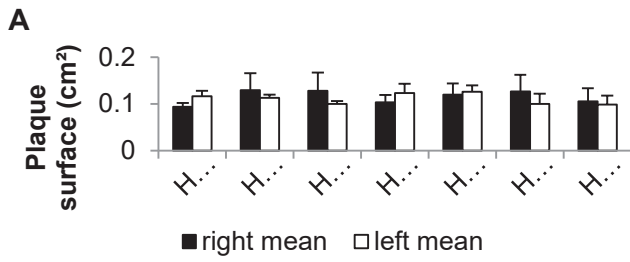


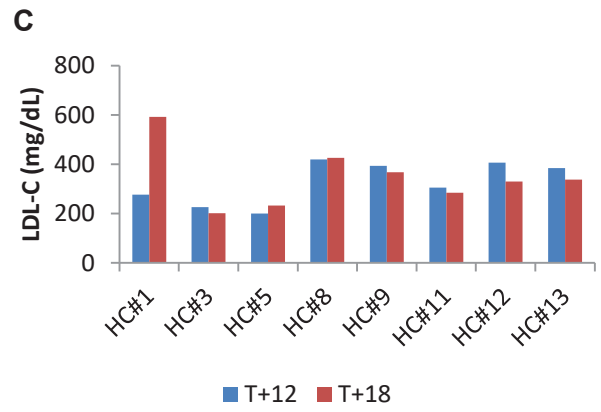
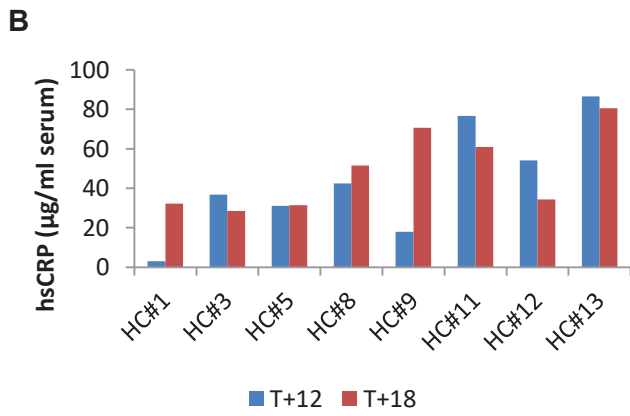
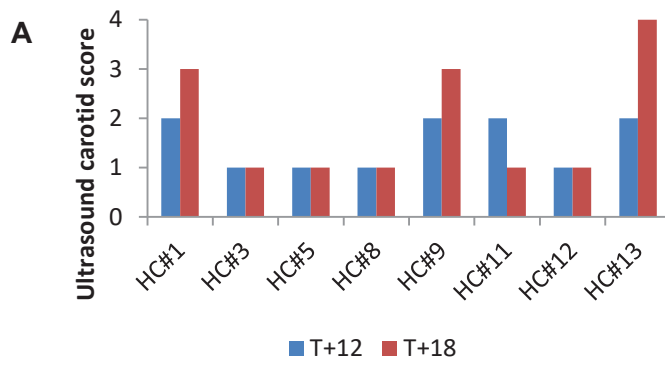
Necropsy + Analysis



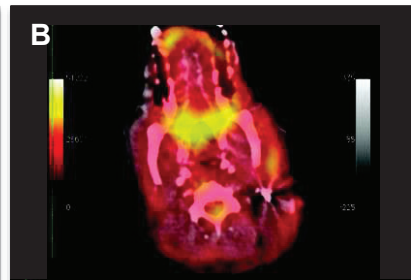
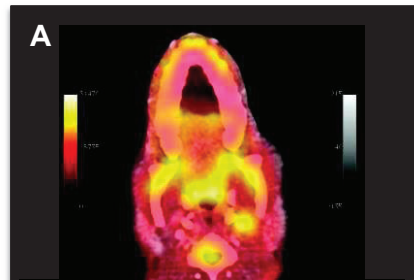
24 months follow-up



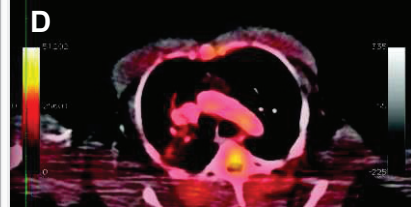
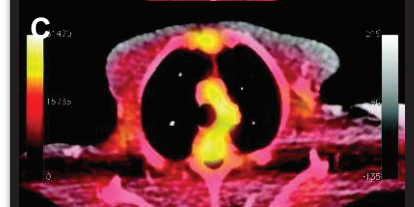




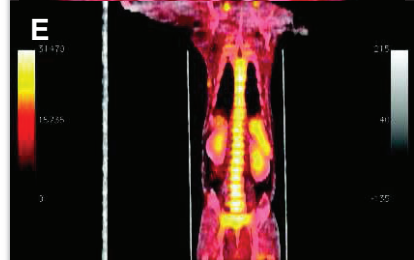
Carotids



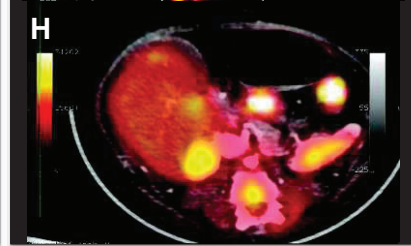
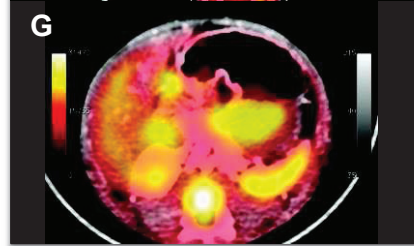
Aorta

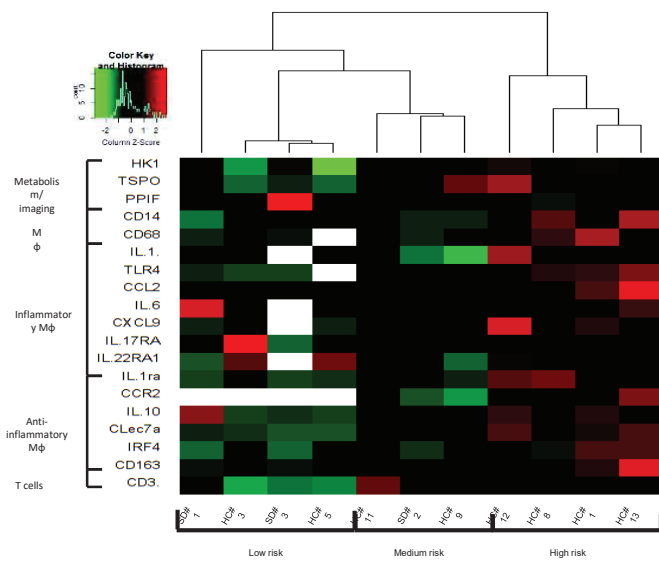


Bone marrow



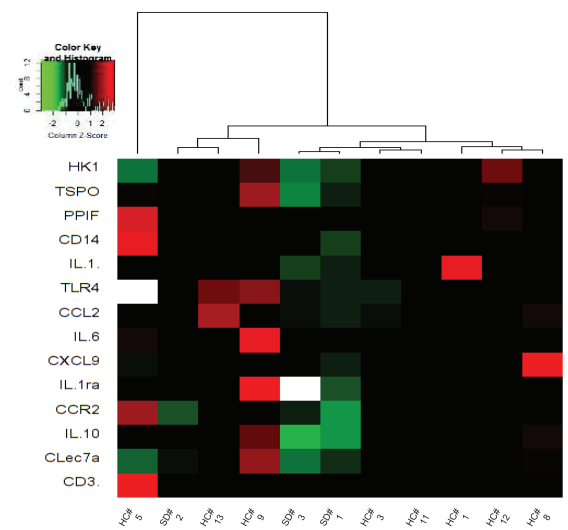
Spleen





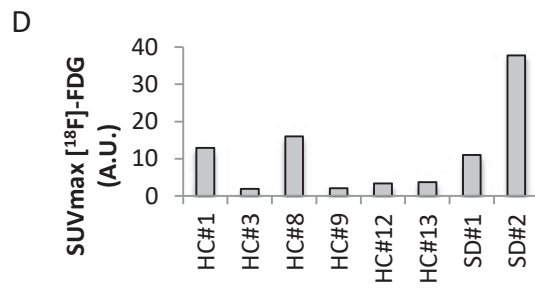
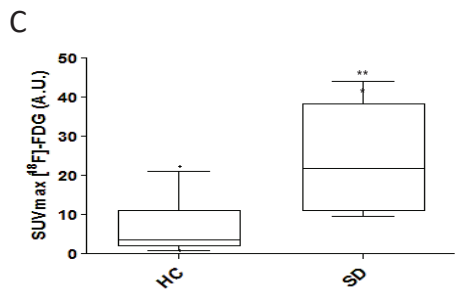
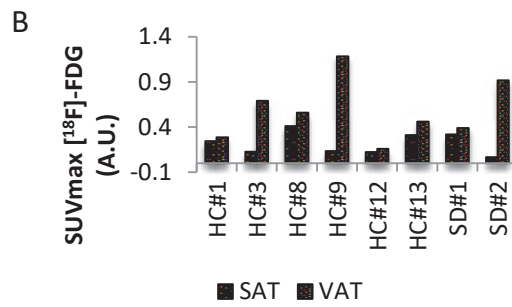
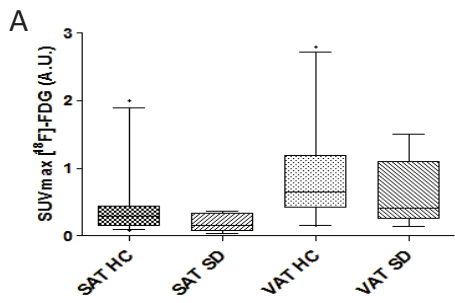
Correlated with	r	p	Correlated with	r	p	
Cd2			HK1 *	0.82	0.002	
	Cd14	0.95	<0.001	Tspo *	0.72	0.012
	Cd68	0.82	0.002	IL1ra **	0.78	0.005
	Tlr4	0.95	<0.001	Clec7a	0.76	0.007
	Clec7a	0.79	0.004	IL17ra	0.85	<0.001
	Cd163 **	0.92	<0.001	Cd14	0.66	0.027
	IL4 **	0.87	<0.001	Ccd9	0.63	0.038
	HK1 *	0.65	0.03	Cor2	0.67	0.024
	IL1ra **	0.64	0.034	IL10 **	0.64	0.034
	Cor2	0.67	0.024	Cd3x	0.74	0.009
	Cd3x	0.61	0.046			
			IL6	IL10 **	0.77	0.008

Aortic arch



Correlated with	r	p	
Cd2	HK1 *	0.65	0.03
	Tlr4	0.72	0.012
	Cor2	0.68	0.021
	Cd14	0.78	0.005
	IL10 **	0.87	<0.001
	Clec7a	0.8	0.003
	Cd3x	0.92	<0.001
IL1β	Tspo *	0.64	0.034
	IL6	0.93	<0.001
	Cd14	0.75	0.008
	Clec7a	0.63	0.038
IL6	Cd14	0.68	0.021

Abdo aorta



**E**

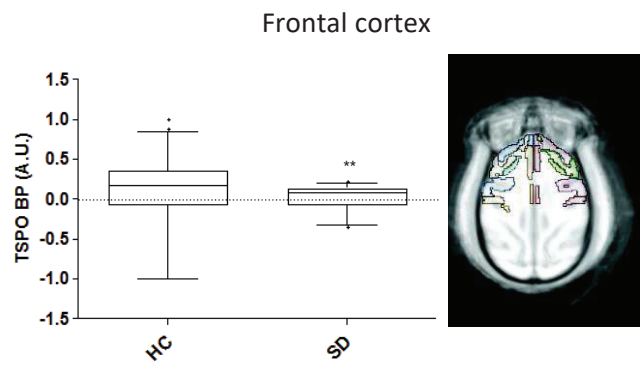
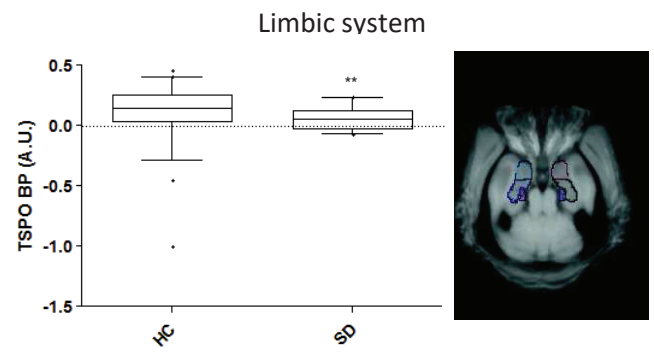
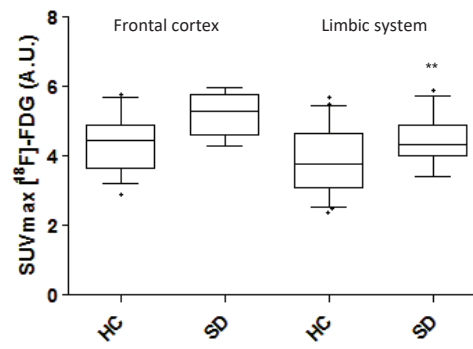
	Correlate w/	r
MCP1 (CCL2)	IL-1b	0.674
	TLR4	0.677
	IL-6	0.644
	IL-10	0.761
	CD3e	0.652
IL-6	IL-1b	0.807
	TLR4	-0.645
CD3e	MCP1	-0.652
	CD163	0.691
	IL-17RA	0.743

**F**

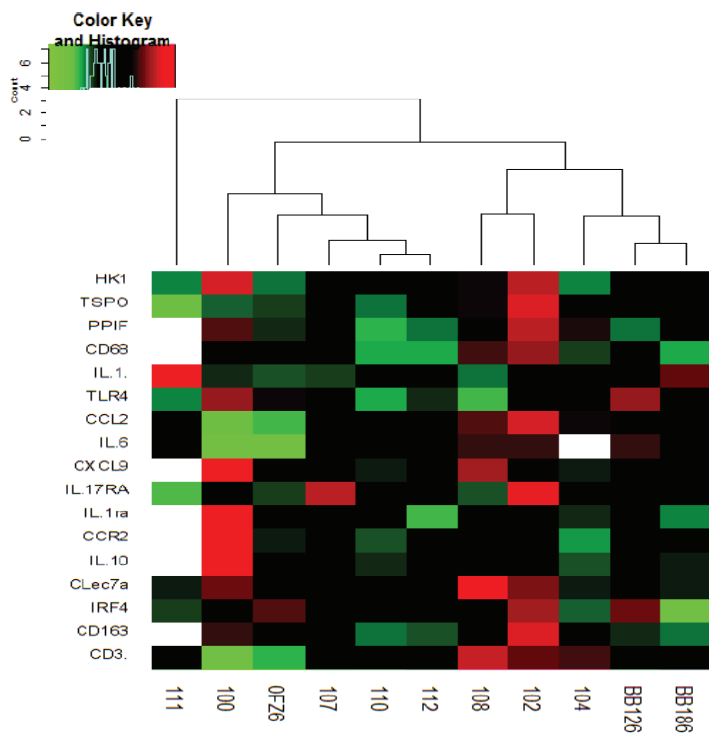
	Correlate w/	r
IL-1b	IL-6	0.776
	CXCL9	0.831
	CCR2	0.861
	CLec7a	0.958
IL-6	CD3e	0.776
	PPIF	0.976

**G**

	Correlate w/	r
MCP1	CD14	0.723
	TLR4	0.691
	IL-6	0.906
	IL-1ra	0.98
	IL-10	0.655
IL-1b	CD163	0.85
	CCR2	0.677
	IL-10	0.739
IL-6	CD163	0.633
	CD68	0.841
	IL-1ra	0.894
CD3e	CD163	0.856
	PPIF	0.865
	CXCL9	0.739

**A****B****C**





	Correlate with	r
MCP1	TSP0 *	0.824
	CD3e	0.952
IL-1b	IL-1ra	-0.617
IL-6	HK1 *	0.675
CD3e	TSP0 *	0.718