



**HAL**  
open science

# Rôle du récepteur nucléaire CAR dans la pathogénèse dimorphique de la NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease), induite par un régime gras ou par l'exposition à des contaminants alimentaires

Fabiana Oliviero

## ► To cite this version:

Fabiana Oliviero. Rôle du récepteur nucléaire CAR dans la pathogénèse dimorphique de la NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease), induite par un régime gras ou par l'exposition à des contaminants alimentaires. Médecine humaine et pathologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2021. Français. NNT : 2021TOU30271 . tel-03701186

**HAL Id: tel-03701186**

**<https://theses.hal.science/tel-03701186>**

Submitted on 21 Jun 2022

**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.

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

# THÈSE

## En vue de l'obtention du **DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

---

Présentée et soutenue par

**Fabiana OLIVIERO**

Le 19 octobre 2021

**Rôle du récepteur nucléaire CAR dans la pathogénèse  
dimorphique de la NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease),  
induite par un régime gras ou par l'exposition à des contaminants  
alimentaires.**

---

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **PHARMACOLOGIE**

Unité de recherche :

**TOXALIM - Laboratoire de Toxicologie Alimentaire**

Thèse dirigée par

**Laila LAKHAL**

Jury

Mme Béatrice DESVERGNE, Rapporteur

M. David VOLLE, Rapporteur

Mme Dominique LAGADIC, Examinatrice

Mme Isabelle CASTAN-LAURELL, Examinatrice

Mme Laila LAKHAL, Directrice de thèse



## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury.

A Madame la Professeure Béatrice Desvergne et à Monsieur le Docteur David Volle, merci d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Votre lecture attentive et vos commentaires très pertinents ont beaucoup apporté. Je vous remercie pour votre investissement.

A Madame la Professeure Isabelle Castan-Laurell, merci d'avoir accepté de présider ce jury. A Madame la Docteure Dominique Lagadic, merci d'avoir accepté d'assister à cette soutenance de thèse en tant qu'examinatrice.

A Monsieur le Docteur Cédric Dray et Monsieur le Docteur Xavier Coumoul, je vous remercie d'avoir participé à mes comités de thèse. Merci pour les discussions intéressantes, les conseils scientifiques et pour vos encouragements.

Je remercie ma directrice de thèse Laïla pour la confiance accordée au cours de ces dernières années. Merci de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur tes projets. La qualité de ces projets nous ont permis d'effectuer beaucoup de manips et d'avoir de belles collaborations extérieures. Merci pour les nombreuses heures passées à discuter de Sciences et autre, pour les heures passées à apprendre à gaver et faire des prises de sang aux souris. Ces 3 années de thèse (et 6 mois de stage) n'ont pas été sans obstacles, on a été confrontées à des situations difficiles mais on a réussi à se soutenir pour être dans les meilleures conditions pour mener à bien ma thèse et tes projets. Merci aussi pour ton aide et soutien pendant cette dernière ligne droite. L'aide à la rédaction de mon manuscrit de thèse et les répétitions de soutenance. Je te souhaite le meilleur pour les prochaines thèses et tes prochaines aventures scientifiques.

Merci à mon équipe d'accueil, l'équipe 3 EXPER de Toxalim. Merci Nicole, Véronique et Catherine pour l'accueil chaleureux que vous nous avez réservé. Merci pour l'aide à la rédaction de demandes de prix, de revues et d'articles. Merci aussi pour les nombreux conseils lors des présentations en réunion d'équipe. Merci à Clémence pour ta gentillesse et bonne humeur. J'ai apprécié les moments passés avec toi, que ce soit discuter au labo ou à l'apéro. Bon courage pour cette dernière ligne droite et je te souhaite le meilleur pour la suite. Merci aussi à Quentin, Cédric, Karine, Ophélie et Alicia pour les moments passés ensemble.

Je remercie également les stagiaires de Master 2 que j'ai encadré/co-encadré au cours de ma thèse : Lucile, Maeva et Yannick. J'ai beaucoup apprécié transmettre mes connaissances. Lucile, merci pour l'aide précieuse sur la manip CARPFOA pendant ton stage et sur toutes les autres qui ont suivi pendant ton CDD. Je ne pourrais manquer de te remercier pour les innombrables matchs de badminton entre midi et deux 😊.

Je remercie chaleureusement l'équipe de Montpellier pour la collaboration sur le projet Hépatobrain. Nicola, merci pour ton aide précieuse sur la rédaction des papiers. J'ai beaucoup appris de toi. Wendy, merci pour ton aide sur les manips à Montpellier et d'avoir suivi nos souris pendant un an d'exposition aux pesticides. Merci aussi d'être venue à Toulouse disséquer les cerveaux de ma manip CARHFD, toujours dans la bonne humeur. Je remercie



aussi Frédéric et Marine pour toute l'aide apportée. Merci de nous avoir toujours bien accueillis à l'IGF.

Je souhaiterais également remercier la plateforme EZOP pour l'expérimentation animale. Merci Colette pour l'élevage des CAR/PXR au bâtiment B. Merci à Jelskey d'avoir pris la relève au bâtiment D. Merci Jelskey pour ton coaching sur les poinçons des souris. Merci pour ta bonne humeur les jours où on avait quelques centaines de souris à poinçonner. Merci aussi à Elodie, Caroline, Florence, Géraldine et Mikael pour votre aide et disponibilité. Aurélia, merci pour ton aide, ta disponibilité et bien sûr pour les moments passés ensemble à discuter.

Merci à l'équipe du midi : Jeannette, Saleha, Anne, Muriel, Hervé. Merci pour tous les agréables moments passés ensemble et les discussions passionnantes.

Je remercie également tous les plateaux techniques tels que la plateforme de lipidomique et la plateforme Anexplo de Ranguel ainsi que la plateforme d'histologie à Purpan.

Merci au groupe des thésards/fêtards de Toxalim : Anaïs bien sûr, de la licence et Master SDN à Paul Sabatier au doctorat à Toxalim, ce fut cool de partager cette route avec toi 😊 Merci à toi et à tout le groupe : Marie, Adèle, Loïc, Jasper, Nùria... pour les apéros souvent bien arrosés mais qui ont été un support énorme. Je vous souhaite à tous le meilleur pour la suite.

J'aimerais également remercier l'équipe TIM qui m'a accueilli à mon arrivée à Toxalim en stage de M2. Merci à vous Hervé, Nicolas, Sandrine, Laurence et Anne. Merci aussi aux thésards de l'époque : Céline, Marion, Sarra, Tiffany, Lorraine, Sharon et les stagiaires Léonie et Quentin. Merci à Arnaud et Fred pour leur aide et formation précieuse sur les manip.

Merci au centre équestre de l'ENVT, merci Alexandra, pour ton coaching infailible qui m'a fait progresser énormément. Merci à l'ASTMB pour tous les volants échangés. Le Covid a malheureusement coupé court à ma carrière Senior 😊 J'ai donc une revanche à prendre sur les prochains tournois.

Merci à Toulouse de m'avoir accueillie pour mes études juste après mon bac. Je suis arrivée étant une jeune fille et j'en repars une femme, docteure ! Toutes les expériences vécues ici pendant ces 9 ans resteront gravées en moi.

Last but definitely not least, à mes parents Francesco et Paola, mes frères Luca et Sacha et ma moitié Shadi, je vous remercie pour le soutien et l'amour INCONDITIONNELS.

## Table des matières

.....	0
<b>Liste des publications</b> .....	<b>6</b>
Publications .....	6
Publications associées .....	6
Publications en préparation/reviewing .....	6
<b>Liste des communications</b> .....	<b>7</b>
Communications orales .....	7
Communications affichées.....	7
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>8</b>
<b>Liste des illustrations</b> .....	<b>11</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>12</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>13</b>
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>14</b>
<b>Partie I : Physiologie du foie</b> .....	<b>14</b>
<b>I.1 Anatomie du foie</b> .....	<b>14</b>
I.1.1 Développement embryonnaire.....	14
I.1.2 Structure en lobes et lobules hépatiques .....	15
<b>I.2 Types cellulaires constituant le foie</b> .....	<b>17</b>
<b>I.3 Fonctions du foie</b> .....	<b>19</b>
I.3.1 Détoxification endogène et exogène.....	19
I.3.2 Homéostasie énergétique.....	21
<b>I.4 Dimorphisme sexuel du foie</b> .....	<b>26</b>
I.4.1 Dimorphisme dans la fonction de détoxification.....	27
I.4.2 Dimorphisme dans la régulation du métabolisme énergétique .....	28
<b>Partie II : Physio-pathologie du foie, la NAFLD</b> .....	<b>30</b>
<b>II.1 Définition et prévalence générale</b> .....	<b>30</b>
<b>II.2 Causes et facteurs de risque</b> .....	<b>32</b>
<b>II.3 Pathogénèse de la NAFLD</b> .....	<b>34</b>
<b>II.4 Dimorphisme sexuel et NAFLD</b> .....	<b>37</b>
II.4.1 Prévalence dimorphique .....	37
II.4.2 Rôle des hormones sexuelles.....	38
<b>II.5 Difficultés du diagnostic de la NAFLD</b> .....	<b>40</b>
<b>II.6 Options thérapeutiques pour la NAFLD</b> .....	<b>42</b>
<b>II.7 Modèles d'étude de la NAFLD</b> .....	<b>46</b>
<b>Partie III : Système nerveux central et NAFLD</b> .....	<b>49</b>
<b>III.1 Généralités sur le SNC</b> .....	<b>49</b>
<b>III.2 Types cellulaires du SNC</b> .....	<b>50</b>

III.3 SNC et métabolisme énergétique .....	53
III.4 Astrocytes et homéostasie énergétique.....	54
III.5 SNC et NAFLD .....	56
<b>Partie IV : Rôle de CAR dans la pathogenèse de la NAFLD.....</b>	<b>59</b>
IV.1 Le récepteur CAR est un senseur de stress périphérique et neurovasculaire .....	59
IV.2 Récepteur CAR et NAFLD .....	79
<b>Partie V : Physio-pathologie du foie : la TAFLD.....</b>	<b>82</b>
V.1 Pathogenèse de la TAFLD .....	82
<b>V.2 Rôle des pesticides dans le développement de la TAFLD .....</b>	<b>85</b>
V.2.1 Généralités sur les pesticides .....	85
V.2.2 Classification des pesticides et exposition humaine .....	86
V.2.3 Effets des pesticides sur l'homéostasie énergétique .....	87
V.2.4 Mécanismes d'action des pesticides .....	89
<b>V.3 PFOA et développement de la TAFLD .....</b>	<b>92</b>
V.3.1 Généralités et structure chimique du PFOA .....	92
V.3.2 Propriétés pharmacocinétiques du PFOA et exposition humaine .....	94
V.3.4 Effets du PFOA sur le métabolisme énergétique.....	96
V.3.5 Mécanismes de toxicité du PFOA .....	99
<b>ETUDES EXPERIMENTALES.....</b>	<b>101</b>
<b>Partie I.....</b>	<b>101</b>
<b>Le récepteur nucléaire CAR protège les souris femelles du développement de la NAFLD induite par un régime gras.....</b>	<b>101</b>
<b>Partie II.....</b>	<b>153</b>
<b>Etude du rôle du récepteur CAR dans la pathogenèse de la stéatose hépatique induite par l'acide perfluorooctanoïque (PFOA).....</b>	<b>153</b>
<b>Partie III.....</b>	<b>170</b>
<b>Une exposition chronique à un mélange de pesticides induit des adaptations du comportement, des altérations neurophysiologiques et une activation des voies de détoxification hépatiques.</b>	<b>170</b>
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>186</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>203</b>

## Liste des publications

### Publications

- Life-long dietary pesticide cocktail induces astrogliosis along with behavioral adaptations and activates p450 metabolic pathways. *Neuroscience*, July 2020.  
**W Klement\***, **F Oliviero\***, G Gangarossa, E Zub, F De Bock, I Forner-Piquer, M Blaquière, F Lasserre, JM Pascussi, T Maurice, E Audinat, S Ellero-Simatos, L Gamet-Payrastre, L Mselli-Lakhal, N Marchi.  
\* : equal contribution
- Constitutive Androstan Receptor : a Peripheral and a Neurovascular stress or environmental sensor. *Cells*, November 2020.  
**F Oliviero\***, C Lukowicz\*, B Boussadia, I Forner-Piquer, N Marchi, L Mselli-Lakhal, JM Pascussi. \* : equal contribution
- Bisphénols, perturbations des voies métaboliques et rôles dans l'obésité et le diabète. *Innovation Agronomiques*, 2018. hal.inrae.fr hal-02618176.  
**F Oliviero**, L Mselli-Lakhal.

### Publications associées

- Dimorphic metabolic and endocrine disorders in mice lacking the constitutive androstan receptor. *Scientific Reports*, December 2019.  
C Lukowicz, S Ellero-Simatos, M Régnier, **F Oliviero**, F Lasserre, A Polizzi, A Montagner, S Smati, F Boudou, F Lenfant, L Guzylack-Pirou, S Menard, S Barretto, A Fougerat, Y Lippi, C Naylies, J Bertrand-Michel, A Ait Belgnaoui, V Theodorou, N Marchi, P Gourdy, L Gamet-Payrastre, N Loiseau, H Guillou, L Mselli-Lakhal.

### Publications en préparation/reviewing

- CAR protects female mice from diet-induced NAFLD and associated metabolic disorders.  
En review - *Journal of hepatology*.  
**F Oliviero**, W Klement, L Mary, C Naylies, Y Lippi, V Gayrard, N Marchi, L Mselli-Lakhal.
- Role of nuclear receptor CAR in the development of PFOA-associated fatty liver disease.  
En préparation.  
**Oliviero et al.**

## Liste des communications

### Communications orales

- Congrès de la société d'endocrinologie internationale ENDO Online 2020 (initialement prévu à San Francisco (USA) mais a eu lieu en distanciel à cause du COVID-19).

Nuclear Receptor CAR protects female mice from the development of diet-induced Non-Alcoholic Fatty Liver Disease.

**F Oliviero**, C Lukowicz, L Mary, L Mselli-Lakhal.

- Demi-journée des graines de ToxAlim 2020

Protection dimorphique du récepteur nucléaire CAR envers la NAFLD et les désordres métaboliques induits par un régime gras.

**F Oliviero**, W Klement, C Lukowicz, L Mary, N Marchi, L Mselli-Lakhal.

### Communications affichées

- Société française d'endocrinologie (SFE), Marseille 2020

Le récepteur nucléaire CAR protège les souris femelles du développement de la NAFLD.

**F Oliviero**, W Klement, C Lukowicz, L Mary, N Marchi, L Mselli-Lakhal.

- EUROTOX 2021 virtual congress

Localization and impact of PFOA in vivo and in vitro by high-resolution chemical imaging.

C Stoffels, H Robert, M Lévèque, **F Oliviero**, L Lakhal, T Wirtz, M Mercier-Bonin, A C Gutleb, J-N Audinot.

## Liste des abréviations

<b>ABC</b>	ATP binding cassette
<b>ABCG2</b>	ATP binding cassette sub-family G member 2
<b>Acc</b>	Acétyl-Coa Carboxylase
<b>Acox1</b>	Acétyl-CoA carboxylase 1
<b>AgRP</b>	Agouti-Related Protein
<b>ALT</b>	Alanine aminotransférase
<b>APOC3</b>	Apolipoprotéine C3
<b>ASK1</b>	Apoptosis signal-regulating kinase 1
<b>AST</b>	Aspartate aminotransférase
<b>ATP</b>	Adenosine triphosphate
<b>BMP</b>	Bone Morphogenetic Protein
<b>CAR</b>	Constitutive Androstan Receptor
<b>CAR-/-</b>	CAR knock-out
<b>CART</b>	Cocaine-and-Amphetamine-Regulated Transcript
<b>CCL4</b>	Carbon tetrachloride
<b>CCR2/CCR5</b>	C-C Motif Chemokine Receptor 4/5
<b>CD-1-/-</b>	Cd1 <sup>tm1Gru</sup> knock-out
<b>CD36</b>	Fatty acid translocase
<b>CRE recombinase</b>	Enzyme recombinase tyrosine
<b>Cyp</b>	Cytochrome P450
<b>DJA</b>	Dose Journalière Admissible
<b>EAT2</b>	Etude d'alimentation totale 2
<b>EFSA</b>	European Food Safety Authority
<b>ELOVL5</b>	Elongation of very long chain fatty acids protein 5
<b>ER<math>\alpha</math></b>	Récepteur aux œstrogènes alpha
<b>FAS</b>	Fatty Acid Synthase
<b>FC</b>	Fold change
<b>FGF</b>	Fibroblast Growth Factor
<b>Fads2</b>	Fatty acid désaturase 2
<b>FXR</b>	Farnesoid X Receptor
<b>GABA</b>	Gamma-Amino Butyric Acid
<b>Gadd45<math>\beta</math></b>	Growth Arrest and DNA-Damage-Inducible 45 Beta
<b>GGT</b>	Gamma-glutamyl transferase
<b>GH</b>	Growth Hormone
<b>GLUT1/2</b>	Glucose transporter ½
<b>GRIP1</b>	Glucocorticoid Receptor Interacting Protein 1
<b>GWAS</b>	Genome Wide Association Studies
<b>HDL</b>	High density lipoprotein
<b>HFD</b>	High Fat Diet

<b>HGF</b>	Hepatocyte Growth Factor
<b>HIM-SIMS</b>	Helium Ion Microscopy with Secondary Ion Mass Spectrometry
<b>HNF4<math>\alpha</math></b>	Hepatocyte Nuclear Factor 4 alpha
<b>IARC</b>	International Agency for Research on Cancer
<b>IL12/18</b>	Interleukine 12/18
<b>JNK1</b>	June Kinase 1
<b>L-FABP</b>	liver-type fatty acid binding protein
<b>LPCAT3</b>	1-acylglycerophosphocholine acyltransférase
<b>LDL</b>	Low density lipoprotein
<b>Ldlr</b>	Low-density lipoprotein receptor
<b>LPAAT</b>	LysoPhosphatidic Acid AcylTransferase
<b>LXR</b>	Liver X Receptor
<b>LYPLAL1</b>	Lysophospholipase Like 1
<b>MBOAT7</b>	Membrane Bound O-Acyltransferase Domain Containing 7
<b>MCD</b>	Methionine/Choline Deficient Diet
<b>MCL-1</b>	Myeloid Cell Leukemia-1
<b>MDR</b>	Multi Drug Resistance
<b>MRP</b>	Multidrug Resistance Protein
<b>NAFLD</b>	Non-Alcoholic Fatty Liver Disease
<b>NASH</b>	Non-Alcoholic Steato Hepatitis
<b>NCAN</b>	Neurocan core protein
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B
<b>NK</b>	Natural Killer
<b>NPY</b>	neuropeptide Y
<b>Nrf2</b>	Nuclear factor-erythroid factor 2
<b>OAT</b>	Organic Anion transporter
<b>OATP</b>	Organic Anion Transporter Polypeptides
<b>OCT</b>	Organic Cation Transporter
<b>PFOA</b>	Perfluorooctanoic acid
<b>PI3K-Akt</b>	Phosphoinositide 3-kinase - Protein kinase B
<b>PNPLA3</b>	Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3
<b>POMC</b>	Proiomélanocortine
<b>POP</b>	Polluants organiques peristants
<b>PPAR<math>\alpha/\beta/\gamma</math></b>	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha/beta/gamma
<b>SCD-1</b>	Stearoyl-CoA desaturase-1
<b>SLC</b>	SoLute Carriers
<b>SREBP-1c</b>	Sterol regulatory element-binding transcription factor 1
<b>Stat5</b>	Signal transducer and activator of transcription 5
<b>SULT1/2</b>	Sulfotransferase family cytosolic 1/2
<b>TAA</b>	Thioacetamide
<b>TAFLD</b>	Toxic-associated fatty liver disease



<b>TASH</b>	Toxic-associated steatohepatitis
<b>TGFβ</b>	Transforming growth factor beta
<b>TLR4</b>	Toll-like receptor 4
<b>TM6SF2</b>	Transmembrane 6 Superfamily Member 2
<b>TOF-SIMS</b>	Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry
<b>TR</b>	Récepteur aux hormones thyroïdiennes
<b>TTR</b>	Human serum transthyretin
<b>UGT1/2</b>	UDP-glucuronosyltransferase 1/2
<b>VLDL</b>	Very Low Density Lipoproteins
<b>WD</b>	Western-like Diet
<b>WT</b>	Wild-Type
<b>α-MSH</b>	α-Melanocyte Stimulating Hormone

## Liste des illustrations

- **Figure 1** : Vascularisation du foie
- **Figure 2** : Structure du lobule hépatique et différents types cellulaires hépatiques
- **Figure 3** : Représentation simplifiée des voies métaboliques au cours de la période alimentaire
- **Figure 4** : Représentation simplifiée des voies métaboliques au cours de la période de jeûne
- **Figure 5** : Spectre de pathologies de la NAFLD
- **Figure 6** : Représentation simplifiée du dialogue inter-organes impliqué dans la pathogenèse de la NAFLD et de la NASH
- **Figure 7** : Représentation des facteurs communs de développement de la NAFLD et de troubles cérébraux
- **Figure 8** : Rôle des xénobiotiques dans la pathogenèse de la TAFD
- **Figure 9** : Une exposition chronique à un mélange de pesticides n'induit pas de perturbations du métabolisme glucidique
- **Figure 10** : Une exposition chronique à un mélange de pesticides n'induit pas de stéatose hépatique
- **Figure 11** : Génération de la lignée de souris invalidées pour CAR spécifiquement au niveau hépatocytaire
- **Figure 12** : Colocalisation du PFOA avec des acides gras
- **Figure 13** : Une exposition de 90 jours au PFOA induit une stéatose hépatique

## Liste des tableaux

- **Tableau I** : Activité dimorphique des enzymes de phase I et II de détoxification
- **Tableau II** : Formules chimiques, noms et abréviations des PFC
- **Tableau III** : Formules chimiques, noms et abréviations des PFAS

## Résumé

Les maladies métaboliques sont en constante augmentation et représentent un problème majeur de santé publique. Parmi celles-ci, la stéatose hépatique non-alcoolique (NAFLD) est la pathologie hépatique chronique la plus courante, touchant 10% de la population générale et 60 à 80% des individus obèses (Farrell et al. 2007). Caractérisée par une accumulation réversible de lipides hépatiques, la NAFLD peut progresser vers des stades plus graves tels que la stéato-hépatite (NASH), la cirrhose ou l'hépatocarcinome (Cohen 2011). La stéatose hépatique est une pathologie complexe et multifactorielle, les facteurs inducteurs étant principalement génétiques ou environnementaux (alimentation riche en gras/sucres, sédentarité) (Matthew Cave et al. 2007). Or, le concept de TAFLD (Toxic-associated fatty liver disease), suggère que des toxiques qualifiés d'obésogènes environnementaux pourraient participer au développement de stéatoses hépatiques (Wahlang et al. 2013). La prévalence de la NAFLD est sexuellement dimorphique, avec un risque plus important de développer la pathologie chez les hommes que chez les femmes pré-ménopausées (Balakrishnan et al. 2021).

Le récepteur nucléaire CAR (Constitutive Androstan Receptor) est au carrefour entre détoxification et métabolisme énergétique (J. Yan et al. 2015). Il est impliqué dans la détoxification de molécules endogènes (bilirubine, acides biliaires) et exogènes (xénobiotiques) ainsi que dans des voies clés du métabolisme énergétique hépatique (néoglucogénèse,  $\beta$ -oxydation).

Nos travaux de recherche ont pour but d'évaluer l'implication du récepteur CAR dans la pathogénèse dimorphique de la NAFLD qu'elle soit induite par un régime riche en gras (HFD) ou par l'exposition à des contaminants alimentaires. A l'aide d'un modèle murin génétiquement invalidé pour le récepteur CAR, nous avons démontré un rôle dimorphique de ce récepteur dans la pathogénèse de la NAFLD. Dans une situation de stress métabolique, le récepteur CAR semble avoir un rôle protecteur envers les désordres métaboliques induits par un régime HFD. Chez les femelles, ce rôle est prépondérant dans la protection contre l'obésité, le développement de la NAFLD et potentiellement dans la progression vers des stades NASH. Nos résultats suggèrent également un cross-talk CAR-ER $\alpha$  dans la protection contre la NAFLD. En revanche, en situation de stress xénobiotique induit par l'exposition à l'acide perfluorooctanoïque (PFOA), CAR semble plutôt participer à la formation de gouttelettes lipidiques caractéristiques d'une TAFLD, dans les deux sexes. Ainsi CAR pourrait être impliqué dans un mécanisme de détoxification du foie, pour internaliser et neutraliser le PFOA à l'intérieur des gouttelettes lipidiques.

Globalement, ce travail de thèse a permis de mieux comprendre la pathogénèse de la NAFLD et de mettre en évidence un rôle dimorphique important du récepteur nucléaire CAR.

## Abstract

Metabolic diseases are constantly increasing and represent a major public health concern. Notable amongst those is NAFLD (Non-alcoholic fatty liver disease), which has become the most common cause of chronic liver disease, affecting 10% of general population and 60-80% of obese individuals (Farrell et al. 2007). NAFLD is characterized by a reversible hepatic lipid accumulation that can progress to more severe forms such as Steato-hepatitis (NASH), Cirrhosis or hepatocarcinoma (Cohen 2011). It is a complex and multifactorial disease, which can be induced by genetic or environmental factors such as high fat/carbohydrate diets or lack of physical exercise (Matthew Cave et al. 2007). However, several studies have revealed that xenobiotics also known as environmental obesogens could be responsible of hepatic lipid accumulation or TAFLD (Toxic-associated fatty liver disease) (Wahlang et al. 2013). Moreover, NAFLD presents a dimorphic prevalence, with a higher susceptibility in men compared to premenopausal women (Balakrishnan et al. 2021).

The Constitutive Androstane Receptor (CAR) stands at the cross-roads between detoxification and energy metabolism (J. Yan et al. 2015). In fact, CAR plays an essential role in endogenous (bilirubin, bile acids...) and exogenous (xenobiotics) detoxification as well as in key hepatic metabolic pathways (neoglucogenesis,  $\beta$ -oxidation).

Our research project aims at understanding the role of CAR in the dimorphic pathogenesis of NAFLD, induced by a high fat diet (HFD) or by exposure to xenobiotics.

Using a genetically CAR-deficient mouse model, we revealed an important dimorphic role of CAR in the pathogenesis of NAFLD. In metabolic-stress conditions, CAR seems to protect mice from metabolic disorders induced by a HFD. CAR plays a major role in females, with a protection from obesity, NAFLD and progression towards more severe states such as NASH. Our results also reveal a CAR-ER $\alpha$  cross-talk in the protection from NAFLD. On the other hand, in xenobiotic-stress conditions induced by exposure to PFOA (perfluorooctanoic acid), CAR seems to participate in the development of hepatic lipid droplets and TAFLD in both sexes. Thus, CAR seems to be involved in a hepatic detoxification mechanism *via* internalization and therefore neutralization of PFOA inside the lipid droplets.

Overall, this thesis research sheds light on the pathogenesis of NAFLD and reveals an important dimorphic role of CAR.

# ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

## Partie I : Physiologie du foie

Le foie est l'organe le plus volumineux du corps humain et par conséquent un des plus vascularisés. Il fait partie intégrante de l'appareil digestif et assure de nombreuses fonctions indispensables à l'organisme dont la digestion alimentaire, la détoxification exogène et endogène ainsi que la régulation de l'homéostasie énergétique.

### I.1 Anatomie du foie

#### I.1.1 Développement embryonnaire

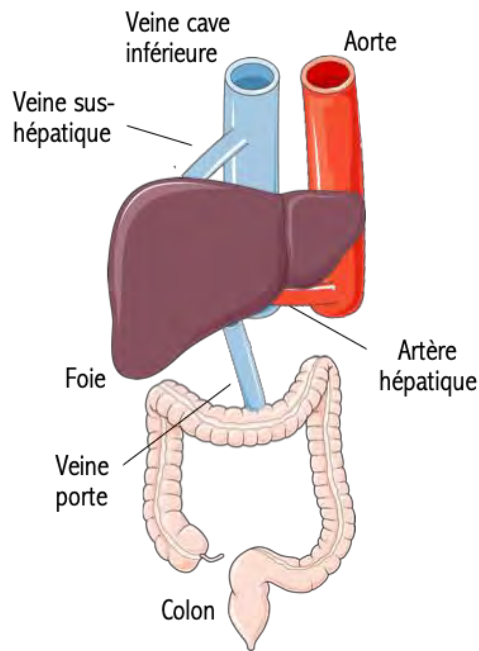
Chez l'Homme, le développement du foie commence à partir du 18<sup>ème</sup> jour de grossesse lors du bourgeonnement de l'extrémité distale de l'intestin qui donne naissance au premier diverticule hépatique. Sous l'action de facteurs de croissance tels que FGF et les BMP, les cellules endodermiques ventrales prolifèrent exponentiellement (Zhao and Duncan 2005). Ce premier bourgeon hépatique prend rapidement une place importante dans la cavité abdominale. Les cellules de la partie distale du diverticule hépatique se différencient ensuite en hépatocytes qui vont former le parenchyme hépatique, à l'origine des voies biliaires intra-hépatiques. L'Oncostatin, les hormones glucocorticoïdes et les facteurs de croissance HGF et Wnt sont impliqués dans l'induction de la différenciation hépatocytaire (Kamiya, Kinoshita, and Miyajima 2001; Suzuki et al. 2003). En parallèle, le diverticule proximal va donner lieu au conduit colédoque et aux voies biliaires extra-hépatiques mettant ainsi en place une connexion avec le duodenum. TGFb, Wnt et Notch sont les facteurs de croissance qui induisent le développement des cellules épithéliales biliaires (Clotman and Lemaigre 2006;

Decaens et al. 2008). En fin de 4<sup>ème</sup> semaine de gestation, la vésicule billiaire se forme à partir d'un bourgeonnement du conduit cholédoque, qui représente la voie principale de sécrétion billiaire. Ce bourgeonnement est également à l'origine du conduit cystique qui va relier le conduit cholédoque à la vésicule biliaire. C'est à partir de la 12<sup>ème</sup> semaine de gestation que commence la synthèse biliaire.

### I.1.2 Structure en lobes et lobules hépatiques

Le foie est situé dans la partie supérieure droite de l'abdomen, séparé du cœur et des poumons par le diaphragme et partiellement protégé par la cage thoracique. C'est un organe intrapéritonéal ; il est recouvert d'une capsule de péritoine viscéral (la capsule de Lænnec) qui rattache la face viscérale du foie à la paroi abdominale. La face diaphragmatique, l'*area nua*, située contre le diaphragme est la seule zone non recouverte de péritoine. Une deuxième capsule sous-jacente à la première recouvre le foie : la capsule de Glisson.

Chez l'Homme, le foie est structuré en deux parties composées chacune de deux lobes : le côté gauche qui représente un tiers du foie comprend le lobe sagittal gauche et le lobe paramédian gauche. Le côté droit avec les lobes paramédian droit et sagittal, occupe les deux tiers restants du foie. Contenant 10% du volume sanguin total, le foie est l'organe le plus densément vascularisé. L'artère hépatique représente l'apport principal en oxygène avec 25 à 30% du flux sanguin hépatique total. La veine porte est responsable de 70 à 75% du flux hépatique et assure l'apport de nutriments absorbés au niveau intestinal (**Figure 1**).

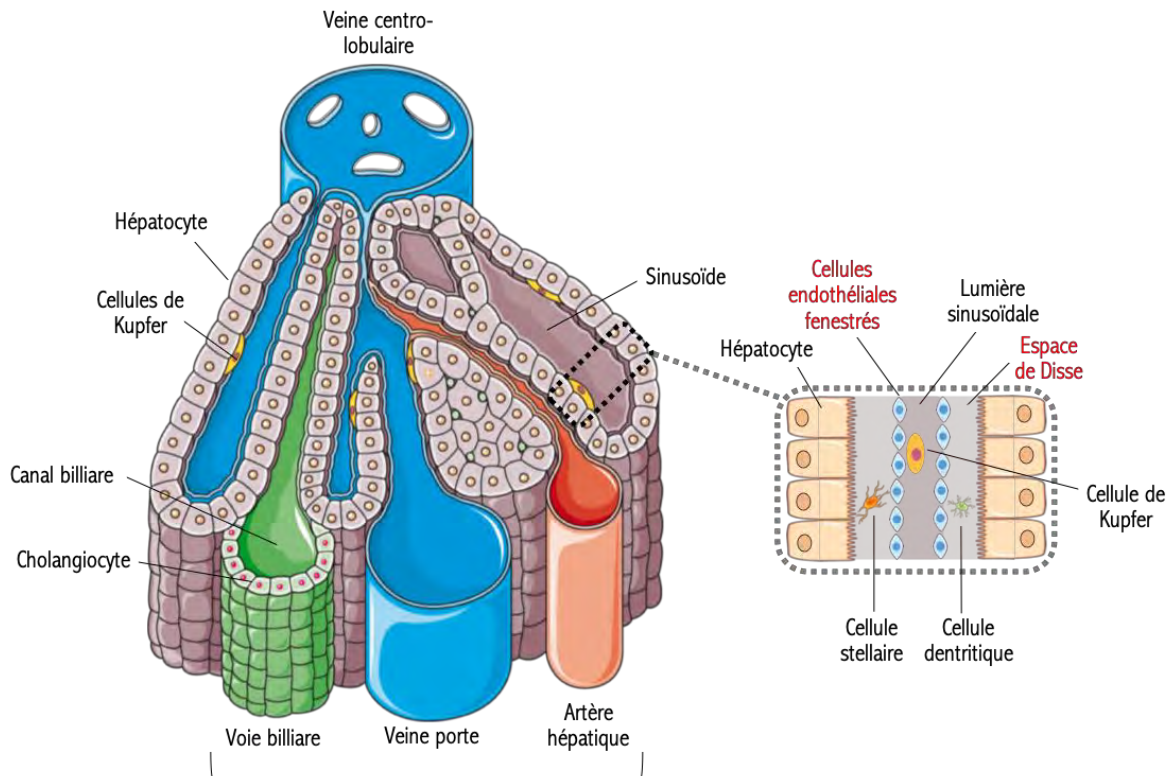


**Figure 1 : Vascularisation du foie**

Représentation schématique de la vascularisation du foie par l'artère hépatique, la veine sus-hépatique et la veine porte qui relie le foie au tube digestif.

Les études de Kiernan, Mall, Rappaport et leurs collaborateurs ont permis de démontrer une unité fonctionnelle du foie qui est le lobule hépatique (**Figure 2**) (Kiernan 1833; Mall 1906; Rappaport et al. 1954). Organisé autour de la veine centro-lobulaire, le lobule peut présenter jusqu'à six espaces « portes » caractérisés d'une triade portale comprenant la voie biliaire, la veine porte et l'artère hépatique. Le lobule présente deux sens circulatoires inverses : le sang circule en sens centripète de la veine porte vers la veine centro-lobulaire et la bile circule en sens centrifuge, des hépatocytes vers les voies biliaires portales. Les hépatocytes, cellules hépatiques majoritaires, sont structurés en monocouche cellulaire formant des sinusoides.





**Figure 2 : Structure du lobule hépatique et différents types cellulaires hépatiques**

Représentation schématique de l'unité fonctionnelle hépatique : le lobule organisé autour de la veine centro-lobulaire et pouvant présenter jusqu'à six espaces portes caractérisés par la triade portale. Le foie présente plusieurs types cellulaires, les hépatocytes étant le type cellulaire majoritaire qui s'organise en mono-couche pour former les sinusoides.

## 1.2 Types cellulaires constituant le foie

Le foie est un organe fonctionnellement complexe, qui présente six types cellulaires différents : les hépatocytes, les cellules endothéliales ou sinusoidales, les cholangiocytes, les cellules de Kupffer, les cellules stellaires et les cellules lymphocytaires.

**Les hépatocytes** sont le groupe cellulaire majoritaire, qui représentent 60 à 65% des cellules hépatiques. Ce sont des cellules polaires qui d'un côté sont en contact avec les capillaires sinusoides (domaine vasculaire) et de l'autre, forment les conduit biliaires (domaine biliaire) grâce à des jonctions serrées permettant une étanchéité des conduits. Les hépatocytes sont également en contact entre eux par leur pôle latéral. Ces cellules assurent une grande partie

des fonctions hépatiques telles que la détoxification, la production de la bile et la régulation du métabolisme glucido-lipidique (Macswen et al. 2003).

**Les cellules endothéliales** représentent 20% des cellules hépatiques et sont localisées le long des capillaires sinusoides. Ces cellules fenestrées ne possèdent pas de membrane basale ce qui permet des échanges entre les hépatocytes et la circulation sanguine. Elles forment la première barrière entre les hépatocytes et le sang et jouent un rôle clé dans l'interaction entre les hépatocytes et les cellules immunitaires.

**Les Cholangiocytes** sont des cellules biliaires qui forment les canaux biliaires intra-hépatiques. Ces cellules assurent le transport de la bile depuis le centre du lobule hépatique vers les canaux biliaires de l'espace porte. Une des fonctions importantes de ces cellules est la modification des acides biliaires primaires venant des hépatocytes.

**Les macrophages** résidents du foie aussi connus sous le nom de cellules de Kupffer, représentent 15% des cellules hépatiques et sont localisées dans la lumière sinusoidale. Ces cellules sont en interaction directe avec les cellules endothéliales sinusoidales mais peuvent également interagir avec les hépatocytes grâce à des prolongements cellulaires qui traversent la barrière endothéliale. De ce fait, ces cellules immunitaires neutralisent les pathogènes provenant de la circulation sanguine en proliférant localement et en sécrétant des cytokines. Lors d'une infection, ces cellules sont impliquées dans les premières phases de la réponse immune par la sécrétion des interleukines IL12 et IL18 qui induisent la prolifération et la différenciation des cellules « Natural Killer » (NK).

**Les cellules stellaires** ou cellules de Ito représentent 5% des cellules du foie et sont localisées dans l'espace de Disse délimité par les hépatocytes et les cellules endothéliales sinusoidales. Elles sont impliquées dans le stockage de la vitamine A et dans la régénération hépatique (Puche, Saiman, and Friedman 2013).

En situation physiologique, ces cellules sont quiescentes mais peuvent subir des modifications en situation pathologique. Les cellules stellaires activées se différencient en myofibroblastes contractiles qui produisent du collagène fibrillaire, caractéristique des états de fibrose et de cirrhose hépatique.

**Les cellules lymphocytaires** ou « pit cells », représentent le reste des cellules hépatiques. Ce sont des cellules résidentes de la lumière capillaire dont les prolongements peuvent traverser la barrière endothéliale. Elles sont majoritairement composées de cellules NK mais également de lymphocytes B et T.

### I.3 Fonctions du foie

Le foie joue un rôle essentiel dans de nombreuses fonctions de l'organisme. Seuls les rôles dans la détoxification et dans la régulation du métabolisme énergétique seront traités dans ce chapitre. Les autres fonctions telles que la digestion alimentaire, le métabolisme du fer et la synthèse protéique ne feront pas l'objet de cette étude.

#### I.3.1 Détoxification endogène et exogène

Le foie, avec les intestins, les reins et les poumons, fait partie des organes présentant des fonctions de détoxification. Il est responsable de différentes réactions de détoxification qui permettent l'élimination de nombreuses molécules exogènes : xénobiotiques ou médicaments ainsi que des molécules endogènes telles que les hormones stéroïdiennes ou les acides biliaires. La fonction de détoxification se déroule en plusieurs étapes ; les molécules venant de la circulation sanguine sont captées par les hépatocytes via des transporteurs, les SLC qui comprennent les OCT, les OAT et les OATP.

La phase I de détoxification est majoritairement assurée par les cytochromes P450 des hépatocytes, qui catalysent des réactions d'oxydo-réduction ou d'hydroxylation, en ajoutant un groupement polaire OH-hydroxyl, NH<sub>2</sub>-amino ou COOH-carboxyl aux molécules. La nomenclature des cytochromes P450 comprend un chiffre, une lettre majuscule et un chiffre désignant respectivement la famille, la sous-famille et l'isoforme (Nelson et al. 1996). Les cytochromes présentant au moins 40% d'homologie et des substrats spécifiques sont regroupés en familles. La famille CYP3A est majoritaire au niveau hépatique et responsable de la métabolisation de 50% des médicaments et le catabolisme d'hormones stéroïdiennes (testostérone) (Usmani, Rose, and Hodgson 2003). Les xénobiotiques sont principalement métabolisés par les cytochromes P450 de famille 1, 2 et 3. Diverses familles de cytochromes participent au métabolisme des stérols (1, 7, 8, 11, 17...). Les cytochromes appartenant aux familles 2 et 4 sont impliqués dans la métabolisation des acides gras. Enfin, les familles 4, 5 et 8 sont impliqués dans le catabolisme des eïcosanoïdes et la famille 2 dans le catabolisme des vitamines. En plus des cytochromes P450, d'autres enzymes telles que les monooxygénases à flavines, les déshydrogénases, les époxydes hydrolases, les réductases, les oxydases et carboxylestérases peuvent assurer la première phase de détoxification.

La phase I de détoxification permet l'obtention d'une molécule plus polaire prise en charge par les enzymes de phase II qui par conjugaison d'un groupement sulfate, acide glucuronique, ou glutathion, vont donner lieu à une molécule plus hydrophile. La sulfatation est assurée par les sulfotransférases, dont deux familles SULT1 et SULT2 sont majoritaires au niveau hépatique. Les enzymes SULT1 sont responsables de la métabolisation des hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes ainsi que des médicaments tels que l'acétaminophène (Yamamoto et al. 2015). Les acides biliaires et les stérols sont pris en charge par les sulfotransférases SULT2 (Fuda et al. 2002).

La glucuronidation implique les uridines diphosphateglucuronosyl transférases (UGT) dont deux familles les UGT1 et UGT2 sont majoritaires. Chaque enzyme UGT est exprimée de manière tissu-spécifique et présente un substrat spécifique (Tukey and Strassburg 2000). La famille UGT1 est responsable de la glucuronidation de 50% des médicaments (Kutsuno et al. 2014). Il existe également d'autres types de conjugaisons dont celle avec le glutathion qui est catalysée par les glutathione-S-transférases, l'acétylation catalysée par des N-acétyltransferases et la méthylation catalysée par des méthyltransferases.

Enfin, au cours de la dernière étape de la détoxification, le transport et l'élimination des molécules métabolisées est assuré par des pompes à efflux avec des transporteurs « ATP binding cassette » (ABC) telles que MDR, MRP et ABCG2 (Cole 2014). Les molécules métabolisées sont éliminées principalement par voies urinaires, biliaires ou fécales.

### I.3.2 Homéostasie énergétique

Le foie joue un rôle central dans le maintien de l'homéostasie énergétique. C'est un organe caractérisé d'insulino-sensible comme le tissu adipeux et le muscle squelettique. Le foie est un organe qui présente une plasticité métabolique importante. Il régule les flux nutritionnels et le stockage des nutriments au cours de la période alimentaire ainsi que la gestion des nutriments ou réapprovisionnement en situation de jeûne. Ces transitions métaboliques complexes sont contrôlées par différents facteurs dont les nutriments, les hormones, le système nerveux et l'horloge biologique.

### 1.3.2.1 La période alimentaire

En période alimentaire ou postprandiale, l'organisme constitue les réserves qui seront utilisées en période de jeûne ou de restriction calorique. Les réserves énergétiques sont principalement composées de glycogène, stocké dans le foie et dans les muscles squelettiques et de triglycérides stockés dans le tissu adipeux. Suite à une prise alimentaire, la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  du pancréas favorise la constitution des réserves énergétiques glucidiques ou lipidiques. L'insuline stimule également l'utilisation de glucose pour la production d'ATP ainsi que la synthèse protéique. L'implication du foie dans la gestion des réserves d'origine glucidique, lipidique ou protéique en période alimentaire sera décrite dans ce chapitre (**Figure 3**).

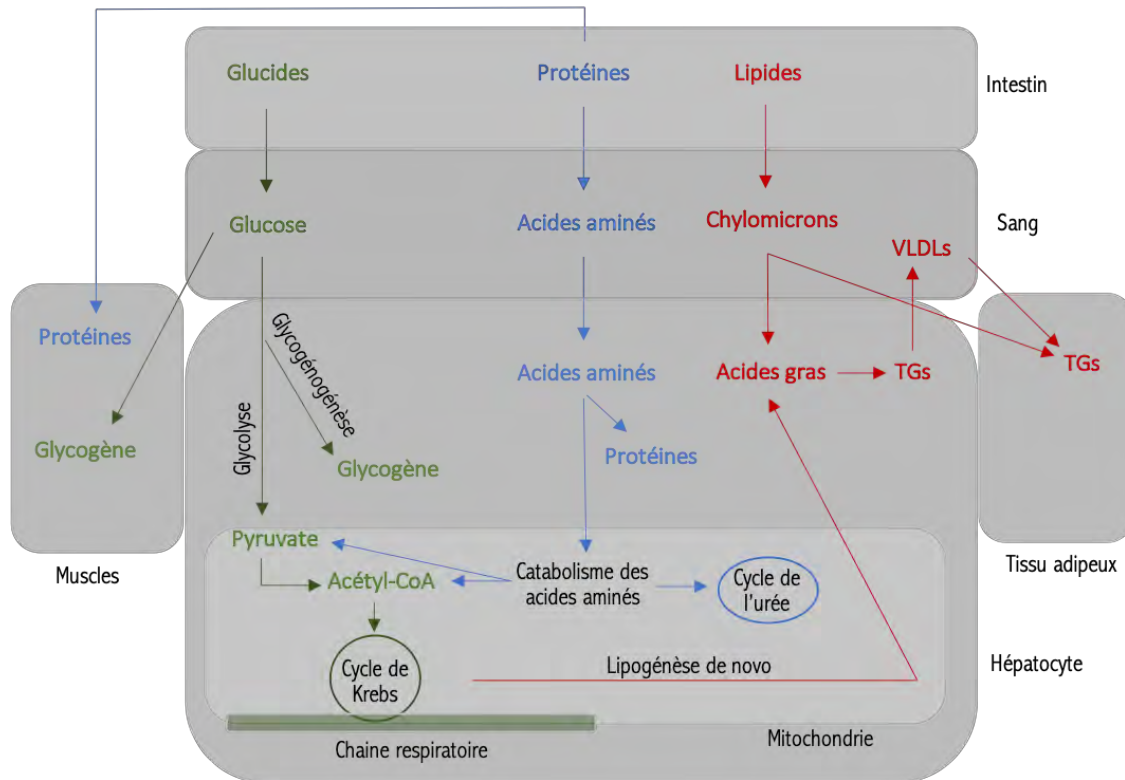
**Les glucides** alimentaires sont absorbés au niveau intestinal puis véhiculés via le sang sous forme de glucose. Le glucose est ensuite capté par le foie et utilisé par les cellules de deux manières : il est dégradé par la glycolyse, le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire pour la production d'ATP et mis en réserve sous forme de glycogène *via* la glycogénolyse. Lorsque les capacités de stockage en glycogène sont épuisées, le foie met en réserve le glucose sous forme de lipides *via* la lipogenèse *de novo*.

**Les lipides** alimentaires qui sont également absorbés au niveau intestinal circulent sous forme de lipoprotéines : les chylomicrons. La première voie de stockage des lipides alimentaires est directe ; les acides gras sont estérifiés avec un glycérol-3-phosphate et stockés sous forme de triglycérides dans le tissu adipeux. Une deuxième voie hépatique indirecte permet au foie de capter les acides gras et de les convertir en triglycérides. Ces triglycérides seront stockés dans des gouttelettes lipidiques au niveau du foie ou exportés dans le sang sous forme de lipoprotéines endogènes, les VLDL stockés dans le tissu adipeux.

**Les protéines** alimentaires sont absorbées au niveau intestinal et dégradées en acides aminés qui sont acheminés par le sang vers différents organes pour permettre assurer le renouvellement des protéines. Les muscles concentrent la part la plus importante de protéines mais ne constituent pas une véritable « réserve » de protéines. Néanmoins, les protéines musculaires peuvent être utilisées en cas de carence protéique. Une synthèse protéique a également lieu au niveau du foie, à l'origine de l'albumine, une protéine essentielle au transport de nombreuses molécules et médicaments. D'autres protéines sont également produites par le foie, pour le transport du fer (transferrine), du cuivre et de différentes hormones. Le foie participe au catabolisme des acides aminés au cours duquel les fonctions azotées (aminées) sont dégradées via le cycle de l'urée et les squelettes carbonés sont convertis en pyruvate et en Acétyl-CoA. Ces produits vont conduire à la formation d'acides gras et de triglycérides permettant le stockage d'acides aminées sous forme de lipides dans le foie.



### La période alimentaire



**Figure 3 : Représentation simplifiée des voies métaboliques au cours de la période alimentaire.**

Les trois macronutriments : les glucides, les protéines et les lipides sont apportés par l'alimentation et absorbés sous forme de glucose, acides aminées, et chylomicrons. En période alimentaire, l'objectif de l'organisme est de constituer les réserves qui seront utilisées pendant la période de jeûne. Ces réserves énergétiques sont constituées majoritairement de glycogène, stocké dans le foie et dans les muscles et de triglycérides stockés dans le tissu adipeux.

VLDLs : « Very Low Density Lipoproteins »; TGs : triglycérides.

#### 1.3.2.2 La période de jeûne

En période de jeûne, l'organisme utilise les réserves cumulées en période alimentaire pour fournir de l'énergie sous forme d'ATP. Il fournit également les molécules indispensables aux processus vitaux de l'organisme. Pendant la période de jeûne, la diminution de la synthèse d'insuline et l'augmentation de la synthèse du glucagon par les cellules  $\alpha$  du pancréas stimule la mobilisation des réserves énergétiques.

Comme décrit précédemment, les réserves énergétiques principales sont assurées par le glycogène hépatique et les triglycérides du tissu adipeux. Lors d'un jeûne prolongé, les protéines musculaires peuvent également être utilisées comme substrat énergétique. La mobilisation des réserves en glycogène, en triglycérides et en protéines musculaires sera traitée dans cette partie (**Figure 4**).

La mobilisation des réserves en **glycogène** hépatique, est assurée par la glycogénolyse qui permet la dégradation du glycogène et la libération de glucose dans la circulation sanguine. La glycogénolyse musculaire ne peut libérer de glucose dans le sang et les stocks de glycogène hépatiques sont limités. La néoglucogenèse est donc activée permettant la synthèse de glucose à partir de précurseurs non-glucidiques tels que le pyruvate.

Les **triglycérides** du tissu adipeux constituent la réserve énergétique la plus importante de l'organisme. Les triglycérides libèrent leurs acides gras dans la circulation, qui sont captés par le foie et oxydés en Acétyl-CoA *via* la  $\beta$ -oxydation. L'Acétyl-CoA permet ensuite la synthèse des corps cétoniques *via* la cétogenèse. Ceux-ci sont libérés dans le sang et utilisés par de nombreux tissus comme le muscle squelettique et le cerveau.

Les muscles représentent la « réserve » de **protéines** la plus importante qui va fournir des acides aminés *via* la protéolyse musculaire. Le foie capte et catabolise ces acides aminés en dégradant les fonctions azotées (aminées) *via* le cycle de l'urée. Les squelettes carbonés des acides aminés sont convertis en glucose *via* le pyruvate ainsi qu'en ATP et en corps cétoniques *via* l'Acétyl-CoA.



Ces résultats soulignent l'importance d'intégrer les femelles dans les études et de comprendre les différences liées au sexe dans le métabolisme énergétique.

#### I.4.1 Dimorphisme dans la fonction de détoxification

Une étude de la FDA effectuée sur 163 médicaments démontre pour 11 molécules, plus de 40% de différences dans la pharmacocinétique selon le sexe (Anderson 2005). Le dimorphisme pharmacocinétique observé est lié à des différences de métabolisme de Phase I et II (Soldin and Mattison 2009). Plusieurs cytochromes P450, enzymes clés de la phase I de métabolisation présentent une activité dimorphique (**Tableau I**). De nombreuses enzymes de phase II présentent une activité plus importante chez les hommes (**Tableau I**). Chez la femme, l'activité de ces enzymes est modifiée au cours de la gestation ou suite à des traitements hormonaux (pilule contraceptive) (Soldin and Mattison 2009).

L'expression dimorphique des gènes hépatiques dépend de plusieurs facteurs dont la sécrétion dimorphique du facteur de croissance GH qui induit une expression dimorphique du facteur de transcription Stat5, essentiel à la régulation des gènes sexe-spécifiques hépatiques (Clodfelter et al. 2006). De plus, l'expression dimorphique de nombreux gènes du métabolisme de phase I dépend du récepteur nucléaire HNF-4 $\alpha$ . Ce récepteur est responsable de la régulation positive de cytochromes p450 spécifiques aux mâles (Cyp4a12) et d'autres spécifiques aux femelles (Cyp2a4 et Cyp2b9) (Wiwi, Gupte, and Waxman 2004).

Des différences liées au sexe sont également observées pour d'autres paramètres pharmacocinétiques telles que l'absorption, la distribution et l'excrétion (Anderson 2005). Malgré ces différences liées au sexe, aucune recommandation de dosage ou de posologie des médicaments ne sont prévues en fonction du sexe.

**Tableau I** : Activité dimorphique des enzymes de phase I et II de détoxification (Soldin and Mattison 2009).

	Enzyme	Activité de l'enzyme	Molécules métabolisées (liste non exhaustive)
Phase I	CYP1A	♂ > ♀	Clomipramine, paracétamol
	CYP2A6	♂ < ♀	Nicotine, coumarin
	CYP2B6	♂ < ♀	Tamoxifène, brupropion
	CYP2C9	♂ = ♀	Ibuprofène, tolbutamide
	CYP2C19	♂ = ♀	Imipramine, piroxicame,
	CYP2D6	♂ < ♀	Codéine, encainide, testosterone
	CYP3A	♂ = ♀ ; ♂ < ♀	Carbamazépine, estradiol, troglitazone
Phase II	Sulfotransferases	♂ > ♀	Paracétamol, lorcasérine
	UDP- glucuronosyl- transferases	♂ > ♀	Paracétamol, diflusal, ibuprofène
	N-Acetyl- transferases	♂ = ♀	Dérivés des catécholamines, mercaptopurine
	Methyl- transferases	♂ > ♀	Ercaptopurine, azathioprine, dopamine

#### I.4.2 Dimorphisme dans la régulation du métabolisme énergétique

Un dimorphisme dans la régulation du métabolisme glucido-lipidique confère une protection aux femmes contre la résistance à l'insuline et la lipotoxicité hépatique (González-Granillo et al. 2019; Geer and Shen 2009). Cela peut s'expliquer par les hormones sexuelles et par une distribution dimorphique des tissus adipeux. Les hommes présentent des quantités plus importantes de tissu adipeux viscéral comparé aux femmes pré-ménopausées qui à l'inverse accumulent plus au niveau sous-cutané (Lundsgaard and Kiens 2014). Les tissus-adipeux viscéraux et sous-cutanés présentent des particularités structurelles et métaboliques distinctes. De par la proximité du foie et un taux de lipolyse important, les dépôts viscéraux peuvent directement affecter les contenus lipidiques et la sensibilité à l'insuline du foie (Montague and O'Rahilly 2000).

A l'inverse, chez la femme, les dépôts adipeux majoritairement sous-cutanés ont un rôle protecteur envers la lipotoxicité hépatique. En situation d'obésité, les femmes présentent une meilleure sensibilité à l'insuline hépatique que les hommes (Ter Horst et al. 2015). En revanche, la sensibilité à l'insuline du tissu adipeux et du muscle squelettique est équivalente dans les deux sexes. Le métabolisme dimorphique de l'insuline hépatique pourrait donc être responsable des différences de prévalence du diabète de type II qui touche majoritairement les hommes.

Le rôle des hormones sexuelles dans la régulation du métabolisme énergétique est complexe. Les œstrogènes, ont une action directe sur les organes métaboliques périphériques mais agissent également *via* un effet sur l'hypothalamus, une région métabolique importante du système nerveux central. Une régulation fine des niveaux d'œstrogènes et de testostérone est requise pour maintenir l'homéostasie énergétique (Varlamov, Bethea, and Roberts 2014). Une diminution des niveaux de ces deux hormones induit des perturbations du métabolisme énergétique hépatique. A l'inverse, des niveaux trop importants de ces deux hormones, dans le cas de prise de pilule contraceptive (excès d'estrogène) ou de syndrome d'ovaire polycystique (excès de testostérone) diminuent la sensibilité à l'insuline (Varlamov, Bethea, and Roberts 2014).

Ces données soulignent un dimorphisme important dans la fonction du foie dans la régulation du métabolisme énergétique. Il est donc important d'étudier ces différences liées au sexe et de ne pas généraliser les conclusions d'études ayant intégré un seul sexe.

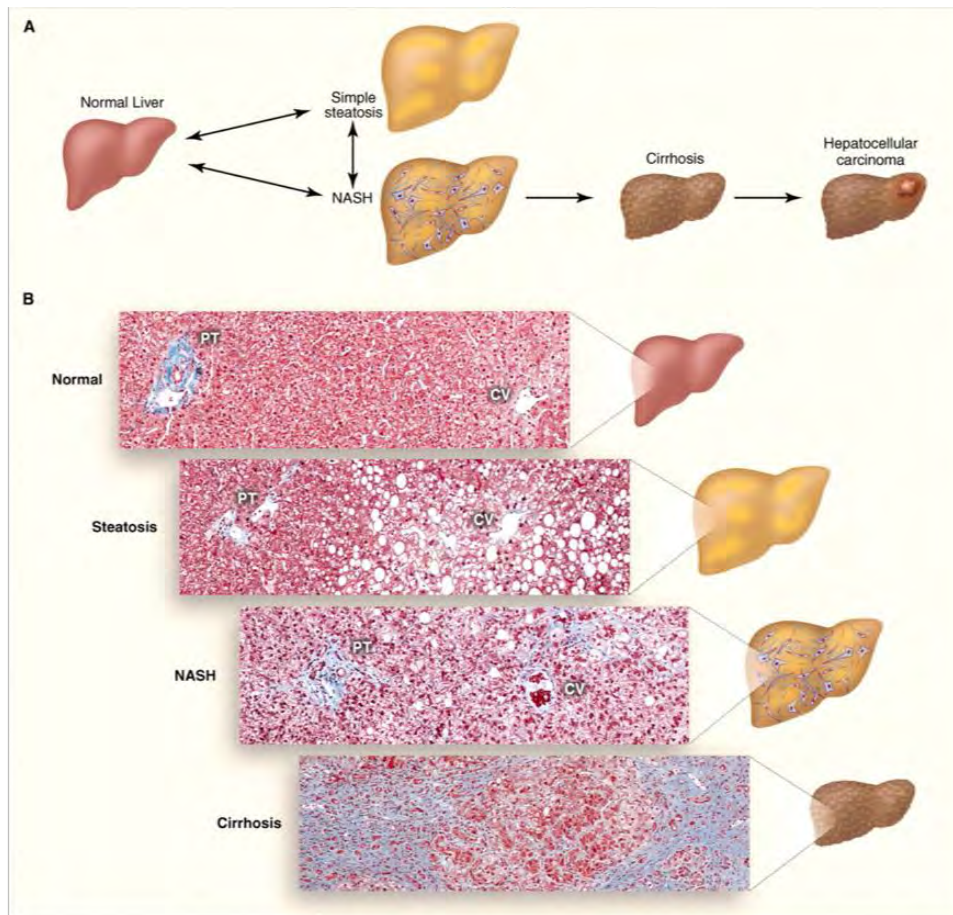
## Partie II : Physio-pathologie du foie, la NAFLD

Les stéatoses hépatiques non-alcooliques ou NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease) touchent un quart de la population adulte et représentent un problème de santé publique majeur. Le diagnostic est difficile et il n'existe aucun traitement de référence pour les patients atteints de NAFLD. De plus, la pathogénèse de ces pathologies est complexe et encore peu connue. L'étude de la pathogénèse et la recherche de cibles thérapeutiques potentielles pour la NAFLD représente donc une problématique de recherche importante.

### II.1 Définition et prévalence générale

La NAFLD représente un spectre de pathologies allant par ordre de gravité, de la NAFL (Non-alcoholic fatty liver) communément définie comme NAFLD, à la NASH (Non-alcoholic steato hepatitis), la cirrhose et l'hépatocarcinome (Cohen 2011). La NAFLD ou stéatose simple est caractérisée par une accumulation excessive de lipides, qui atteint plus de 5% du parenchyme hépatique (**Figure 5**). La NAFLD peut progresser en NASH, qui en plus de la stéatose simple, est caractérisée par une ou plusieurs lésions cellulaires dont l'inflammation lobulaire, la fibrose et le « ballooning » des hépatocytes. La stéatose simple ainsi que la NASH sont des stades réversibles pouvant régresser vers un foie sain. L'irréversibilité de la pathologie a lieu au stade cirrhose lorsque les lésions cellulaires induisent une réorganisation des cellules du foie. Une modification de la structure hépatique et la formation de nodules anormaux vont affecter les fonctions hépatiques au cours de la cirrhose.





**Figure 5 : Spectre de pathologies de la NAFLD (Cohen et al., 2011)**

**A :** Représentation schématique de la progression de la NAFLD. Le premier stade de la NAFLD est la stéatose simple, caractérisée par une accumulation de lipides de plus de 5% du parenchyme hépatique. La stéatose associée à de l'inflammation et de la fibrose est caractérisée de NASH, qui peut progresser en Cirrhose. Les patients atteints de Cirrhose ont un risque important de développer un hépto-carcinome.  
**B :** Des coupes histologiques de foie colorées à l'éosine-hématoxyline ainsi qu'au bleu de Masson's qui colore les fibres de collagène. PT : triade portale, CV : veine centrale.

Le premier stade de stéatose simple, qui se définit par l'absence de lésions cellulaires, touche 25% de la population générale. Chez les individus présentant des complications métaboliques, les chiffres sont plus inquiétants. Parmi les individus obèses, 75-80% sont atteints de NAFLD et 20-35% présentent une NASH (Farrell et al. 2007). 50% des patients atteints de diabète de type II présentent également une NAFLD avec des lésions plus graves que celles observées chez des patients non diabétiques (Silverman et al. 1990). Dans 7 à 30% des cas, la NAFLD progresse vers le stade NASH et dans 20% des cas, les patients atteints de NASH développent une cirrhose.

La cirrhose entraîne le décès du patient dans 10% des cas et est un facteur de risque important pour le développement d'un hépatocarcinome (Farrell et al. 2007).

## II.2 Causes et facteurs de risque

Par définition, les pathologies hépatiques non-alcooliques (NAFLD) excluent des causes secondaires de stéatoses hépatiques non métaboliques telles que la consommation excessive d'alcool ou un traitement stéatogène (corticoïdes, tamoxifène...).

Il est important souligner que la pathogénèse de la NAFLD est complexe et que dans la majorité des cas il est difficile de déceler une seule et unique cause de la maladie. Pour cela, la théorie de la pathogénèse multifactorielle est la plus acceptée (Luciano-Mateo et al. 2018).

Un ou plusieurs facteurs combinés dont une alimentation riche en gras et en sucres, le syndrome métabolique (insulino-résistance) et des facteurs génétiques peuvent induire une stéatose hépatique (Luciano-Mateo et al. 2018). Plus récemment, l'exposition à des toxiques environnementaux est également suggérée comme un facteur de développement d'une stéatose hépatique (Al-Eryani et al. 2015). Dans la majorité des cas, au moment du diagnostic de la NAFLD, d'autres comorbidités sont installées, ce qui rend difficile la distinction des causes et des conséquences de la stéatose hépatique (Glass et al. 2019).

Une **alimentation** déséquilibrée et hypercalorique est une des causes principales de développement de stéatoses hépatiques. Des régimes trop riches en gras induisent une arrivée excessive d'acides gras sous forme de chylomicrons vers le foie et favorisent l'accumulation de lipides hépatiques. Les régimes riches en sucres (fructose/glucose) induisent la lipogénèse *de novo* hépatique, un mécanisme clé dans la pathogénèse de la NAFLD. Ces mécanismes seront abordés dans le chapitre suivant II.3. Les habitudes alimentaires des pays occidentaux combinent un régime riche en gras et riche en sucre.

Ce régime qualifié de « Western Diet » est également reproduit en recherche expérimentale pour générer des modèles animaux pour l'étude de la NAFLD.

La NAFLD est considérée comme la manifestation hépatique du **syndrome métabolique**. Une méta-analyse démontre parmi les individus atteints de NAFLD, 69% de dyslipidémies, 51% d'obésité, 43% de syndrome métabolique et 39% d'hypertension (Z. M. Younossi et al. 2016).

L'insulino-résistance des trois tissus insulino-sensibles : le foie, le tissu adipeux et le muscle est considérée comme une composante importante de la pathogénèse de la NAFLD. L'implication de l'insulino-résistance sera détaillée dans la partie II.3 de cette thèse.

Des variations **génétiques** telles que les polymorphismes SNP (Single Nucleotide Polymorphism) affectent des mécanismes comme le flux hépatique d'acides gras, le stress oxydatif, la production de cytokines et la réponse aux endotoxines. Ces derniers sont des mécanismes déterminants dans le développement et la progression de la NAFLD. Il existe plusieurs polymorphismes SNP impliqués dans la pathogénèse de la NAFLD dont ceux des gènes PNPLA3, TM6SF2, MBOAT7, NCAN, LYPLAL1 et APOC3. Des études GWAS ont démontré un lien entre un SNP du gène PNPLA3 (Patatin-like phospholipase 3), le variant I148 M (rs738409 C/G), et le développement et la progression de la NAFLD (Namjou et al. 2019). Ce polymorphisme est responsable de 5,3% des variations génétiques impliquées dans le développement de la NAFLD chez l'Homme (Sookoian and Pirola 2011). Le gène PNPLA3 code pour l'adiponutrine, une enzyme LPAAT impliquée dans la synthèse lipidique hépatique. Un gain de fonction du variant I148 M résulte en une activité plus importante de l'adiponutrine, associée à une accumulation de lipides hépatiques (Kumari et al. 2012). Cette accumulation de lipides dans le foie résulte d'une diminution de la sécrétion de VLDL hépatiques (Pirazzi et al. 2012). Chez la souris, un knock-in du variant I148M induit une accumulation de gouttelettes lipidiques hépatiques caractéristique d'une NAFLD (Smagris et al. 2015).

En plus des composantes alimentaires et génétiques, l'exposition à des produits toxiques environnementaux pourrait être impliquée dans le développement de stéatoses hépatiques. En effet, de nombreux toxiques qualifiés de persistants comme l'acide perfluorooctanoïque (PFOA) perturbent le métabolisme lipidique hépatique (Das et al. 2017; Kudo et al. 2011). Le terme de **TAFLD** pour « Toxic-Associated Fatty Liver Disease » suggère un lien entre l'exposition aux xénobiotiques et le développement de la stéatose hépatique (Al-Eryani et al. 2015) qui sera détaillé dans la Partie V de cette thèse.

### II.3 Pathogénèse de la NAFLD

L'accumulation de lipides hépatiques caractéristiques de la NAFLD peut résulter de différents mécanismes dont une augmentation de l'import de lipides provenant de l'alimentation ou de la lipolyse adipocytaire, une diminution de l'export lipidique, une diminution de la  $\beta$ -oxydation ou une augmentation de la lipogenèse *de novo*.

Comme décrit dans le paragraphe précédent, la résistance à l'insuline est considérée comme un des facteurs clés du développement de la NAFLD. Les mécanismes impliqués dans le développement de la résistance à l'insuline sont encore inconnus mais l'inflammation du tissu adipeux et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6) semblent déclencher ces dérégulations (**Figure 6**). La résistance à l'insuline du tissu adipeux active la lipolyse adipocytaire qui entraîne une augmentation du flux d'acides gras vers le foie (Bugianesi et al. 2010). Le développement de l'insulino-résistance au niveau du foie active la voie de la lipogenèse *de novo* (DNL) hépatique qui favorise le stockage de lipides hépatiques sous forme de gouttelettes lipidiques composées de triglycérides et d'esters de cholestérol.

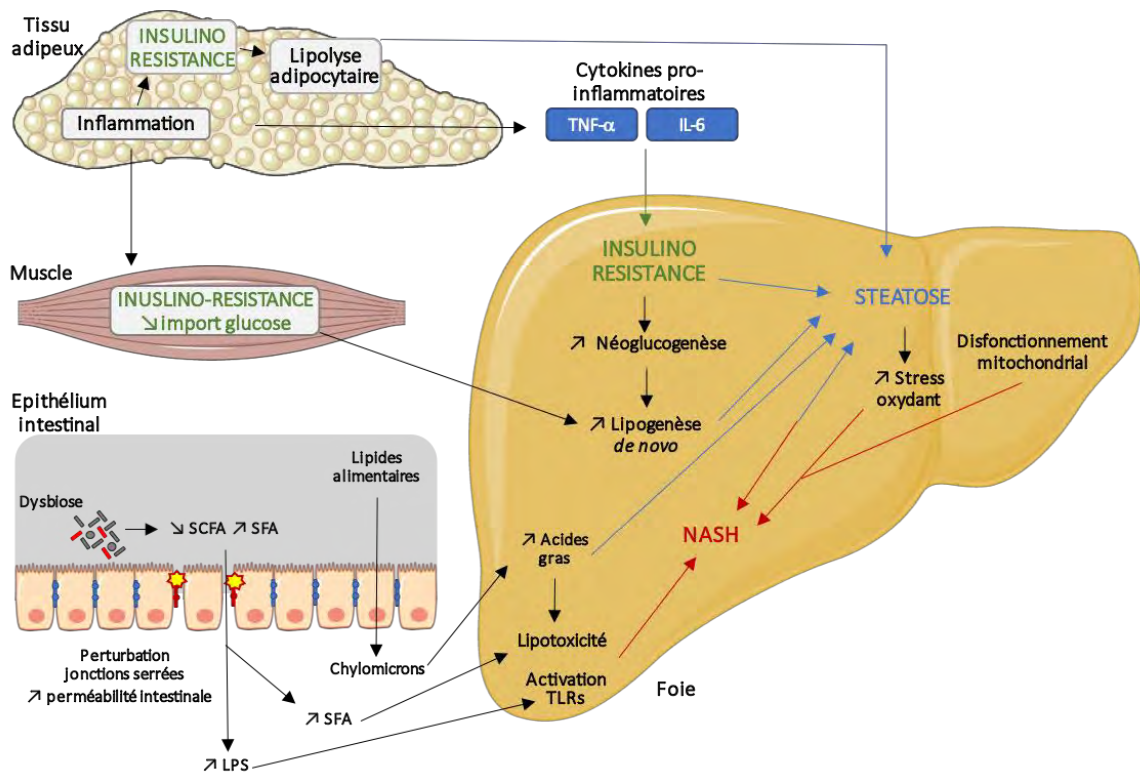
Cette accumulation de lipides est également associée à une lipotoxicité caractéristique d'un dysfonctionnement mitochondrial, de stress oxydant et de production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Cusi 2009).

L'accumulation de triglycérides dans le foie n'est pas hépatotoxique et pourrait servir de mécanisme tampon pour éviter l'excès d'acides gras libres dans la circulation sanguine (Koliwad et al. 2010). Néanmoins, certains lipides peuvent être toxiques pour le foie en conditions physiopathologiques. C'est le cas des acides gras saturés à chaîne longue (SFA : saturated fatty acid). Le palmitate (C16:0) ou le stéarate (C18:0) sont des SFA retrouvés dans les produits laitiers et dans les graisses animales et sont également produits dans le foie au cours de la lipogenèse *de novo*, à partir de substrats glucidiques provenant de l'alimentation. En conditions physiologiques, les SFA subissent la  $\beta$ -oxydation ou l'estérification pour être exportés sous forme de VLDL ou stockés sous forme de gouttelettes lipidiques. En situation de NASH, l'excès de SFA et de cholestérol libre provenant de la lipogenèse *de novo* participe au développement de lésions hépatiques (Fuchs and Sanyal 2012). L'accumulation de lipides entraîne l'activation de voies de signalisation des cellules stellaires et des cellules de Kupffer qui favorisent l'inflammation et la fibrogenèse hépatique (Arguello et al. 2015). Les lipides SFA peuvent activer différentes voies d'apoptose intracellulaires (JNK1) et mitochondriales induisant un stress lipotoxique dans le réticulum endoplasmique et la mitochondrie (Malhi et al. 2006). De plus, en réponse à l'excès de SFA, le récepteur TLR4 active la voie NF $\kappa$ B pro-inflammatoire et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ ) (Sharifnia et al. 2015). Ces différents mécanismes induisent une inflammation et des lésions hépatiques qui peuvent évoluer en fibrose caractérisée par une accumulation de matrice-extracellulaire dans le parenchyme hépatique.

En conditions de fibrose, les cellules stellaires hépatiques prolifèrent et se différencient en cellules myofibroblastiques qui sécrètent des composants matriciels à l'origine de la fibrose hépatique (collagène, fibronectine) (Mavier 2004).

L'implication du système digestif et du système nerveux central dans la pathogenèse de la NAFLD suscite également un grand intérêt. Une dysbiose intestinale augmente la perméabilité et fragilise la barrière intestinale. Cela entraîne une absorption intestinale plus importante d'acides gras et de lipopolysaccharides bactériens (LPS) qui favorisent un environnement inflammatoire en provoquant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL6, TNF $\alpha$ ) (Kirpich, Marsano, and McClain 2015). Le système nerveux central (SNC) joue un rôle clé dans la régulation de l'homéostasie énergétique périphérique via un dialogue avec les tissus périphériques tels que le foie. Le dialogue SNC-foie ainsi que l'implication du SNC dans le développement de la NAFLD seront détaillés dans la Partie IV de cette thèse.

L'hypothèse d'une « multiple-hit pathogenesis » suggère donc que la pathogenèse de la NAFLD résulte de nombreux facteurs de nature différente. Il a souvent été supposé que l'accumulation de lipides caractéristique de la stéatose précède l'inflammation ; néanmoins des études ont révélé que dans certains cas l'inflammation peut être la première lésion hépatique avant le développement de la NAFLD. La combinaison et le « timing » des facteurs génétiques, externes et intracellulaires influencent les différents mécanismes à l'origine de la stéatose simple ou de la NASH (Yilmaz 2012).



**Figure 6 : Représentation simplifiée du dialogue inter-organes impliqué dans la pathogenèse de la NAFLD et de la NASH.** L'inflammation au niveau du tissu adipeux, induit une insulino-résistance locale et l'augmentation de cytokines pro-inflammatoires. Cela va favoriser le développement de l'insulino-résistance hépatique. Les lipides hépatiques proviennent de l'alimentation via les chylomicrons, de la lipolyse adipocytaire ou de la lipogenèse *de novo*. L'insulino-résistance hépatique et musculaire induisent l'augmentation de la lipogenèse *de novo* hépatique qui favorise l'accumulation de lipides et la stéatose. Le stress oxydant induit par la stéatose ainsi qu'un dysfonctionnement mitochondrial entraîne une NASH. Au niveau intestinal, une dysbiose peut également participer au développement de lésions hépatiques. La dysbiose induit une perturbation des jonctions serrées des entérocytes et une augmentation de la perméabilité intestinale, qui résulte en une augmentation de la translocation d'acides gras saturés à chaîne longue (SFA) ainsi que de lipopolysaccharides (LPS) bactériens. Cela entraîne une lipotoxicité ainsi qu'une activation des « toll-like receptors » (TLRs) favorisant le développement de la stéato-hépatite (NASH). SCFA : Short Chain Fatty Acids.

## II.4 Dimorphisme sexuel et NAFLD

### II.4.1 Prévalence dimorphique

Plusieurs études démontrent un dimorphisme sexuel dans le risque de développer des pathologies métaboliques telles que l'obésité et le syndrome métabolique. La NAFLD présente également une prévalence dimorphique, comme le démontrent de nombreuses études qui révèlent une différence de risque de développer une stéatose en fonction du sexe et de l'âge. Une méta-analyse récente, regroupant 54 études a démontré que les femmes présentent 19% de chances en moins de développer une NAFLD (Balakrishnan et al. 2021).

Néanmoins, une fois la NAFLD installée, les femmes présentent un risque égal de progression vers la NASH et 39% de chances en plus d'évolution vers la cirrhose. Le facteur « âge » modifie les effets du sexe sur la gravité de la NAFLD car les femmes de plus de 50 ans présentent un risque plus élevé de progression vers des stades NASH/cirrhose que les femmes plus jeunes. Les différences liées au sexe dans le développement et la progression de la maladie sont donc atténuées en ne considérant que les femmes de plus de 50 ans.

#### II.4.2 Rôle des hormones sexuelles

Comme décrit précédemment, la NAFLD présente une différence de prévalence en fonction du sexe mais également en fonction de l'âge. Les femmes pré-ménopausées sont protégées du développement de la NAFLD alors que les femmes ménopausées présentent un risque aussi important de développer une stéatose hépatique que les hommes (Balakrishnan et al. 2021). Plusieurs études suggèrent une implication des hormones sexuelles dans les différences liées au sexe observés dans le développement de la NAFLD (Kamada et al. 2011). Les œstrogènes et les androgènes sont des hormones stéroïdiennes principalement synthétisées respectivement par les ovaires chez la femme et les testicules chez l'homme. De par leur rôle dans la régulation du métabolisme glucido-lipidique hépatique, ces hormones sont impliquées dans la pathogénèse de la NAFLD.

Une étude effectuée sur des souris ovariectomisées et nourries avec un régime riche en gras et en cholestérol connu pour induire une NASH démontre une protection des œstrogènes du développement de la NASH (Kamada et al. 2011). L'ovariectomie induit une déficience en œstrogènes qui accélère la progression de la NASH et ce phénotype est reversé suite à une administration de 17- $\beta$  estradiol.



De plus, dans un modèle murin génétique d'obésité (*ob/ob*), l'administration chronique de 17- $\beta$  estradiol entraîne une réduction des triglycérides hépatiques et une répression des gènes lipogéniques (Bryzgalova et al. 2006). Dans cette étude, l'utilisation de souris génétiquement délétées pour les récepteurs ER $\alpha$  ou ER $\beta$  démontre que les effets protecteurs du 17- $\beta$  estradiol sont médiés par le récepteur ER $\alpha$  (Bryzgalova et al. 2006). Tous les mécanismes impliqués dans l'effet protecteur des œstrogènes ne sont pas encore connus. Néanmoins, certaines études suggèrent l'implication d'un axe estradiol, hormone FSH et récepteur aux glucocorticoïdes hépatique (GR) (Quinn et al. 2018). Dans cette étude, les auteurs démontrent que l'activation du récepteur GR et la production de FSH favorisent la stéatose induite par l'ovariectomie dans un modèle murin (Quinn et al. 2018). Cela suggère une implication de la voie estradiol/FSH/GR dans le développement de la stéatose hépatique induite par la déplétion naturelle d'œstrogènes qui a lieu chez la femme au cours de la ménopause. Les œstrogènes sont synthétisées en quantité moins importante chez les mâles mais sont également importants dans la régulation du métabolisme lipidique. Des souris mâles génétiquement délétées pour le gène de l'aromatase, une enzyme responsable de la synthèse d'œstrogènes, développent un phénotype type NAFLD (Jones et al. 2001). Ces études suggèrent un effet protecteur des œstrogènes contre le développement de la NAFLD, aussi bien chez les femmes que chez les hommes.

Pour explorer l'implication des androgènes dans le métabolisme énergétique hépatique, plusieurs modèles sont utilisés comme l'ablation des androgènes par castration, la supplémentation en testostérone ou la délétion/activation du récepteur aux androgènes (AR). Une étude effectuée sur un modèle murin démontre des effets dimorphiques du récepteur aux androgènes dans le développement de la stéatose hépatique (Lin et al. 2008).

Chez les souris mâles, la délétion génétique du récepteur AR favorise le développement de la stéatose et de l'insulino-résistance induites par un régime riche en gras (Lin et al. 2008).

En revanche, les femelles knock-out pour le récepteur AR sont résistantes à la stéatose induite par le régime. Chez les mâles, le phénotype semble résulter d'une augmentation de la lipogénèse *de novo* via le facteur de transcription SREBP-1c ainsi qu'une diminution de la  $\beta$ -oxydation *via* PPAR $\alpha$  (Senmaru et al. 2013). En revanche, les mécanismes impliqués dans la protection des femelles knock-out pour le récepteur AR sont moins connus. Les effets du récepteur AR dans la pathogénèse de la NAFLD sont médiés par la testostérone, l'hormone androgène majoritaire. La castration chez les rats induit une stéatose hépatique et une insulino-résistance qui sont reversés par une supplémentation en testostérone (Nikolaenko et al. 2014; Xia et al. 2013). En plus de ces effets insulino-sensibilisateurs, anti-lipogéniques et pro- $\beta$ -oxydation, la testostérone présente également des effets anti-inflammatoires puisque l'administration de testostérone reverse l'inflammation hépatique et le stress du réticulum endoplasmique observés en contexte de NASH (Jia et al. 2018).

L'ensemble de ces données démontrent qu'en plus des facteurs nutritionnels, génétiques et environnementaux, la balance des hormones sexuelles joue un rôle fondamental dans la pathogénèse de la NAFLD. Les hormones sexuelles peuvent donc expliquer le caractère dimorphique de la NAFLD. Les dérégulations hormonales devraient être considérés comme un facteur de risque de cette pathologie.

## II.5 Difficultés du diagnostic de la NAFLD

De nombreuses études sont en cours pour améliorer les techniques de diagnostic de la NAFLD et trouver des méthodes permettant de déterminer le stade d'évolution de la pathologie.

La seule méthode efficace à ce jour pour diagnostiquer le stade NASH est la biopsie hépatique, une méthode invasive et coûteuse. La première étape du diagnostic de la NAFLD généralement lieu suite à une analyse plasmatique de marqueurs hépatiques (ALT, AST, GGT) et au calcul de scores « SteatoTest » et « Fatty Liver Index » (Castera, Friedrich-Rust, and Loomba 2019). Ces scores prennent en compte différents paramètres : le score « Fatty Liver Index » par exemple, prend en compte l'indice de masse corporelle, le tour de taille, les triglycérides plasmatiques et la transaminase GGT. Ces premières analyses orientent ensuite vers l'échographie hépatique qui permet de confirmer l'accumulation excessive de lipides hépatiques.

Plus récemment, d'autres techniques ont été testées telles que l'imagerie par résonance magnétique (IRM) pour évaluer la quantité de lipides au niveau hépatique. D'autres marqueurs sont également importants tels que la fibrose hépatique qui est un déterminant majeur dans la progression de la pathologie (Dulai et al. 2017). La fibrose entraîne une rigidité du foie qui peut être évaluée par IRM ou par ultrasons (Vilar-Gomez and Chalasani 2018). Enfin, comme pour les scores de stéatose, il existe également des marqueurs plasmatiques qui peuvent permettre de calculer des scores correspondant à la fibrose : les scores « Fibrosis-4 » et « NAFLD fibrosis score ».

Le diagnostic de la NAFLD et surtout de la progression vers des stades plus avancés de la maladie est compliqué. L'ensemble de ces techniques complémentaires est donc utilisé dans le but d'améliorer la sensibilité et la spécificité du diagnostic. La prise en charge de patients atteints de NAFLD ou de stades plus sévères telles que la NASH est difficile car même lorsque le diagnostic est effectué, il n'existe aucun traitement de référence pour la NAFLD et la NASH. Néanmoins, de nombreuses molécules de nature et fonction différentes sont en cours d'essais cliniques.

## II.6 Options thérapeutiques pour la NAFLD

Un changement du mode de vie du patient représente le moyen le plus efficace contre la NAFLD. Une alimentation équilibrée et de l'exercice physique régulier dans le but d'une perte de poids favorise la réversion de la NAFLD (Yoshioka et al. 2020). Néanmoins, ces modifications comportementales sont difficiles à mettre en place et à maintenir sur le long terme. De plus, comme décrit plus haut, il existe plusieurs facteurs inducteurs de la NAFLD. Ces méthodes comportementales pourront donc être efficaces contre une stéatose induite par un régime gras mais ne vont peut-être pas reverser une NAFLD d'origine génétique ou toxique.

Il n'existe à ce jour aucun traitement de référence pour la NAFLD, mais de nombreuses molécules sont en cours d'essais cliniques de Phase I, II ou III dans le but de trouver un traitement efficace. Du fait des nombreux facteurs inducteurs de la NAFLD, ces molécules ciblent différents mécanismes impliqués dans la pathogénèse de la NAFLD. Trois types de molécules se distinguent : les molécules ciblant le stress métabolique et la lipotoxicité, celles qui ciblent l'inflammation, la fibrose et l'apoptose et enfin les molécules agissant sur l'intestin. Les molécules qui ciblent le **stress métabolique** et la **lipotoxicité** sont principalement des molécules modulant l'activité de récepteurs nucléaires (PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$ , PPAR $\gamma$  et FXR) ou des molécules qui régulent la synthèse lipidique hépatique. Le récepteur PPAR $\alpha$  joue un rôle clé dans le transport et le catabolisme des acides gras via la  $\beta$ -oxydation et représente donc une cible intéressante pour le stress métabolique et la lipotoxicité en situation de NAFLD (Pawlak, Lefebvre, and Staels 2015). Les fibrates, des agonistes pharmacologiques du récepteur PPAR $\alpha$  ont fait l'objet de nombreuses études mais n'ont pas abouti à des résultats prometteurs (Fernández-Miranda et al. 2008; Fabbrini et al. 2010).

Des agonistes de PPAR $\alpha$  de nouvelle génération tels que le pémafibrate et l'élafibranor sont des molécules à potentiel intéressant pour le traitement de la NAFLD (Honda et al. 2017; Westerouen Van Meeteren, Drenth, and Tjwa 2020). Les agonistes doubles PPAR $\alpha$ /PPAR $\beta$  comme l'élafibranor, visent à combiner les effets de PPAR $\alpha$  sur la  $\beta$ -oxydation et les effets de PPAR $\beta$  sur la lipogenèse *de novo*. L'élafibranor, actuellement en phase III d'essai clinique présente un potentiel intéressant pour le traitement de la NASH. Des études précliniques chez la souris révèlent un effet protecteur de l'élafibranor sur l'inflammation et la fibrose (Staels et al. 2013) ainsi qu'un effet bénéfique sur la résistance à l'insuline hépatique (Cariou et al. 2013). La Pioglitazone, un agoniste de PPAR $\gamma$  est approuvé pour le traitement du diabète de type II pour ses effets insulino-sensibilisateurs (Sharma and Staels 2007). Ce composé est actuellement en phase III pour le traitement de la NASH et semble avoir des effets prometteurs uniquement chez les patients dont la NASH est associée au diabète de type II (Sanyal et al. 2010). Un agoniste double PPAR $\alpha$ /PPAR $\gamma$ , le Saroglitazar est approuvé dans certains pays pour le traitement des dyslipidémies et du diabète de type II, et actuellement en phase III d'essai clinique pour le traitement de NASH associée au diabète de type II.

Le récepteur FXR est intéressant de par son rôle dans l'homéostasie des acides biliaires dont la concentration circulante est augmentée chez les patients atteints de NAFLD (Kliwer and Mangelsdorf 2015). FXR est également impliqué dans la régulation de lipogenèse *de novo* et la néoglucogenèse, mécanismes clés dans le développement de la NAFLD. L'agoniste de FXR le plus étudié est l'acide obéticholique (OCA), qui est en phase III d'essai clinique avec des effets prometteurs sur la stéatose, la NASH et la fibrose. L'OCA possède des effets métaboliques telles que la diminution de la production endogène d'acides biliaires et l'inhibition de la lipogenèse *de novo* (Mudaliar et al. 2013) ainsi que des effets anti-inflammatoires et anti-fibrotiques (Ali, Carey, and Lindor 2015).

Parmi les composés ciblant le stress métabolique et la lipotoxicité, il existe également des molécules qui ciblent la synthèse lipidique hépatique, un mécanisme clé dans le développement de la NAFLD. Différentes molécules qui ciblent les enzymes limitantes de la lipogenèse *de novo* sont en essai clinique. Trois composés, l'Aramchol, le GS-0976 et le TVB-2640 sont respectivement des inhibiteurs des enzymes SCD-1, ACC et FAS de la lipogenèse *de novo*. Ces composés sont actuellement en phase II d'essai clinique et semblent présenter des effets encourageants sur la stéatose, la NASH et la fibrose (Safadi et al. 2014; Loomba et al. 2018).

Les molécules qui ciblent **l'inflammation, la fibrose et l'apoptose** regroupent les molécules anti-oxydantes, anti-inflammatoires, anti-apoptotiques ou anti-fibrotiques. La vitamine E, un anti-oxydant est actuellement en phase III d'essai clinique et présente des effets bénéfiques sur la NASH, *via* une diminution de l'inflammation et du « ballooning » des hépatocytes (Kowdley et al. 2015). La Cystéamine, un autre anti-oxydant en phase II d'essai clinique est intéressant pour son rôle dans le captage des espèces réactives de l'oxygène et dans la diminution des niveaux circulants de transaminase ALT (Schwimmer et al. 2016). Des anti-inflammatoires tels que le Pentoxifylline, un inhibiteur de TNF $\alpha$  ou le Cenicrivirox, un antagoniste des chimiokines CCR2/CCR5 sont actuellement en phase III d'essai clinique pour des effets prometteurs sur la NASH et la fibrose. Enfin, des anti-apoptotiques tels que le Selonsertib, un inhibiteur de la kinase ASK1 qui régule l'apoptose et l'Emricasan, un inhibiteur des caspases sont respectivement en phase II et III pour le traitement de la NASH et de la fibrose.

La première intervention **intestinale** recommandée pour les patients atteints de NAFLD est la chirurgie bariatrique, qui consiste à placer un anneau autour de la partie supérieure de l'estomac. Cette technique est prometteuse pour la NAFLD et la NASH puisque 94% de patients qui présentait une NASH modérée reversent vers un foie sain (Lassailly et al. 2015). Dans les cas de NASH plus sévère, la chirurgie améliore le phénotype dans 70% des cas.

Une des molécules pharmacologiques ciblant l'intestin est l'Orlistat, une molécule inhibitrice de la lipase dans l'estomac. Ce composé qui diminue l'absorption des lipides alimentaires, est déjà autorisé pour le traitement de l'obésité et est actuellement en phase III pour le traitement de la NAFLD. Comme décrit précédemment, la NAFLD peut résulter d'une dysbiose intestinale. Un antibiotique agissant sur le microbiote intestinal, la Solithromycine, est en phase II d'essai clinique pour des effets bénéfiques sur l'inflammation et le « ballooning » des hépatocytes (Fernandes et al. 2014) ainsi que sur les niveaux de transaminases circulants (Dobbins et al. n.d.).

La pathogénèse de la NAFLD et de la NASH est complexe, multifactorielle et implique différents organes. Cela complique la recherche de cibles thérapeutiques efficaces et explique l'importante diversité des molécules actuellement en études cliniques pour le traitement de ces pathologies. La poursuite de l'étude de la pathogénèse de la NAFLD et des facteurs impliqués est donc essentielle pour trouver de nouvelles cibles thérapeutiques intéressantes. Pour cela, l'utilisation de modèles animaux adaptés pour l'étude de la pathogénèse de la NAFLD est essentielle, le choix du modèle se fait en fonction de la question ou de l'hypothèse posée.

## II.7 Modèles d'étude de la NAFLD

La recherche de modèles animaux présentant des caractéristiques pathologiques similaires à l'Homme est essentielle à l'avancée scientifique sur les hépatopathies métaboliques. Un bon modèle animal de NAFLD devrait développer une stéatose hépatique accompagnée de lésions telles que l'inflammation lobulaire, la fibrose et le « ballooning » des hépatocytes. Pour l'étude de stades plus avancés, le modèle animal devrait progresser vers de la fibrose avancée, de la cirrhose et enfin le développement de l'hépatocarcinome. Aucun modèle ne regroupe la totalité des lésions observés chez l'Homme mais il existe néanmoins un grand nombre de modèles animaux qui permettent l'exploration des mécanismes impliqués dans le développement de ces pathologies.

La souris (*Mus musculus*) est le modèle animal de référence pour l'étude de l'homéostasie énergétique et de la NAFLD mais d'autres espèces comme le rat sont également utilisées.

Trois groupes de modèles animaux se distinguent, les modèles induits par des facteurs alimentaires, génétiques ou chimiques. Une combinaison de différents facteurs est souvent utilisée comme l'administration d'un régime alimentaire stéatogène à un modèle génétiquement modifié.

Plusieurs régimes obésogènes et/ou stéatogènes sont utilisés pour étudier le développement de la NAFLD et sa progression vers la NASH. Parmi ces régimes, les plus utilisés sont le régime HFD (High Fat Diet), le régime MCD (Methionine/Choline Deficient Diet) et le régime WD (Western Diet). A travers des mécanismes distincts, ces trois régimes perturbent le métabolisme énergétique et induisent des caractéristiques pathologiques de la NAFLD.

Le régime HFD classique est un régime riche en gras, composé de 60% de lipides, 20% de protéines et 20% de glucides. C'est un régime caractérisé d'obésogène, puisqu'il induit une accumulation de tissu adipeux suite à 10 semaines de régime (Ito et al. 2007).



Le régime HFD perturbe également le métabolisme glucido-lipidique en induisant une insulino-résistance et une dyslipidémie. Au niveau hépatique, ce régime induit une stéatose hépatique accompagnée de lésions inflammatoires mineures qui sont observées au bout de 19 semaines de régime. Une administration prolongée de ce régime (34 semaines) induit une augmentation des niveaux circulants de transaminases hépatiques (ALT, AST) (Ito et al. 2007). Suite à 50 semaines de régime HFD, ce modèle ne développe que des lésions mineures d'inflammation et de fibrose. Les effets du régime HFD sont différents en fonction du sexe, les souris mâles développent des perturbations métaboliques beaucoup plus sévères que les femelles (Pettersson et al. 2012). Le régime HFD induit une obésité, une résistance à l'insuline et une stéatose hépatique plus sévère chez les mâles que chez les femelles (Pettersson et al. 2012).

Le régime MCD (21% lipides, 16% protéines, 63% glucides), est un régime déficient en deux acides aminés essentiels : la méthionine et la choline qui sont indispensables dans la voie de la  $\beta$ -oxydation hépatique et la synthèse de VLDL. Ce régime induit une stéatose hépatique et une élévation des niveaux plasmatiques d'ALT et d'AST au bout de 2 semaines (Itagaki et al. 2013). A 10 semaines de régime, une fibrose irréversible s'installe. En revanche, ce modèle ne présente pas d'insulino-résistance.

Contrairement au régime MCD, le régime WD, est un régime obésogène et stéatogène qui induit une accumulation de tissu adipeux et une stéatose hépatique. Le régime WD est composé de 42% de lipides, 15% de protéines et 43% de glucides. Cependant, la composition du régime WD peut varier en fonction des études dans le but de ressembler le plus possible au régime « western » qui est riche en lipides saturés, en cholestérol et en glucides telles que le sucre. Ce régime induit une accumulation de tissu adipeux, une insulino-résistance et une stéatose hépatique au bout de trois semaines (Plump et al. 1992).

Les régimes stéatogènes sont souvent associés aux modèles génétiques pour obtenir un maximum de lésions associées à la NAFLD/NASH humaine.

Depuis l'utilisation des modèles obésogènes classiques ob/ob, db/db, d'autres modèles murins génétiques intéressants ont été générés qui présentent des effets physiopathologiques plus proches de la NAFLD humaine. Un modèle murin pour l'étude de la NASH présente une délétion du récepteur Ldlr, un gène important dans la régulation de l'internalisation du cholestérol dans les hépatocytes et dans les macrophages hépatiques.

Les souris délétées pour Ldlr et soumises à un régime riche en cholestérol, un régime stéatogène, développent une stéatose hépatique accompagnée d'inflammation (Bieghs et al. 2012). Cette stéatose est également accompagnée d'une augmentation des niveaux circulants de LDL et une diminution des HDL, un profil lipidique similaire à la NAFLD humaine. D'autres modèles génétiques ont pour cible les polymorphismes associées à la NAFLD chez l'humain. Le modèle « knock-in » du polymorphisme 148 du gène *Pnpla3* développe une stéatose hépatique en conditions alimentaires riches en sucrose (Smagris et al. 2015). Néanmoins, ce modèle ne présente pas de lésions hépatocellulaires (inflammation, « ballooning »).

Enfin, les modèles alimentaires ou génétiques peuvent également être combinés à des modèles de NAFLD/NASH induits par des facteurs chimiques. Pour l'étude du développement de la fibrose et de la cirrhose, des chimiotoxines telles que CCL4 ou la TAA sont utilisées. L'administration de CCL4 deux fois par semaine pendant 6 semaines induit une augmentation des niveaux plasmatiques de transaminases hépatiques ainsi qu'une fibrose hépatique (Domitrović et al. 2009). Cependant, les mécanismes impliqués dans les effets stéatogènes de CCL4 sont peu connus. L'administration de TAA est souvent associée à des régimes stéatogènes comme le régime WD. La combinaison du régime WD et de TAA pendant 8 semaines induit une inflammation lobulaire et une importante fibrose hépatique.

En revanche, une perte de poids importante est observée dans ces modèles induits par des facteurs chimiques qui ne sont donc pas adaptés à l'étude de la pathogénèse de la NAFLD ou NASH humaine.

L'utilisation de modèles animaux précliniques est indispensable pour l'étude de la pathogénèse et pour la recherche de cibles thérapeutiques pour la NAFLD. La majorité des modèles animaux existants ne présentent pas toutes les étapes et lésions caractéristiques des hépatopathies humaines. La NAFLD est une pathologie multifactorielle qui implique plusieurs organes dont le foie, le microbiote intestinal et le système nerveux central. Il est donc important de générer des modèles animaux prenant en compte la totalité des composantes des stéatose hépatiques métaboliques.

## Partie III : Système nerveux central et NAFLD

Le système nerveux central (SNC) joue un rôle important dans la régulation du métabolisme énergétique central et périphérique. Il communique avec plusieurs organes tels que le foie et l'intestin via des signaux neuronaux, métaboliques ou hormonaux. Le rôle des circuits neuronaux dans l'homéostasie énergétique a longtemps été étudié. Néanmoins, des études plus récentes suggèrent que d'autres types cellulaires du SNC sont également importants dans les régulations métaboliques centrales et périphériques.

### III.1 Généralités sur le SNC

Le système nerveux central comprend deux parties qui présentent des fonctions spécifiques : le système nerveux somatique et le système nerveux autonome ou végétatif.

Le système nerveux somatique participe aux fonctions de motricité volontaire et de perception. Il permet d'acheminer les informations du cerveau vers les muscles squelettiques grâce à des nerfs moteurs constitués de fibres efférentes (Akinrodoye and Lui 2020). Il permet également de faire remonter les informations provenant des organes sensoriels vers le cerveau via les nerfs sensoriels constitués de fibres afférentes. Le système nerveux autonome (SNA), comme son nom l'indique, contrôle les fonctions automatiques telles que la motricité digestive et la fonction cardiaque. Le SNA comprend le système nerveux sympathique et parasympathique qui présentent des fonctions antagonistes. Leurs fibres communiquent avec les cellules de différents organes tels que le foie, le muscle cardiaque, les glandes endocrines et les cellules du système immunitaire (McCorry 2007).

### III.2 Types cellulaires du SNC

Le SNC est composé d'une multitude de type cellulaires présentant une grande diversité moléculaire, morphologique et fonctionnelle. Ces cellules sont interconnectées et forment des réseaux complexes et dynamiques. Deux grandes familles de cellules se distinguent au sein du tissu cérébral : les neurones et les cellules gliales. Les cellules gliales telles que les astrocytes, les oligodendrocytes ou les tanocytes servent de support structurel et nutritionnel aux neurones (Jessen 2004).

**Les neurones** représentent l'unité fonctionnelle du système nerveux et de par leur capacité d'excitabilité, ils permettent la transmission de l'influx nerveux. Ils sont structurés en trois parties distinctes : le corps cellulaire, l'axone et les dendrites. Le corps cellulaire est la partie centrale du neurone qui contient un cytoplasme, un noyau et une membrane cellulaire. L'axone est la partie qui contient les terminaisons nerveuses et qui permet de transmettre l'influx nerveux venant du corps cellulaire.

Enfin, les neurones présentent des ramifications, appelées dendrites qui sont la structure réceptrice de l'influx nerveux et qui vont permettre de conduire l'information nerveuse de l'extérieur de la cellule vers le corps cellulaire. Il existe trois types de neurones dont les neurones moteurs ou efférents qui transmettent l'influx nerveux du SNC vers les cellules effectrices (muscles ou glandes) (Hounsgaard 2017). A l'inverse, les neurones sensitifs ou afférents vont véhiculer l'information sensorielle des organes vers le SNC. Enfin, les interneurones ou neurones d'association assurent la transmission d'information entre les neurones moteurs et sensitifs (McBain and Fisahn 2001).

Les **cellules gliales**, sont dix fois plus nombreuses que les neurones et sont essentielles au bon fonctionnement et à la survie des neurones. Ces cellules ne présentent pas de dendrites ou d'axone et n'émettent pas de signal électrique, en revanche elles participent à la transmission de l'influx nerveux des neurones.

Les oligodendrocytes sont des cellules qui forment la gaine de myéline qui entoure les axones des neurones (Bradl and Lassmann 2010). La myéline est une structure lipidique multi-lamellaire qui joue un rôle clé dans la propagation de l'influx nerveux des neurones. En plus du support nerveux, les oligodendrocytes apportent un support métabolique aux neurones. Ils transfèrent aux neurones des métabolites énergétiques à travers des canaux cytoplasmiques « myéliniques » et des transporteurs mono-carboxylates (Bradl and Lassmann 2010). Cela permet le transfert rapide de métabolites énergétiques à chaîne courte vers les neurones telles que le pyruvate et le lactate. Ces substrats sont ensuite métabolisés et contribuent à la synthèse d'ATP dans les neurones.

Les astrocytes, comme leur nom l'indique, présentent une forme étoilée composée d'un corps cellulaire et d'un noyau ainsi que de prolongements cytoplasmiques ramifiés.

La particularité du cytoplasme astrocytaire est la présence de gliofilaments ou filaments intermédiaires riches en protéine glio-fibrillaire acide (GFAP) et de grains de glycogène (Almad and Maragakis 2018). Ces grains de glycogène astrocytaires représentent la principale réserve énergétique cérébrale. Les astrocytes sont très sensibles à leur environnement, de par la présence de nombreux canaux ioniques mécano-sensibles ou voltages dépendants et de transporteurs ioniques au niveau de la membrane astrocytaire. De plus, les astrocytes présentent des récepteurs membranaires pour différents types de ligands (neuropeptides, neurotransmetteurs, cytokines), des récepteurs nucléaires pour différentes hormones (thyroïdiennes, stéroïdiennes) ainsi que des jonctions permettant la communication avec les neurones. Enfin, ce sont également des cellules endocrines qui synthétisent et sécrètent des neurostéroïdes dont la progestérone et la déhydroépiandrostérone (DHEA).

Les tanocytes sont des cellules gliales dont les corps cellulaires bordent les parois du troisième ventricule de l'hypothalamus. Ces cellules partagent de nombreuses spécificités avec les astrocytes mais présentent néanmoins une morphologie unique et des fonctions distinctes (Akmayev and Popov 1977). Les tanocytes sont des cellules polarisées, non ciliées, qui présentent des prolongements qui s'étendent dans le parenchyme cérébral (Rodríguez et al. 2005). Ces cellules forment une « barrière tanocytaire », de par leur localisation entre le ventricule de l'hypothalamus et les vaisseaux sanguins. Elles régulent les échanges sang-hypothalamus et sont impliquées dans la régulation de fonctions clés du métabolisme énergétique via le contrôle du passage de neuropeptides hypothalamiques dans le système porte hypothalamo-hypophysaire (Parkash et al. 2015). De plus, les tanocytes sont sensibles aux variations de glycémie périphérique (Frayling, Britton, and Dale 2011).

Les différentes cellules du système nerveux central présentent donc un rôle important dans la régulation du métabolisme énergétique.

### III.3 SNC et métabolisme énergétique

Différentes structures du système nerveux central sont impliquées dans la régulation nerveuse du métabolisme énergétique dont l'hypothalamus et le tronc cérébral qui sont les plus étudiées. De nombreuses études ont mis en évidence l'implication de circuit neuronaux dans la régulation du métabolisme périphérique. Néanmoins, d'autres types cellulaires non-neuronaux (astrocytes, tancytes...) qui étaient uniquement considérées pour leur fonction de soutien aux neurones, présentent également un rôle critique dans l'homéostasie énergétique.

Dès les années 1940, l'hypothalamus a été décrit comme le centre régulateur du métabolisme grâce à l'observation de comportements hyperphagiques et d'obésité suite à des lésions hypothalamiques tumorales de régions spécifiques dont les noyaux ventromédian, dorsomédian et paraventriculaire (Hetherington 1944; Brobeck 1946). Par la suite, d'autres études ont démontré que des lésions à la région latérale de l'hypothalamus entraînent à l'inverse une hyperphagie (Anand and Brobeck 1951). Cela a permis de comprendre la spécificité des différentes régions hypothalamiques dans la régulation de la prise alimentaire et de l'homéostasie énergétique. Au cœur du système nerveux central, l'hypothalamus est le principal centre d'intégration des signaux hormonaux et des nutriments qui arrivent de la périphérie (Cone et al. 2001). Ces signaux métaboliques induisent des modifications fonctionnelles et morphologiques de l'hypothalamus pour maintenir l'homéostasie énergétique. Ils sont intégrés par des réseaux neuronaux qui vont faire remonter l'influx nerveux vers d'autres régions du système nerveux central. Le noyau arqué de l'hypothalamus joue un rôle primordial dans la régulation du métabolisme énergétique. Il comprend deux populations de neurones qui régulent la prise alimentaire. Les neurones oréxigènes qui stimulent la prise alimentaire, co-expriment les neuropeptides NPY, AgRP et GABA.

Les neurones anorexigènes qui à l'inverse induisent un effet de satiété, expriment des peptides POMC comme la  $\alpha$ -MSH et CART. Ces circuits neuronaux permettent l'intégration de signaux métaboliques et une adaptation rapide de l'appétit et de la dépense énergétique (Webber, Bonci, and Krashes 2015). Les neurones intègrent également des signaux hormonaux tels que la leptine et la ghréline, des hormones qui régulent la prise alimentaire et qui sont respectivement synthétisées par le tissu adipeux et l'intestin. Les signaux métaboliques et hormonaux induisent des changements fonctionnels et morphologiques dans l'hypothalamus dans le but de maintenir l'homéostasie énergétique.

#### III.4 Astrocytes et homéostasie énergétique

Un intérêt grandissant se porte sur les cellules non-neuronales telles que les astrocytes dont le rôle dans l'homéostasie énergétique a longtemps été sous-estimé. Ces cellules sont en première ligne de la barrière hémato-encéphalique et sont fondamentales dans la signalisation et le transport des nutriments. Ce positionnement leur permet de capter les informations périphériques. En effet, ces cellules sont sensibles aux taux circulants de glucose grâce à l'expression des transporteurs GLUT1/2. Les astrocytes ont un véritable rôle métabolique puisque suite à l'entrée de glucose dans les astrocytes *via* GLUT1/2, il est pris en charge par l'héxokinase pour donner du glucose-6-P qui va soit être stocké sous forme de glycogène ou entrer dans la voie de la glycolyse. Le pyruvate issu de la glycolyse est internalisé dans la mitochondrie des astrocytes pour être métabolisé par le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative pour produire de l'ATP. Les astrocytes présentent un métabolisme glycolytique, le pyruvate va préférentiellement être réduit en lactate par l'enzyme lactate déshydrogénase 5.



Cela va permettre la « coopération métabolique » entre les neurones et les astrocytes puisque le lactate libéré dans le milieu extracellulaire va pouvoir être utilisé par les neurones qui présentent un métabolisme oxydatif.

Un stress métabolique induit par l'administration d'un régime riche en gras entraîne une augmentation du nombre d'astrocytes dans des régions telles que l'hypothalamus, un phénomène caractérisé d'astrogliose. Ce phénomène est décrit comme une réponse adaptatrice protectrice qui va diminuer la prise alimentaire en réponse au régime gras (Buckman et al. 2015). Les mécanismes impliqués ne sont pas complètement élucidés. Certaines études animales suggèrent une protection des femelles vis à vis des effets délétères du régime HFD sur l'homéostasie cérébrale (Morselli et al. 2016). Les auteurs de cette étude suggèrent une implication du récepteur ER $\alpha$  dans cette protection des femelles.

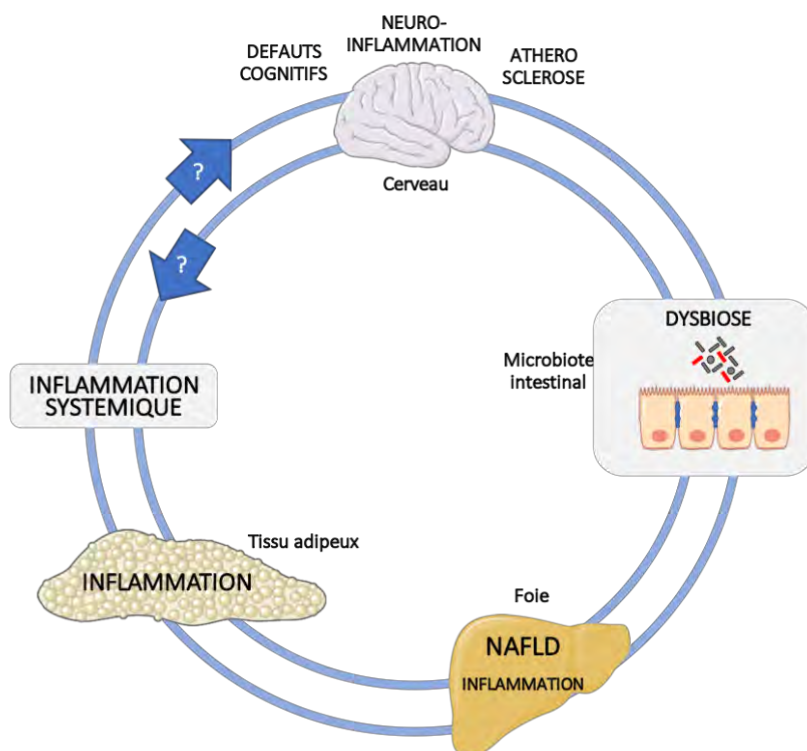
Il existe un dimorphisme sexuel dans la morphologie des astrocytes de l'hypothalamus qui subissent des changements morphologiques au cours du cycle œstral. Dans des modèles murins, il a été démontré que le noyau arqué de l'hypothalamus présente un remodelage du nombre de synapses des neurones et de la morphologie des astrocytes qui est lié aux variations hormonales du cycle œstral (Arias et al. 2009).

Les astrocytes, en plus d'avoir un rôle important de soutien à la transmission et la plasticité synaptique, présentent un rôle critique dans la réponse hypothalamique à des informations métaboliques en participant au « sensing » des nutriments.

### III.5 SNC et NAFLD

Il existe un dialogue entre le système nerveux central et les organes périphériques tels que le foie, l'intestin et les glandes endocrines. Le foie est sous la régulation du système nerveux autonome de manière directe grâce à l'innervation des hépatocytes. Il est également indirectement régulé par l'effet d'hormones sécrétées sous l'influence du système nerveux parasympathique telles que l'insuline (Nonogaki 2000). Le SNC est également impliqué dans la mobilisation des réserves énergétiques en fonction de l'état nutritionnel. En situation de jeûne, le système nerveux parasympathique stimule la libération de glucose hépatique dans la circulation sanguine mais celui-ci est un mécanisme secondaire en comparaison à l'action du glucagon qui stimule la glycogénolyse et la néoglucogenèse hépatique. En parallèle, en conditions postprandiales, l'innervation directe des hépatocytes par le système parasympathique est essentielle pour l'action hypoglycémiante de l'insuline sur le foie (Püschel 2004). La détection de l'arrivée du glucose au niveau intestinal stimule le système nerveux parasympathique dont l'innervation des hépatocytes va favoriser l'import du glucose au niveau hépatique (Püschel 2004). Cette coopération métabolique entre le SNC et le foie participe au maintien de l'homéostasie énergétique.

Plusieurs études démontrent un lien entre le développement de la NAFLD et des perturbations du SNC. Chez l'Homme, la NAFLD est associée à de nombreux troubles cérébraux tels qu'une neuro-inflammation, des défauts cognitifs et une athérosclérose cérébrale (Kjærgaard et al. 2021). D'autres facteurs sont communs au développement de la NAFLD et de troubles cérébraux tels qu'une altération du microbiote intestinal, l'inflammation du tissu adipeux et l'inflammation systémique. Néanmoins, il est difficile d'établir un lien de causalité et de déterminer si ce sont les troubles au niveau hépatique ou au niveau du système nerveux central qui apparaissent en premier (**Figure 7**).



**Figure 7 : Représentation des facteurs communs de développement de la NAFLD et de troubles cérébraux.**  
 La NAFLD est associée à des troubles du système nerveux central tels qu’une neuro-inflammation, des troubles cognitifs et une athérosclérose. Différents facteurs sont communs au développement de la NAFLD et des troubles du système nerveux central dont une dysbiose intestinale, une inflammation du tissu adipeux et une inflammation systémique. Il est néanmoins difficile d’établir un lien de causalité et un « sens » de développement de ces troubles.

Les pathologies hépatiques et cérébrovasculaires partagent de nombreux facteurs de risque métaboliques tels que l’insulino-résistance, l’hypertension, l’obésité et la dyslipidémie (Fargion, Porzio, and Fracanzani 2014). La NAFLD est caractérisée par différents degrés d’inflammation hépatique en fonction du stade et de la sévérité de la pathologie. Comme décrit dans le chapitre précédent de cette thèse, en situation de NAFLD, l’inflammation hépatique est souvent associée à une inflammation du tissu adipeux à l’origine d’une inflammation systémique. L’inflammation périphérique induit une augmentation des cytokines pro-inflammatoires circulantes ainsi qu’une induction des facteurs de transcription pro-athérogéniques (Hansson 2005).

Cela peut favoriser l'apparition de lésions vasculaires athérogéniques (McColl, Allan, and Rothwell 2009) ainsi que le développement de pathologies cardio-vasculaires (Mellinger et al. 2015). De plus, l'état inflammatoire observé au cours de la NAFLD peut perturber l'homéostasie des vaisseaux cérébraux et des cellules gliales via une augmentation du nombre de cellules gliales activées. De telles altérations peuvent induire des perturbations des neurotransmetteurs et favoriser l'apparition de neurodégénération et d'ischémie cérébrale (Ghareeb et al. 2011). Des études ont démontré que la lipocaline 2 est un acteur clé de l'axe foie-cerveau en condition de NASH (Mondal et al. 2020). La lipocaline 2, qui est une protéine exclusivement produite par le foie, est un médiateur important dans la neuro-inflammation et la neuro-dégénérescence en conditions de NASH (Mondal et al. 2020). En plus de l'inflammation, d'autres facteurs présents au cours de la NAFLD peuvent également avoir des effets délétères sur le cerveau tels qu'un état pro-coagulant, un dysfonctionnement endothélial et une augmentation de l'activité des plaquettes sanguines (Lombardi, Fargion, and Fracanzani 2019).

Les récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription impliqués dans le « sensing » des changements environnementaux ou des signaux hormonaux. Plusieurs de ces récepteurs nucléaires tels que les récepteurs CAR, PPAR $\alpha$ , PXR, LXR et FXR sont impliqués dans le dialogue entre le système nerveux central et les organes périphériques (Olivares, Moreno-Ramos, and Haider 2015). La partie suivante de cette thèse sera consacrée à l'analyse du rôle du récepteur nucléaire CAR dans les adaptations neurovasculaires et périphériques en réponse à différents stress. L'implication de ce récepteur dans les troubles hépatiques et extra-hépatiques au cours de la NAFLD sera également détaillée.

## Partie IV : Rôle de CAR dans la pathogenèse de la NAFLD

### IV.1 Le récepteur CAR est un senseur de stress périphérique et neurovasculaire

Le récepteur nucléaire constitutif aux androstanes (CAR), qui fait l'objet de notre étude, est principalement exprimé dans le foie mais également dans d'autres organes tels que l'intestin, les reins, le cerveau et les poumons. Il a d'abord été étudié pour son rôle dans la détoxification de molécules endogènes comme les acides biliaires et la bilirubine et dans la détoxification de molécules exogènes (médicaments, xénobiotiques) (Wagner et al. 2005; Wei et al. 2000). Son rôle dans le catabolisme hépatique des hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes a également été largement étudié dans les dernières années (Xie et al. 2003; Qatanani, Zhang, and Moore 2005). Plus récemment, plusieurs études ont démontré une implication du récepteur CAR dans la régulation de deux voies métaboliques hépatiques, la  $\beta$ -oxydation et la néoglucogenèse (Lynch et al. 2014; J. Yan et al. 2015). Ces études révèlent donc un rôle de CAR au carrefour entre détoxification, catabolisme hormonal et métabolisme énergétique. En revanche, le rôle extra-hépatique de ce récepteur a très peu été étudié (système nerveux central, intestin).

Dans cette revue publiée dans le journal « Cells », nous avons détaillé les voies d'activation directes et indirectes de CAR ainsi que son implication dans la réponse et l'adaptation au stress physiologique. Nous avons également abordé son implication dans la régulation du métabolisme énergétique *via* son rôle de senseur lipidique et glucidique. De nombreuses études récentes suggèrent l'importance du récepteur CAR au niveau du système nerveux central (SNC).

Nous rapportons dans cette revue, des études qui démontrent un rôle de CAR dans l'homéostasie de la barrière hématoencéphalique, une interface clé dans le dialogue entre le SNC et la périphérie. Enfin, nous discutons la régulation de cytochromes P450 dans le SNC par le récepteur CAR ainsi que son implication dans des pathologies cérébrales.

Review

# Constitutive Androstane Receptor: A Peripheral and a Neurovascular Stress or Environmental Sensor

Fabiana Oliviero <sup>1,†</sup>, Céline Lukowicz <sup>1,†</sup>, Badreddine Boussadia <sup>2</sup>, Isabel Forner-Piquer <sup>2</sup>, Jean-Marc Pascussi <sup>2</sup>, Nicola Marchi <sup>2,\*</sup> and Laila Mselli-Lakhal <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRAE, ENVT, INP-Purpan, UPS, 31027 Toulouse, France; fabiana.oliviero@inrae.fr (F.O.); celine.lukowicz@unil.ch (C.L.)

<sup>2</sup> Cerebrovascular and Glia Research, Institute of Functional Genomics (UMR 5203 CNRS–U 1191 INSERM, University of Montpellier), 34094 Montpellier, France; badreddine.boussadia@gmail.com (B.B.); Isabel.Forner-Piquer@igf.cnrs.fr (I.F.-P.); jean-marc.pascussi@inserm.fr (J.-M.P.)

\* Correspondence: Nicola.Marchi@igf.cnrs.fr (N.M.); laila.lakhal@inrae.fr (L.M.-L.); Tel.: +33-4-34-35-92-20 (N.M.); +33-5-61-19-39-15 (L.M.-L.)

† These authors contributed equally to this work.

Received: 6 October 2020; Accepted: 2 November 2020; Published: 6 November 2020



**Abstract:** Xenobiotic nuclear receptors (NR) are intracellular players involved in an increasing number of physiological processes. Examined and characterized in peripheral organs where they govern metabolic, transport and detoxification mechanisms, accumulating data suggest a functional expression of specific NR at the neurovascular unit (NVU). Here, we focus on the Constitutive Androstane Receptor (CAR), expressed in detoxifying organs such as the liver, intestines and kidneys. By direct and indirect activation, CAR is implicated in hepatic detoxification of xenobiotics, environmental contaminants, and endogenous molecules (bilirubin, bile acids). Importantly, CAR participates in physiological stress adaptation responses, hormonal and energy homeostasis due to glucose and lipid sensing. We next analyze the emerging evidence supporting a role of CAR in NVU cells including the blood–brain barrier (BBB), a key vascular interface regulating communications between the brain and the periphery. We address the emerging concept of how CAR may regulate specific P450 cytochromes at the NVU and the associated relevance to brain diseases. A clear understanding of how CAR engages during pathological conditions could enable new mechanistic, and perhaps pharmacological, entry-points within a peripheral–brain axis.

**Keywords:** constitutive androstane receptor; liver; brain; neurovascular unit; blood-brain barrier, stress sensor; environmental contaminants

## 1. Introduction: CAR Governs Detoxification Mechanisms

The Constitutive Androstane Receptor (CAR), a key nuclear receptor (subfamily 1, group I, member 3 (NR1i3)), displays a prominent functional expression in peripheral organs and an emerging role in the brain. Here, we examine CAR as an element responding to environmental or stress challenges, preserving cellular and multi-organ homeostasis. CAR was originally defined as a xenobiotic nuclear receptor that controls the hepatic detoxification of foreign chemicals and endogenous bile acids [1]. CAR is the mediator of phenobarbital-induced cytochrome P450 enzymes expression in the liver [2,3]. CAR directly regulates the expression of an array of phase I and II xenobiotic metabolism enzymes and multi-drug transporters (Table 1) [4,5]. Specifically, CAR controls the inductive expression of the CYP phase I enzymes CYP2B, CYP3A, CYP2C, contributing to the detoxification of numerous drugs and environmental chemicals. Furthermore, CAR activation results in the upregulation of phase II enzymes such as uridine diphosphate glucuronosyltransferase (UGT), sulphotransferases



(SULT), and efflux and uptake transporters such as multidrug resistance mutation 1 (MDR1), multidrug resistance proteins (MRPS), and organic-anion-transporting polypeptides (OATP) [6,7]. Via these enzymes and transporters, CAR governs the detoxification of endogenous bile acids and bilirubin, which can cause hepato-toxicity if accumulated [8,9]. This evidence outlines CAR as a player regulating key metabolic and transporter machineries involved in a myriad of endogenous and protective cellular processes, applicable to peripheral organs and the brain.

**Table 1.** Constitutive Androstane Receptor (CAR) target genes involved in detoxification processes [4,5].

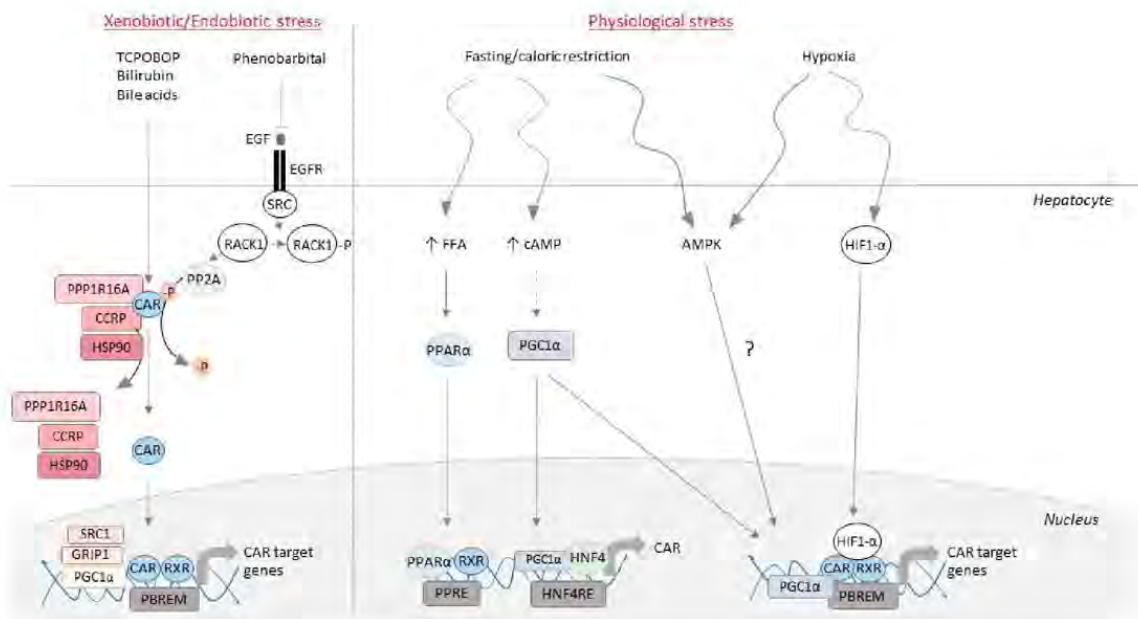
	Mice	Human
Phase I	<i>Cyp1a1, Cyp1a2, Cyp2a4, Cyp2b10, Cyp2c29, Cyp2c37, Cyp2c55, Cyp3a11, Nqo1, Aldh1a1, Aldh1a7, Akr1b7, Ces6</i>	<i>CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5</i>
Phase II	<i>Ugt1a1, Ugt1a9, Ugt2b34, Ugt2b35, Ugt2b36, Sult1e1, Sult2a1, Sult2a2, Sult3a1, Sult5a1, Gsta1, Gsta4, Gstm1, Gstm2, Gstm3, Gstm4, Gstp, Gstt1</i>	<i>UGT1A1, SULT2A1</i>
Transporters	<i>Mrp2, Mrp3, Mrp4, Oatp1a4</i>	<i>MDR1, PTGS2, GCK, PTPRN, ATP2B2</i>

Importantly, microarray analyses identified additional sets of CAR target genes involved in hepatocyte proliferation, glucose and lipid metabolism [10,11]. The latter was confirmed in functional studies revealing that selective activation of CAR alleviates high fat diet-induced obesity and type 2 diabetes [12,13]. Furthermore, CAR is activated by cellular stress as induced by fasting, caloric restriction [14,15] or hypoxia [16]. CAR regulatory pathways include AMP-activated protein kinase (AMPK) [17], a key player maintaining intracellular homeostasis, and stress activated protein kinase (SAPK) [18]. Based on this evidence, we here review how CAR, through key peripheral and central functions, acts as a stress sensor engaging and responding to toxic, environmental, or metabolic insults.

## 2. CAR Has a Particular Mechanism of Action: Direct and Indirect Activation

The crystal structure of CAR, published in 2004 [19,20], outlined the sites responsible for its constitutive activity. CAR contains a single-turn helix X located before the C-terminal AF2 helix that favors an active conformation of the receptor. The intrinsic constitutive nature of CAR necessitates specific mechanisms of regulation aside from ligand binding. Specifically, CAR is sequestered in the cytoplasm in a phosphorylated active conformation, forming a complex with chaperone proteins: Cytoplasmic CAR retaining protein (CCRP), Heat shock protein (HSP90) and PPP1R16A (the membrane subunit of protein phosphatase 1 $\beta$ ) [21,22]. TCPOBOP (murine form, 1,4-Bis-[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene) or CITCO (human form, 6-(4-Chlorophenyl)imidazo[2,1-b][1,3]thiazole-5-carbaldehyde O-(3,4-dichlorobenzyl)oxime) are synthetic CAR agonist interacting with the ligand-binding pocket of CAR to induce its nuclear translocation (Figure 1) [23]. This translocation requires the recruitment of phosphatase protein A2 (PP2A) responsible for dephosphorylating the threonine 38 (human form) or 48 (murine form) [24], thus releasing CAR from its cytosolic complex [21,22].





**Figure 1.** CAR is a sensor for xenobiotic/endobiotic and physiological stress. CAR is maintained in the cytoplasm by a complex of chaperone proteins (PP1R16A, CCRP, HSP90) and can be activated through direct or indirect processes by a xenobiotic or endogenous molecule. Dephosphorylation of CAR allows it to be free from its chaperone complex, to migrate to the nucleus, heterodimerize with RXR, recruit co-activator factors and allow transcription of its target genes. Gene expression of CAR is induced in response to fasting and caloric restriction through nuclear receptors PPAR $\alpha$  and HNF4. Hypoxia induces nuclear translocation of CAR and expression of its target genes through HIF1.

CAR can be activated by endogenous and exogenous molecules without direct binding. Phenobarbital induces CAR translocation indirectly by competing with the epidermal growth factor (EGF) for binding on its receptor EGFR. This prevents activity of Src kinase and dephosphorylates Receptor of activated C kinase 1 (RACK1). RACK1 activation of PP2A leads to dephosphorylation and nuclear translocation of CAR (Figure 1) [24]. Once in the nucleus, CAR heterodimerizes with its partner Retinoid X Receptor (RXR), and binds to its response elements: Phenobarbital response element module (PBREM) [25]. PBREMs are located on the promoters of CAR-target genes such as *CYP2B6* for the human form of CAR, or *Cyp2b10* for murine CAR. The CAR/RXR heterodimer recruits specific co-activators allowing its interaction with the transcription machinery. Glucocorticoid receptor interacting protein-1 (GRIP-1), Proliferator activated receptor coactivator 1 $\alpha$  (PGC1 $\alpha$ ), and Steroid receptor co-activator (SRC-1) allow the transcription of CAR-target genes [26–28].

### 3. Functional Roles of CAR in Peripheral Organs

CAR is expressed mainly in the liver, and also in the intestines and kidneys [29]. Most of the functions of CAR as a stress sensor occur in the liver, the main peripheral organ responsible for xenobiotics and metabolic stress responses [30]. The generation of CAR deficient mice represented a milestone to understand the complex roles of CAR in physiological and pathological settings [31]. CAR deletion induces sensitivity to toxins due to the disruption of detoxification enzymes regulation. Thus, CAR coordinates the expression of hepatic genes involved in xenobiotic catabolism, including phase I and II biotransformation enzymes and transporters [32]. Importantly, two main groups of xenobiotics are described as modulators of CAR activity: drugs and environmental pollutants (Tables 2 and 3). Hepatoprotection of CAR against xenobiotics does not only consist of induction of detoxification genes but also in specific gene repression. For instance, CAR prevents the induction of CYP4A, a major lipid peroxidation enzyme, by augmenting superoxide dismutase-3 (SOD) to limit oxidative stress [10].

**Table 2.** Environmental contaminants identified as CAR activators.

Contaminants	Species	References
Diphenamid (Pesticide)	Human	[33]
Phenothrin (Pesticide)	Human	[33]
Permethrin (Pesticide)	Rat	[34]
Perfluorocarboxylic acid, PFCA (Detergent)	Mice	[35,36]
Perfluorooctanoic acid, PFOA (Detergent)	Mice	[3,37]
Perfluorooctanesulfonic acid PFOS (Detergent)	Rat	[38]
Alachlor (Pesticide)	Mice	[39]
Arsenite (Chemical)	Mice	[39]
Azo dyes (Paint)	Mice/Rat	[40]
Bisphenol A (Chemical)	Mice	[39]
Butylate (Pesticide)	Mice	[39]
Chlorpropham (Pesticide)	Mice	[39]
Chlorpyrifos (Pesticide)	Mice	[39]
Cypermethrin (Pesticide)	Mice	[39]
Cyproconazole (Pesticide)	Mice	[41]
DBP, Di-n-butylphthalate (Plasticizer)	Rat	[42]
DDE, Dichlorodiphenyldichloroethylene (Pesticide)	Rat	[43]
Di-isononyl phthalate (DiBP) (Plasticizer)	Human	[44]
O,p-DDT,1,1,1-Trichloro-2-(2-chlorophenyl)2-(4-chlorophenyl)ethane (Pesticide)	Mice/Rat	[43,45]
DEHP (Plasticizer)	Mice/Human	[39,46]
Dieldrine (Pesticide)	Mice	[47]
Endosulfan (Pesticide)	Mice/Human	[39,48]
Ferrirothion (Pesticide)	Mice	[39]
Polycyclic aromatic hydrocarbons	Mice	[49]
Imazalil (Pesticide)	Mice	[39]
Kepone (Pesticide)	Mice	[39]
MEHP (Plasticizer)	Mice	[39]
Metolachlor (Pesticide)	Mice	[39]
Methoxychlor (Pesticide) and metabolites	Mice/Rat/Human	[39,48,50]
Monosodium methane arsenate	Mice	[39]
Nonylphenol (Plasticizer)	Human	[4]
Parathion (Pesticide)	Mice	[4]
PCB Polychlorobiphenyles (Chemical derivatives)	Mice	[45]
Propachlor (Pesticide)	Mice	[39]
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)	Mice	[51]
SSS-Tributylphosphorothioate (Pesticide)	Mice	[39]
Triclopyr (Pesticide)	Mice	[39]



**Table 3.** Drugs presenting activation or repression action on CAR.

Drugs	Species	Action	References
Neticonazole	Human	Activator	[33]
Rimcazole	Human	Activator	[33]
Sorafenib	Human	Inhibitor	[52]
Rimonabant	Human	Inhibitor	[52]
DL5050	Human	Activator	[53]
Valproic Acid	Human	Activator	[54]
Acetaminophen	Mice	Activator	[55,56]
Triazole Antifungals	Mice	Activator	[41,57]
Artemisinin	Mice/Human	Activator	[58,59]
Benzodiazepines	Human	Inhibitor	[60]
Clotrimoxazole	Human	Inhibitor	[31]
Cocaine	Human	Inhibitor	[61]
Dexamethasone	Human	Activator	[62,63]
Ketoconazole	Human	Inhibitor	[64]
Meclizine	Mice/Human	Activator (Mice) Inhibitor (Human)	[65]
Metamizole	Human	Activator	[66]
Methotrexate	Mice	Inhibitor	[67,68]
Orphenadrine	Rat	Activator	[69]
Phenobarbital	Mice, Rat	Activator	[70,71]
Phenytoin	Human	Activator	[72–74]
Statins	Human	Activator	[75,76]

### 3.1. CAR as an Endobiotic Stress Sensor

CAR controls the metabolism of endogenous molecules. The degradation product of heme, bilirubin, is a potentially highly neurotoxic endogenous compound in case of extended accumulation. Glucuronidation by UGT1A1 enzyme is the main detoxification pathway of bilirubin, then secreted into the bile by MRP2 active transporter. CAR is involved in bilirubin clearance by inducing UGT1A1 and Glutathione S-transferase A1 (GSTa1) enzymes [77], as well as OATP2 and MRP2 transporters [78].

CAR activation in mice induces the expression of enzymes (CYP3A11, SULT2A1) and transporters (MRP3) involved in bile acid metabolism and elimination [56]. Bile acids, produced by the liver, are necessary for cholesterol elimination and dietary lipids absorption. Hepatic cholesterol is degraded in two primary bile acids, cholic acid (CA) and chenodeoxycholic acid (CDCA). In the intestine, these bile acids are hydroxylated by the microbiota into secondary bile acids, deoxycholic acid and lithocholic acid (LCA), reabsorbed and transported to the liver [79]. Wild type mice subjected to a diet containing 0.5% of LCA present Cyp2b10 induction which is not seen in CAR knock-out mice subjected to the same diet [56]. Furthermore, TCPOBOP-induced CAR activation protects the liver from cholestasis by allowing the production of non-toxic bile acids [80]. CAR seems to act independently from Farnesoid X Receptor (FXR) receptor, a known xenosensor of bile acids. In FXR and PXR deficient mice, elevated cholic acid levels induce expression of CAR and its target genes which metabolize potentially-toxic cholic acid [78].



### 3.2. CAR as a Regulator of Steroid and Thyroid Hormones

The involvement of CAR in hormone regulation was first suggested when androstanol and androstenol were identified as CAR ligands. These steroids inhibit CAR activity by inducing the dissociation of CAR from the co-activator SRC1 [2]. Progesterone and testosterone also inhibit CAR activity [59]. Steroid hormone levels are maintained by a dynamic balance between synthesis and inactivation due to limited storage capacity. Therefore, coordination between synthesis and biotransformation is necessary to maintain normal physiological functions. Many CYPs (CYP11, CYP17, CYP19, CYP21) are responsible for steroid hormone synthesis, catabolism and inactivation [81]. The liver is the main site of steroid catabolism where CAR plays an important role through regulation of CYPs and sulfotransferases expression. TCPOBOP activation of CAR induces estrogen catabolism to promote its excretion [82]. CAR also regulates estrogen sulfotransferase (EST) encoded by the *SULT1E1* gene which catalyzes the conjugation of a sulfate on estrogens, producing inactive forms [83].

Several studies outline a link between CAR and thyroid hormones activity. Phenobarbital chronic treatment leads to thyroid hypertrophy in rats and humans [84]. Other studies revealed that phenobarbital or phenytoin activation of CAR lowered circulating thyroxine (T4) levels [15,84,85]. CAR is involved in thyroid hormone catabolism through regulation of phase II enzymes UGT1A1 and SULT1A1 [4,86]. Experimental evidence demonstrated CAR regulation of the catabolism of the stress hormone corticosterone [87]. CAR knockout mice developed hypercorticism associated with obesity, glucose intolerance, insulin insensitivity, dyslipidemia and hepatic steatosis [87]. Remarkably, the latter modifications were absent, or minor, in CAR knockout females, developing similar metabolic disorders only when ovariectomized. Analysis of the hepatic transcriptome revealed a role of CAR in the catabolism of corticosterone [87]. CAR deletion resulted in down-regulation of enzymes involved in the hepatic catabolism of steroid hormones, specifically Hydroxy-Delta-5-Steroid Dehydrogenase, 3 Beta- And Steroid Delta-Isomerase 1 (Hsd3b1), Hydroxy-Delta-5-Steroid Dehydrogenase, 3 Beta- And Steroid Delta-Isomerase 5 (Hsd3b5), Hydroxy-Delta-5-Steroid Dehydrogenase, 11 Beta- And Steroid Delta-Isomerase 1 (Hsd11b1), Aldo-Keto Reductase Family 1 Member C14 (Akr1c14), Steroid 5 Alpha-Reductase 1 (Srd5a1) and Aldehyde Dehydrogenase 3 Family Member A2 (Aldh3a2) [87]. Altogether, these results highlight the important role of CAR in the maintenance of endocrine and metabolic equilibrium. The CAR-dependent regulation of hormone catabolism constitutes a lever for the maintenance of energy homeostasis.

### 3.3. CAR as a Sensor of Fasting and Caloric Restriction

The activity of CAR is modulated according to physiological and pathophysiological conditions (Figure 1). Resistance to weight-loss during extended fasting or caloric restriction requires the establishment of specific metabolic pathways. CAR deficient mice present a defect in extended-fasting resistance to weight loss [15]. Importantly, fasting activates CAR through interaction of PGC1 $\alpha$  and Hepatocyte nuclear factor 4  $\alpha$  (HNF4 $\alpha$ ) with response elements that regulate expression of CAR [14]. Nuclear receptor Peroxisome proliferator-activated receptors  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) is essential in CAR induction during response to fasting [88]. The glucocorticoid receptor (GR) is also involved, as its response elements have been identified on the CAR promoter [89]. Finally, a study conducted on HepG2 cells revealed the involvement of SAPK and ETS Like-1 (Elk1) in regulating CAR expression [18]. Collectively, these data support CAR as a nuclear receptor that reacts to nutritional conditions such as fasting and caloric restriction.

### 3.4. CAR as a Glucose Sensor

A role of CAR in glucose homeostasis was first hypothesized as a result of clinical observations obtained from phenobarbital-treated diabetic patients who presented improved insulin sensitivity and decreased glycaemia levels [90,91]. Experimentally, diabetic mice present improved glucose tolerance following treatment with the CAR agonist TCPOBOP [12]. Improvement of glucose tolerance is mainly



due to the suppression of hepatic glucose production. CAR activation represses the gluconeogenesis limiting enzymes Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) and Glucose 6-phosphatase (G6Pase). A number of mechanisms were suggested, including competition of CAR with Forkhead box protein O1 (FoxO1) and HNF4 $\alpha$  for binding on Iron-responsive element (IRE) and Hepatocyte nuclear factor 4  $\alpha$  responsive element (HNF4RE), respectively located on promoters of PEPCK and G6Pase [92]. Furthermore, CAR could bind to SRC2/GRIPI and PGC1 $\alpha$  which are two co-activators of HNF4 $\alpha$ , lowering expression of gluconeogenesis genes [93]. Additional evidence suggests that nuclear translocation of CAR allows physical interaction with PGC1 $\alpha$ , allowing the recruitment of E3 Cullin Ligase and interaction to Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies. This leads to PGC1 $\alpha$  degradation by the proteasome and consequent repression of gluconeogenesis genes [94]. Finally, data suggest the action of CAR through SULT2b1 regulation on HNF4 $\alpha$  deacetylation, which could prevent CAR nuclear translocation and action on gluconeogenesis genes [95]. CAR repression of gluconeogenesis genes was confirmed on human hepatocyte primary cultures [96]. Overall, this reveals a glucose sensing action of CAR through regulation of hepatic gluconeogenesis.

### 3.5. CAR as a Lipid Sensor

The role of CAR in the regulation of lipid metabolism remains controversial, with studies reporting both anti-lipogenic [12,13] and pro-lipogenic functions [97,98]. Chronic treatment with CAR activators, such as phenobarbital or valproic acid, is associated with hepatic metabolic disorders [99,100]. These clinical observations were confirmed using animal models, revealing a CAR-dependent control of fatty acid catabolism and hepatic lipogenic genes. CAR acts as an anti-lipogenic factor by interfering with PPAR $\alpha$  on  $\beta$ -oxydation of fatty acids [101]. In ob/ob obese mice subjected to a high fat diet, CAR activation leads to a decreased hepatic steatosis by inhibiting de novo lipogenesis via Stearoyl-CoA desaturase-1 (Scd1), Fatty acid synthase (Fas), Acetyl coa carboxylase (Acc), and SREBP-1c repression [12,13]. Furthermore, CAR may act on de novo lipogenesis genes through the LXR nuclear receptor, regulator of hepatic lipogenesis genes. CAR could contribute to the inactivation of oxysterols which are endogenous ligands of LXR through regulation of Sult2B1b sulfotransferase expression. Oxysterol inactivation leads to decreased LXR activity and reduction of the LXR–SREBP pathway [102]. Accordingly, Sult2B1b deficient mice treated with TCPOBOP do not present repression of de novo lipogenesis genes [12].

However, recent data reported a prolipogenic effect of CAR, inducing hepatic lipid accumulation upon its activation [98]. This occurs through the induction of hepatic lipogenic genes, including patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (*Pnpla3*), a gene whose polymorphism is associated with the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver diseases (NAFLD). The underlying mechanism involves the transcription factor Carbohydrate-responsive element-binding protein (ChREBP), a master regulator of hepatic carbohydrate-lipid metabolism [98]. The same prolipogenic effect was reported on human hepatocytes primary cultures, revealing that Thyroid hormone responsive protein (*Spot14*), a CAR target gene, is an important modulator of hepatic lipogenesis [97].

The contradictory effect of CAR on lipid metabolism may be explained considering the dissimilar physiological settings across studies. CAR appears to inhibit lipogenesis in a situation of metabolic stress induced by a high-fat diet, while activating it when a chemical stress is caused by the presence of a pharmacological agonist. Lipid droplet accumulation following activation of CAR by a xenobiotic could allow the neutralization of the xenobiotic before elimination from the cell. This hypothesis remains to be verified. Overall, these data indicate CAR as a stress sensor, responding in a stress-dependent manner to allow cell homeostasis.

### 3.6. CAR as a Hypoxia Sensor

CAR was reported to cross-talk with Hypoxia inductible factor (HIF1) [16]. Hypoxia is a pathologic condition that activates HIF1 transcription and AMPK in the same way as energetic depletion and oxidative stress [103]. HIF1 is degraded during normoxic conditions and it is stabilized by hypoxia to



regulate transcription of its target genes: Vascular Endothelial Growth Factor (*VEGF*), erythropoietine (*EPO*) and glycolytic enzymes. Interestingly, treatment of mice with a HIF1 activator induces nuclear translocation of CAR and the expression of *Cyp2b10*. Furthermore, CAR can interact with HIF1 when binding on PBREMs [16]. This initial evidence suggests the engagement of CAR during reduced oxygen levels as an attempt to maintain cell homeostasis.

### 3.7. CAR Intestinal Response to Inflammatory Stress

CAR is down-regulated in intestinal biopsies obtained from Crohn's disease or Ulcerative Colitis patients and in colitis mouse tissues [104]. Consistently, CAR activation accelerates intestinal mucosal healing both in vitro and in vivo, suggesting that CAR plays a role in the maintenance of intestinal mucosal integrity, while CAR dysfunction could contribute to the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. In addition, a link between CAR and the gut microbiota was reported. In mice, pharmacological activation of CAR by its ligand TCPOBOP impacted the microbiome composition and down-regulated bile-acid-metabolizing bacteria in the intestine [105]. A deficiency of CAR also modified the microbiota, increasing the pro-inflammatory bacteria and cytokines [106]. CAR may act on immune surveillance to prevent the colonization of harmful bacteria [106]. These data suggest that CAR regulates microbiota composition and responds to intestinal inflammatory stresses.

### 3.8. CAR Protects from Acute Kidney Injury

A role of CAR was recently demonstrated in mediating a kidney-liver cross-talk in Acute kidney injury (AKI) which is characterized by the sudden impairment of kidney function [107]. CAR activation by its agonist prevented the development of AKI-induced fatty liver and liver injury, and improved kidney function [107]. The protective effect of CAR agonist was abolished in CAR knockout mice. These results suggest that CAR could be a target in the management of hepatic steatosis and kidney function in patients with AKI.

## 4. Functional Roles of CAR in the Brain: Focus on the Neurovascular Unit

The brain integrates multiple inputs from and to the periphery, providing the adequate adaptive response to environmental changes. This includes the regulation of energy homeostasis based on highly coordinated interactions between the brain and peripheral metabolic organs [108]. Here, we examine the available evidence indicating expression of CAR in the brain, then extending to its potential role in a peripheral-brain interplay.

### 4.1. Brain Expression, Regulation and Function of CAR

While studied in peripheral organs, it is only recently that the functional expression of CAR was examined in the brain, in healthy and pathological conditions. Outing its expression patterns at the neurovascular unit (NVU) is important to unveil novel functional aspects at a key physiological brain-peripheral interface and within a multi-cellular neuronal, glial, and cerebrovascular structure [109–111]. Within the NVU, the blood-brain barrier (BBB) represents a key dynamic interface functioning as a protective brain gatekeeper [109,111] and as a hindrance for the delivery of systemically administered brain xenobiotics [112].

Early reports described mRNA and protein levels expression of CAR in the brain. In humans, analysis of mRNA in whole tissue homogenates obtained from one adult brain specimen showed detectable, although low as compared to liver and intestine, expression of CAR [113]. Others reported CAR mRNA in brain areas, specifically in the nucleus accumbens, caudate nucleus, and putamen [114,115]. In rodents, the expression of CAR was demonstrated at the mRNA or protein levels in the cerebral cortex, hippocampus, midbrain and the cerebellum [116–119]. An available human protein ATLAS dataset outlines the expression of CAR in the brain, further indicating levels in the cerebral cortex, hippocampus, amygdala, hypothalamus and the basal ganglia [120]. To date, no specific studies have examined the impact of gender and aging on brain CAR expression.



Supporting a possible role at the cerebrovascular interface, CAR mRNA and protein expression were shown in an *in vitro* BBB model, using human-derived cerebral endothelial cells [121]. The functional expression of CAR, and other cognate nuclear receptors, at the BBB was demonstrated by quantifying specific downstream P450 cytochromes or MDR gene targets [19,122–126]. Interestingly, acetaminophen treatment in mice increased the functional expression of Abcb1 transporter (P-gp) at the BBB by a CAR-dependent mechanism [126]. These results are significant, considering the strategic expression of xenobiotic nuclear receptors at the NVU interface. In other brain cell types, the role of CAR was examined in the settings of chemotherapy and pesticide-induced neurotoxicity [127]. In neuroblastoma (SH-SY5Y) and glioblastoma (U373-MG) cell lines, up-regulation of CAR mRNA and specific P450 cytochromes (CYP3A4, CYP2C8, etc.) was reported following treatment with cyclophosphamide, also increasing reactive oxygen species (ROS) production, and upregulating the expression of pro-apoptotic markers caspase-3, caspase-9, Bax, and p53 [127].

Modulation of CAR directly impacts the expression of biotransformation transporters and enzymes, possibly affording neuroprotection [7,124,128–130]. Available evidence supports a use for CITCO, a CAR agonist, as a potential therapy for gliomas. CITCO inhibits the growth and expansion of cancer stem cells by inducing cell cycle arrest and apoptosis, without affecting primary astrocytes [129]. Additional evidence indicated that stimulation of primary cultures of porcine brain capillary endothelial cells with CITCO provoked a significant up-regulation of Abcb1 (P-glycoprotein) and Abcg2 (breast cancer resistance protein) efflux-transporters at the RNA, protein and transport levels [131]. Another study showed that exposure to Triclocarban (3,4,4'-trichlorocarbanilide), an antibacterial, induced apoptosis of embryonic neuronal cells. The mechanism encompassed a caspase-3 dependent process with a CAR-mediated signaling activation. Furthermore, triclocarban induced CAR hypomethylation along with a disruption of the epigenetic status of neuronal cells and inhibiting post-translational protein modifications [118]. Collectively, this initial evidence supports the continuous investigation of the varying roles of CAR in brain cells.

#### 4.2. CAR and Brain Disease Conditions: Initial Clinical and Experimental Clues

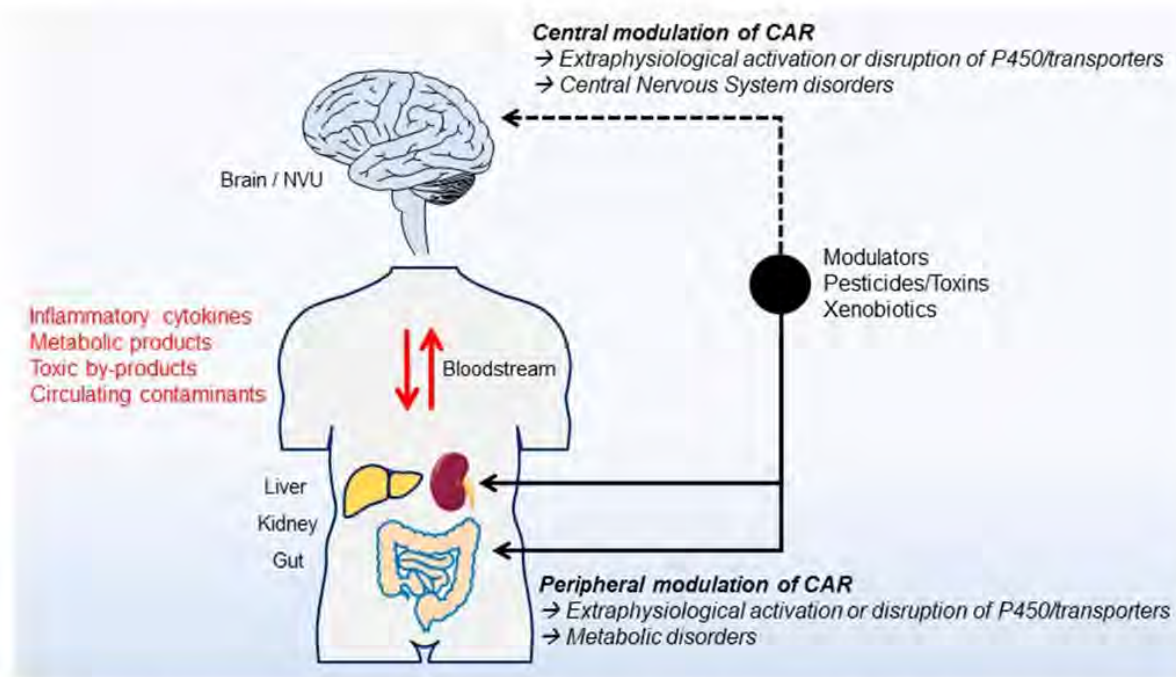
In humans, a genetic association study identified a mutation of CAR (NR1I3) in a cohort of pediatric subjects affected by the Kleefstra syndrome (KS) (OMIM#610253), a condition characterized by neurodevelopmental delay, dysmorphic features, behavioral and intellectual disabilities. However, the pathophysiology of CAR mutation in KS patients remains understudied [132]. From a pre-clinical stand point, loss of CAR in mice was associated with memory defects and anxiety-like behavior [133]. Electroencephalographic changes in CAR<sup>-/-</sup> mice during sleep or awake periods were found to correlate with memory outcome. This phenotype was accompanied by morphologic glial modifications suggestive of a mild neuro-inflammatory processes. Moreover, expression of the tight junction protein ZO-1 was reduced in isolated brain capillaries, pointing to BBB permeability [133]. Taken together, this initial indication suggests that pharmacological, or genetic, modulation of CAR could be one element perhaps contributing to neurological dysfunctions [118,133]. Understanding the functional relevance of CAR expression in brain cells may be significant to unravel new molecular mechanisms involved in neurodevelopmental diseases.

The memory defects and anxiety-like behavior displayed by the CAR knock-out mice could be linked with the endocrine and metabolic disorders reported in this model [87,133]. A similar link was suggested in another study, indicating that CAR selective activation alleviates high fat diet-induced obesity. The authors suggested that the hypothalamic and pituitary functions of CAR may have contributed to the hepatic phenotype [13]. Although CAR is not expressed in brown and white adipose tissues (BAT, WAT), the authors observed increased BAT energy expenditure, and activation of adipose triglyceride lipase gene expression in WAT upon CAR activation. This suggests an indirect effect of CAR activation in tissues outside the adipose tissue [108]. Tissue-specific CAR knockout mice (e.g, hepatic) could constitute a tool to further elucidate the varying roles of CAR in physiological and pathological settings.



## 5. Conclusions: Can We Integrate CAR within a Peripheral–Brain Axis?

Existing evidence supports a multi-facet role of CAR, capturing the physiological state of varying cell types and contributing to organs homeostasis. Available data support the hypothesis that CAR functions may extend to a dialogue between multiple organs, perhaps including the central nervous system (Figure 2). The role of CAR could differ according to brain regions as suggested [134]. Furthermore, in the brain, CAR may be involved in the control of energy homeostasis through a cross-talk with the liver or the adipose tissue [13,87,133]. These associations are supported by clinical and experimental data revealing a link between obesity, cognitive impairment and BBB dysfunction. Rats fed with a high fat/sugar diet present with hippocampal BBB permeability, contingent to weight gain and concomitant to hippocampal-dependent learning defects [135]. Pathological conditions such as inflammatory bowel diseases (IBD; e.g., ulcerative colitis (UC); Crohn’s disease (CD)) [136,137] can present extra-intestinal, brain symptoms. Approximately 3% of subjects suffering from IBD display neurological symptoms [137] and cerebrovascular disorders occur in 0.12–4% of cases [138]. The latter is important as BBB breakdown is emerging as a participant mechanism of dysregulated peripheral–CNS interplay, promoting or contributing to brain diseases [110,139].



**Figure 2.** Modulation of CAR activity and a brain-peripheral dialogue. Peripheral or central activities of CAR can be modulated by endogenous or exogenous molecules (e.g., pesticides, toxins, xenobiotics), leading to a disruption of detoxifying p450 cytochromes and transporters regulation. A pathological brain-peripheral dialogue may enable disease conditions via soluble circulating blood factors, such as pro-inflammatory cytokines, metabolic or toxic by-products.

The exact role of nuclear receptors within the peripheral–brain axis needs to be fully deciphered. Experimentally, a CAR mediated microbiota–gut–brain communication was suggested [140] given the emerging role of this receptor in the brain [133] and in microbiota–gut interaction [104]. Experimentally, lack of CAR expression in mice was associated with metabolic disruptions including obesity, diabetes and hepatic steatosis [87]. Concomitantly to BBB permeability, impairment in recognition memory and increased anxiety-like behavior were observed [133]. These studies support the hypothesis of a multi-organ pathological impact of CAR deletion. Further studies are required to understand whether the peripheral metabolic disorders lead to brain dysregulations or whether NVU cells damage in specific brain areas is the initiator of peripheral pathology. In summary, a holistic role of CAR fits



within the accumulating evidence indicating a peripheral–brain interplay, as occurring in metabolic and CNS diseases. Modulating CAR during pathological conditions could represent a new strategy to prevent or target metabolic modifications impacting the periphery and the brain.

**Author Contributions:** All authors have read and agreed to the published version of the manuscript. Conceptualization: L.M.-L., N.M., J.-M.P.; writing-original draft preparation: L.M.-L., N.M., F.O., C.L., B.B., I.F.-P.; writing—review and editing: L.M.-L., N.M., F.O.

**Funding:** This research was funded by ANR-Hepatobrain, PNRPE Synepest, ANSES Epidemicmac, MUSE-iSite University of Montpellier, ANSES Xenomix.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Wei, P.; Zhang, J.; Egan-Hafley, M.; Liang, S.; Moore, D.D. The nuclear receptor CAR mediates specific xenobiotic induction of drug metabolism. *Nature* **2000**, *407*, 920–923. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Forman, B.M.; Tzamelis, I.; Choi, H.S.; Chen, J.; Simha, D.; Seol, W.; Evans, R.M.; Moore, D.D. Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR-beta. *Nature* **1998**, *395*, 612–615. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Kawamoto, T.; Sueyoshi, T.; Zelko, I.; Moore, R.; Washburn, K.; Negishi, M. Phenobarbital-responsive nuclear translocation of the receptor CAR in induction of the CYP2B gene. *Mol. Cell. Biol.* **1999**, *19*, 6318–6322. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Hernandez, J.; Mota, L.; Baldwin, W. Activation of CAR and PXR by Dietary, Environmental and Occupational Chemicals Alters Drug Metabolism, Intermediary Metabolism, and Cell Proliferation. *Curr. Pharm. Person. Med.* **2009**, *7*, 81–105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Li, D.; Mackowiak, B.; Brayman, T.G.; Mitchell, M.; Zhang, L.; Huang, S.; Wang, H.; Spring, S. Genome-wide Analysis of Human Constitutive Androstane Receptor (CAR) Transcriptome in Wild-type and CAR-knockout HepaRG cells. *Biochem. Pharmacol.* **2015**, *98*, 190–202. [[CrossRef](#)]
6. Li, H.; Wang, H. Activation of xenobiotic receptors: Driving into the nucleus. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2010**, *6*, 409–426. [[CrossRef](#)]
7. Maglich, J.M.; Stoltz, C.M.; Goodwin, B.; Hawkins-Brown, D.; Moore, J.T.; Kliewer, S.A. Nuclear pregnane X receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *62*, 638–646. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Saini, S.P.S.; Sonoda, J.; Xu, L.; Toma, D.; Uppal, H.; Mu, Y.; Ren, S.; Moore, D.D.; Evans, R.M.; Xie, W. A Novel Constitutive Androstane Receptor-Mediated and CYP3A-Independent Pathway of Bile Acid Detoxification. *Mol. Pharmacol.* **2004**, *65*, 292–300. [[CrossRef](#)]
9. Sugatani, J.; Yamakawa, K.; Yoshinari, K.; Miwa, M.; Machida, T.; Takagi, H.; Mori, M.; Kakizaki, S.; Sueyoshi, T.; Negishi, M. Identification of a defect in the UGT1A1 gene promoter and its association with hyperbilirubinemia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *292*, 492–497. [[CrossRef](#)]
10. Ueda, A.; Hamadeh, H.K.; Webb, H.K.; Yamamoto, Y.; Sueyoshi, T.; Afshari, C.A.; Lehmann, J.M.; Negishi, M. Diverse roles of the nuclear orphan receptor CAR in regulating hepatic genes in response to phenobarbital. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *61*, 1–6. [[CrossRef](#)]
11. Locker, J.; Tian, J.; Carver, R.; Concas, D.; Cossu, C.; Ledda-Columbano, G.M.; Columbano, A. A common set of immediate-early response genes in liver regeneration and hyperplasia. *Hepatology* **2003**, *38*, 314–325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. 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. Activation of nuclear receptor CAR ameliorates diabetes and fatty liver disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 18831–18836. [[CrossRef](#)]
13. Gao, J.; He, J.; Zhai, Y.; Wada, T.; Xie, W. The constitutive androstane receptor is an anti-obesity nuclear receptor that improves insulin sensitivity. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 25984–25992. [[CrossRef](#)]
14. Ding, X.; Lichti, K.; Kim, I.; Gonzalez, F.J.; Staudinger, J.L. Regulation of constitutive androstane receptor and its target genes by fasting, cAMP, hepatocyte nuclear factor alpha, and the coactivator peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 26540–26551. [[CrossRef](#)]



15. Maglich, J.M.; Watson, J.; McMillen, P.J.; Goodwin, B.; Willson, T.M.; Moore, J.T. The nuclear receptor CAR is a regulator of thyroid hormone metabolism during caloric restriction. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 19832–19838. [[CrossRef](#)]
16. Shizu, R.; Shindo, S.; Yoshida, T.; Numazawa, S. Cross-talk between constitutive androstane receptor and hypoxia-inducible factor in the regulation of gene expression. *Toxicol. Lett.* **2013**, *219*, 143–150. [[CrossRef](#)]
17. Shindo, S.; Numazawa, S.; Yoshida, T. A physiological role of AMP-activated protein kinase in phenobarbital-mediated constitutive androstane receptor activation and CYP2B induction. *Biochem. J.* **2007**, *401*, 735–741. [[CrossRef](#)]
18. Osabe, M.; Sugatani, J.; Takemura, A.; Kurosawa, M.; Yamazaki, Y.; Ikari, A.; Miwa, M. Up-regulation of CAR expression through Elk-1 in HepG2 and SW480 cells by serum starvation stress. *FEBS Lett.* **2009**, *583*, 885–889. [[CrossRef](#)]
19. Xu, R.X.; Lambert, M.H.; Wisely, B.B.; Warren, E.N.; Weinert, E.E.; Waitt, G.M.; Williams, J.D.; Collins, J.L.; Moore, L.B.; Willson, T.M.; et al. A structural basis for constitutive activity in the human CAR/RXR $\alpha$  heterodimer. *Mol. Cell* **2004**, *16*, 919–928. [[CrossRef](#)]
20. Shan, L.; Vincent, J.; Brunzelle, J.S.; Dussault, I.; Lin, M.; Ianculescu, I.; Sherman, M.A.; Forman, B.M.; Fernandez, E.J. Structure of the murine constitutive androstane receptor complexed to androsteneol: A molecular basis for inverse agonism. *Mol. Cell* **2004**, *16*, 907–917. [[CrossRef](#)]
21. Yoshinari, K.; Kobayashi, K.; Moore, R.; Kawamoto, T.; Negishi, M. Identification of the nuclear receptor CAR:HSP90 complex in mouse liver and recruitment of protein phosphatase 2A in response to phenobarbital. *FEBS Lett.* **2003**, *548*, 17–20. [[CrossRef](#)]
22. Sueyoshi, T.; Moore, R.; Sugatani, J.; Matsumura, Y.; Negishi, M. PPP1R16A, the membrane subunit of protein phosphatase 1beta, signals nuclear translocation of the nuclear receptor constitutive active/androstane receptor. *Mol. Pharmacol.* **2008**, *73*, 1113–1121. [[CrossRef](#)]
23. Tzamelis, I.; Pissios, P.; Schuetz, E.G.; Moore, D.D. The xenobiotic compound 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)] benzene is an agonist ligand for the nuclear receptor CAR. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 2951–2958. [[CrossRef](#)]
24. Mutoh, S.; Osabe, M.; Inoue, K.; Moore, R.; Pedersen, L.; Perera, L.; Reboloso, Y.; Sueyoshi, T.; Negishi, M. Dephosphorylation of threonine 38 is required for nuclear translocation and activation of human xenobiotic receptor CAR (NR1I3). *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 34785–34792. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Mäkinen, J.; Frank, C.; Jyrkkärinne, J.; Gynther, J.; Carlberg, C.; Honkakoski, P. Modulation of mouse and human phenobarbital-responsive enhancer module by nuclear receptors. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *62*, 366–378. [[CrossRef](#)]
26. Min, G.; Kemper, J.K.; Kemper, B. Glucocorticoid receptor-interacting protein 1 mediates ligand-independent nuclear translocation and activation of constitutive androstane receptor in vivo. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 26356–26363. [[CrossRef](#)]
27. Shiraki, T.; Sakai, N.; Kanaya, E.; Jingami, H. Activation of orphan nuclear constitutive androstane receptor requires subnuclear targeting by peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ : A possible link between xenobiotic response and nutritional state. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 11344–11350. [[CrossRef](#)]
28. Wright, E.; Vincent, J.; Fernandez, E.J. Thermodynamic characterization of the interaction between CAR-RXR and SRC-1 peptide by isothermal titration calorimetry. *Biochemistry* **2007**, *46*, 862–870. [[CrossRef](#)]
29. Baes, M.; Gulick, T.; Choi, H.S.; Martinoli, M.G.; Simha, D.; Moore, D.D. A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily that interacts with a subset of retinoic acid response elements. *Mol. Cell. Biol.* **1994**, *14*, 1544–1552. [[CrossRef](#)]
30. Zmrzljak, U.P.; Rozman, D. Circadian regulation of the hepatic endobiotic and xenobiotic detoxification pathways: The time matters. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 811–824. [[CrossRef](#)]
31. Moore, L.B.; Parks, D.J.; Jones, S.A.; Bledsoe, R.K.; Consler, T.G.; Stimmel, J.B.; Goodwin, B.; Liddle, C.; Blanchard, S.G.; Willson, T.M.; et al. Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 15122–15127. [[CrossRef](#)]
32. Hernandez, J.P.; Mota, L.C.; Huang, W.; Moore, D.D.; Baldwin, W.S. Sexually dimorphic regulation and induction of P450s by the constitutive androstane receptor (CAR). *Toxicology* **2009**, *256*, 53–64. [[CrossRef](#)]
33. Lynch, C.; Mackowiak, B.; Huang, R.; Li, L.; Heyward, S.; Srilatha, S.; Wang, H.; Xia, M. Identification of Modulators that Activate the Constitutive Androstane Receptor from the Tox21 10K Compound Library. *Toxicol. Sci.* **2019**, *1*, 282–292. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



34. Fujino, C.; Watanabe, Y.; Sanoh, S.; Nakajima, H.; Uramaru, N.; Kojima, H.; Yoshinari, K.; Ohta, S.; Kitamura, S. Activation of PXR, CAR and PPAR $\alpha$  by pyrethroid pesticides and the effect of metabolism by rat liver microsomes. *Heliyon* **2019**, *5*, e02466. [[CrossRef](#)]
35. Abe, T.; Takahashi, M.; Kano, M.; Amaike, Y.; Ishii, C.; Maeda, K.; Kudoh, Y.; Morishita, T.; Hosaka, T.; Sasaki, T.; et al. Activation of nuclear receptor CAR by an environmental pollutant perfluorooctanoic acid. *Arch. Toxicol.* **2017**, *91*, 2365–2374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Cheng, X.; Klaassen, C.D. Perfluorocarboxylic acids induce cytochrome P450 enzymes in mouse liver through activation of PPAR- $\alpha$  and CAR transcription factors. *Toxicol. Sci.* **2008**, *106*, 29–36. [[CrossRef](#)]
37. Oshida, K.; Vasani, N.; Jones, C.; Moore, T.; Hester, S.; Nesnow, S.; Auerbach, S.; Geter, D.R.; Aleksunes, L.M.; Thomas, R.S.; et al. Identification of chemical modulators of the constitutive activated receptor (CAR) in a gene expression compendium. *Nucl. Recept. Signal.* **2015**, *13*, e002. [[CrossRef](#)]
38. Elcombe, C.R.; Elcombe, B.M.; Foster, J.R.; Chang, S.C.; Ehresman, D.J.; Butenhoff, J.L. Hepatocellular hypertrophy and cell proliferation in Sprague-Dawley rats from dietary exposure to potassium perfluorooctanesulfonate results from increased expression of xenosensor nuclear receptors PPAR $\alpha$  and CAR/PXR. *Toxicology* **2012**, *293*, 16–29. [[CrossRef](#)]
39. Baldwin, W.S.; Roling, J.A. A Concentration Addition Model for the Activation of the Constitutive Androstane Receptor by Xenobiotic Mixtures. *Toxicol. Sci.* **2009**, *107*, 93–105. [[CrossRef](#)]
40. Pakharukova, M.Y.; Smetanina, M.A.; Kaledin, V.I.; Kobzev, V.F.; Romanova, I.V.; Merkulova, T.I. Activation of constitutive androstane receptor under the effect of hepatocarcinogenic aminoazo dyes in mouse and rat liver. *Bull. Exp. Biol. Med.* **2007**, *144*, 338–341. [[CrossRef](#)]
41. Peffer, R.C.; Moggs, J.G.; Pastoor, T.; Currie, R.A.; Wright, J.; Milburn, G.; Waechter, F.; Rusyn, I. Mouse liver effects of cyproconazole, a triazole fungicide: Role of the constitutive androstane receptor. *Toxicol. Sci.* **2007**, *99*, 315–325. [[CrossRef](#)]
42. Wyde, M.E.; Kirwan, S.E.; Zhang, F.; Laughter, A.; Hoffman, H.B.; Bartolucci-Page, E.; Gaido, K.W.; Yan, B.; You, L. Di-n-butyl phthalate activates constitutive androstane receptor and pregnane X receptor and enhances the expression of steroid-metabolizing enzymes in the liver of rat fetuses. *Toxicol. Sci.* **2005**, *86*, 281–290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Wyde, M.E.; Bartolucci, E.; Ueda, A.; Zhang, H.; Yan, B.; Negishi, M.; You, L. The environmental pollutant 1,1-Dichloro-2,2-bis (p-chlorophenyl)ethylene induces rat hepatic cytochrome P450 2B and 3A expression through the constitutive androstane receptor and pregnane X receptor. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *64*, 474–481. [[CrossRef](#)]
44. Laurenzana, E.M.; Coslo, D.M.; Vigilar, M.V.; Roman, A.M.; Omiecinski, C.J. Activation of the Constitutive Androstane Receptor by Monophthalates. *Chem. Res. Toxicol.* **2016**, *29*, 1651–1661. [[CrossRef](#)]
45. Sueyoshi, T.; Kawamoto, T.; Zelko, I.; Honkakoski, P.; Negishi, M. The repressed nuclear receptor CAR responds to phenobarbital in activating the human CYP2B6 gene. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 6043–6046. [[CrossRef](#)]
46. DeKeyser, J.G.; Stagliano, M.C.; Auerbach, S.S.; Prabhu, K.S.; Jones, A.D.; Omiecinski, C.J. Di(2-ethylhexyl) phthalate is a highly potent agonist for the human constitutive androstane receptor splice variant CAR2. *Mol. Pharmacol.* **2009**, *75*, 1005–1012. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Wei, P.; Zhang, J.; Dowhan, D.H.; Han, Y.; Moore, D.D. Specific and overlapping functions of the nuclear hormone receptors CAR and PXR in xenobiotic response. *Pharm. J.* **2002**, *2*, 117–126. [[CrossRef](#)]
48. Savary, C.C.; Jossé, R.; Bruyère, A.; Guillet, F.; Robin, M.A.; Guillouzo, A. Interactions of endosulfan and methoxychlor involving CYP3A4 and CYP2B6 in human HepaRG cells. *Drug Metab. Dispos.* **2014**, *42*, 1234–1240. [[CrossRef](#)]
49. Zhang, X.J.; Shi, Z.; Lyv, J.X.; He, X.; Englert, N.A.; Zhang, S.Y. Pyrene is a novel constitutive androstane receptor (CAR) activator and causes hepatotoxicity by CAR. *Toxicol. Sci.* **2015**, *147*, 436–445. [[CrossRef](#)]
50. Blizard, D.; Sueyoshi, T.; Negishi, M.; Dehal, S.S.; Kupfer, D. Mechanism of Induction of Cytochrome P450 Enzymes by the Proestrogenic Endocrine Disruptor Pesticide-Methoxychlor: Interactions of Methoxychlor Metabolites with the Constitutive Androstane Receptor System. *Drug Metab. Dispos.* **2001**, *29*, 781–785.
51. Prokopec, S.D.; Watson, J.D.; Lee, J.; Pohjanvirta, R.; Boutros, P.C. Sex-related differences in murine hepatic transcriptional and proteomic responses to TCDD. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2015**, *284*, 188–196. [[CrossRef](#)]



52. Mackowiak, B.; Li, L.; Lynch, C.; Ziman, A.; Heyward, S.; Wang, H.; States, U.; States, U.; States, U.; Technologies, I.V.; et al. High-content analysis of constitutive androstane receptor (CAR) translocation identifies mosapride citrate as a CAR agonist that represses gluconeogenesis. *Biochem. Pharmacol.* **2019**, *168*, 224–236. [[CrossRef](#)]
53. Liang, D.; Li, L.; Lynch, C.; Diethelm-Varela, B.; Xia, M.; Xue, F.; Wang, H. DL5050, a Selective Agonist for the Human Constitutive Androstane Receptor. *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, *10*, 1039–1044. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Cervený, L.; Svecová, L.; Anzenbacherová, E.; Vrzal, R.; Staud, F.; Dvorak, Z.; Ulrichová, J.; Anzenbacher, P.; Pavek, P. Valproic acid induces CYP3A4 and MDR1 gene expression by activation of constitutive androstane receptor and pregnane X receptor pathways. *Drug Metab. Dispos.* **2007**, *35*, 1032–1041. [[CrossRef](#)]
55. Zhang, J.; Huang, W.; Chua, S.S.; Wei, P.; Moore, D.D. Modulation of acetaminophen-induced hepatotoxicity by the xenobiotic receptor CAR. *Science* **2002**, *298*, 422–424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Zhang, J.; Huang, W.; Qatanani, M.; Evans, R.M.; Moore, D.D. The constitutive androstane receptor and pregnane X receptor function coordinately to prevent bile acid-induced hepatotoxicity. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 49517–49522. [[CrossRef](#)]
57. Goetz, A.K.; Bao, W.; Ren, H.; Schmid, J.E.; Tully, D.B.; Wood, C.; Rockett, J.C.; Narotsky, M.G.; Sun, G.; Lambert, G.R.; et al. Gene expression profiling in the liver of CD-1 mice to characterize the hepatotoxicity of triazole fungicides. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2006**, *215*, 274–284. [[CrossRef](#)]
58. Burk, O.; Arnold, K.A.; Nussler, A.K.; Schaeffeler, E.; Efimova, E.; Avery, B.A.; Avery, M.A.; Fromm, M.F.; Eichelbaum, M. Antimalarial artemisinin drugs induce cytochrome P450 and MDR1 expression by activation of xenosensors pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *67*, 1954–1965. [[CrossRef](#)]
59. Swales, K.; Negishi, M. CAR, Driving into the Future. *Mol. Endocrinol.* **2004**, *18*, 1589–1598. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Li, L.; Chen, T.; Stanton, J.D.; Sueyoshi, T.; Negishi, M.; Wang, H. The peripheral benzodiazepine receptor ligand 1-(2-chlorophenyl-methylpropyl)-3-isoquinoline-carboxamide is a novel antagonist of human constitutive androstane receptor. *Mol. Pharmacol.* **2008**, *74*, 443–453. [[CrossRef](#)]
61. Malaplate-Armand, C.; Ferrari, L.; Masson, C.; Visvikis-Siest, S.; Lambert, H.; Batt, A.M. Down-regulation of astroglial CYP2C, glucocorticoid receptor and constitutive androstane receptor genes in response to cocaine in human U373 MG astrocytoma cells. *Toxicol. Lett.* **2005**, *159*, 203–211. [[CrossRef](#)]
62. Pascussi, J.M.; Gerbal-Chaloin, S.; Fabre, J.M.; Maurel, P.; Vilarem, M.J. Dexamethasone enhances constitutive androstane receptor expression in human hepatocytes: Consequences on cytochrome P450 gene regulation. *Mol. Pharmacol.* **2000**, *58*, 1441–1450. [[CrossRef](#)]
63. Qatanani, M.; Wei, P.; Moore, D.D. Alterations in the distribution and orexigenic effects of dexamethasone in CAR-null mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2004**, *78*, 285–291. [[CrossRef](#)]
64. Duret, C.; Daujat-Chavanieu, M.; Pascussi, J.M.; Pichard-Garcia, L.; Balaguer, P.; Fabre, J.M.; Vilarem, M.J.; Maurel, P.; Gerbal-Chaloin, S. Ketoconazole and miconazole are antagonists of the human glucocorticoid receptor: Consequences on the expression and function of the constitutive androstane receptor and the pregnane X receptor. *Mol. Pharmacol.* **2006**, *70*, 329–339. [[CrossRef](#)]
65. Huang, W.; Zhang, J.; Wei, P.; Schrader, W.T.; Moore, D.D. Meclizine is an agonist ligand for mouse constitutive androstane receptor (CAR) and an inverse agonist for human CAR. *Mol. Endocrinol.* **2004**, *18*, 2402–2408. [[CrossRef](#)]
66. Saussele, T.; Burk, O.; Bliedernicht, J.K.; Klein, K.; Nussler, A.; Nussler, N.; Hengstler, J.G.; Eichelbaum, M.; Schwab, M.; Zanger, U.M. Selective induction of human hepatic cytochromes P450 2B6 and 3A4 by metamizole. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2007**, *82*, 265–274. [[CrossRef](#)]
67. Chen, X.; Maiti, S.; Zhang, J.; Chen, G. Nuclear receptor interactions in methotrexate induction of human dehydroepiandrosterone sulfotransferase (hSULT2A1). *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2006**, *20*, 309–317. [[CrossRef](#)]
68. Shibayama, Y.; Ushinohama, K.; Ikeda, R.; Yoshikawa, Y.; Motoya, T.; Takeda, Y.; Yamada, K. Effect of methotrexate treatment on expression levels of multidrug resistance protein 2, breast cancer resistance protein and organic anion transporters Oat1, Oat2 and Oat3 in rats. *Cancer Sci.* **2006**, *97*, 1260–1266. [[CrossRef](#)]
69. Murray, M.; Fiala-Beer, E.; Sutton, D. Upregulation of cytochromes P450 2B in rat liver by orphenadrine. *Br. J. Pharmacol.* **2003**, *139*, 787–796. [[CrossRef](#)]
70. Li, L.; Bao, X.; Zhang, Q.Y.; Negishi, M.; Ding, X. Role of Cyp2b in phenobarbital-induced hepatocyte proliferation in mice. *Drug Metab. Dispos.* **2017**, *45*, 977–981. [[CrossRef](#)]



71. Currie, R.A.; Peffer, R.C.; Goetz, A.K.; Omiecinski, C.J.; Goodman, J.I. Phenobarbital and propiconazole toxicogenomic profiles in mice show major similarities consistent with the key role that constitutive androstane receptor (CAR) activation plays in their mode of action. *Toxicology* **2014**, *321*, 80–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Jackson, J.P.; Ferguson, S.S.; Moore, R.; Negishi, M.; Goldstein, J.A. The constitutive active/androstane receptor regulates phenytoin induction of Cyp2c29. *Mol. Pharmacol.* **2004**, *65*, 1397–1404. [[CrossRef](#)]
73. Wang, H.; Faucette, S.; Moore, R.; Sueyoshi, T.; Negishi, M.; LeCluyse, E. Human constitutive androstane receptor mediates induction of CYP2B6 gene expression by phenytoin. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 29295–29301. [[CrossRef](#)]
74. Jackson, J.P.; Ferguson, S.S.; Negishi, M.; Goldstein, J.A. Phenytoin Induction of the Cyp2c37 Gene is Mediated by the Constitutive Androstane Receptor. *Drug Metab. Dispos.* **2006**, *34*, 2003–2010. [[CrossRef](#)]
75. Howe, K.; Sanat, F.; Thumser, A.E.; Coleman, T.; Plant, N. The statin class of HMG-CoA reductase inhibitors demonstrate differential activation of the nuclear receptors PXR, CAR and FXR, as well as their downstream target genes. *Xenobiotica* **2011**, *41*, 519–529. [[CrossRef](#)]
76. Režen, T.; Hafner, M.; Kortagere, S.; Ekins, S.; Hodnik, V.; Rozman, D. Rosuvastatin and atorvastatin are ligands of the human constitutive androstane receptor/retinoid X receptor  $\alpha$  complex. *Drug Metab. Dispos.* **2017**, *45*, 974–976. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Sugatani, J.; Kojima, H.; Ueda, A.; Kakizaki, S.; Yoshinari, K.; Gong, Q.H.; Owens, I.S.; Negishi, M.; Sueyoshi, T. The phenobarbital response enhancer module in the human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 gene and regulation by the nuclear receptor CAR. *Hepatology* **2001**, *33*, 1232–1238. [[CrossRef](#)]
78. Guo, G.L.; Choudhuri, S.; Klaassen, C.D. Induction profile of rat organic anion transporting polypeptide 2 (oatp2) by prototypical drug-metabolizing enzyme inducers that activate gene expression through ligand-activated transcription factor pathways. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *300*, 206–212. [[CrossRef](#)]
79. Ridlon, J.M.; Kang, D.J.; Hylemon, P.B. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J. Lipid Res.* **2006**, *47*, 241–259. [[CrossRef](#)]
80. Beilke, L.D.; Aleksunes, L.M.; Holland, R.D.; Besselsen, D.G.; Beger, R.D.; Klaassen, C.D.; Cherrington, N.J. Constitutive androstane receptor-mediated changes in bile acid composition contributes to hepatoprotection from lithocholic acid-Induced liver injury in mice. *Drug Metab. Dispos.* **2009**, *37*, 1035–1045. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Schenkman, J.B. Steroid metabolism by constitutive cytochromes P450. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1992**, *43*, 1023–1030. [[CrossRef](#)]
82. Yamamoto, Y.; Moore, R.; Hess, H.A.; Guo, G.L.; Gonzalez, F.J.; Korach, K.S.; Maronpot, R.R.; Negishi, M. Estrogen receptor  $\alpha$  mediates 17 $\alpha$ -ethynylestradiol causing hepatotoxicity. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 16625–16631. [[CrossRef](#)]
83. Sueyoshi, T.; Green, W.D.; Vinal, K.; Woodrum, T.S.; Moore, R.; Negishi, M. Garlic Extract Diallyl Sulfide (DAS) Activates Nuclear Receptor CAR to Induce the Sult1e1 Gene in Mouse Liver. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e21229. [[CrossRef](#)]
84. Curran, P.G.; DeGroot, L.J. The effect of hepatic enzyme-inducing drugs on thyroid hormones and the thyroid gland. *Endocr. Rev.* **1991**, *12*, 135–150. [[CrossRef](#)]
85. Qatanani, M.; Zhang, J.; Moore, D.D. Role of the Constitutive Androstane Receptor in Xenobiotic-Induced Thyroid Hormone Metabolism. *Endocrinology* **2005**, *146*, 995–1002. [[CrossRef](#)]
86. Visser, T.J.; Kaptein, E.; Glatt, H.; Bartsch, I.; Hagen, M.; Coughtrie, M.W.H. Characterization of thyroid hormone sulfotransferases. *Chem. Biol. Interact.* **1998**, *109*, 279–291. [[CrossRef](#)]
87. Lukowicz, C.; Ellero-Simatos, S.; Régnier, M.; Oliviero, F.; Lasserre, F.; Polizzi, A.; Montagner, A.; Smati, S.; Boudou, F.; Lenfant, F.; et al. Dimorphic metabolic and endocrine disorders in mice lacking the constitutive androstane receptor. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 20169. [[CrossRef](#)]
88. Wieneke, N.; Hirsch-Ernst, K.I.; Kuna, M.; Kersten, S.; Püschel, G.P. PPAR $\alpha$ -dependent induction of the energy homeostasis-regulating nuclear receptor NR1i3 (CAR) in rat hepatocytes: Potential role in starvation adaptation. *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 5617–5626. [[CrossRef](#)]
89. Pascussi, J.M.; Busson-Le Coniat, M.; Maurel, P.; Vilarem, M.J. Transcriptional analysis of the orphan nuclear receptor constitutive androstane receptor (NR1I3) gene promoter: Identification of a distal glucocorticoid response element. *Mol. Endocrinol.* **2003**, *17*, 42–55. [[CrossRef](#)]



90. Lahtela, J.T.; Arranto, A.J.; Sotaniemi, E.A. Enzyme inducers improve insulin sensitivity in non-insulin-dependent diabetic subjects. *Diabetes* **1985**, *34*, 911–916. [[CrossRef](#)]
91. Sotaniemi, E.A.; Arranto, A.J.; Sutinen, S.; Stengård, J.H.; Sutinen, S. Treatment of noninsulin-dependent diabetes mellitus with enzyme inducers. *Clin. Pharmacol. Ther.* **1983**, *33*, 826–835. [[CrossRef](#)]
92. Kodama, S.; Koike, C.; Negishi, M.; Yamamoto, Y. Nuclear receptors CAR and PXR cross talk with FOXO1 to regulate genes that encode drug-metabolizing and gluconeogenic enzymes. *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 7931–7940. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Miao, J.; Fang, S.; Bae, Y.; Kemper, J.K. Functional inhibitory cross-talk between constitutive androstane receptor and hepatic nuclear factor-4 in hepatic lipid/glucose metabolism is mediated by competition for binding to the DR1 motif and to the common coactivators, GRIP-1 and PGC-1 $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 14537–14546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Gao, J.; Yan, J.; Xu, M.; Ren, S.; Xie, W. CAR Suppresses Hepatic Gluconeogenesis by Facilitating the Ubiquitination and Degradation of PGC1 $\alpha$ . *Mol. Endocrinol.* **2015**, *29*, 1558–1570. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Shi, X.; Cheng, Q.; Xu, L.; Yan, J.; Jiang, M.; He, J.; Xu, M.; Stefanovic-Racic, M.; Sipula, I.; O'Doherty, R.M.; et al. Cholesterol Sulfate and Cholesterol Sulfotransferase Inhibit Gluconeogenesis by Targeting Hepatocyte Nuclear Factor 4. *Mol. Cell. Biol.* **2014**, *34*, 485–497. [[CrossRef](#)]
96. Lynch, C.; Pan, Y.; Li, L.; Heyward, S.; Moeller, T.; Swaan, P.W.; Wang, H. Activation of the constitutive androstane receptor inhibits gluconeogenesis without affecting lipogenesis or fatty acid synthesis in human hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2014**, *279*, 33–42. [[CrossRef](#)]
97. Breuker, C.; Moreau, A.; Lakhil, L.; Tamasi, V.; Parmentier, Y.; Meyer, U.; Maurel, P.; Lumbroso, S.; Vilarem, M.J.; Pascussi, J.M. Hepatic expression of thyroid hormone-responsive spot 14 protein is regulated by constitutive androstane receptor (NR1H3). *Endocrinology* **2010**, *151*, 1653–1661. [[CrossRef](#)]
98. Marmugi, A.; Lukowicz, C.; Lasserre, F.; Montagner, A.; Polizzi, A.; Ducheix, S.; Goron, A.; Gamet-Payrastré, L.; Gerbal-Chaloin, S.; Pascussi, J.M.; et al. Activation of the Constitutive Androstane Receptor induces hepatic lipogenesis and regulates Pnpla3 gene expression in a LXR-independent way. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2016**, *303*, 90–100. [[CrossRef](#)]
99. La Vecchia, C.; Negri, E. A review of epidemiological data on epilepsy, phenobarbital, and risk of liver cancer. *Eur. J. Cancer Prev.* **2014**, *23*, 1–7.
100. Verrotti, A.; Agostinelli, S.; Parisi, P.; Chiarelli, F.; Coppola, G. Nonalcoholic fatty liver disease in adolescents receiving valproic acid. *Epilepsy Behav.* **2011**, *20*, 382–385. [[CrossRef](#)]
101. Kassam, A.; Winrow, C.J.; Fernandez-Rachubinski, F.; Capone, J.P.; Rachubinski, R.A. The peroxisome proliferator response element of the gene encoding the peroxisomal beta-oxidation enzyme enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase is a target for constitutive androstane receptor beta/9-cis-retinoic acid receptor-mediated transactivation. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 4345–4350.
102. Chen, W.; Chen, G.; Head, D.L.; Mangelsdorf, D.J.; Russell, D.W. Enzymatic Reduction of Oxysterols Impairs LXR Signaling in Cultured Cells and the Livers of Mice. *Cell Metab.* **2007**, *5*, 73–79. [[CrossRef](#)]
103. Lee, M.; Hwang, J.T.; Lee, H.J.; Jung, S.N.; Kang, I.; Chi, S.G.; Kim, S.S.; Ha, J. AMP-activated protein kinase activity is critical for hypoxia-inducible factor-1 transcriptional activity and its target gene expression under hypoxic conditions in DU145 cells. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 39653–39661. [[CrossRef](#)]
104. Hudson, G.M.; Flannigan, K.L.; Erickson, S.L.; Vicentini, F.A.; Zamponi, A.; Hirota, C.L.; Alston, L.; Altier, C.; Ghosh, S.; Rioux, K.P.; et al. Constitutive androstane receptor regulates the intestinal mucosal response to injury. *Br. J. Pharmacol.* **2017**, *174*, 1857–1871. [[CrossRef](#)]
105. Dempsey, J.L.; Wang, D.; Siginir, G.; Fei, Q.; Raftery, D.; Gu, H.; Yue Cui, J. Pharmacological Activation of PXR and CAR Downregulates Distinct Bile Acid-Metabolizing Intestinal Bacteria and Alters Bile Acid Homeostasis. *Toxicol. Sci.* **2019**, *168*, 40–60. [[CrossRef](#)]
106. Little, M.; Dutta, M.; Li, H.; Matson, A.; Shi, X.; Gu, H.; Mani, S.; Cui, J.Y. Understanding the Physiological Functions of the Host Xenobiotic-Sensing Nuclear Receptors PXR and CAR on the Gut Microbiome Using Genetically Modified Mice. Master's Thesis, University of Washington, Seattle, WA, USA, 2019.
107. Choi, Y.J.; Zhou, D.; Barbosa, A.C.S.; Niu, Y.; Guan, X.; Xu, M.; Ren, S.; Nolin, T.D.; Liu, Y.; Xie, W. Activation of constitutive androstane receptor ameliorates renal ischemia-reperfusion-induced kidney and liver injury. *Mol. Pharmacol.* **2018**, *93*, 239–250. [[CrossRef](#)]
108. Oh, E.; Kim, M.S. Brain regulation of energy metabolism. *Endocrinol. Metab.* **2016**, *31*, 519–524.



109. Giannoni, P.; Badaut, J.; Dargazanli, C.; De Maudave, A.F.H.; Klement, W.; Costalat, V.; Marchi, N. The pericyte-glia interface at the blood-brain barrier. *Clin. Sci.* **2018**, *132*, 361–374. [CrossRef]
110. Giannoni, P.; Claeysen, S.; Noe, F.; Marchi, N. Peripheral Routes to Neurodegeneration: Passing Through the Blood–Brain Barrier. *Front. Aging Neurosci.* **2020**, *12*, 3. [CrossRef]
111. Sweeney, M.D.; Zhao, Z.; Montagne, A.; Nelson, A.R.; Zlokovic, B.V. Blood-brain barrier: From physiology to disease and back. *Physiol. Rev.* **2019**, *99*, 21–78. [CrossRef]
112. Abbott, N.J.; Patabendige, A.A.K.; Dolman, D.E.M.; Yusof, S.R.; Begley, D.J. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis.* **2010**, *37*, 13–25. [CrossRef]
113. Nishimura, M.; Naito, S.; Yokoi, T. Tissue-specific mRNA expression profiles of human nuclear receptor subfamilies. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2004**, *19*, 135–149. [CrossRef]
114. Lamba, J.K.; Lamba, V.; Yasuda, K.; Lin, Y.S.; Assem, M.; Thompson, E.; Strom, S.; Schuetz, E.G. Expression of constitutive androstane receptor splice variants in human tissues and their functional consequences. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, *311*, 811–821. [CrossRef]
115. Dutheil, F.; Dauchy, S.; Diry, M.; Sazdovitch, V.; Cloarec, O.; Mellottée, L.; Bièche, I.; Ingelman-Sundberg, M.; Flinois, J.P.; De Waziers, I.; et al. Xenobiotic-metabolizing enzymes and transporters in the normal human brain: Regional and cellular mapping as a basis for putative roles in cerebral function. *Drug Metab. Dispos.* **2009**, *37*, 1528–1538. [CrossRef]
116. Souidi, M.; Gueguen, Y.; Linard, C.; Dudoignon, N.; Grison, S.; Baudelin, C.; Marquette, C.; Gourmelon, P.; Aigueperse, J.; Dublineau, I. In vivo effects of chronic contamination with depleted uranium on CYP3A and associated nuclear receptors PXR and CAR in the rat. *Toxicology* **2005**, *214*, 113–122. [CrossRef] [PubMed]
117. Marini, S.; Nannelli, A.; Sodini, D.; Dragoni, S.; Valoti, M.; Longo, V.; Gervasi, P.G. Expression, microsomal and mitochondrial activities of cytochrome P450 enzymes in brain regions from control and phenobarbital-treated rabbits. *Life Sci.* **2007**, *80*, 910–917. [CrossRef]
118. Kajta, M.; Wnuk, A.; Rzemieniec, J.; Lason, W.; Mackowiak, M.; Chwastek, E.; Staniszevska, M.; Nehring, I.; Wojtowicz, A.K. Triclocarban Disrupts the Epigenetic Status of Neuronal Cells and Induces AHR/CAR-Mediated Apoptosis. *Mol. Neurobiol.* **2019**, *56*, 3113–3131. [CrossRef] [PubMed]
119. Litwa, E.; Rzemieniec, J.; Wnuk, A.; Lason, W.; Krzeptowski, W.; Kajta, M. RXR $\alpha$ , PXR and CAR xenobiotic receptors mediate the apoptotic and neurotoxic actions of nonylphenol in mouse hippocampal cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2016**, *156*, 43–52. [CrossRef]
120. The Human Protein Atlas. Available online: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000143257-NR1I3/brain> (accessed on 1 September 2020).
121. Weksler, B.; Romero, I.A.; Couraud, P.O. The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier. *Fluids Barriers CNS* **2013**, *10*. [CrossRef] [PubMed]
122. Wang, H.; LeCluyse, E.L. Role of Orphan Nuclear Receptors in the Regulation of Drug-Metabolising Enzymes. *Clin. Pharmacokinet.* **2003**, *42*, 1331–1357. [CrossRef]
123. Miller, D.S. Regulation of ABC Transporters Blood-Brain Barrier. The Good, the Bad, and the Ugly. In *Advances in Cancer Research*; Academic Press Inc.: Cambridge, MA, USA, 2015; Volume 125, pp. 43–70.
124. Chan, G.N.Y.; Hoque, M.T.; Cummins, C.L.; Bendayan, R. Regulation of P-glycoprotein by orphan nuclear receptors in human brain microvessel endothelial cells. *J. Neurochem.* **2011**, *118*, 163–175. [CrossRef]
125. Wang, X.; Sykes, D.B.; Miller, D.S. Constitutive androstane receptor-mediated up-regulation of ATP-driven xenobiotic efflux transporters at the blood-brain barrier. *Mol. Pharmacol.* **2010**, *78*, 376–383. [CrossRef] [PubMed]
126. Slosky, L.M.; Thompson, B.J.; Sanchez-Covarrubias, L.; Zhang, Y.; Laracuente, M.L.; Vanderah, T.W.; Ronaldson, P.T.; Davis, T.P. Acetaminophen modulates P-glycoprotein functional expression at the blood-brain barrier by a constitutive androstane receptor-dependent mechanism. *Mol. Pharmacol.* **2013**, *84*, 774–786. [CrossRef]
127. Tripathi, V.K.; Kumar, V.; Pandey, A.; Vatsa, P.; Dhasmana, A.; Singh, R.P.; Appikonda, S.H.C.; Hwang, I.; Lohani, M. Monocrotophos Induces the Expression of Xenobiotic Metabolizing Cytochrome P450s (CYP2C8 and CYP3A4) and Neurotoxicity in Human Brain Cells. *Mol. Neurobiol.* **2017**, *54*, 3633–3651. [CrossRef]
128. Ghosh, C.; Puvenna, V.; Gonzalez-Martinez, J.; Janigro, D.; Marchi, N. Blood-Brain Barrier P450 Enzymes and Multidrug Transporters in Drug Resistance: A Synergistic Role in Neurological Diseases. *Curr. Drug Metab.* **2011**, *12*, 742–749. [CrossRef]



129. Chakraborty, S.; Kanakasabai, S.; Bright, J.J. Constitutive androstane receptor agonist CITCO inhibits growth and expansion of brain tumour stem cells. *Br. J. Cancer* **2011**, *104*, 448–459. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
130. Maglich, J.M.; Parks, D.J.; Moore, L.B.; Collins, J.L.; Goodwin, B.; Billin, A.N.; Stoltz, C.A.; Kliewer, S.A.; Lambert, M.H.; Willson, T.M.; et al. Identification of a Novel Human Constitutive Androstane Receptor (CAR) Agonist and Its Use in the Identification of CAR Target Genes. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 17277–17283. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
131. Lemmen, J.; Tozakidis, I.E.P.; Bele, P.; Galla, H.J. Constitutive androstane receptor upregulates Abcb1 and Abcg2 at the blood-brain barrier after CITCO activation. *Brain Res.* **2013**, *1501*, 68–80. [[CrossRef](#)]
132. Koemans, T.S.; Kleefstra, T.; Chubak, M.C.; Stone, M.H.; Reijnders, M.R.F.; de Munnik, S.; Willemsen, M.H.; Fenckova, M.; Stumpel, C.T.R.M.; Bok, L.A.; et al. Functional convergence of histone methyltransferases EHMT1 and KMT2C involved in intellectual disability and autism spectrum disorder. *PLoS Genet.* **2017**, *13*. [[CrossRef](#)]
133. Boussadia, B.; Gangarossa, G.; Mselli-Lakhal, L.; Rousset, M.-C.; de Bock, F.; Lassere, F.; Ghosh, C.; Pascussi, J.-M.; Janigro, D.; Marchi, N. Lack of CAR impacts neuronal function and cerebrovascular integrity in vivo. *Exp. Neurol.* **2016**, *283*, 39–48. [[CrossRef](#)]
134. Torres-Vergara, P.; Ho, Y.S.; Espinoza, F.; Nualart, F.; Escudero, C.; Penny, J. The constitutive androstane receptor and pregnane X receptor in the brain. *Br. J. Pharmacol.* **2020**, *177*, 2666–2682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Davidson, T.L.; Monnot, A.; Neal, A.U.; Martin, A.A.; Horton, J.J.; Zheng, W. The effects of a high-energy diet on hippocampal-dependent discrimination performance and blood-brain barrier integrity differ for diet-induced obese and diet-resistant rats. *Physiol. Behav.* **2012**, *107*, 26–33. [[CrossRef](#)]
136. Ferro, J.M.; Oliveira, S.N.; Correia, L. Neurologic manifestations of inflammatory bowel diseases. In *Handbook of Clinical Neurology*; Elsevier B.V.: Amsterdam, The Netherlands, 2014; Volume 120, pp. 595–605.
137. Casella, G.; Tontini, G.E.; Bassotti, G.; Pastorelli, L.; Villanacci, V.; Spina, L.; Baldini, V.; Vecchi, M. Neurological disorders and inflammatory bowel diseases. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 8764–8782.
138. Miehsler, W.; Reinisch, W.; Valic, E.; Osterode, W.; Tillinger, W.; Feichtenschlager, T.; Grisar, J.; Machold, K.; Scholz, S.; Vogelsang, H.; et al. Is inflammatory bowel disease an independent and disease specific risk factor for thromboembolism? *Gut* **2004**, *53*, 542–548. [[CrossRef](#)]
139. Varatharaj, A.; Galea, I. The blood-brain barrier in systemic inflammation. *Brain. Behav. Immun.* **2017**, *60*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
140. Duszka, K.; Wahli, W. Enteric Microbiota–Gut–Brain Axis from the Perspective of Nuclear Receptors. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 2210. [[CrossRef](#)]

**Publisher’s Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



## IV.2 Récepteur CAR et NAFLD

De nombreuses études ont démontré l'implication de certains récepteurs nucléaires dans le développement de la NAFLD et ont permis de générer de nombreuses cibles thérapeutiques potentielles pour le traitement de ces pathologies (M. C. Cave et al. 2016). Les récepteurs les plus étudiés dans la pathogénèse des hépatopathies métaboliques sont les récepteurs PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor), LXR (Liver-X Receptor), PXR (Pregnane-X Receptor) et enfin le récepteur CAR qui fait l'objet de cette étude (M. C. Cave et al. 2016).

Les études existantes sur le rôle du récepteur nucléaire CAR dans la pathogénèse de la NAFLD ne sont pas toujours concordantes. Cela pourrait être expliqué par l'utilisation de modèles différents (activation ou délétion de CAR) et de régimes différents (régimes stéatogènes ou obésogènes).

Les premières études sur l'implication de CAR dans le développement de la NAFLD ont été effectuées en 2009 par Dong et Gao et leurs collaborateurs (Dong et al. 2009; J. Gao et al. 2009). Ces études démontrent que l'activation de CAR par son agoniste le TCPOBOP dans un modèle de souris obèses (ob/ob) améliore l'insulino-résistance ainsi que la stéatose hépatique en induisant une inhibition de la lipogénèse et une activation de la  $\beta$ -oxydation au niveau hépatique (Dong et al. 2009). Au cours de la même année, la deuxième étude démontrait que l'activation de CAR par le TCPOBOP améliore la stéatose hépatique et la sensibilité à l'insuline dans modèle murin d'obésité induite par un régime riche en gras (HFD) (J. Gao et al. 2009).

Dans cette étude, les effets bénéfiques du TCPOBOP résultent d'une inhibition de la lipogénèse et de la néoglucogénèse hépatique ainsi que d'une réduction de l'export des triglycérides et de la sécrétion des VLDL. Ces deux études furent les premières à mettre en évidence le potentiel thérapeutique de ce récepteur nucléaire pour le traitement de la NAFLD.

La majorité des études qui ont suivi celles de Gao et Dong sont concordantes et démontrent un effet bénéfique de l'activation de CAR dans la stéatose hépatique (Masuyama and Hiramatsu 2012; Roth et al. 2008; M. C. Cave et al. 2016). Néanmoins, certaines études démontrent une augmentation des lipides plasmatiques ainsi qu'une répression de la  $\beta$ -oxydation hépatique suite à une activation du récepteur CAR dans un modèle murin d'obésité induite par un régime gras (Maglich, Lobe, and Moore 2009).

Des effets anti-inflammatoires et anti-apoptotiques ont été démontrés pour le récepteur CAR, qui pourraient être bénéfiques dans un contexte de NAFLD. En revanche, son rôle dans le développement de la fibrose et de l'hépatocarcinome reste incertain. Dans un modèle de NASH induite par un régime MCD (Methionine/Choline Deficient), l'administration d'un agoniste de CAR réduit la stéatose hépatique et l'inflammation lobulaire (Baskin-Bey et al. 2007). L'activation du récepteur CAR réduit également la fibrose et l'apoptose hépatocellulaire en diminuant l'expression des protéines pro-apoptotiques Bak/Bax et en augmentant l'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 (Baskin-Bey et al. 2007). En revanche, une autre étude utilisant un modèle de NASH induite par le régime MCD révèle des effets délétères de l'activation de CAR dont une augmentation de la peroxydation des lipides ainsi qu'une aggravation de la fibrose et de la souffrance hépatique (Yamazaki et al. 2007). De plus, l'activation de CAR chez la souris induit la transcription du gène qui code pour la protéine PNPLA3, impliquée dans la pathogenèse de la NAFLD et qui représente le polymorphisme le plus commun dans la NAFLD humaine (Dongiovanni et al. 2013).

Le récepteur CAR est également impliqué dans la tumorigenèse médiée par la voie de signalisation de la  $\beta$ -caténine, une voie dont l'activation aberrante contribue à un tiers des hépatocarcinomes chez l'Humain.

Dans un modèle murin, l'activation du récepteur CAR favorise la prolifération hépatocellulaire et le développement de l'hépatocarcinome (Dong et al. 2015). Une interaction du récepteur CAR avec la protéine Gadd45 $\beta$  pourrait expliquer ses effets sur la prolifération hépatocellulaire (Hori et al. 2018). En revanche, des études effectuées sur une lignée humaine hépatique HepaRG suggèrent que chez l'Homme, CAR aurait un effet anti-prolifératif et donc protecteur du développement de l'hépatocarcinome (D. Li et al. 2015; Luisier et al. 2014).

Ces résultats contradictoires démontrent l'importance d'approfondir le rôle de CAR dans la pathogenèse de la NAFLD et dans la progression vers des stades plus graves telles que la NASH. La différence de résultats obtenus entre les modèles murins et les modèles cellulaires humains résultent probablement de différences inter-espèces de fonction et de structure du récepteur CAR (Molnár et al. 2013). Cela témoigne de l'importance de vérifier la pertinence clinique des études animales en les associant à des études sur des modèles humains (lignées cellulaires humaines, organoïdes, souris humanisées). De plus, la majorité des études visant à investiguer le rôle de CAR dans la pathogenèse de la NAFLD ont été effectuées sur des modèles animaux de sexe mâle. Comme décrit dans la partie II de cette thèse, la NAFLD est une pathologie qui présente une prévalence et une pathogenèse sexuellement dimorphique. Il est donc important d'inclure les femelles dans les études pour étudier la pathogenèse dimorphique de la NAFLD ainsi que pour trouver des cibles thérapeutiques qui soient pertinentes pour les deux sexes.

## Partie V : Physio-pathologie du foie : la TAFLD

L'hépatotoxicité est la lésion la plus communément induite par l'exposition à des toxiques environnementaux. Un large spectre de pathologies hépatiques allant de la stéatohépatite à la nécrose puis à l'hépatocarcinome a été observé suite à l'exposition à des produits toxiques chez l'Homme et dans des modèles animaux expérimentaux. Le terme récent de TAFLD, pour « Toxic-Associated Fatty Liver Disease » décrit une forme de pathologie hépatique similaire à la stéatose hépatique ou NAFLD. La TASH pour « Toxic-Associated SteatoHepatitis » est une forme plus sévère de la TAFLD caractérisée par de la stéatose hépatique, de l'inflammation et dans certains cas de la fibrose. Les individus atteints de TAFLD ou de TASH présentent une exposition à des toxiques environnementaux mais ne présentent pas les facteurs de risque traditionnels de la stéatose hépatique comme la consommation d'alcool ou la présence de maladies métaboliques (obésité, diabète de type II) (Wahlang et al. 2013). Les niveaux circulants de transaminases (ALT, AST) utilisés comme marqueur de la NAFLD sont souvent normaux au cours de la TAFLD et de la TASH, ce qui rend compliqué le diagnostic de ces pathologies (Wahlang et al. 2013).

### V.1 Pathogenèse de la TAFLD

Plusieurs familles de molécules sont associées au développement d'une TAFLD. Ces molécules incluent des toxiques environnementaux tels que des **POP** pour polluants organiques persistants (pentachlorobenzène, biphenils polychlorinés...), des **pesticides** (malathion, atrazine...), des **solvants** (2,2-Bis(Bromométhyl)-1,3 propanediol...), des **plastifiants** (dibutyl phthalate) et autres hydrocarbures halogénés et composés organiques volatiles (Al-Eryani et al. 2015).

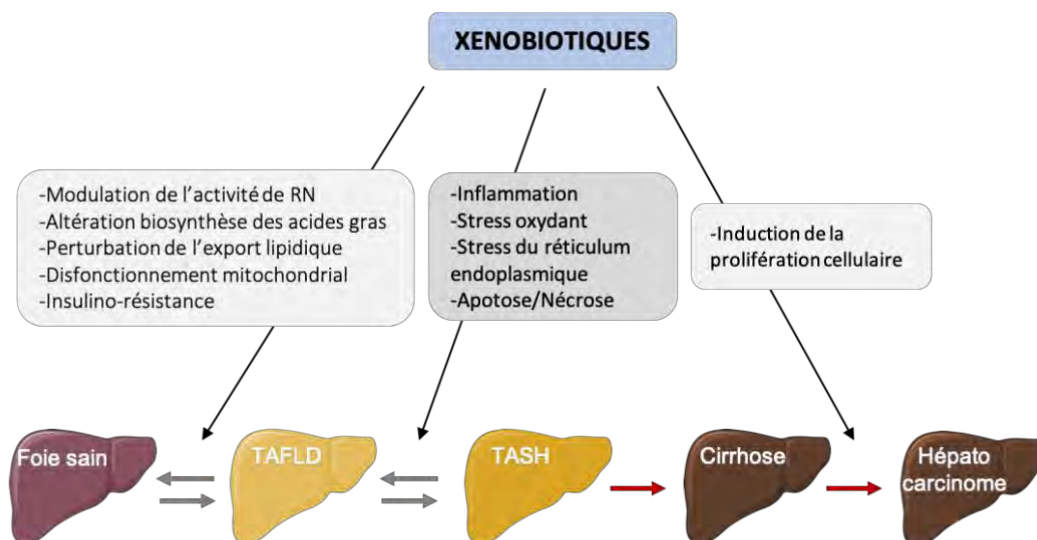
Des **médicaments** tels que les carbamazépinés, l'aspirine et l'ibuprofène sont associés avec le développement d'une stéatose hépatique simple (Satapathy et al. 2015). D'autres médicaments tels que les glucocorticoïdes et le tamoxifène sont associés à un risque de développement d'une stéatohépatite.

Contrairement à la NASH qui est généralement associée à des niveaux élevés de transaminases (ALT, AST), la TASH est souvent associée à des niveaux normaux d'enzymes hépatiques (Wahlang et al. 2013). La difficulté de diagnostic de la TAFLD/TASH complique l'estimation de la prévalence de ces pathologies.

La TAFLD est un concept récent qui n'a pas fait l'objet d'un grand nombre d'études. Néanmoins, différents mécanismes ont été mis en évidence dans la pathogenèse de ces pathologies qui peuvent varier en fonction de la nature du toxique ainsi que de la durée et la voie d'exposition. Les xénobiotiques peuvent agir à différentes étapes de la pathogenèse de la stéatose hépatique. Ces molécules favorisent le développement d'une stéatose simple (TAFLD) par différents mécanismes (**Figure 8**) dont la modulation de l'activité des récepteurs aux xénobiotiques CAR et PXR, PPAR $\alpha$  et des récepteurs endocriniens (ER $\alpha$ , TR) qui sont impliqués dans l'homéostasie énergétique hépatique (Klaunig, Li, and Wang 2018). Les xénobiotiques perturbent la biosynthèse des acides gras et diminuent l'export des lipides favorisant l'accumulation de lipides (Maradonna et al. 2015). De plus, l'exposition à des produits toxiques entraîne une insulino-résistance et un dysfonctionnement mitochondrial qui peut participer au développement d'une TAFLD (Joshi-Barve et al. 2015). Les xénobiotiques peuvent induire une inflammation, un stress oxydant et un stress du réticulum endoplasmique pouvant induire une stéato-hépatite (TAFLD) (Klaunig, Li, and Wang 2018).

L'ensemble de ces mécanismes sont communs à la NAFLD, néanmoins un grand nombre de xénobiotiques induisent une nécrose, qui est spécifique à la TAFLD/TASH (Takaki, Kawai, and Yamamoto 2013). D'autres mécanismes sont également impliqués dans le développement de la TAFLD comme l'autophagie, une altération de la barrière intestinale ou encore des modifications épigénétiques (Joshi-Barve et al. 2015). Enfin, les xénobiotiques sont impliqués dans la prolifération hépatocellulaire dont l'altération peut entraîner le développement d'un hépatocarcinome (Shizu et al. 2013).

Des perturbations métaboliques comme l'obésité modifient la réponse aux xénobiotiques (Sadler et al. 2018). De plus, certains toxiques qualifiés « d'obésogènes environnementaux » sont impliqués dans le développement d'obésité. Le développement d'une NAFLD et d'une TAFLD pourraient donc être concomitants.



**Figure 8 : Rôle des xénobiotiques dans la pathogenèse de la TAFLD.** Les xénobiotiques peuvent agir à différentes étapes de la NAFLD. Ils peuvent favoriser le développement d'une stéatose simple (TAFLD) par leur action sur l'activité des récepteurs nucléaires (RN), le métabolisme lipidique cellulaire et mitochondrial ainsi que l'insulino-résistance. Les xénobiotiques induisent également une inflammation au niveau hépatique, du stress oxydant et du RE, de l'apoptose et de la nécrose qui sont des mécanismes clés dans le développement d'une stéato-hépatite (TASH). Les xénobiotiques sont également impliqués dans la prolifération hépatocellulaire pouvant favoriser le développement d'un hépatocarcinome. RE : réticulum endoplasmique

## V.2 Rôle des pesticides dans le développement de la TAFLD

### V.2.1 Généralités sur les pesticides

Le terme « pesticides » regroupe des substances ou des produits utilisés pour lutter contre des organismes considérés comme nuisibles. L'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture a établi une définition précise qui décrit les pesticides comme :

*« toute substance ou association de substances, ou micro-organismes y compris les virus, destinée à repousser, détruire ou combattre les ravageurs, y compris les vecteurs de maladies humaines ou animales, les ravageurs nuisibles, les espèces indésirables de plantes ou d'animaux causant des dommages ou se montrant autrement nuisibles durant la production, la transformation, le stockage, le transport ou la commercialisation des denrées alimentaires, des produits agricoles, du bois et des produits ligneux, ou des aliments pour animaux, ou qui peut être administrée aux animaux pour combattre les insectes, les arachnides et les autres endo- ou ecto-parasites. Le terme inclut les substances destinées à être utilisées comme régulateur de croissance d'insectes ou de plantes, comme défoliant, comme agent de dessiccation, comme agent d'éclaircissage des fruits ou pour empêcher la chute prématurée de ceux-ci, ainsi que les substances appliquées sur les cultures, avant ou après la récolte, pour protéger les produits contre la détérioration durant l'entreposage et le transport. Ce terme inclut aussi les produits synergistes et détoxifiants des pesticides quand ils sont essentiels pour obtenir une prestation satisfaisante du pesticide » (OMS 2010).*

La mise sur le marché et l'utilisation des pesticides sont soumises à des directives et réglementations encadrées par l'Union Européenne (UE) qui existent depuis 1993 et sont régulièrement mises à jour. Depuis 2005, l'UE surveille également les résidus de pesticides dans les denrées alimentaires. La commercialisation des denrées alimentaires est contrôlée par des limites maximales de résidus (LMR) fixant un seuil de résidus à ne pas dépasser qui est spécifique à chaque produit alimentaire. La détermination de ces seuils est critique pour la protection de la santé humaine. En effet, l'utilisation des pesticides est à double tranchant, ils sont efficaces pour contrôler les organismes indésirables mais peuvent également avoir des effets toxiques sur l'Homme.

### V.2.2 Classification des pesticides et exposition humaine

Les pesticides sont regroupés en différentes familles dont les produits phytosanitaires, les biocides et les médicaments à usage humain ou vétérinaire. Les produits phytosanitaires sont des produits chimiques d'origine naturelle ou synthétique majoritairement représentés par les insecticides, les herbicides et les fongicides luttant respectivement contre les insectes nuisibles, les plantes adventices et les champignons pathogènes. Ils sont destinés à protéger les végétaux et leur produits dérivés des organismes nuisibles. Ces composés permettent également de conserver les produits végétaux ou d'agir sur la croissance indésirable des végétaux. Les biocides sont des produits caractérisés de « pesticides à usage non agricole » tels que les antiparasitaires ou les insecticides ménagers. Par leur action biologique ou chimique, les biocides ont pour but de repousser, détruire ou rendre inoffensif des organismes nuisibles. Enfin, les médicaments à usage humain ou vétérinaire sont des substances présentant des propriétés préventives ou curatives envers des maladies humaines ou animales. Les antiparasitaires et les antibiotiques sont des exemples de produits fréquemment utilisés chez l'Homme et pour les animaux domestiques ou d'élevage.

Les pesticides sont utilisés dans le cadre professionnel par de nombreux travailleurs agricoles, horticoles, d'entretien des bâtiments et des voiries qui sont y donc exposés (Jakubowski and Trzcinka-Ochocka 2005). Le reste de la population est également exposé aux pesticides à travers l'alimentation, l'usage domestique et par l'environnement (air, eau, poussière). Dans ces différents contextes, l'Homme est exposé aux pesticides par voie cutané, par ingestion et par inhalation. La voie d'exposition majoritaire est la voie orale *via* l'alimentation pour la population générale et la voie cutanée pour les professionnels utilisateurs de pesticides (Jakubowski and Trzcinka-Ochocka 2005).



### V.2.3 Effets des pesticides sur l'homéostasie énergétique

L'exposition aux xénobiotiques est considérée comme un facteur inducteur de perturbations du métabolisme énergétique (Grün and Blumberg 2009; Casals-Casas and Desvergne 2011). Un lien entre l'exposition aux pesticides et le développement de perturbations métaboliques a été suggéré dans plusieurs études épidémiologiques qui se sont principalement focalisées sur les organochlorés, des pesticides persistants (Pelletier, Després, and Tremblay 2002; Pelletier, Imbeault, and Tremblay 2003).

Pelletier et ses collaborateurs ont démontré une concentration sanguine plus élevée de 11 pesticides chez des individus obèses par rapport à des individus non-obèses (Pelletier, Després, and Tremblay 2002). Les auteurs suggèrent chez ces individus obèses, un stockage des pesticides lipophiles dans le tissu adipeux, qui en cas de perte de poids sont libérés dans la circulation (Pelletier, Imbeault, and Tremblay 2003). D'autres études effectuées pendant la période prénatale démontrent une augmentation du risque d'obésité infantile suite à l'exposition à des organochlorés comme l'hexachlorobenzane ou le dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) (Smink et al. 2008; Mendez et al. 2011).

L'exposition aux organochlorés (aldrin, chlordane, heptachlor) et à d'autres famille de pesticides (alachlor, cyanazine, dichlorvos, trichlorfon) est associée au développement du diabète de type II (Everett and Matheson 2010; Montgomery et al. 2008; Patel, Bhattacharya, and Butte 2010; D.-H. Lee et al. 2010; Ukropec et al. 2010). Les organophosphorés et les pyréthrinoïdes ont également été associés à des risques plus importants de perturbations du métabolisme glucidique et de diabète de type II (Lasram, Dhouib, Annabi, et al. 2014; J. Wang et al. 2011). Ces résultats sont confortés par une méta-analyse de 13 études révélant un lien entre l'exposition aux pesticides et un risque plus élevé de développer un diabète de type II (Evangelou et al. 2016).

Une méta analyse de 371 études effectuées chez la souris a révélé 123 toxiques environnementaux associés au développement de la NAFLD dont 44% sont des pesticides (insecticides, fongicides, herbicides) (Al-Eryani et al. 2015). Des études épidémiologiques démontrent une association entre l'exposition aux organochlorés et une augmentation des transaminases circulantes et le développement de TAFLD ou de TASH (Matt Cave, Falkner, and McClain 2012; Taylor et al. 1978). L'ensemble des études épidémiologiques suggère un lien entre l'exposition aux pesticides et une perturbation du métabolisme énergétique dont la stéatose hépatique mais ne permet pas d'établir un lien de causalité.

Plusieurs études expérimentales confortent ces résultats épidémiologiques. Une étude chez le rat démontre que l'administration d'un herbicide organophosphate, le malathion induit une insulino-résistance, une hyperglycémie et hyperinsulinémie et une stéatose hépatique accompagnée d'inflammation (Lasram, Dhouib, Bouzid, et al. 2014). D'autres familles de pesticides tels que l'herbicide atrazine ou l'insecticide cyperméthrine induisent chez la souris une stéatose hépatique et une dyslipidémie lorsqu'ils sont administrés en association avec un régime riche en gras et en sucre (Jin et al. 2014). De nombreuses études portant sur le chlorpyrifos, des carbamates, ou des herbicides néonicotinoïdes révèlent un effet de ces pesticides sur l'homéostasie énergétique (P. Wang et al. 2014; Peris-Sampedro et al. 2015; Bhaskar and Mohanty 2014).

Il existe un dimorphisme sexuel dans les dérégulations métaboliques induites par l'exposition aux pesticides (Lukowicz et al. 2018; Slotkin, Brown, and Seidler 2005; Lassiter et al. 2008).

Une exposition chronique à un mélange de six pesticides induit une augmentation du poids corporel et une stéatose hépatique uniquement chez des souris mâles (Lukowicz et al. 2018).

Ces travaux suggèrent une implication du récepteur CAR dans la réponse dimorphique à ce cocktail de pesticides.

D'autres études effectuées chez le rat révèlent également des troubles plus sévères chez des animaux mâles suite à l'exposition au chlorpyrifos ou au mancozeb (Slotkin, Brown, and Seidler 2005; Lassiter and Brimijoin 2008; Bhaskar and Mohanty 2014). Néanmoins, certaines études démontrent des troubles du métabolisme glucidique plus marqués chez les femelles suite à l'exposition à un organophosphate, le parathion (Lassiter et al. 2008). Ces différences liées au sexe peuvent être expliquées par le dimorphisme sexuel qui existe dans la capacité de détoxification, de métabolisation des pesticides et dans l'activation de récepteurs nucléaires (Soldin and Mattison 2009).

#### V.2.4 Mécanismes d'action des pesticides

Différents mécanismes d'action des pesticides ont été mis en évidence dont une action sur les récepteurs nucléaires, sur la voie de signalisation de l'insuline, la sécrétion de l'insuline, la différenciation adipocytaire, la fonction thyroïdienne et le microbiote intestinal (Hiroyuki Kojima, Takeuchi, and Nagai 2010; J. Kim et al. 2013; Claus, Guillou, and Ellero-Simatos 2016). Un grand nombre de pesticides présente des propriétés lipophiles leurs conférant une capacité à se lier et moduler l'activité de plusieurs récepteurs nucléaires. Ces derniers sont donc suspectés comme médiateurs des effets des pesticides. Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* démontrent une activation de CAR par différents types de pesticides tels que des insecticides (organophospharés, pyréthriinoïdes, sulfoxalor, carbamate), des herbicides (pronamide) et des fongicides (triazole) (Abass and Pelkonen 2013; LeBaron et al. 2014; Lake, Price, and Osimitz 2015). Des études *in vitro* sur des cellules hépatiques ont révélé une centaine de pesticides de nature différente qui activent les formes murines et/ou humaines de PXR (Coumoul, Diry, and Barouki 2002; Lemaire et al. 2006; H Kojima et al. 2010).

Le récepteur PPAR $\alpha$  est également une cible des pesticides, activé par différents types de molécules comme l'herbicide pronamide, des carbamates et des organochlorés (LeBaron et al. 2014; Takeuchi et al. 2006). Plusieurs études *in vivo* et *in vitro* démontrent également une activation de récepteurs endocriniens par les pesticides soulignant leur potentiel de perturbateurs endocriniens (Medjakovic et al. 2014; H. Sun et al. 2008; Guizhen Du et al. 2010; Lu et al. 2015; Zhang et al. 2016). Des fongicides (fluxidioxonil, fenhexamid) activent les récepteurs ER $\alpha$  et AR et induisent la transcription de leurs gènes cibles (Medjakovic et al. 2014). Différents pesticides tels que le fludioxonil, le mepanipyrim, le cypronidil, le pyremethanil et le chlorpyrifos sont des activateurs du récepteur AhR (Medjakovic et al. 2014). L'activité d'autres récepteurs comme le récepteur TR et le récepteur GR sont également modulés par l'exposition aux pesticides (H. Sun et al. 2008; Guizhen Du et al. 2010; Lu et al. 2015; Zhang et al. 2016).

Des pesticides tels que l'imidacloprid, la perméthrine, l'atrazine ou la roténone agissent sur la voie de signalisation de l'insuline en perturbant la phosphorylation de protéines kinases clés (Akt, IRS) impliqués dans la signalisation de l'insuline (J. Kim et al. 2013; X. Xiao et al. 2017; Lim et al. 2009; Al-Lahham, Deford, and Papaconstantinou 2016). Certains pesticides agissent directement sur la synthèse de l'insuline par les cellules  $\beta$  du pancréas. C'est le cas du malathion et du diazinon qui induisent un stress oxydant au niveau des îlots de Langerhans qui altère la sécrétion de l'insuline (Panahi et al. 2006; Ghafour-Rashidi et al. 2007). Certains pesticides obésogènes comme le triflumizole (fongicide), l'imidaclopride et le fipronil (insecticides) activent le récepteur PPAR $\gamma$  et induisent une différenciation adipocytaire (X. Li et al. 2012; J. Kim et al. 2013; Q. Sun et al. 2016).

En revanche, d'autres pesticides tels que le glyphosate (herbicide), l'endrine et la deltaméthrine (insecticides) inhibent PPAR $\gamma$  et la différenciation adipocytaire (Martini et al. 2016; Moreno-Aliaga and Matsumura 1999; Armstrong et al. 2013). Des études effectuées chez le rat démontrent que les effets des pesticides sur la fonction thyroïdienne sont également contradictoires et dépendent de la nature du pesticide (Porter et al. 1993; S. Wang et al. 2002). Certains pesticides comme les carbamates induisent une augmentation des niveaux circulants de l'hormone thyroïdienne T4 (Porter et al. 1993) alors que la perméthrine diminue les niveaux de cette hormone (S. Wang et al. 2002).

L'interaction entre les pesticides et le microbiote intestinal est également considéré comme un mécanisme médiateur des effets toxiques des pesticides (Claus, Guillou, and Ellero-Simatos 2016). Le microbiote intestinal joue un rôle essentiel dans la détoxification et la métabolisation des xénobiotiques. L'étude de Velmurugan et ses collaborateurs démontre que chez la souris, le monocrotophos (insecticide) est dégradé par le microbiote intestinal. Sa dégradation produit des acides gras à chaîne courte comme l'acétate qui perturbent la néoglucogénèse hépatique et peuvent induire une intolérance au glucose (Velmurugan et al. 2017). De même, les pesticides peuvent perturber la composition et l'activité du microbiote intestinal à l'origine d'une dysbiose intestinale pouvant favoriser le développement de perturbations métaboliques et d'une stéatose hépatique (Kirpich, Marsano, and McClain 2015). Des études chez la souris montrent que de nombreux pesticides comme le glyphosate, le diazinon et les carbendazimes (fongicides) induisent une dysbiose intestinale qui pourrait être un des mécanismes médiateurs de leurs effets toxiques (Shehata et al. 2013; B. Gao et al. 2017; Velmurugan et al. 2017).

### V.3 PFOA et développement de la TAFLD

Depuis les années 1950, divers domaines industriels ont eu recours à une utilisation massive de composés perfluorés tels que l'acide perfluorooctanoïque (PFOA). Ces composés présentent de nombreux atouts dont une importante résistance thermique, chimique, mécanique et aux rayons ultra-violets. Ils sont donc utilisés dans la conception de différents produits utilisés au quotidien : emballages alimentaires, canettes, revêtements antiadhésifs des poêles, imperméabilisants textiles, mousses anti-incendie etc. Ces composés sont retrouvés de manière ubiquitaire, sont très persistants dans l'environnement et de nombreuses questions se posent quant à leur toxicité. Le PFOA est caractérisé d'obésogène environnemental et est inscrit dans la liste de POP décrits par la convention de Stockholm.

#### V.3.1 Généralités et structure chimique du PFOA

Les composés perfluorés sont regroupés dans la très complexe famille des alkyls perfluorés, dont le trait commun est une chaîne carbonée de longueur variable sur laquelle tous ou la plupart des atomes d'hydrogène sont remplacés par des atomes de fluor.

Les alkyls perfluorés sont classés en différents sous-groupes dont les deux principaux sont les carboxylates d'alkyls perfluorés et les sulfonates d'alkyls perfluorés

**Les carboxylates d'alkyls perfluorés** (PFC) présentent une chaîne carbonée avec à l'extrémité un groupement carboxyle (-COOH). Comme présenté dans le **tableau II**, la longueur de la chaîne carbonée définit le nom et l'abréviation des composés PFC dont les principaux représentants sont : l'acide perfluorooctanoïque (PFOA) et l'acide perfluorononanoïque (PFNA).

**Tableau II : Formules chimiques, noms et abréviations des PFC**

Nom	Abréviation	n	Structure chimique
Acide perfluoropropanoïque	PFPrA	1	
Acide perfluorobutanoïque	PFBA	2	
Acide perfluoropentanoïque	PFPeA	3	
Acide perfluorohexanoïque	PFHxA	4	
Acide perfluoroheptanoïque	PFHpA	5	
<b>Acide perfluorooctanoïque</b>	<b>PFOA</b>	<b>6</b>	
Acide perfluorononanoïque	PFNA	7	
Acide perfluorodécanoïque	PFDA	8	
Acide perfluoroundécanoïque	PFUnA	9	
Acide perfluorododécanoïque	PFDoA	10	
Acide perfluorotridécanoïque	PFTTrA	11	

Les **sulfonates d'alkyls perfluorés** (PFAS) présentent également une chaîne carbonée à longueur variable mais avec à l'extrémité un groupement sulfonate. Le représentant majoritaire de ce sous-groupe est le sulfonate de perfluorooctane (PFOS). Comme pour les PFC, la longueur de la chaîne carbonée définit le nom et l'abréviations des PFAS (Tableau 2).

**Tableau III : Formules chimiques, noms et abréviations des PFAS**

Nom	Abréviation	n	Structure chimique
Sulfonate de perfluorobutane	PFBS	3	
Sulfonate de perfluorohexane	PFHxS	5	
Sulfonate de perfluoroheptane	PFHpS	6	
Sulfonate de perfluorooctane	PFOS	7	
Sulfonate de perfluorodécane	PFDS	9	

### V.3.2 Propriétés pharmacocinétiques du PFOA et exposition humaine

Des études pharmacocinétiques menées chez l'Homme et sur des modèles animaux ont permis d'établir un profil pharmacocinétique de l'absorption, la distribution, la métabolisation et l'excrétion du PFOA. Une étude clinique effectuée par l'IARC en 2016 rapporte que suite à une ingestion de PFOA, l'absorption a lieu rapidement au niveau de l'intestin, avec un pic de concentration sanguine à 1,5 heures post-ingestion (IARC 2016). Le PFOA est absorbé quasi en totalité, 90% de PFOA se retrouve au niveau plasmatique où il est lié à des protéines plasmatiques TTR ou L-FABP (Han, Kemper, and Jepson 2005; Dzierlenga et al. 2020). Une étude menée sur un modèle murin, démontre un dimorphisme sexuel dans les taux d'absorption alimentaire de PFOA avec 80% d'absorption chez les mâles contre 100% chez les femelles (Fujii et al. 2015). Suite à l'administration de PFOA radiomarqué chez le rat, ce composé est majoritairement retrouvé au niveau plasmatique (22%), hépatique (22%) et rénal (2%) (Han, Kemper, and Jepson 2005). En revanche, chez des rates femelles, 7% de PFOA est retrouvé au niveau plasmatique, 6% au niveau hépatique et 3% au niveau rénal. Le PFOA est également retrouvé dans de plus faibles concentrations dans le cerveau, le cœur et les muscles. Contrairement à de nombreux POP, le PFOA n'est qu'en partie lipophile et s'accumule très peu dans le tissu adipeux (Han, Kemper, and Jepson 2005). Au niveau plasmatique, le PFOA est principalement lié à l'albumine mais peut également se lier à d'autres protéines. Les résultats d'études *in vitro* et *in vivo* suggèrent que le PFOA n'est pas métabolisé et ne subit pas de réactions chimiques de détoxification. Des études expérimentales utilisant du PFOA radiomarqué n'ont pas révélé de molécules ou métabolites dérivés du PFOA dans l'urine, la bile ou le plasma (Goecke, Jarnot, and Reo 1992; Ylinen and Auriola 1990; Cui et al. 2010).



*In vitro*, l'incubation de PFOA avec des fractions microsomales de foie, d'intestin ou de reins n'a révélé aucune métabolisation du PFOA qui semble résulter d'une importante stabilité des liaisons carbone-ions fluorure (Kemper and Nabb 2005). Le PFOA est principalement éliminé au niveau urinaire, fécal, et dans le lait maternel (Wambaugh, Barton, and Setzer 2008). Néanmoins, du fait de l'absence de métabolisation du PFOA, les taux d'excrétion sont très faibles. Le PFOA est également pris en charge par les voies biliaires mais est réabsorbé en quasi-totalité. Un dimorphisme sexuel dans l'excrétion de ce composé a été mis en évidence qui peut expliquer les différences liées au sexe observés dans la distribution du PFOA (Wambaugh, Barton, and Setzer 2008). Des études effectuées chez le rat démontrent une excrétion bi-phasique du PFOA chez les mâles qui est environ 40 fois plus lente que chez les femelles qui présentent une excrétion en une seule phase d'élimination (Wambaugh, Barton, and Setzer 2008).

Comme pour la majorité des contaminants persistants, l'accumulation de PFOA dans l'environnement résulte de l'activité humaine et est donc qualifiée d'anthropique (Anses 2015). Le PFOA est une molécule amphiphile qui présente des propriétés hydrophobes et hydrophiles. Du fait de ses propriétés physico-chimiques, le PFOA se retrouve de manière ubiquitaire dans l'environnement, dans l'eau, l'air, le sol et les sédiments. Il est donc susceptible de s'intégrer dans la chaîne alimentaire. Une contamination de l'alimentation est également possible du fait du transfert du PFOA des emballages alimentaires vers les denrées alimentaires. Trois voies d'exposition au PFOA sont majoritaires chez l'Homme : la voie orale, l'inhalation et la voie dermale. La voie orale est la voie d'exposition principale de la population générale et concerne majoritairement l'alimentation et l'eau de boisson. Selon plusieurs études, cette voie contribuerait pour 90% de l'exposition totale chez l'Homme (Anses 2015).

Une étude d'alimentation totale conduite par l'ANSES (EAT2) a révélé que les aliments dont la concentration de PFOA est la plus élevée sont les produits de la mer telles que les poissons ou crustacés (Anses 2011). Il est important de souligner que dans 98% des échantillons analysés dans le cadre de l'étude EAT2, les concentrations de PFOA reportées sont en dessous des limites de détection. L'inhalation représente également une voie importante d'exposition aux composés perfluorés du fait de leur présence dans l'air et dans les poussières domestiques (Fromme et al. 2009). Enfin, la voie dermale d'exposition au PFOA concerne l'absorption cutanée suite au contact de produits contenant du PFOA. C'est majoritairement le contact avec des textiles comme les vêtements qui induisent une exposition cutanée au PFOA (Lassen et al. 2015). En effet, près de 50% des composés perfluorés sont fabriqués pour la production de vêtements (Lassen et al. 2015).

#### V.3.4 Effets du PFOA sur le métabolisme énergétique

Plusieurs études ont révélé des effets délétères du PFOA au cours du développement et chez l'adulte (Steves et al. 2018). Une hépatotoxicité (Frawley et al. 2018), une immunotoxicité (Peden-Adams et al. 2008), une neurotoxicité (Shrestha et al. 2017), ainsi que des effets reprotoxiques (Liu et al. 2017) ont été démontrés suite à une exposition au PFOA. Des effets sur le métabolisme endocrinien ont également été révélés suggérant un potentiel de « perturbateur endocrinien » du PFOA (G Du et al. 2013). Dans ce chapitre, seuls les effets du PFOA sur le métabolisme énergétique hépatique ainsi que son implication potentielle dans le développement de la TAFLD seront détaillés.

Le premier effet le plus décrit du PFOA sur le foie est l'hépatomégalie ou l'augmentation du poids du foie observée dans les modèles expérimentaux.

L'exposition alimentaire au PFOA pendant 10 jours chez la souris à une concentration de 0,002% induit une hépatomégalie associée à une hypertrophie des hépatocytes centrolobulaires (Qazi et al. 2010). D'autres études ont décrit une hépatomégalie dose-dépendante chez des souris exposées oralement à des concentrations de PFOA allant de 5 à 50mg/kg/jour pendant 21 jours (Son et al. 2008). Ces données ont été confirmées par d'autres études (Filgo et al. 2015; Biegel et al. 2001).

Quelques études ont révélé que le PFOA peut également induire le développement d'un hépatocarcinome. Dans l'étude de Filgo et al., l'utilisation de souris CD-1, un modèle utilisé pour les études de carcinogénèse a permis de démontrer un effet du PFOA sur le développement d'adénomes hépatocellulaires. Dans cette étude, des souris CD-1 ont été exposées à des doses journalières de 0,01 à 5 mg/kg/jours pendant la gestation (Filgo et al. 2015). Les petits descendants des mères exposées au PFOA développent une hypertrophie ainsi que des adénomes hépatocellulaires. L'étude de Biegel et al., démontre également une augmentation de l'incidence d'adénomes hépatiques suite à une exposition alimentaire chronique de 2 ans chez le rat (50 et 300ppm de PFOA) (Biegel et al. 2001). Malgré le manque d'études épidémiologiques soutenant ces résultats, le PFOA a été classé comme molécule « susceptible d'être cancérigène pour l'Homme » par l'agence de protection environnementale américaine en 2006.

En plus de l'hypertrophie hépatocytaire, l'hépatomégalie induite par le PFOA peut également être expliquée par l'accumulation de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes. En effet, plusieurs études démontrent un effet du PFOA sur le développement d'une stéatose hépatique (Das et al. 2017; Kudo et al. 2011). Une étude menée sur des souris exposées à 10mg/kg/j pendant 7 jours révèle une stéatose hépatique avec une augmentation de triglycérides hépatiques (Das et al. 2017).

L'exposition au PFOA modifie les profils de lipides hépatiques chez la souris en augmentation des proportions d'acide oléique, d'acide palmitoléique et d'acide 8,11,14-eicosatriénoïque (Kudo et al. 2011). L'exposition au PFOA dérégule également les niveaux d'expression en ARNm de gènes clés du métabolisme lipidique hépatique dont *Acox1*, *Fas*, *Scd1*, *Elovl5*, *Fads2* et *Lpcat3* (Kudo et al. 2011). Une analyse histologique et ultra-structurale de foies de souris exposées au PFOA a permis de démontrer pour la première fois une accumulation de gouttelettes lipidiques à l'intérieur des noyaux hépatocellulaires (Ling Wang et al. 2013). Les auteurs de cette étude suggèrent que le PFOA de par sa structure pourrait interférer avec le transport et le métabolisme des acides gras et des gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes. Cette localisation anormale de gouttelettes lipidiques dans les noyaux des hépatocytes pourrait participer à la toxicité du PFOA. Plusieurs études épidémiologiques démontrent une corrélation entre l'exposition au PFOA et les niveaux circulants de transaminases (ALT) qui est un marqueur important pour le diagnostic de la NAFLD. Une augmentation des niveaux d'ALT est également observée dans les études animales expérimentales d'exposition au PFOA (Wu et al. 2018; Son et al. 2008).

Un nombre important d'études démontre des effets délétères du PFOA sur le métabolisme lipidique. Néanmoins, les études focalisant sur les effets du PFOA sur le métabolisme glucidique et les désordres associées sont moins nombreuses et ne sont pas toujours concordantes. Les études épidémiologiques sur l'association entre l'exposition au PFOA et les désordres du métabolisme glucidique tel que le diabète de type II sont contradictoires et aucune corrélation n'a été établie. En revanche, des études expérimentales sur des modèles animaux démontrent un effet du PFOA sur l'homéostasie glucidique (S. Yan et al. 2015; Zheng et al. 2017).

L'exposition à 5 doses de PFOA chez la souris (0.08, 0.31, 1.25, 5 et 20 mg/kg/day) pendant 28 jours induit des perturbations du métabolisme glucidique et de la sensibilité à l'insuline (S. Yan et al. 2015). La voie de signalisation PI3K-Akt, une voie essentielle dans l'import hépatique du glucose médié par l'insuline est réprimée dans les foies de souris exposées à des doses égales ou supérieures à 1.25 mg/kg/j. Les souris exposées à 5 mg/kg/j de PFOA présentent également une diminution de la synthèse de glycogène hépatique qui selon les auteurs pourrait résulter d'une répression de la néoglucogenèse. En accord avec cette étude, d'autres études démontrent une altération de la néoglucogenèse et de la glycogénolyse suite à 28 jours d'exposition au PFOA (1.25mg/kg/j) (Zheng et al. 2017).

#### V.3.5 Mécanismes de toxicité du PFOA

Plusieurs études ont investigué le rôle de différents récepteurs nucléaires dans les effets toxiques du PFOA et ont révélé que 85% des gènes altérés par le PFOA dépendent de PPAR $\alpha$  (Rosen et al. 2008). L'altération de gènes PPAR $\alpha$ -indépendants impliqués dans le métabolisme lipidique et dans le métabolisme des xénobiotiques suggère l'implication d'autres récepteurs nucléaires tels que PPAR $\gamma$ , CAR et Nrf2. Une activation de PPAR $\alpha$  a été démontrée suite à l'exposition au PFOA sur des modèles cellulaires ou des modèles animaux (James A Bjork and Wallace 2009; Fragki et al. 2021). Certains des effets du PFOA sont attribués à l'activation de PPAR $\alpha$  tels que l'hypertrophie hépatocellulaire induite par une augmentation du nombre et de la taille des peroxysomes (Wolf et al. 2008; Pastoor et al. 1987). Néanmoins, certains effets du PFOA sont complètement ou partiellement indépendants de l'activation de PPAR $\alpha$  tels que l'hépatomégalie, la stéatose hépatique et le développement d'adénomes hépatocellulaires (Das et al. 2017; Beggs et al. 2016).

Une étude suggère l'implication du facteur de transcription HNF-4 qui pourrait représenter une cible du PFOA pour induire la stéatose hépatique, le stress oxydant et la tumorigenèse (Beggs et al. 2016). Globalement, les mécanismes moléculaires impliqués dans la stéatose hépatique induite par le PFOA ont fait l'objet de très peu d'études. Cela souligne l'importance de poursuivre les études pour évaluer l'implication d'autres récepteurs nucléaires telles que CAR, PXR, Nrf2 et LXR $\alpha$  qui sont activés dans des modèles expérimentaux d'exposition au PFOA (J. A. Bjork, Butenhoff, and Wallace 2011).

L'implication de CAR dans la détoxification des xénobiotiques et dans la pathogenèse de la NAFLD fait de ce récepteur une cible intéressante pour étudier les effets du PFOA. Le PFOA est également un activateur de CAR comme le démontre l'étude de Abe et ses collaborateurs dans laquelle une exposition au PFOA chez la souris induit une transcription de Cyp2b10, un gène cible prototypique de CAR (Abe et al. 2017). Dans des cellules humaines HepaRG, le PFOA induit la transcription de CYP2B6, équivalent du gène prototypique de CAR chez l'humain (Abe et al. 2017). Dans cette étude, les auteurs se sont intéressés au mode d'activation de CAR par le PFOA et suggèrent une activation indirecte de ce récepteur. Le récepteur CAR est impliqué dans différents mécanismes caractéristiques de l'exposition au PFOA telles que l'hépatomégalie et la stéatose hépatique et pourrait donc être une cible importante du PFOA.

## ETUDES EXPERIMENTALES

### *Partie I*

**Le récepteur nucléaire CAR protège les souris femelles du développement de la NAFLD induite par un régime gras.**

La première partie de mes travaux de recherche a consisté à étudier le rôle du récepteur CAR dans la pathogenèse dimorphique de la stéatose hépatique induite par un régime riche en gras. Des souris mâles ou femelles, de génotype Wild Type (WT) ou knock-out pour le récepteur CAR (CAR<sup>-/-</sup>) ont été soumises à un régime riche en gras (HFD) ou à un régime contrôle pendant 16 semaines. Dans cette étude, trois facteurs ont été inclus dont le sexe, le génotype et le régime. Pour explorer le rôle dimorphique de CAR dans une situation de stress métabolique tel que le régime HFD, nous avons fait le choix d'effectuer les analyses en prenant en compte uniquement le facteur sexe et le facteur génotype. Tous les groupes représentés dans les figures (mâles/femelles, WT/CAR<sup>-/-</sup>) ont été soumis au régime HFD.

Cette étude a permis de mettre en évidence un rôle dimorphique du récepteur CAR dans le développement de la NAFLD et des troubles métaboliques associés. Chez des souris femelles CAR<sup>-/-</sup> sous régime gras, l'absence du récepteur CAR induit des troubles métaboliques plus importants que ceux observés chez les souris Wild-Type (WT). Ces troubles incluent une prise de poids corporel, une accumulation de tissu adipeux, une hyperglycémie, une hyperinsulinémie, une stéatose et une souffrance hépatique qui sont plus graves que chez les femelles WT. Chez les mâles, l'effet de la délétion de CAR est moindre. Les mâles CAR<sup>-/-</sup> présentent une hyperglycémie, une hyperinsulinémie, une stéatose et une souffrance hépatique plus importante que les WT.

Pour compléter cette analyse phénotypique, une analyse du transcriptome hépatique par microarray a permis de démontrer une induction de gènes impliqués dans le développement de la NAFLD et de la NASH uniquement chez les femelles CAR<sup>-/-</sup>. Cette analyse transcriptomique a également permis de mettre en évidence une corrélation positive entre la signature transcriptomique des femelles CAR<sup>-/-</sup> et celle de femelles délétées pour le récepteur aux œstrogènes ER $\alpha$ . Enfin, la délétion de CAR induit chez les femelles une astrogliose qui est une augmentation anormale du nombre d'astrocytes au niveau des noyaux arqués et paraventriculaire de l'hypothalamus plus importante que chez les WT. Chez les mâles, la délétion de CAR n'affecte pas le nombre d'astrocytes.

L'ensemble de ces résultats apporte de nouvelles connaissances sur le rôle de CAR dans le développement de la NAFLD en suggérant un rôle protecteur de CAR chez les femelles.

Ces résultats font l'objet d'un article en phase de reviewing dans le journal « Journal of Hepatology ».



## **CAR protects female mice from diet-induced NAFLD and associated metabolic disorders**

Fabiana Oliviero<sup>1</sup>, Wendy Klement<sup>2</sup>, Lucile Mary<sup>1</sup>, Yannick Lippi<sup>1</sup>, Claire Naylies<sup>1</sup>, Véronique Gayrard<sup>1</sup>, Nicola Marchi<sup>2</sup> and Laila Mselli-Lakhal<sup>1,#</sup>

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

<sup>2</sup> Cerebrovascular and Glia Research, Department of Neuroscience, Institute of Functional Genomics (UMR 5203 CNRS – U 1191 INSERM, University of Montpellier), Montpellier, France.

# Corresponding author

### **Contact Information**

Laila Mselli-Lakhal, ToxAlim UMR1331 INRA/INPT/UPS, Exposure, Endocrino-metabolic disruption and reproduction group, 180 chemin de Tournefeuille, BP 93173, 31027 Toulouse Cedex 3, FRANCE. Tel: +33 561285524. Fax: +33 561285310. [laila.lakhal@inrae.fr](mailto:laila.lakhal@inrae.fr).

**Conflict of interest :** The authors listed above certify that they have NO affiliations with any organization with any conflict of interest in the subject matter discussed in this manuscript.

**Financial support :** This work was supported by grants from the “Agence Nationale de la Recherche” ANR-Hepatobrain. Fabiana Oliviero is the recipient of a PhD fellowship from the ANR-Hepatobrain.

**Authors contributions :** study conception and design: F.O, N.M, L.M-L; data collection: F.O, W.K, L.M, Y.L, C.N, L.M-L analysis and interpretation of results: F.O, W.K, L.M, Y.L, C.N, L.M-L; draft manuscript preparation: F.O, V.G, N.M, L.M-L.  
All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

**Keywords :** NAFLD, Sexual dimorphism, Constitutive Androstane Receptor, High fat diet

## **Abstract**

**Background & Aims :** Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) emerges as the most common cause of chronic liver disease worldwide, affecting 70-90% of obese individuals. In humans, lower NAFLD incidence is reported in premenopausal women, although the mechanisms affording this protection remain under-investigated. Here, we tested the hypothesis that the constitutive androstane nuclear receptor (CAR) plays a role in the dimorphic pathogenesis of experimental NAFLD.

**Methods :** Male and female, wild-type (WT) and CAR knock-out (CAR<sup>-/-</sup>) mice were subjected to a high-fat diet (HFD) for 16 weeks. We examined the metabolic phenotype of mice through body weight follow-up, glucose tolerance tests and analysis of plasmatic metabolic markers. We evaluated hepatic lipid accumulation and fibrosis levels through histological staining and analysed hepatic transcriptome using microarray. Finally, we examined the potential impact of HFD and CAR deletion on specific brain regions, focusing on glial cells.

**Results :** HFD-induced metabolic disruptions such as weight gain and hepatic steatosis are more important in WT males than in females. However, CAR deletion in HFD-fed mice exacerbates weight gain and hepatic steatosis only in females. CAR<sup>-/-</sup> females present a NASH-like hepatic transcriptomic signature suggesting a potential NAFLD to NASH transition. A transcriptomic correlation analysis highlighted a possible cross-talk between CAR and ER $\alpha$  receptors which could explain the protective role of CAR. The peripheral effects of CAR deletion in female mice were associated with astrogliosis in the hypothalamus.

**Conclusion :** Physiological expression of CAR protects female mice from the development of HFD-induced NAFLD and from a possible progression to more severe forms such as NASH. These findings provide evidence that nuclear receptor CAR may serve as a potential therapeutic target in the treatment of NAFLD/NASH.

## **Introduction**

Metabolic diseases include a wide range of disorders affecting energy metabolism such as obesity and type II diabetes. The widespread of metabolic diseases represents a global health issue that is approaching epidemic proportions. Among these, Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) emerges as the most common cause of chronic liver disease worldwide, affecting 30% of general population and 70 to 90% of obese individuals (D. Kim et al. 2013). NAFLD is characterized by a reversible accumulation of lipid droplets in the liver, which in some cases can progress to more severe states such as Non-Alcoholic Steato-Hepatitis (NASH), Cirrhosis or Hepato-Carcinoma. NAFLD is a multifactorial pathology that can be the result of genetic and/or environmental factors such as lack of physical exercise and high fat and carbohydrate diets. Moreover, several studies suggest a sexual dimorphism in the prevalence of NAFLD with a higher susceptibility in men compared to pre-menopausal women (Ballestri et al. 2017).

Despite the important prevalence of hepatic diseases, there is no approved treatment for NAFLD. It is therefore important to elucidate the molecular mechanisms involved in the pathogenesis of NAFLD in order to seek new therapeutic targets while considering sexual dimorphism of this disease.

Nuclear receptor CAR (Constitutive Androstan Receptor), mainly expressed in the liver has first been described for its role in exogenous detoxification processes and endogenous catabolism of steroid and thyroid hormones (Qatanani, Zhang, and Moore 2005; Xie et al. 2003). However, many studies have highlighted the involvement of CAR in major hepatic metabolic pathways such as gluconeogenesis and lipogenesis, thus revealing a role in the regulation of energy homeostasis (Lynch et al. 2014). Given its role at the crossroads between endocrine regulation and energy metabolism, CAR could be involved in dimorphic metabolic disruptions such as NAFLD.

In this study, using a CAR knock-out murine model, we demonstrate that CAR protects males and females from metabolic disorders induced by a HFD diet. This protection is more prominent in females where CAR deletion resulted in more severe weight gain, hepatic steatosis, liver injury, hyperglycemia, hyperinsulinemia and hypothalamic astrogliosis compared to WT females. Importantly, CAR deletion leads to dimorphic disruptions of hepatic transcriptome, with an up-regulation of genes involved in a NAFLD to NASH transition specifically in female mice. The transcriptomic analysis also highlighted a possible crosstalk between CAR and ER $\alpha$  receptors in female mice, potentially explaining the protective role of CAR.

## **Material and methods**

### **Animal experiments**

All in vivo experiments were conducted following French national and European laws and regulations relating to the housing and use of animals. These experiments have been approved by an independent ethics committee (Toxcométhique, INRAE ToxAlim, Toulouse, France). CAR knock out mice backcrossed on C57BL/6J background were provided by Dr. Urs A. Meyer (Biocenter, University Basel, Switzerland). 8 weeks old male and female, Wild-Type (WT) or CAR knock-out (CAR $^{-/-}$ ) mice were fed a High Fat Diet (HFD, 60% fat, D12492, Research Diets) during 16 weeks (n=10 mice per group, divided into two cages). Mice had access to food and water *ad libitum* with 12-hour light/dark cycles (23 $\pm$ 2°C). Body weight, food and water intake were measured weekly. Animals were euthanized following 16 weeks of HFD by cervical dislocation. Liver, subcutaneous and epididymal white adipose tissues were collected, weighed, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for further use.

### Oral glucose tolerance test.

At 4 and 10 weeks of diet, oral glucose tolerance tests were performed on conscious mice. Mice were fasted for 6 hours and fasted glycaemia was assessed with a drop of tail vein blood using an AccuCheck Performa glucometer (Roche Diagnostics). Mice then received an oral glucose load (2 g/kg body weight) and blood glucose was assessed as described above at -15, 0, 15, 30, 45, 60, 90 and 120 minutes.

### Liver histological sections and scoring

Paraformaldehyde-fixed, paraffin-embedded liver tissue was sliced into 3- $\mu$ m sections, deparaffinized, rehydrated, and stained with Hematoxylin-Eosin or Sirius Red for histopathological analysis. Slides each having two sections of a single hepatic lobe were digitized using a Mirax scanner from 3DHistech. Sections were visualized using CaseViewer software and each section was individually scored using a NAFLD scoring system (NAS) adapted from Kleiner et al. (Kleiner et al. 2005). A total of four variables were qualitatively assessed and ranked with a score: hepatocellular steatosis, liver inflammation, lobular fibrosis, and hepatocyte ballooning. A detailed summary of criteria for score assignments are presented in **table 1**.

**Table 1** : Precise criteria used in the NAS scoring system

Score	Steatosis	Inflammation	Fibrosis	Hepatocyte ballooning
0	<5% of liver parenchyma	No foci	None	None
1	5-33% of liver parenchyma	<2 foci at 20x field	Zone 3 and/or perisinusoidal fibrosis	Minimal to mild focal involving fewer than 3 hepatocytes per foci
2	34-66% of liver parenchyma	2 to 4 foci at 20x field	As grade 1 and portal fibrosis	Moderate multifocal involving more than 3 hepatocytes per foci
3	>66% of liver parenchyma	>4 foci at 20x field	As grade 2 and bridging fibrosis	Prominent multifocal involving large number of hepatocytes
4	Not applicable	Not applicable	Cirrhosis	Not applicable

### **Hepatic neutral lipids analysis**

Hepatic neutral lipid contents were determined at the end of the experiment as described previously (Régnier et al. 2018). Liver samples were homogenized in methanol/5 mM EGTA (2:1, v/v); lipids were extracted with chloroform/methanol/water (2.5:2.5:2.1, v/ v/v), in the presence of glyceryl trinonadecanoate, stigmasterol, and cholesteryl heptadecanoate (Sigma) as internal standards. Triglycerides, free cholesterol, and cholesterol esters were analysed by gas-liquid chromatography on a Focus Thermo Electron system.

### **Plasma analysis**

Blood samples were collected following a 6 hour fast for insulinemia assays or in fed-state before euthanasia for aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT) assays. Blood was collected from the sub-mandibular vein using a lancet into lithium-heparin coated tubes (BD Microtainer). Plasma was obtained by centrifugation (1500xg, 10min, 4°C) and stored at -80°C. Fasted insulinemia was assayed using the ultrasensitive mouse insulin ELISA kit (Crystal Chem). AST and ALT plasmatic levels were assayed using a PENTRA 400 biochemical analyser (Anexplo facility, Toulouse, France).

### **Microarray and qPCR gene expression studies.**

RNA was extracted from liver samples and qPCR assays were performed as previously described (Lukowicz et al. 2019) for gene expression analysis of *Tnfa* and *Pdgfr1β*. Primers used for qPCR assays are reported in **Table 2**. A microarray analysis on liver samples (n=6 per group) was performed at the GeT-TRiX facility (G noToul, G nopole Toulouse) using Agilent Sureprint G3 Mouse GE v2 microarrays (8x60K, design 074809) following the manufacturer's instructions. Microarray data and experimental details are available in NCBI's Gene Expression Omnibus (Edgar et al., 2002) and are accessible through GEO Series accession number

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSEXXXXX>). Microarray data were analyzed using R (R Core Team, 2018) and Bioconductor packages (Huber et al. 2015) as described in GEO accession GSEXXXXX. Raw data (median signal intensity) were filtered, log2 transformed, corrected for batch effects (microarray washing bath and labeling serials) and normalized using quantile method (Bolstad et al. 2003). A model was fitted using the limma lmFit function (Ritchie et al. 2015). Pair-wise comparisons between biological conditions were applied using specific contrasts. A correction for multiple testing was applied using Benjamini-Hochberg procedure (Benjamini 2010) to control the False Discovery Rate (FDR). Probes with  $FDR \leq 0.05$  were considered to be differentially expressed between conditions. Hierarchical clustering was applied to the samples and the differentially expressed probes using 1-Pearson correlation coefficient as distance and Ward's criterion for agglomeration. The clustering results are illustrated as a heatmap of expression signals. The enrichment of KEGG pathways was evaluated using Enrichr (Biotools). The differentially expressed gene list of CAR<sup>-/-</sup> males and females were compared in BaseSpace Correlation Engine (Illumina, NextBio) to compare the transcriptomic signature of CAR<sup>-/-</sup> mice to liver signatures of male mice submitted to a Choline/Folic deficient diet (GSE57524), male LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup> knockout mice fed a WD (western diet) (GSE38083) or female ER $\alpha$ <sup>-/-</sup> knockout mice fed a HFD (GSE95283).

**Table 2:** Oligonucleotide primers used for qPCR assays

Gene	GenBank number	Forward 5'-3'	Reverse 3'-5'
<i>Tnfa</i>	NM_013693	TCCCCAAAGGGATGAGAAGTTC	GCGCTGGCTCAGCCACT
<i>Pdgfr1<math>\beta</math></i>	NM_008809	TGTGCAGTTGCCTTACGACT	CAGGTGGGGTCCAAGATGAC

### Brain immunohistochemistry

Brains were fixed in PFA 4% solution and immersed in sucrose 15% for 24h followed by sucrose 30% (n=5 per group). Brains were then snap frozen and stored at -80°C. Slices (20 $\mu$ m) were obtained using a cryostat and immunohistochemistry was performed after PBS washes.

Slices were added with blocking solution (PBS, triton 0.5%, horse serum 20%) at room temperature for 1h. Primary antibodies (**Table 3**) were diluted in blocking solution and slices incubated overnight at 4°C. After PBS washes, secondary antibody was added in PBS for 2h at room temperature. After PBS washes, slices were mounted using Vectashield containing DAPI. For all quantifications, 20X Z-stack images (Z=12 to 15 planes, each of 1µm) were analysed using Fiji. Two slices were examined for each mouse to quantify signals in constant regions of interest (ROI), identified by DAPI maps: arcuate (AN) and paraventricular (PVN) nuclei of hypothalamus, Cortex (CTX), Dentate Gyrus (DG) and White Matter (WM). Prior to analysis, all Z-stacks images were combined (Z-project, sum) using Fiji. For GFAP quantification: images were converted to RGB stack format. Signal threshold was adjusted to 200 units for each image. Area of GFAP signal was calculated setting threshold sensitivity equal for each image. GFAP data are expressed as a percentage of ROI total pixels. For Iba1 quantification, a cell counter tool was used to calculate the total number of DAPI cells and the number of Iba1+ cells in each ROI. Data are expressed as percentage (Iba1+/tot DAPI+) x 100.

**Table 3** : Primary/secondary antibodies used for immunohistochemistry

Primary antibodies	Host	Vendor	Reference	Dilution
Anti-IBA1	Anti-rabbit	Wako Laboratory Chemicals	019-19741	1/1000
Anti-GFAP	Anti-chicken	Abcam	Ab4674	1/300
DAPI	Vectashield : mountain medium for fluorescence with DAPI	Vector Laboratories	H-1200	[DAPI] = 1.5µg/ml
Secondary antibodies	Host	Vendor	Reference	Dilution
Anti-IBA1	Donkey anti-rabbit Alexa Fluor 488	Jackson ImmunoResearch	711-545-152	1/500
Anti-GFAP	Donkey anti-chicken Alexa Fluor Cy3	Jackson ImmunoResearch	703-165-155	1/500

### Data representation and statistical analysis

All data are presented as mean +/- standard error of mean. Statistical analyses were performed using Mann-Whitney statistical test on GraphPad Prism (version 8.00; GraphPad Software). Significance threshold was set at p<0,05 (\*).



## Results

### **CAR deletion exacerbates HFD-induced body weight gain only in female mice**

Male mice present similar patterns of weight gain during the 16 weeks of diet with a total weight gain of  $25,7\pm 1,1$ g for WT and  $26,2\pm 0,8$ g for CAR<sup>-/-</sup> mice (Figure 1A). However, CAR<sup>-/-</sup> female mice gain  $30,5\pm 1,1$ g compared to  $14,5\pm 1,5$ g in WT (Figure 1B). At the last weigh-in (16 weeks), mean weight was  $47,3\pm 1,9$ g for WT males and  $49,5\pm 0,7$ g for CAR<sup>-/-</sup> males. CAR<sup>-/-</sup> females reached  $49,2\pm 1,2$ g compared to  $33,9\pm 1,4$ g in WT females. No difference was observed in food and water intake of WT and CAR<sup>-/-</sup> mice (Supplementary figure 1A-D)

At the end of the 16 weeks of diet, sub-cutaneous and epididymal white adipose tissues (WAT) were harvested and weighed. An increase in WAT weight was observed only in CAR<sup>-/-</sup> females (Figure 1D). Subcutaneous WAT was  $0,049\pm 0,004$ g in WT compared to  $0,073\pm 0,004$ g in CAR<sup>-/-</sup> females. Epididymal WAT was also increased from  $0,052\pm 0,005$ g in WT to  $0,068\pm 0,002$ g in CAR<sup>-/-</sup> females.

### **CAR deletion exacerbates HFD-induced hyperglycemia and hyperinsulinemia**

After 10 weeks of diet, glucose tolerance was assessed using an oral glucose tolerance test (OGTT). WT and CAR<sup>-/-</sup> males present equal glucose tolerance as indicated by an equal OGTT area under the curve (AUC) (Figure 2A). Conversely, CAR<sup>-/-</sup> female mice present decreased AUC, revealing better glucose tolerance than WT mice (Figure 2B). Similar results were obtained after 4 weeks of diet (data not shown). Fasted glycaemia and insulinemia levels were assessed, revealing a more important hyperglycaemia and hyperinsulinemia in CAR<sup>-/-</sup> mice compared to WT, in both male and female mice (Figure 2C, D).

### **CAR deletion exacerbates HFD-induced hepatic steatosis and liver injury**

After 16 weeks of HFD, liver samples were harvested for histological sectioning, haematoxylin-eosin staining and scoring of hepatocellular steatosis. WT males present mainly microvesicular hepatocellular steatosis (Figure 3A), with a mean steatosis score of  $2.00 \pm 0.21$ . CAR<sup>-/-</sup> males present a higher mean steatosis score of  $2.67 \pm 0.24$  with cells presenting mixed micro/macrovesicular steatosis or microvesicular steatosis (Figure 3A). In WT females, a score-1 microvesicular steatosis was observed in all animals, which is considerably lower than WT males (Figure 3B). CAR<sup>-/-</sup> females present a more severe steatosis, with a mean score of  $2.60 \pm 0.16$ , comparable to that described for CAR<sup>-/-</sup> males (Figure 3B).

Hepatic neutral lipids were analysed to support the histological observations. CAR<sup>-/-</sup> males present increased levels of cholesterol esters compared to WT mice (Figure 3C). In females, both cholesterol esters and triglycerides are increased in CAR<sup>-/-</sup> mice (Figure 3D).

To determine whether the observed steatosis presents markers of progression towards a more severe form such as NASH, inflammation scores were assessed by the presence of foci of mononuclear and polymorphonuclear cells. CAR<sup>-/-</sup> male mice present a discrete score-1 inflammation with changes comparable in appearance and distribution to those of WT mice (Figure 3E). Score-1 inflammation was also observed in both WT and CAR<sup>-/-</sup> females (Figure 3F). Despite no morphological differences, RNA expression of pro-inflammatory cytokine *Tnfa* is increased in both male and female CAR<sup>-/-</sup> mice (Figure 3E, F).

To further characterize the hepatic consequences of CAR deletion, plasmatic levels of Alanine Aminotransferase (ALT) and Aspartate Aminotransferase (AST) were assessed to evaluate liver injury. CAR<sup>-/-</sup> mice, both males and females, present increased levels of ALT and AST, suggesting underlying steatohepatitis (Figure 3G, H).

The presence of liver fibrosis was determined by analysis of histological slices stained with Sirius Red (Figure 4A, B).

Fibrosis scoring revealed a comparable score-1 peri-sinusoidal or peri-portal fibrosis in all groups and no transcriptional changes in expression of *Pdgfr1 $\beta$* , a marker for fibrosis (Figure 4A, B). Finally, no hepatocyte ballooning was observed in any groups. Overall, CAR<sup>-/-</sup> mice present more important hepatic steatosis and liver injury compared to WT mice.

### **Dimorphic impact of CAR deletion on hepatic transcriptome**

A microarray analysis was performed to assess the impact of CAR deletion on the hepatic transcriptome of HFD-fed mice. A principal component analysis (PCA) revealed an important effect of CAR deletion on hepatic transcriptome in males and females (Figure 5A), with a significant discrimination of WT and CAR<sup>-/-</sup> mice on the first principal component, representing 28,6% of total variance (Dim1). Clustering of male and female mice is reported on the second principal component (Dim2, 22,7% of total variance) with a convergence of CAR<sup>-/-</sup> females towards the male profile.

A heat map of 3354 probes selected as differentially expressed genes was plotted (Figure 5B). Nine clusters are distinguishable; cluster 1 is specifically downregulated in CAR<sup>-/-</sup> males whereas cluster 5 is specifically upregulated in CAR<sup>-/-</sup> females. Clusters 4 and 6 are impacted by sex: male vs female, whereas clusters 2, 8 and 9 by genotype: WT vs CAR<sup>-/-</sup>. Interestingly, the expression profiles of clusters 3 and 7 in CAR<sup>-/-</sup> female mice are closer to the profiles of males than of WT females. Enrichment analysis of Kegg pathways were performed for clusters 3 and 7. The 7 most significant pathways are presented in **supplementary table 1**.

Venn diagrams were plotted to compare variations between WT and CAR<sup>-/-</sup> in both sexes (Figure 5C, D). CAR<sup>-/-</sup> males and females present respectively 1643 and 1896 upregulated genes compared to WT. Only 810 up-regulated genes are common to both CAR<sup>-/-</sup> males and females.

Similarly, CAR<sup>-/-</sup> males and females present respectively 1550 and 1788 down-regulated genes compared to WT and only 367 down-regulated genes are common to both sexes. Thus, the majority of up and down-regulated genes in CAR<sup>-/-</sup> mice are not common to both sexes, revealing a dimorphic impact of CAR deletion on hepatic transcriptome. Enrichment analysis of upregulated genes in males revealed pathways such as osteoclast differentiation and natural killer cytotoxicity (Figure 5C). In females, thermogenesis and NAFLD are represented among up-regulated genes (Figure 5C). In males, steroid hormone biosynthesis as well as amino acid metabolism are negatively affected (Figure 5D). Protein processing in endoplasmic reticulum (ER) and spliceosome are the main pathways represented among down-regulated genes in females (Figure 5D). The 36 genes linked to the NAFLD pathway which are represented among the specifically up-regulated genes in CAR<sup>-/-</sup> females (Figure 5C) are presented in figure 5E. These genes were traced in the NAFLD *Kegg pathway* map (hsa04932) representing stage-dependent progression of NAFLD and are mainly involved in  $\beta$ -oxidation (Ndufa-b-s-c, Sdhb, Cyc1, Uqcrcq-c-s, Cox1-5-6-7-8) and inflammation (Jun) which are mechanisms disrupted in NASH conditions. Genes involved in simple steatosis mechanisms are also represented among specifically up-regulated genes in CAR<sup>-/-</sup> females (Gsk3, Prkab2).

### **Positive correlation between transcriptomic signatures of CAR<sup>-/-</sup> and ER $\alpha$ <sup>-/-</sup> females**

The hepatic transcriptomic signature of CAR<sup>-/-</sup> males and females was compared to other hepatic profiles using *Base Space Correlation Engine* (Illumina). For both males and females, an important positive correlation was revealed with profiles of mice fed a choline/folic deficient diet, and LXR $\alpha\beta$  knock-out mice fed a western diet (WD), which are both NASH-inducing diets (Figure 6A). The transcriptomic signature of CAR<sup>-/-</sup> females positively correlated with ER $\alpha$  knock-out females fed a HFD, whereas a negative correlation was revealed for CAR<sup>-/-</sup> males (Figure 6A).

Among up-regulated genes, 373 genes are common to both CAR<sup>-/-</sup> females and ER $\alpha$  females (Figure 6B). Enrichment analysis revealed that these genes are involved in NAFLD and oxidative phosphorylation which is disrupted in NASH conditions (Figure 6D). On the other hand, 345 down-regulated genes are common to CAR<sup>-/-</sup> and ER $\alpha$  females (Figure 6C) and are mostly involved in the spliceosome pathway and linoleic acid metabolism (Figure 6E).

### **CAR deletion associates with hypothalamic astrogliosis in HFD-fed females**

To assess the possible impact of CAR deletion and HFD on central nervous system homeostasis, specific brain regions were analysed. GFAP reactivity in the arcuate (AN) and paraventricular (PVN) nuclei of the hypothalamus was increased in CAR<sup>-/-</sup> females (Figure 7A, B). This astrogliosis is specific to the hypothalamus as it was not observed in other regions such as the Cortex (CTX), hippocampus (e.g., dentate gyrus) and White Matter (WM) (Figure 7C). No GFAP expression changes were observed in males (Supp. Figure 2 A).

In addition, IBA1 microglial reactivity was unchanged across experimental conditions with the exception of the WM in males (Supp. Figure 2 B) and AN in females (Supp. Figure 2 C). These results, exclude the presence of significant, or widespread, pro-inflammatory changes, while pointing to a possible, and specific, involvement of hypothalamic astrocytes in female mice.

### **Discussion**

The results presented in this study advance our understanding of the role of CAR in the development of NAFLD. Our results reveal a preponderant role of CAR in females through protection from metabolic disorders induced by a HFD such as obesity, hyperglycemia, hyperinsulinemia and hypothalamic astrogliosis. Importantly, CAR seems to protect females from NAFLD and the progression towards more severe forms such as NASH. In males, CAR implications are limited to hyperglycemia, hyperinsulinemia and hepatic injury.

Several studies aimed at investigating the role of CAR in the development of NAFLD/NASH, yet existing results are contradictory. CAR activation in HFD-fed mice was reported to improve hepatic steatosis by decreasing lipogenesis and inducing  $\beta$ -oxidation (Dong et al. 2009). However, CAR activation in MCD diet-fed NASH mice (methionine-choline deficient diet) was reported to worsen hepatic fibrosis (Yamazaki et al. 2007) and promote hepatocarcinogenesis (Kettner et al. 2016; Takizawa et al. 2011). Most of the studies focused on CAR's role in the pathogenesis of NAFLD were carried-out on males only and therefore they did not investigate the dimorphic role of CAR.

Here, we reveal an important role of CAR in the protection of female mice against NAFLD and a potential NASH transition. Interestingly, several studies highlighted a protection of premenopausal women, which is lost after menopause. A recent meta-analysis of 54 studies revealed that women have a 19% lower risk of NAFLD than men, however, once NAFLD is established, women have similar risk of progression to NASH and a 37% higher risk of advanced fibrosis (Balakrishnan et al. 2021). The protection of premenopausal women from NAFLD involves estrogens which reduce hepatic lipid accumulation and suppress liver inflammation and fibrosis (C. Lee, Kim, and Jung 2019). Moreover, silencing  $ER\alpha$  expression in the liver using an adenoviral short hairpin RNA markedly increases hepatic triglyceride accumulation in HFD-fed C57BL/6 female mice (X. Wang et al. 2015). Consistently, deletion of  $ER\alpha$  in the liver abolishes E2-induced protection against HFD-induced steatosis (Guillaume et al. 2019). In our study, selected CAR functions overlap with  $ER\alpha$ , as CAR deletion in females leads to a greater accumulation of lipids in the liver in response to a HFD-diet (Figure **3B**). This lipid accumulation is associated with an increase in ALT and AST levels in CAR<sup>-/-</sup> mice in both males and females suggesting a role of this receptor in the progression from NAFLD to NASH (Figure **3G** and **H**).

However, a Sirius Red staining of liver slices did not reveal changes in fibrosis levels between WT and CAR<sup>-/-</sup> mice. A more extended administration of the HFD would probably have been necessary to reveal such markers. In fact, in a recent study, authors revealed that a prolonged administration of HFD (80 weeks) in mice, induces NASH-like disruptions such as hepatic inflammation and fibrosis (Velázquez et al. 2019).

The transcriptomes of HFD-fed CAR<sup>-/-</sup> males and females are closer than those of WT males and females as illustrated on the PCA analysis in Figure 5A and the heatmap in Figure 5B. CAR deletion in females brings their transcriptomes closer to the male profile. Moreover, the impact of CAR deletion appears to be greater in females than in males (Figure 5A) with a more important number of up and down-regulated genes (Figure 5C-D), which is consistent with the development of more severe metabolic disorders in CAR<sup>-/-</sup> females (Figures 1B and 2B). Clusters 3 and 7 depicted in the heatmap are specifically disrupted in CAR<sup>-/-</sup> females (Figure 5B). The profiles of these two clusters also highlights that the loss of CAR brings the female transcriptome closer to that of males. Further analysis revealed that the NAFLD pathway is significantly enriched among genes up-regulated specifically in CAR<sup>-/-</sup> females (Figure 5C, E). These genes were traced in the NAFLD *Kegg pathway* map representing stage-dependent progression of NAFLD. They are involved in inflammation and oxidative phosphorylation and therefore fit into a pattern of a NAFLD to NASH transition. Consistently, the *Base Space Correlation Engine* analysis highlights an important positive correlation of liver transcriptomes of HFD-fed CAR<sup>-/-</sup> males and females and mice fed a choline/folate deficient diet, a NASH-inducing diet (Stephenson et al. 2017). This analysis also revealed a positive correlation between the transcriptomes of HFD-fed CAR<sup>-/-</sup> mice and western diet-fed LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup> mice, confirming the previously reported CAR/LXR crosstalk (L. Xiao, Xie, and Zhai 2010). Interestingly, a correlation between HFD-Fed-CAR<sup>-/-</sup> mice and HFD-fed ER $\alpha$ <sup>-/-</sup> mice was observed only in females, revealing an undescribed yet CAR and ER $\alpha$  crosstalk.

The cross-talk between CAR and ER $\alpha$  signaling pathway could lead to estrogen inefficiency when CAR is absent as when ER $\alpha$  is absent (Guillaume et al. 2019).

Another interesting result of our study is the presence of sex and region-specific adaptations of the central nervous system of HFD-fed CAR $^{-/-}$  mice compared to WT. We report astrogliosis in response to the HFD and CAR deletion, specifically in the hypothalamus and in females. In the hypothalamus, astrocytes perform various functions that can directly affect energy homeostasis such as nutrient sensing and transport (Bélanger, Allaman, and Magistretti 2011). In addition, a HFD-induced metabolic stress is known to induce astrogliosis, described as a protective homeostatic response which restrains food intake in response to the diet (Buckman et al. 2015). Some studies have reported that females are protected from the deleterious effects of HFD on brain homeostasis and that this protection involves the estrogen receptor ER $\alpha$  (Morselli et al. 2016). Collectively, evidence suggests that a protective role of CAR in females may extend to organs other than the liver.

Overall, these findings provide further insights in the dimorphic pathogenesis of NAFLD by revealing an important role of nuclear receptor CAR in the protection of females from HFD-induced peripheral and central metabolic disruptions. CAR seems to protect females from NAFLD and potential NASH transition and it should therefore be further considered for the development of potential therapeutic targets in the treatment of NAFLD/NASH.

### **Acknowledgements**

We thank Colette Bétoulières and the *EZOP* facility in ToxAlim for breeding of CAR $^{-/-}$  mice, Virgile Richard of *SciempathBio* for the work on analysis of histological slices for NAFLD/NASH/fibrosis scoring, *Anexplor* facility of Genotoul for plasmatic analysis, *Metatoul* facility of I2MC for hepatic neutral lipid analysis. This work was supported by grants from the



“Agence Nationale de la Recherche” ANR-Hepatobrain. Fabiana Oliviero is the recipient of a PhD fellowship from the ANR-Hepatobrain.

## Bibliographic references

- Abass, Khaled, and Olavi Pelkonen. 2013. “The Inhibition of Major Human Hepatic Cytochrome P450 Enzymes by 18 Pesticides: Comparison of the N-in-One and Single Substrate Approaches.” *Toxicology in Vitro : An International Journal Published in Association with BIBRA* 27 (5): 1584–88. <https://doi.org/10.1016/J.TIV.2012.05.003>.
- Abdourahime, Himdata, Maria Anastassiadou, Maria Arena, Domenica Auteri, Stefania Barmaz, Alba Brancato, Daniela Brocca, et al. 2019. “Peer Review of the Pesticide Risk Assessment of the Active Substance Thiacloprid.” *EFSA Journal* 17 (3). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2019.5595>.
- Abe, Taiki, Mirei Takahashi, Makoto Kano, Yuto Amaike, · Chizuru Ishii, Kazuhiro Maeda, Yuki Kudoh, et al. 2017. “Activation of Nuclear Receptor CAR by an Environmental Pollutant Perfluorooctanoic Acid.” *Arch Toxicol* 3: 2365–74. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1888-3>.
- Akinrodoye, MA, and F Lui. 2020. “Neuroanatomy, Somatic Nervous System.” *StatPearls*, April. <http://europepmc.org/books/NBK556027>.
- Akmayev, I. G., and A. P. Popov. 1977. “Morphological Aspects of the Hypothalamic-Hypophyseal System.” *Cell and Tissue Research* 1977 180:2 180 (2): 263–82. <https://doi.org/10.1007/BF00231958>.
- Al-Eryani, Laila, Banrida Wahlang, K C Falkner, J J Guardiola, H B Clair, R A Prough, and Matt Cave. 2015. “Identification of Environmental Chemicals Associated with the Development of Toxicant-Associated Fatty Liver Disease in Rodents.” *Toxicologic Pathology* 43 (4): 482–97. <https://doi.org/10.1177/0192623314549960>.
- Al-Lahham, Rabab, James H. Deford, and John Papaconstantinou. 2016. “Mitochondrial-Generated ROS down Regulates Insulin Signaling via Activation of the P38MAPK Stress Response Pathway.” *Molecular and Cellular Endocrinology* 419 (January): 1–11. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2015.09.013>.
- Ali, AH, EJ Carey, and KD Lindor. 2015. “Recent Advances in the Development of Farnesoid X Receptor Agonists.” *Annals of Translational Medicine* 3 (1). <https://doi.org/10.3978/J.ISSN.2305-5839.2014.12.06>.
- Almad, Akshata, and Nicholas J Maragakis. 2018. “A Stocked Toolbox for Understanding the Role of Astrocytes in Disease.” *Nature Reviews. Neurology* 14 (6): 351–62. <https://doi.org/10.1038/S41582-018-0010-2>.
- Anand, B. K., and J. R. Brobeck. 1951. “Hypothalamic Control of Food Intake in Rats and Cats.” *The Yale Journal of Biology and Medicine* 24 (2): 123–40. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2599116/>.
- Anderson, Gail D. 2005. “Sex and Racial Differences in Pharmacological Response: Where Is the Evidence? Pharmacogenetics, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics.” *Journal of Women’s Health*. Mary Ann Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/jwh.2005.14.19>.
- Anses. 2011. “Etude de l’alimentation Totale Française 2 (EAT2)” Tome 1.
- . 2015. “NOTE de l’Anses Relative à l’état Des Connaissances Sur Les Usages, Les Sources d’exposition et La Toxicité de Plusieurs Perflorés et Phtalates: Présentation de La Question Posée et Organisation de l’expertise ” RAPPORT de l’Anses ... (Connaissances relatives aux données de contamination et aux expositions par des

- composés de la famille des Perfluorés).
- Arguello, Graciela, Elisa Balboa, Marco Arrese, and Silvana Zanlungo. 2015. “Recent Insights on the Role of Cholesterol in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease.” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.05.015>.
- Arias, Clorinda, Angélica Zepeda, Karina Hernández-Ortega, Perla Leal-Galicia, Cinthia Lojero, and Ignacio Camacho-Arroyo. 2009. “Sex and Estrous Cycle-Dependent Differences in Glial Fibrillary Acidic Protein Immunoreactivity in the Adult Rat Hippocampus.” *Hormones and Behavior* 55 (1): 257–63. <https://doi.org/10.1016/J.YHBEH.2008.10.016>.
- Armstrong, Laura E., Maureen V. Driscoll, Vijay R. More, Ajay C. Donepudi, Jialin Xu, Angela Baker, Lauren M. Aleksunes, Jason R. Richardson, and Angela L. Slitt. 2013. “Effects of Developmental Deltamethrin Exposure on White Adipose Tissue Gene Expression.” *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 27 (2): 165–71. <https://doi.org/10.1002/JBT.21477>.
- Balakrishnan, Maya, Parth Patel, Sydney Dunn-Valadez, Cecilia Dao, Vinshi Khan, Hiba Ali, Laith El-Serag, et al. 2021. “Women Have a Lower Risk of Nonalcoholic Fatty Liver Disease but a Higher Risk of Progression vs Men: A Systematic Review and Meta-Analysis.” *Clin Gastroenterol Hepatol* 19 (1): 61–71.
- Ballestri, Stefano, Fabio Nascimbeni, Enrica Baldelli, Alessandra Marrazzo, Dante Romagnoli, and Amedeo Lonardo. 2017. “NAFLD as a Sexual Dimorphic Disease: Role of Gender and Reproductive Status in the Development and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Inherent Cardiovascular Risk.” *Advances in Therapy*. Springer Healthcare. <https://doi.org/10.1007/s12325-017-0556-1>.
- Baskin-Bey, Edwina S, Akira Anan, Hajime Isomoto, Steven F Bronk, and Gregory J Gores. 2007. “Constitutive Androstane Receptor Agonist, TCPOBOP, Attenuates Steatohepatitis in the Methionine Choline-Deficient Diet-Fed Mouse.” *World Journal of Gastroenterology : WJG* 13 (42): 5635. <https://doi.org/10.3748/WJG.V13.I42.5635>.
- Beggs, Kevin M., Steven R. McGreal, Alex McCarthy, Sumedha Gunewardena, Jed N. Lampe, Christopher Lau, and Udayan Apte. 2016. “The Role of Hepatocyte Nuclear Factor 4-Alpha in Perfluorooctanoic Acid- and Perfluorooctanesulfonic Acid-Induced Hepatocellular Dysfunction.” *Toxicology and Applied Pharmacology* 304 (August): 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.05.001>.
- Bélanger, Mireille, Igor Allaman, and Pierre J. Magistretti. 2011. “Brain Energy Metabolism: Focus on Astrocyte-Neuron Metabolic Cooperation.” *Cell Metabolism*. Cell Metab. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.08.016>.
- Benjamini, Yoav. 2010. “Discovering the False Discovery Rate.” *Journal of the Royal Statistical Society. Series B: Statistical Methodology* 72 (4): 405–16. <https://doi.org/10.1111/j.1467-9868.2010.00746.x>.
- Beyaz, Semir, Miyeko D. Mana, Jatin Roper, Dmitriy Kedrin, Assieh Saadatpour, Sue Jean Hong, Khristian E. Bauer-Rowe, et al. 2016. “High-Fat Diet Enhances Stemness and Tumorigenicity of Intestinal Progenitors.” *Nature* 531 (7592): 53–58. <https://doi.org/10.1038/NATURE17173>.
- Bhaskar, Rakesh, and Banalata Mohanty. 2014. “Pesticides in Mixture Disrupt Metabolic Regulation: In Silico and in Vivo Analysis of Cumulative Toxicity of Mancozeb and Imidacloprid on Body Weight of Mice.” *General and Comparative Endocrinology* 205 (September): 226–34. <https://doi.org/10.1016/J.YGCEN.2014.02.007>.
- Biegel, Lisa B, Mark E Hurtt, Steven R Frame, John C O’Connor, and Jon C Cook. 2001. “Mechanisms of Extrahepatic Tumor Induction by Peroxisome Proliferators in Male CD Rats | Toxicological Sciences | Oxford Academic.” *Toxicological Sciences*. March 2001.

- <https://academic.oup.com/toxsci/article/60/1/44/1686497>.
- Bieghs, Veerle, Patrick J. Van Gorp, Kristiaan Wouters, Tim Hendriks, Marion J. Gijbels, Marc van Bilsen, Jaap Bakker, et al. 2012. "LDL Receptor Knock-Out Mice Are a Physiological Model Particularly Vulnerable to Study the Onset of Inflammation in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *PLOS ONE* 7 (1): e30668. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0030668>.
- Bjork, J. A., J. L. Butenhoff, and K. B. Wallace. 2011. "Multiplicity of Nuclear Receptor Activation by PFOA and PFOS in Primary Human and Rodent Hepatocytes." *Toxicology* 288 (1–3): 8–17. <https://doi.org/10.1016/J.TOX.2011.06.012>.
- Bjork, James A, and Kendall B Wallace. 2009. "Structure-Activity Relationships and Human Relevance for Perfluoroalkyl Acid-Induced Transcriptional Activation of Peroxisome Proliferation in Liver Cell Cultures." *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology* 111 (1): 89–99. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFP093>.
- Bolstad, B. M., R. A. Irizarry, M. Åstrand, and T. P. Speed. 2003. "A Comparison of Normalization Methods for High Density Oligonucleotide Array Data Based on Variance and Bias." *Bioinformatics* 19 (2): 185–93. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/19.2.185>.
- Bradl, Monika, and Hans Lassmann. 2010. "Oligodendrocytes: Biology and Pathology." *Acta Neuropathol* 119: 37–53. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0601-5>.
- Brobeck, J. R. 1946. "Mechanism of the Development of Obesity in Animals with Hypothalamic Lesions." *Physiological Reviews* 26 (4): 541–59. <https://doi.org/10.1152/physrev.1946.26.4.541>.
- Bryzgalova, G., H. Gao, B. Ahren, J.R. Zierath, D. Galuska, T.L. Steiler, K. Dahlman-Wright, 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* 2006 49:3 49 (3): 588–97. <https://doi.org/10.1007/S00125-005-0105-3>.
- Buckman, Laura B., Misty M. Thompson, Rachel N. Lippert, Timothy S. Blackwell, Fiona E. Yull, and Kate L.J. Ellacott. 2015. "Evidence for a Novel Functional Role of Astrocytes in the Acute Homeostatic Response to High-Fat Diet Intake in Mice." *Molecular Metabolism* 4 (1): 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2014.10.001>.
- Bugianesi, Moscatiello, Ciaravella, and Marchesini. 2010. "Insulin Resistance in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *Curr Pharm Des. Curr Pharm Des.* <https://doi.org/10.2174/138161210791208875>.
- Cariou, B, R Hanf, S Lambert-Porcheron, Y Zaïr, V Sauvinet, B Noël, L Flet, H Vidal, B Staels, and M Laville. 2013. "Dual Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\alpha/\delta$  Agonist GFT505 Improves Hepatic and Peripheral Insulin Sensitivity in Abdominally Obese Subjects." *Diabetes Care* 36 (10): 2923–30. <https://doi.org/10.2337/DC12-2012>.
- Casals-Casas, Cristina, a atrice Desvergne. 2011. "Endocrine Disruptors: From Endocrine to Metabolic Disruption." *Annual Review of Physiology* 73: 135–62. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHYSIOL-012110-142200>.
- Castera, Laurent, Mireen Friedrich-Rust, and Rohit Loomba. 2019. "Noninvasive Assessment of Liver Disease in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Gastroenterology*. W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.12.036>.
- Cave, Matt, Keith Cameron Falkner, and Craig McClain. 2012. "Occupational and Environmental Hepatotoxicity." *Zakim and Boyer's Hepatology*, 476–92. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0881-3.00027-9>.
- Cave, Matthew C., Heather B. Clair, Josiah E. Hardesty, K. Cameron Falkner, Wenke Feng, Barbara J. Clark, Jennifer Sidey, et al. 2016. "Nuclear Receptors and Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1859 (9): 1083–99. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGRM.2016.03.002>.

- Cave, Matthew, Ion Deaciuc, Christian Mendez, Zhenyuan Song, Swati Joshi-barve, Shirish Barve, and Craig McClain. 2007. "Nonalcoholic Fatty Liver Disease : Predisposing Factors and the Role of Nutrition B" 18: 184–95. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2006.12.006>.
- Christian, Mark. 2013. "Nuclear Receptor-Mediated Regulation of Lipid Droplet-Associated Protein Gene Expression in Adipose Tissue." *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* 14 (3): 87–97. <https://doi.org/10.1515/HMBCI-2013-0028>.
- Claus, Sandrine P., Hervé Guillou, and Sandrine Ellero-Simatos. 2016. "The Gut Microbiota: A Major Player in the Toxicity of Environmental Pollutants?" *Npj Biofilms and Microbiomes* 2 (May). <https://doi.org/10.1038/NPJBIOFILMS.2016.3>.
- Clodfelter, Karl H., Minita G. Holloway, Paul Hodor, Soo Hee Park, William J. Ray, and David J. Waxman. 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." *Molecular Endocrinology* 20 (6): 1333–51. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0489>.
- Clotman, Frédéric, and Frédéric P. Lemaigre. 2006. "Control of Hepatic Differentiation by Activin/TGF $\beta$  Signaling." *Cell Cycle*. Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.4161/cc.5.2.2341>.
- Cohen. 2011. "NIH Public Access." *Science* 332 (6037): 1519–23. <https://doi.org/10.1126/science.1204265.Human>.
- Cole, Susan P.C. 2014. "Multidrug Resistance Protein 1 (Mrp1, Abcc1), a 'Multitasking' ATP-Binding Cassette (Abc,) Transporter." *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc. <https://doi.org/10.1074/jbc.R114.609248>.
- Cone, R. D., M. A. Cowley, A. A. Butler, W. Fan, D. L. Marks, and M. J. Low. 2001. "The Arcuate Nucleus as a Conduit for Diverse Signals Relevant to Energy Homeostasis." *International Journal of Obesity* 25: S63–67. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801913>.
- Coumoul, Xavier, Monique Diry, and Robert Barouki. 2002. "PXR-Dependent Induction of Human CYP3A4 Gene Expression by Organochlorine Pesticides." *Biochemical Pharmacology* 64 (10): 1513–19. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)01298-4](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(02)01298-4).
- Cui, Lin, Chun-yang Liao, Qun-fang Zhou, Tong-mei Xia, Zhao-jun Yun, and Gui-bin Jiang. 2010. "Excretion of PFOA and PFOS in Male Rats during a Subchronic Exposure." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 58 (1): 205–13. <https://doi.org/10.1007/S00244-009-9336-5>.
- Cusi, Kenneth. 2009. "Role of Insulin Resistance and Lipotoxicity in Non-Alcoholic Steatohepatitis." *Clinics in Liver Disease*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2009.07.009>.
- Das, Kaberi P., Carmen R. Wood, Mimi J. Lin, Anatoly A. Starkov, Christopher Lau, Kendall B. Wallace, J. Christopher Corton, and Barbara D. Abbott. 2017. "Perfluoroalkyl Acids-Induced Liver Steatosis: Effects on Genes Controlling Lipid Homeostasis." *Toxicology* 378 (March): 37–52. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.12.007>.
- Decaens, Thomas, Cécile Godard, Aurélien De Reyniès, David S. Rickman, François Tronche, Jean Pierre Couty, Christine Perret, and Sabine Colnot. 2008. "Stabilization of  $\beta$ -Catenin Affects Mouse Embryonic Liver Growth and Hepatoblast Fate." *Hepatology* 47 (1): 247–58. <https://doi.org/10.1002/hep.21952>.
- Dobbins, R, P Gholam, S Ertel, N Furey, GM Baskaran, Z Goodman, D Oldach, and P Fernandes. n.d. "Solithromycin Treatment for 13 Weeks Improves Histological.... EASL LiverTree™. Gholam P. Apr 22 2017; 168249." Accessed July 9, 2021. <https://liver.tree.easl.eu/easl/2017/international.liver.congress/168249/pierre.gholam.solit>

- hromycin.treatment.for.13.weeks.improves.histological.html.
- Domitrović, Robert, Hrvoje Jakovac, Jelena Tomac, and Ivana Šain. 2009. "Liver Fibrosis in Mice Induced by Carbon Tetrachloride and Its Reversion by Luteolin." *Toxicology and Applied Pharmacology* 241 (3): 311–21. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2009.09.001>.
- Dong, Bingning, Ju-Seog Lee, Yun-Yong Park, Feng Yang, Ganyu Xu, Wendong Huang, Milton J. Finegold, and David D. Moore. 2015. "Activating CAR and  $\beta$ -Catenin Induces Uncontrolled Liver Growth and Tumorigenesis." *Nature Communications* 2015 6:1 6 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms6944>.
- Dong, Bingning, Pradip K. Saha, Wendong Huang, Wenling Chen, Lutfi A. Abu-Elheiga, Salih J. Wakil, Robert D. Stevens, et al. 2009. "Activation of Nuclear Receptor CAR Ameliorates Diabetes and Fatty Liver Disease." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (44): 18831–36. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909731106>.
- Dongiovanni, Paola, Benedetta Donati, Roberta Fares, Rosa Lombardi, Rosellina Margherita Mancina, Stefano Romeo, and Luca Valenti. 2013. "PNPLA3 I148M Polymorphism and Progressive Liver Disease." *World Journal of Gastroenterology : WJG* 19 (41): 6969. <https://doi.org/10.3748/WJG.V19.I41.6969>.
- Du, G, H Huang, J Hu, Y Qin, D Wu, L Song, Y Xia, and X Wang. 2013. "Endocrine-Related Effects of Perfluorooctanoic Acid (PFOA) in Zebrafish, H295R Steroidogenesis and Receptor Reporter Gene Assays." *Chemosphere* 91 (8): 1099–1106. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2013.01.012>.
- Du, Guizhen, Ouxi Shen, Hong Sun, Juan Fei, Chuncheng Lu, Ling Song, Yankai Xia, Shoulin Wang, and Xinru Wang. 2010. "Assessing Hormone Receptor Activities of Pyrethroid Insecticides and Their Metabolites in Reporter Gene Assays." *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology* 116 (1): 58–66. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFQ120>.
- Dulai, PS, S Singh, J Patel, M Soni, LJ Prokop, Z Younossi, G Sebastiani, et al. 2017. "Increased Risk of Mortality by Fibrosis Stage in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Systematic Review and Meta-Analysis." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 65 (5): 1557–65. <https://doi.org/10.1002/HEP.29085>.
- Dzierlenga, Anika L, Veronica G Robinson, Suramya Waidyanatha, Michael J DeVito, Max A Eifrid, Seth T Gibbs, Courtney A Granville, and Chad R Blystone. 2020. "Toxicokinetics of Perfluorohexanoic Acid (PFHxA), Perfluorooctanoic Acid (PFOA) and Perfluorodecanoic Acid (PFDA) in Male and Female Hsd:Sprague Dawley SD Rats Following Intravenous or Gavage Administration." *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems* 50 (6): 722–32. <https://doi.org/10.1080/00498254.2019.1683776>.
- EFSA. 2015. "The 2013 European Union Report on Pesticide Residues in Food." *EFSA Journal* 13 (3). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2015.4038>.
- Evangelou, Evangelos, Georgios Ntritsos, Maria Chondrogiorgi, Fotini K. Kavvoura, Antonio F. Hernández, Evangelia E. Ntzani, and Ioanna Tzoulaki. 2016. "Exposure to Pesticides and Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Environment International* 91 (May): 60–68. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2016.02.013>.
- Everett, Charles J, and Eric M Matheson. 2010. "Biomarkers of Pesticide Exposure and Diabetes in the 1999-2004 National Health and Nutrition Examination Survey." *Environment International* 36 (4): 398–401. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2010.02.010>.
- Fabbrini, Elisa, B. Selma Mohammed, Kevin M. Korenblat, Faidon Magkos, Jennifer McCrea, Bruce W. Patterson, and Samuel Klein. 2010. "Effect of Fenofibrate and Niacin on Intrahepatic Triglyceride Content, Very Low-Density Lipoprotein Kinetics, and

- Insulin Action in Obese Subjects with Nonalcoholic Fatty Liver Disease.” *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 95 (6): 2727. <https://doi.org/10.1210/JC.2009-2622>.
- Fargion, Silvia, Marianna Porzio, and Anna Ludovia Fracanzani. 2014. “Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Vascular Disease: State-of-the-Art.” *World Journal of Gastroenterology* 20 (37): 13306–24. <https://doi.org/10.3748/WJG.V20.I37.13306>.
- Farrell, Geoffrey C., Jacob George, Pauline de la M. Hall, and Arthur J. McCullough. 2007. *Fatty Liver Disease: NASH and Related Disorders*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470987438>.
- Fernandes, Prabhavathi, Taishi Hashiguchi, Masato Fujii, and Hiroyuki Yoneyama. 2014. “850f Anti-NASH Effects of Solithromycin in NASH-HCC Mouse Model.” *Gastroenterology* 146 (5): S-145-S-146. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(14\)60517-5](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(14)60517-5).
- Fernández-Miranda, C., M. Pérez-Carreras, F. Colina, G. López-Alonso, C. Vargas, and J. A. Solís-Herruzo. 2008. “A Pilot Trial of Fenofibrate for the Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease.” *Digestive and Liver Disease* 40 (3): 200–205. <https://doi.org/10.1016/J.DLD.2007.10.002>.
- Filgo, Adam J., Erin M. Quist, Mark J. Hoenerhoff, Amy E. Brix, Grace E. Kissling, and Suzanne E. Fenton. 2015. “Perfluorooctanoic Acid (PFOA)–Induced Liver Lesions in Two Strains of Mice Following Developmental Exposures:PPAR $\alpha$  Is Not Required.” *Toxicologic Pathology* 43 (4): 558–68. <https://doi.org/10.1177/0192623314558463>.
- Fleeker, James R., H. Morgan Lacy, R. Schultz Imogene, and Everin C. Houkom. 1974. “Persistence and Metabolism of Thiophanate-Methyl in Soil.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 22 (4): 592–95. <https://doi.org/10.1021/JF60194A046>.
- Fragki, Styliani, Hubert Dirven, Tony Fletcher, Bettina Grasl-Kraupp, Kristine Bjerve Gützkow, Ron Hoogenboom, Sander Kersten, et al. 2021. “Systemic PFOS and PFOA Exposure and Disturbed Lipid Homeostasis in Humans: What Do We Know and What Not?” *Critical Reviews in Toxicology* 51 (2): 141–64. <https://doi.org/10.1080/10408444.2021.1888073>.
- Frawley, Rachel P, Matthew Smith, Mark F Cesta, Schantel Hayes-Bouknight, Chad Blystone, Grace E Kissling, Shawn Harris, and Dori Germolec. 2018. “Immunotoxic and Hepatotoxic Effects of Perfluoro-n-Decanoic Acid (PFDA) on Female Harlan Sprague-Dawley Rats and B 6 C 3 F 1/N Mice When Administered by Oral Gavage for 28 Days.” *Journal of Immunotoxicology* 15 (1): 41–52. <https://doi.org/10.1080/1547691X.2018.1445145>.
- Frayling, Cameron, Ruth Britton, and Nicholas Dale. 2011. “ATP-Mediated Glucosensing by Hypothalamic Tanycytes.” *The Journal of Physiology* 589 (9): 2275–86. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2010.202051>.
- Fromme, Hermann, Sheryl A Tittlemier, Wolfgang Völkel, Michael Wilhelm, and Dorothee Twardella. 2009. “Perfluorinated Compounds--Exposure Assessment for the General Population in Western Countries.” *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 212 (3): 239–70. <https://doi.org/10.1016/J.IJHEH.2008.04.007>.
- Fu, Xiaohua, Lili Xing, Weihai Xu, and Jing Shu. 2016. “Treatment with Estrogen Protects against Ovariectomy-Induced Hepatic Steatosis by Increasing AQP7 Expression.” *Molecular Medicine Reports* 14 (1): 425–31. <https://doi.org/10.3892/MMR.2016.5236>.
- Fuchs, Michael, and Arun J. Sanyal. 2012. “Lipotoxicity in NASH.” *Journal of Hepatology*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.05.019>.
- Fuda, Hirotooshi, Young C. Lee, Chikara Shimizu, Norman B. Javitt, and Charles A. Strott. 2002. “Mutational Analysis of Human Hydroxysteroid Sulfotransferase SULT2B1 Isoforms Reveals That Exon 1B of the SULT2B1 Gene Produces Cholesterol

- Sulfotransferase, Whereas Exon 1A Yields Pregnenolone Sulfotransferase.” *Journal of Biological Chemistry* 277 (39): 36161–66. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207165200>.
- Fujii, Yukiko, Tamon Niisoe Niisoe, Kouji H Harada, Shinji Uemoto, Yasuhiro Ogura, Katsunobu Takenaka, and Akio Koizumi. 2015. “Toxicokinetics of Perfluoroalkyl Carboxylic Acids with Different Carbon Chain Lengths in Mice and Humans.” *Journal of Occupational Health* 57 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1539/JOH.14-0136-OA>.
- Fujimoto, Toyoshi, and Robert G. Parton. 2011. “Not Just Fat: The Structure and Function of the Lipid Droplet.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (3): 1–17. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A004838>.
- Gao, Bei, Xiaoming Bian, Ridwan Mahbub, and Kun Lu. 2017. “Sex-Specific Effects of Organophosphate Diazinon on the Gut Microbiome and Its Metabolic Functions.” *Environmental Health Perspectives* 125 (2): 198–206. <https://doi.org/10.1289/EHP202>.
- Gao, J, J He, Y Zhai, T Wada, and W Xie. 2009. “The Constitutive Androstane Receptor Is an Anti-Obesity Nuclear Receptor That Improves Insulin Sensitivity.” *The Journal of Biological Chemistry* 284 (38): 25984–92. <https://doi.org/10.1074/JBC.M109.016808>.
- Geer, Eliza B., and Wei Shen. 2009. “Gender Differences in Insulin Resistance, Body Composition, and Energy Balance.” *Gender Medicine* 6 (Suppl 1): 60. <https://doi.org/10.1016/J.GENM.2009.02.002>.
- Ghafour-Rashidi, Zahra, Elham Dermenaki-Farahani, Atousa Aliahmadi, Hadi Esmaily, Azadeh Mohammadirad, Seyed Nasser Ostad, and Mohammad Abdollahi. 2007. “Protection by CAMP and CGMP Phosphodiesterase Inhibitors of Diazinon-Induced Hyperglycemia and Oxidative/Nitrosative Stress in Rat Langerhans Islets Cells: Molecular Evidence for Involvement of Non-Cholinergic Mechanisms.” *Pesticide Biochemistry and Physiology* 87 (3): 261–70. <https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2006.08.007>.
- Ghareeb, Doaa A, Hani S Hafez, Hend M Hussien, and Nihal F Kabapy. 2011. “Non-Alcoholic Fatty Liver Induces Insulin Resistance and Metabolic Disorders with Development of Brain Damage and Dysfunction.” *Metabolic Brain Disease* 26 (4): 253–67. <https://doi.org/10.1007/S11011-011-9261-Y>.
- Giesy, John P, Keith R Solomon, Don Mackay, and Julie Anderson. 2014. “Evaluation of Evidence That the Organophosphorus Insecticide Chlorpyrifos Is a Potential Persistent Organic Pollutant (POP) or Persistent, Bioaccumulative, and Toxic (PBT).” *Environmental Sciences Europe* 26:1 26 (1): 1–20. <https://doi.org/10.1186/S12302-014-0029-Y>.
- Glass, Lisa M., Christine M. Hunt, Michael Fuchs, and Grace L. Su. 2019. “Comorbidities and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The Chicken, the Egg, or Both?” *Federal Practitioner* 36 (2): 64. [/pmc/articles/PMC6411365/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3111365/).
- Goecke, C M, B M Jarnot, and N V Reo. 1992. “A Comparative Toxicological Investigation of Perfluorocarboxylic Acids in Rats by Fluorine-19 NMR Spectroscopy.” *Chemical Research in Toxicology* 5 (4): 512–19. <https://doi.org/10.1021/TX00028A009>.
- González-Granillo, Marcela, Luisa A. Helguero, Eliana Alves, Amena Archer, Christina Savva, Matteo Pedrelli, Osman Ahmed, et al. 2019. “Sex-Specific Lipid Molecular Signatures in Obesity-Associated Metabolic Dysfunctions Revealed by Lipidomic Characterization in Ob/Ob Mouse.” *Biology of Sex Differences* 2019 10:1 10 (1): 1–17. <https://doi.org/10.1186/S13293-019-0225-Y>.
- Grün, Felix, and Bruce Blumberg. 2009. “Endocrine Disrupters as obesogens.” *Molecular and Cellular Endocrinology* 304 (1–2): 19–29. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2009.02.018>.
- Guillaume, Maeva, Elodie Riant, Aurélie Fabre, Isabelle Raymond-Letron, Melissa Buscato, Morgane Davezac, Blandine Tramunt, et al. 2019. “Selective Liver Estrogen Receptor  $\alpha$

- Modulation Prevents Steatosis, Diabetes, and Obesity Through the Anorectic Growth Differentiation Factor 15 Hepatokine in Mice.” *Hepatology Communications* 3 (7): 908–24. <https://doi.org/10.1002/hep4.1363>.
- Han, X, R A Kemper, and G W Jepson. 2005. “Subcellular Distribution and Protein Binding of Perfluorooctanoic Acid in Rat Liver and Kidney.” *Drug and Chemical Toxicology* 28 (2): 197–209. <https://doi.org/10.1081/DCT-52547>.
- Hansson, Göran K. 2005. “Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease.” *The New England Journal of Medicine* 352 (16): 1685–95. <https://doi.org/10.1056/NEJMRA043430>.
- Hetherington, A. W. 1944. “Non-production of Hypothalamic Obesity in the Rat by Lesions Rostral or Dorsal to the Ventro-medial Hypothalamic Nuclei.” *Journal of Comparative Neurology* 80 (1): 33–45. <https://doi.org/10.1002/cne.900800104>.
- Honda, Yasushi, Takaomi Kessoku, Yuji Ogawa, Wataru Tomeno, Kento Imajo, Koji Fujita, Masato Yoneda, et al. 2017. “Pemafibrate, a Novel Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Modulator, Improves the Pathogenesis in a Rodent Model of Nonalcoholic Steatohepatitis.” *Scientific Reports* 7 (February). <https://doi.org/10.1038/srep42477>.
- Hori, Takeshi, Kosuke Saito, Rick Moore, Gordon P Flake, and Masahiko Negishi. 2018. “Nuclear Receptor CAR Suppresses GADD45B-P38 MAPK Signaling to Promote Phenobarbital-Induced Proliferation in Mouse Liver.” *Molecular Cancer Research : MCR* 16 (8): 1309–18. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-18-0118>.
- Horst, Kasper W. Ter, Pim W. Gilijamse, Barbara A. De Weijer, Murat Kilicarslan, Mariette T. Ackermans, Aart J. Nederveen, Max Nieuwdorp, Johannes A. Romijn, and Mireille J. Serlie. 2015. “Sexual Dimorphism in Hepatic, Adipose Tissue, and Peripheral Tissue Insulin Sensitivity in Obese Humans.” *Frontiers in Endocrinology* 6 (NOV). <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00182>.
- Houngaard, Jorn. 2017. “Motor Neurons.” *Comprehensive Physiology* 7 (2): 463–84. <https://doi.org/10.1002/CPHY.C160025>.
- Huber, Wolfgang, Vincent J. Carey, Robert Gentleman, Simon Anders, Marc Carlson, Benilton S. Carvalho, Hector Corrada Bravo, et al. 2015. “Orchestrating High-Throughput Genomic Analysis with Bioconductor.” *Nature Methods* 12 (2): 115–21. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3252>.
- Hui, Zongguang, Rujiang Li, and Li Chen. 2017. “The Impact of Exposure to Environmental Contaminant on Hepatocellular Lipid Metabolism.” *Gene* 622 (July): 67–71. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2017.04.024>.
- IARC. 2016. “PERFLUOROOCCTANOIC ACID IARC 2016.”
- Itagaki, Hiroko, Kazuhiko Shimizu, Shunichi Morikawa, Kenji Ogawa, and Taichi Ezaki. 2013. “Morphological and Functional Characterization of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Induced by a Methionine-Choline-Deficient Diet in C57BL/6 Mice.” *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 6 (12): 2683. <https://doi.org/10.1007/s12026-013-9249-1>.
- Ito, Makoto, Jun Suzuki, Shigeharu Tsujioka, Minoru Sasaki, Akira Gomori, Takashi Shirakura, Hiroyasu Hirose, et al. 2007. “Longitudinal Analysis of Murine Steatohepatitis Model Induced by Chronic Exposure to High-Fat Diet.” *Hepatology Research* 37 (1): 50–57. <https://doi.org/10.1111/J.1872-034X.2007.00008.X>.
- Jakubowski, Marek, and Malgorzata Trzcinka-Ochocka. 2005. “Biological Monitoring of Exposure: Trends and Key Developments.” *Journal of Occupational Health* 47 (1): 22–48. <https://doi.org/10.1539/JOH.47.22>.
- Jessen, Kristjan R. 2004. “Glial Cells.” *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36 (10): 1861–67. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2004.02.023>.



- Jia, Y, JK Yee, C Wang, L Nikolaenko, M Diaz-Arjonilla, JN Cohen, SW French, et al. 2018. “Testosterone Protects High-Fat/Low-Carbohydrate Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Castrated Male Rats Mainly via Modulating Endoplasmic Reticulum Stress.” *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 314 (4): E366–76. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00124.2017>.
- Jin, Yuanxiang, Xiaojian Lin, Wenyu Miao, Tao Wu, Hangjie Shen, Shan Chen, Yanhong Li, Qiaoqiao Pan, and Zhengwei Fu. 2014. “Chronic Exposure of Mice to Environmental Endocrine-Disrupting Chemicals Disturbs Their Energy Metabolism.” *Toxicology Letters* 225 (3): 392–400. <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2014.01.006>.
- Jones, Margaret E.E., Anne W. Thorburn, Kara L. Britt, Kylie N. Hewitt, Marie L. Misso, Nigel G. Wreford, Joseph Proietto, et al. 2001. “Aromatase-Deficient (ArKO) Mice Accumulate Excess Adipose Tissue.” *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 79 (1–5): 3–9. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(01\)00136-4](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(01)00136-4).
- Joshi-Barve, Swati, Irina Kirpich, Matthew C. Cave, Luis S. Marsano, and Craig J. McClain. 2015. “Alcoholic, Nonalcoholic, and Toxicant-Associated Steatohepatitis: Mechanistic Similarities and Differences.” *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 1 (4): 356–67. <https://doi.org/10.1016/J.JCMGH.2015.05.006>.
- Kamada, Yoshihiro, Shinichi Kiso, Yuichi Yoshida, Norihiro Chatani, Takashi Kizu, Mina Hamano, Mayumi Tsubakio, et al. 2011. “Estrogen Deficiency Worsens Steatohepatitis in Mice Fed High-Fat and High-Cholesterol Diet.” *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 301 (6). <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00211.2011>.
- Kamiya, Akihide, Taisei Kinoshita, and Atsushi Miyajima. 2001. “Oncostatin M and Hepatocyte Growth Factor Induce Hepatic Maturation via Distinct Signaling Pathways.” *FEBS Letters* 492 (1–2): 90–94. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02140-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02140-8).
- Kemper, Raymond A, and Diane L Nabb. 2005. “In Vitro Studies in Microsomes from Rat and Human Liver, Kidney, and Intestine Suggest That Perfluorooctanoic Acid Is Not a Substrate for Microsomal UDP-Glucuronosyltransferases.” *Drug and Chemical Toxicology* 28 (3): 281–87. <https://doi.org/10.1081/DCT-200064468>.
- Kettner, Nicole M., Horatio Voicu, Milton J. Finegold, Cristian Coarfa, Arun Sreekumar, Nagireddy Putluri, Chinenye A. Katchy, Choogon Lee, David D. Moore, and Loning Fu. 2016. “Circadian Homeostasis of Liver Metabolism Suppresses Hepatocarcinogenesis.” *Cancer Cell* 30 (6): 909–24. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.10.007>.
- Kiernan, Francis. 1833. “The Anatomy and Physiology of the Liver.” *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 123 (December): 711–70. <https://doi.org/10.1098/rstl.1833.0031>.
- Kim, Donghee, W. Ray Kim, Hwa Jung Kim, and Terry M. Therneau. 2013. “Association between Noninvasive Fibrosis Markers and Mortality among Adults with Nonalcoholic Fatty Liver Disease in the United States.” *Hepatology* 57 (4): 1357–65. <https://doi.org/10.1002/hep.26156>.
- Kim, Jonggun, Yooheon Park, Kyong Sup Yoon, J. Marshall Clark, and Yeonhwa Park. 2013. “Imidacloprid, a Neonicotinoid Insecticide, Induces Insulin Resistance.” *Journal of Toxicological Sciences* 38 (5): 655–60. <https://doi.org/10.2131/JTS.38.655>.
- Kirpich, Irina A, Luis S Marsano, and Craig J McClain. 2015. “Gut-Liver Axis, Nutrition, and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease.” *Clinical Biochemistry*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.06.023>.
- Kjærgaard, Kristoffer, Anne Catrine Daugaard Mikkelsen, Charlotte Wilhelmina Wernberg, Lea Ladegaard Grønkjær, Peter Lykke Eriksen, Malene Flensborg Damholdt, Rajeshwar Prosad Mookerjee, Hendrik Vilstrup, Mette Munk Lauridsen, and Karen Louise Thomsen. 2021. “Cognitive Dysfunction in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease—Current Knowledge, Mechanisms and Perspectives.” *Journal of Clinical Medicine* 10 (4): 673.

- <https://doi.org/10.3390/JCM10040673>.
- Klaunig, James E., Xilin Li, and Zemin Wang. 2018. "Role of Xenobiotics in the Induction and Progression of Fatty Liver Disease." *Toxicology Research* 7 (4): 664–80. <https://doi.org/10.1039/C7TX00326A>.
- Kleiner, David E., Elizabeth M. Brunt, Mark Van Natta, Cynthia Behling, Melissa J. Contos, Oscar W. Cummings, Linda D. Ferrell, et al. 2005. "Design and Validation of a Histological Scoring System for Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Hepatology* 41 (6): 1313–21. <https://doi.org/10.1002/hep.20701>.
- Kliwer, Steven A., and David J. Mangelsdorf. 2015. "Bile Acids as Hormones: The FXR-FGF15/19 Pathway." *Digestive Diseases (Basel, Switzerland)* 33 (3): 327. <https://doi.org/10.1159/000371670>.
- Knebel, Constanze, Thorsten Buhrke, Roderich Süßsmuth, Alfonso Lampen, Philip Marx-Stoelting, and Albert Braeuning. 2019. "Pregnane X Receptor Mediates Steatotic Effects of Propiconazole and Tebuconazole in Human Liver Cell Lines." *Archives of Toxicology* 93 (5): 1311–22. <https://doi.org/10.1007/S00204-019-02445-2>.
- Kojima, H, F Sata, S Takeuchi, T Sueyoshi, and T Nagai. 2010. "Comparative Study of Human and Mouse Pregnane X Receptor Agonistic Activity in 200 Pesticides Using in Vitro Reporter Gene Assays." *Toxicology* 280 (3): 77–87. <https://doi.org/10.1016/J.TOX.2010.11.008>.
- Kojima, Hiroyuki, Shinji Takeuchi, and Tadanori Nagai. 2010. "Endocrine-Disrupting Potential of Pesticides via Nuclear Receptors and Aryl Hydrocarbon Receptor." *Journal of Health Science* 56 (4): 374–86. <https://doi.org/10.1248/JHS.56.374>.
- Koliwad, Suneil K., Ryan S. Streeper, Mara Monetti, Ivo Cornelissen, Liana Chan, Koji Terayama, Stephen Naylor, Meghana Rao, Brian Hubbard, and Robert V. Farese. 2010. "DGAT1-Dependent Triacylglycerol Storage by Macrophages Protects Mice from Diet-Induced Insulin Resistance and Inflammation." *Journal of Clinical Investigation* 120 (3): 756–67. <https://doi.org/10.1172/JCI36066>.
- Kowdley, K.V, L.A Wilson, ML Van Natta, R.K Pai, and AJ Sanyal. 2015. "Efficacy and Safety of Vitamin E in Nonalcoholic Steatohepatitis Patients With and Without Diabetes: Pooled Analysis from the PIVENS and FLINT NIDDK NASH CRN Trials."
- Kudo, Naomi, Tohru Yamazaki, Takeshi Sakamoto, Katsuyoshi Sunaga, Tadashi Tsuda, Atsushi Mitsumoto, and Yoichi Kawashima. 2011. "Effects of Perfluorinated Fatty Acids with Different Carbon Chain Length on Fatty Acid Profiles of Hepatic Lipids in Mice." *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 34 (6): 856–64. <https://doi.org/10.1248/bpb.34.856>.
- Kumari, Manju, Gabriele Schoiswohl, Chandramohan Chittraju, Margret Paar, Irina Cornaciu, Ashraf Y. Rangrez, Nuttaporn Wongsiriroj, et al. 2012. "Adiponutrin Functions as a Nutritionally Regulated Lysophosphatidic Acid Acyltransferase." *Cell Metabolism* 15 (5): 691–702. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.04.008>.
- Kutsuno, Yuki, Tomoo Itoh, Robert H. Tukey, and Ryoichi Fujiwara. 2014. "Glucuronidation of Drugs and Drug-Induced Toxicity in Humanized UDP-Glucuronosyltransferase 1 Mice." *Drug Metabolism and Disposition* 42 (7): 1146–52. <https://doi.org/10.1124/dmd.114.057083>.
- Lake, Brian G, Roger J Price, and Thomas G Osimitz. 2015. "Mode of Action Analysis for Pesticide-Induced Rodent Liver Tumours Involving Activation of the Constitutive Androstane Receptor: Relevance to Human Cancer Risk." *Pest Management Science* 71 (6): 829–34. <https://doi.org/10.1002/PS.3854>.
- Lamba, Jatinder K, Vishal Lamba Lamba, Kazuto Yasuda, Yvonne S Lin, Mahfoud Assem, Emma Thompson, Stephen Strom Strom, and Erin Schuetz. 2004. "Expression of Constitutive Androstane Receptor Splice Variants in Human Tissues and Their

- Functional Consequences.” *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 311 (2): 811–21. <https://doi.org/10.1124/JPET.104.069310>.
- Lasram, Mohamed Montassar, Ines Bini Dhouib, Alya Annabi, Saloua El Fazaa, and Najoua Gharbi. 2014. “A Review on the Molecular Mechanisms Involved in Insulin Resistance Induced by Organophosphorus Pesticides.” *Toxicology* 322 (August): 1–13. <https://doi.org/10.1016/J.TOX.2014.04.009>.
- Lasram, Mohamed Montassar, Ines Bini Dhouib, Kahna Bouzid, Aicha Jrad Lamine, Alya Annabi, Nadia Belhadjmida, Malika Ben Ahmed, Saloua El Fazaa, Jaouida Abdelmoula, and Najoua Gharbi. 2014. “Association of Inflammatory Response and Oxidative Injury in the Pathogenesis of Liver Steatosis and Insulin Resistance Following Subchronic Exposure to Malathion in Rats.” *Environmental Toxicology and Pharmacology* 38 (2): 542–53. <https://doi.org/10.1016/J.ETAP.2014.08.007>.
- Lassailly, G, R Caiazzo, D Buob, M Pigeyre, H Verkindt, J Labreuche, V Raverdy, et al. 2015. “Bariatric Surgery Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis in Morbidly Obese Patients.” *Gastroenterology* 149 (2): 379–88. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2015.04.014>.
- Lassen, C, J Kjolholt, S Mikkelsen, M Warming, and Allan A Jensen. 2015. “Polyfluoroalkyl Substances (PFASs) in Textiles for Children. Survey of Chemical Substances in Consumer Products.” [https://www.researchgate.net/publication/299229536\\_Polyfluoroalkyl\\_substances\\_PFAS\\_s\\_in\\_textiles\\_for\\_children\\_Survey\\_of\\_chemical\\_substances\\_in\\_consumer\\_products](https://www.researchgate.net/publication/299229536_Polyfluoroalkyl_substances_PFAS_s_in_textiles_for_children_Survey_of_chemical_substances_in_consumer_products).
- Lassiter, T. Leon, and Stephen Brimijoin. 2008. “Rats Gain Excess Weight after Developmental Exposure to the Organophosphorothionate Pesticide, Chlorpyrifos.” *Neurotoxicology and Teratology* 30 (2): 125–30. <https://doi.org/10.1016/J.NTT.2007.10.004>.
- Lassiter, T. Leon, Ian T. Ryde, Emiko A. MacKillop, Kathleen K. Brown, Edward D. Levin, Frederic J. Seidler, and Theodore A. Slotkin. 2008. “Exposure of Neonatal Rats to Parathion Elicits Sex-Selective Reprogramming of Metabolism and Alters the Response to a High-Fat Diet in Adulthood.” *Environmental Health Perspectives* 116 (11): 1456–62. <https://doi.org/10.1289/EHP.11673>.
- LeBaron, Matthew J., Reza J. Rasoulpour, B. Bhaskar Gollapudi, Radhakrishna Sura, H. Lynn Kan, Melissa R. Schisler, Lynn H. Pottenger, Sabitha Papineni, and David L. Eisenbrandt. 2014. “Characterization of Nuclear Receptor-Mediated Murine Hepatocarcinogenesis of the Herbicide Pronamide and Its Human Relevance.” *Toxicological Sciences* 142 (1): 74–92. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFU155>.
- Lee, Chanbin, Jieun Kim, and Youngmi Jung. 2019. “Potential Therapeutic Application of Estrogen in Gender Disparity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease/Nonalcoholic Steatohepatitis.” *Cells*. NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/cells8101259>.
- Lee, Duk-Hee, Michael W Steffes, Andreas Sjödin, Richard S Jones, Larry L Needham, and David R Jacobs. 2010. “Low Dose of Some Persistent Organic Pollutants Predicts Type 2 Diabetes: A Nested Case-Control Study.” *Environmental Health Perspectives* 118 (9): 1235–42. <https://doi.org/10.1289/EHP.0901480>.
- Lemaire, Géraldine, Wissem Mnif, Jean-Marc Pascussi, Arnaud Pillon, Fanja Rabenoelina, H lène Fenet, Elena Gomez, et al. 2006. “Identification of New Human Pregnane X Receptor Ligands among Pesticides Using a Stable Reporter Cell System.” *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology* 91 (2): 501–9. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFJ173>.
- Li, Ching Y, and Earl E Nelson. 1985. “Persistence of Benomyl and Captan and Their Effects on Microbial Activity in Field Soils.” *Bull. Environ. Contam. Toxicol* 34: 533–40.
- Li, Daochuan, Bryan MacKowiak, Timothy G. Brayman, Michael Mitchell, Lei Zhang, Shiew

- Mei Huang, and Hongbing Wang. 2015. "Genome-Wide Analysis of Human Constitutive Androstane Receptor (CAR) Transcriptome in Wild-Type and CAR-Knockout HepaRG Cells." *Biochemical Pharmacology* 98 (1): 190–202. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2015.08.087>.
- Li, Xia, Hang T Pham, Amanda S Janesick, and Bruce Blumberg. 2012. "Triflumizole Is an Obesogen in Mice That Acts through Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma (PPAR $\gamma$ )." *Environmental Health Perspectives* 120 (12): 1720–26. <https://doi.org/10.1289/EHP.1205383>.
- Lim, Soo, Sun Young Ahn, In Chan Song, Myung Hee Chung, Hak Chul Jang, Kyong Soo Park, Ki Up Lee, Youngmi Kim Pak, and Hong Kyu Lee. 2009. "Chronic Exposure to the Herbicide, Atrazine, Causes Mitochondrial Dysfunction and Insulin Resistance." *PLoS ONE* 4 (4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0005186>.
- Lin, HY, IC Yu, RS Wang, YT Chen, NC Liu, S Altuwajri, CL Hsu, et al. 2008. "Increased Hepatic Steatosis and Insulin Resistance in Mice Lacking Hepatic Androgen Receptor." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 47 (6): 1924–35. <https://doi.org/10.1002/HEP.22252>.
- Liu, Yanwei, Ting Ruan, Yongfeng Lin, Aifeng Liu, Miao Yu, Runzeng Liu, Mei Meng, Yawei Wang, Jiyan Liu, and Guibin Jiang. 2017. "Chlorinated Polyfluoroalkyl Ether Sulfonic Acids in Marine Organisms from Bohai Sea, China: Occurrence, Temporal Variations, and Trophic Transfer Behavior." *Environmental Science and Technology* 51 (8): 4407–14. <https://doi.org/10.1021/ACS.EST.6B06593>.
- Lombardi, Rosa, Silvia Fargion, and Anna Ludovica Fracanzani. 2019. "Brain Involvement in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD): A Systematic Review." *Digestive and Liver Disease : Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 51 (9): 1214–22. <https://doi.org/10.1016/J.DLD.2019.05.015>.
- Loomba, Rohit, Zeid Kayali, Mazen Nouredin, Peter Ruane, Eric J. Lawitz, Michael Bennett, Lulu Wang, et al. 2018. "GS-0976 Reduces Hepatic Steatosis and Fibrosis Markers in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Gastroenterology* 155 (5): 1463-1473.e6. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2018.07.027>.
- Lu, Meiya, Jie Du, Peixue Zhou, Hao Chen, Chensheng Lu, and Quan Zhang. 2015. "Endocrine Disrupting Potential of Fipronil and Its Metabolite in Reporter Gene Assays." *Chemosphere* 120 (February): 246–51. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2014.07.015>.
- Luciano-Mateo, F., N. Cabré, G. Baiges, A. Hernández-Aguilera, S. Fernández-Arroyo, J. Camps, and J. Joven. 2018. "The Multifactorial Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Connecting Inflammation and Oxidation." *Journal of Hepatology* 68 (April): S340. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(18\)30901-2](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(18)30901-2).
- Luisier, Raphaëlle, Harri Lempiäinen, Nina Scherbichler, Albert Braeuning, Miriam Geissler, Valerie Dubost, Arne Müller, et al. 2014. "Phenobarbital Induces Cell Cycle Transcriptional Responses in Mouse Liver Humanized for Constitutive Androstane and Pregnane X Receptors." *Toxicological Sciences* 139 (2): 501–11. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFU038>.
- Lukowicz, Céline, Sandrine Ellero-Simatos, Marion Régnier, Fabiana Oliviero, Frédéric Lasserre, Arnaud Polizzi, Alexandra Montagner, et al. 2019. "Dimorphic Metabolic and Endocrine Disorders in Mice Lacking the Constitutive Androstane Receptor." *Scientific Reports* 9 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56570-0>.
- Lukowicz, Céline, Sandrine Ellero Simatos, Marion Régnier, Arnaud Polizzi, Frédéric Lasserre, Alexandra Montagner, Yannick Lippi, et al. 2018. "Metabolic Effects of Achronic Dietary exposure to a Low-Dose Pesticide Cocktail in Mice: Sexual Dimorphism and Role of the Constitutive and Rostane Receptor." *Environmental Health*

- Perspectives* 126 (6). <https://doi.org/10.1289/EHP2877>.
- Lundsgaard, Anne Marie, and Bente Kiens. 2014. "Gender Differences in Skeletal Muscle Substrate Metabolism - Molecular Mechanisms and Insulin Sensitivity." *Frontiers in Endocrinology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00195>.
- Lynch, Caitlin, Yongmei Pan, Linhao Li, Scott Heyward, Timothy Moeller, Peter W. Swaan, and Hongbing Wang. 2014. "Activation of the Constitutive Androstane Receptor Inhibits Gluconeogenesis without Affecting Lipogenesis or Fatty Acid Synthesis in Human Hepatocytes." *Toxicology and Applied Pharmacology* 279 (1): 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.05.009>.
- Macsween, R.M.N, A.D Burt, B.C Portmann, K.G Ishak, P.J Scheurer, P.P Anthony, and E. Weisenberg. 2003. "Pathology of the Liver." *Diagn. Cytopathol.* 29: 43–43.
- Maglich, Jodi M., David C. Lobe, and John T. Moore. 2009. "The Nuclear Receptor CAR (NR1I3) Regulates Serum Triglyceride Levels under Conditions of Metabolic Stress." *Journal of Lipid Research* 50 (3): 439–45. <https://doi.org/10.1194/JLR.M800226-JLR200>.
- Malhi, Harmeet, Steven F. Bronk, Nathan W. Werneburg, and Gregory J. Gores. 2006. "Free Fatty Acids Induce JNK-Dependent Hepatocyte Lipoapoptosis." *Journal of Biological Chemistry* 281 (17): 12093–101. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510660200>.
- Mall, F P. 1906. "A Study of the Structural Unit of the Liver." *Am J Anat* 5: 227–308.
- Maradonna, F, V Nozzi, S Santangeli, I Traversi, P Gallo, E Fattore, D G Mita, A Mandich, and O Carnevali. 2015. "Xenobiotic-Contaminated Diets Affect Hepatic Lipid Metabolism: Implications for Liver Steatosis in Sparus Aurata Juveniles." *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 167 (October): 257–64. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2015.08.006>.
- Marmugi, Alice, Céline Lukowicz, Frederic Lasserre, Alexandra Montagner, Arnaud Polizzi, Simon Ducheix, Adeline Goron, et al. 2016. "Activation of the Constitutive Androstane Receptor Induces Hepatic Lipogenesis and Regulates Pnpla3 Gene Expression in a LXR-Independent Way." *Toxicology and Applied Pharmacology* 303 (July): 90–100. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2016.05.006>.
- Martini, Claudia N., Matías Gabrielli, Javier N. Brandani, and María del C. Vila. 2016. "Glyphosate Inhibits PPAR Gamma Induction and Differentiation of Preadipocytes and Is Able to Induce Oxidative Stress." *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 30 (8): 404–13. <https://doi.org/10.1002/JBT.21804>.
- Masi, Alessandra di, Elisabetta De Marinis, Paolo Ascenzi, and Maria Marino. 2009. "Nuclear Receptors CAR and PXR: Molecular, Functional, and Biomedical Aspects." *Molecular Aspects of Medicine* 30 (5): 297–343. <https://doi.org/10.1016/J.MAM.2009.04.002>.
- Masuyama, Hisashi, and Yuji Hiramatsu. 2012. "Treatment with Constitutive Androstane Receptor Ligand during Pregnancy Prevents Insulin Resistance in Offspring from High-Fat Diet-Induced Obese Pregnant Mice." *Http://Doi.Org/10.1152/Ajpendo.00167.2012* 303 (2): 293–300. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00167.2012>.
- Mavier, P. 2004. "La Fibrose H patique : Physiopathologie-Perspectives Th rapeutiques."
- McBain, Chris J., and A Fisahn. 2001. "Interneurons Unbound." *Nature Reviews Neuroscience* 2001 2:1 2 (1): 11–23. <https://doi.org/10.1038/35049047>.
- McColl, BW, SM Allan, and NJ Rothwell. 2009. "Systemic Infection, Inflammation and Acute Ischemic Stroke." *Neuroscience* 158 (3): 1049–61. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2008.08.019>.
- McCorry, Laurie Kelly. 2007. "Physiology of the Autonomic Nervous System." *American Journal of Pharmaceutical Education* 71 (4). <https://doi.org/10.5688/AJ710478>.
- Medjakovic, Svjetlana, Alfred Zochling, Petra Gerster, Margarita M Ivanova, Yun Teng,

- Carolyn M Klinge, Barbara Schildberger, Michael Gartner, and Alois Jungbauer. 2014. "Effect of Nonpersistent Pesticides on Estrogen Receptor, Androgen Receptor, and Aryl Hydrocarbon Receptor." *Environmental Toxicology* 29 (10): 1201–16. <https://doi.org/10.1002/TOX.21852>.
- Mellinger, Jessica L, Karol M Pencina, Joseph M Massaro, Udo Hoffmann, Sudha Seshadri, Caroline S Fox, Christopher J O'Donnell, and Elizabeth K Speliotes. 2015. "Hepatic Steatosis and Cardiovascular Disease Outcomes: An Analysis of the Framingham Heart Study." *Journal of Hepatology* 63 (2): 470–76. <https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2015.02.045>.
- Mendez, Michelle A., Raquel Garcia-Esteban, Mónica Guxens, Martine Vrijheid, Manolis Kogevinas, Fernando Goñi, Silvia Fochs, and Jordi Sunyer. 2011. "Prenatal Organochlorine Compound Exposure, Rapid Weight Gain, and Overweight in Infancy." *Environmental Health Perspectives* 119 (2): 272–78. <https://doi.org/10.1289/EHP.1002169>.
- Min, Gyesik. 2010. "Estrogen Modulates Transactivations of SXR-Mediated Liver X Receptor Response Element and CAR-Mediated Phenobarbital Response Element in HepG2 Cells." *Experimental & Molecular Medicine* 42(11): 731–38. <https://doi.org/10.3858/emm.2010.42.11.074>.
- Min, Gyesik, Hwajin Kim, Yangjin Bae, Larry Petz, and Jongsook Kim Kemper. 2002. "Inhibitory Cross-Talk between Estrogen Receptor (ER) and Constitutively Activated Androstane Receptor (CAR): CAR INHIBITS ER-MEDIATED SIGNALING PATHWAY BY SQUELCHING P160 COACTIVATORS \*." *Journal of Biological Chemistry* 277 (37): 34626–33. <https://doi.org/10.1074/JBC.M205239200>.
- Molnár, Ferdinand, Jenni Küblbeck, Johanna Jyrkkärinne, Viktória Prantner, and Paavo Honkakoski. 2013. "An Update on the Constitutive Androstane Receptor (CAR)." *Drug Metabolism and Drug Interactions* 28 (2): 79–93. <https://doi.org/10.1515/DMDI-2013-0009>.
- Mondal, Ayan, Dipro Bose, Punnag Saha, Sutapa Sarkar, Ratanesh Seth, Diana Kimono, Muayad Albadrani, Mitzi Nagarkatti, Prakash Nagarkatti, and Saurabh Chatterjee. 2020. "Lipocalin 2 Induces Neuroinflammation and Blood-Brain Barrier Dysfunction through Liver-Brain Axis in Murine Model of Nonalcoholic Steatohepatitis." *Journal of Neuroinflammation* 2020 17:1 17 (1): 1–15. <https://doi.org/10.1186/S12974-020-01876-4>.
- Montague, Carl T., and Stephen O'Rahilly. 2000. "The Perils of Portliness: Causes and Consequences of Visceral Adiposity." *Diabetes*. American Diabetes Association Inc. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.6.883>.
- Montgomery, MP, F Kamel, TM Saldana, MC Alavanja, and DP Sandler. 2008. "Incident Diabetes and Pesticide Exposure among Licensed Pesticide Applicators: Agricultural Health Study, 1993-2003." *American Journal of Epidemiology* 167 (10): 1235–46. <https://doi.org/10.1093/AJE/KWN028>.
- Moreno-Aliaga, M J, and F Matsumura. 1999. "Endrin Inhibits Adipocyte Differentiation by Selectively Altering Expression Pattern of CCAAT/Enhancer Binding Protein-Alpha in 3T3-L1 Cells." *Molecular Pharmacology* 56 (1): 91–101. <https://doi.org/10.1124/MOL.56.1.91>.
- Morselli, E., A. P. Frank, B. F. Palmer, C. Rodriguez-Navas, A. Criollo, and D. J. Clegg. 2016. "A Sexually Dimorphic Hypothalamic Response to Chronic High-Fat Diet Consumption." *International Journal of Obesity* 40 (2): 206–9. <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.114>.
- Mudaliar, S, RR Henry, AJ Sanyal, L Morrow, HU Marschall, M Kipnes, L Adorini, et al. 2013. "Efficacy and Safety of the Farnesoid X Receptor Agonist Obeticholic Acid in

- Patients with Type 2 Diabetes and Nonalcoholic Fatty Liver Disease.” *Gastroenterology* 145 (3). <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2013.05.042>.
- Namjou, Bahram, Todd Lingren, Yongbo Huang, Sreeja Parameswaran, Beth L. Cobb, Ian B. Stanaway, John J. Connolly, et al. 2019. “GWAS and Enrichment Analyses of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Identify New Trait-Associated Genes and Pathways across EMERGE Network.” *BMC Medicine* 17 (1): 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12916-019-1364-z>.
- Nelson, David R., Luc Koymans, Tetsuya Kamataki, John J. Stegeman, René Feyereisen, David J. Waxman, Michael R. Waterman, et al. 1996. “P450 Superfamily: Update on New Sequences, Gene Mapping, Accession Numbers and Nomenclature.” *Pharmacogenetics*. Pharmacogenetics. <https://doi.org/10.1097/00008571-199602000-00002>.
- Nikolaenko, L., Y. Jia, C. Wang, M. Diaz-Arjonilla, J. K. Yee, S. W. French, P. Y. Liu, et al. 2014. “Testosterone Replacement Ameliorates Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Castrated Male Rats.” *Endocrinology* 155 (2): 417. <https://doi.org/10.1210/EN.2013-1648>.
- Nonogaki, K. 2000. “New Insights into Sympathetic Regulation of Glucose and Fat Metabolism.” *Diabetologia* 43:5 43 (5): 533–49. <https://doi.org/10.1007/S001250051341>.
- Ogrodnik, Mikolaj, Satomi Miwa, Tamar Tchkonja, Dina Tiniakos, Caroline L. Wilson, Albert Lahat, Christopher P. Day, et al. 2017. “Cellular Senescence Drives Age-Dependent Hepatic Steatosis.” *Nature Communications* 2017 8:1 8 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms15691>.
- Olivares, Ana Maria, Oscar Andrés Moreno-Ramos, and Neena B. Haider. 2015. “Role of Nuclear Receptors in Central Nervous System Development and Associated Diseases.” *Journal of Experimental Neuroscience* 9 (Suppl 2): 93. <https://doi.org/10.4137/JEN.S25480>.
- Oliviero, Fabiana, Céline Lukowicz, Badreddine Boussadia, Isabel Forner-Piquer, Jean-Marc Pascussi, Nicola Marchi, and Laila Mselli-Lakhal. 2020. “Constitutive Androstane Receptor: A Peripheral and a Neurovascular Stress or Environmental Sensor.” *Cells* 9 (11). <https://doi.org/10.3390/CELLS9112426>.
- OMS. 2010. “Code International de Conduite Pour La Distribution et l’utilisation Des Pesticides Directives Pour La Publicit Des Pesticides.”
- Panahi, Parastoo, Sanaz Vosough-Ghanbari, Shirin Pournourmohammadi, Seyed Naser Ostad, Shekoufeh Nikfar, Bagher Minaie, and Mohammad Abdollahi. 2006. “Stimulatory Effects of Malathion on the Key Enzymes Activities of Insulin Secretion in Langerhans Islets, Glutamate Dehydrogenase and Glucokinase.” *Toxicology Mechanisms and Methods* 16 (4): 161–67. <https://doi.org/10.1080/15376520500191623>.
- Parkash, Jyoti, Andrea Messina, Fanny Langlet, Irene Cimino, Anne Loyens, Danièle Mazur, Sarah Gallet, et al. 2015. “Semaphorin7A Regulates Neuroglial Plasticity in the Adult Hypothalamic Median Eminence.” *Nature Communications* 2015 6:1 6 (1): 1–17. <https://doi.org/10.1038/ncomms7385>.
- Pastoor, T P, K P Lee, M A Perri, and P J Gillies. 1987. “Biochemical and Morphological Studies of Ammonium Perfluorooctanoate-Induced Hepatomegaly and Peroxisome Proliferation.” *Experimental and Molecular Pathology* 47 (1): 98–109. [https://doi.org/10.1016/0014-4800\(87\)90011-6](https://doi.org/10.1016/0014-4800(87)90011-6).
- Patel, Chirag J, Jayanta Bhattacharya, and Atul J Butte. 2010. “An Environment-Wide Association Study (EWAS) on Type 2 Diabetes Mellitus.” *PloS One* 5 (5). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0010746>.
- Pawlak, Michal, Philippe Lefebvre, and Bart Staels. 2015. “Molecular Mechanism of PPAR $\alpha$

- Action and Its Impact on Lipid Metabolism, Inflammation and Fibrosis in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease.” *Journal of Hepatology* 62 (3): 720–33.  
<https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2014.10.039>.
- Peden-Adams, Margie M, Jennifer M Keller, Jackie G Eudaly, Jennifer Berger, Gary S Gilkeson, and Deborah E Keil. 2008. “Suppression of Humoral Immunity in Mice Following Exposure to Perfluorooctane Sulfonate.” *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology* 104 (1): 144–54.  
<https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFN059>.
- Pelletier, Catherine, Jean-Pierre Després, and Angelo Tremblay. 2002. “Plasma Organochlorine Concentrations in Endurance Athletes and Obese Individuals.” *Medicine and Science in Sports and Exercise* 34 (12): 1971–75.  
<https://doi.org/10.1249/01.MSS.0000040820.48707.99>.
- Pelletier, Catherine, P Imbeault, and A Tremblay. 2003. “Energy Balance and Pollution by Organochlorines and Polychlorinated Biphenyls.” *Obesity Reviews : An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity* 4 (1): 17–24.  
<https://doi.org/10.1046/J.1467-789X.2003.00085.X>.
- Peris-Sampedro, Fiona, Maria Cabre, Pia Basaure, Ingrid Reverte, Jose L Domingo, and Maria Teresa Colomina. 2015. “Adulthood Dietary Exposure to a Common Pesticide Leads to an Obese-like Phenotype and a Diabetic Profile in ApoE3 Mice.” *Environmental Research* 142 (October): 169–76.  
<https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2015.06.036>.
- Pettersson, US, TB Wal n, PO Carlsson, L Jansson, and M Phillipson. 2012. “Female Mice Are Protected against High-Fat Diet Induced Metabolic Syndrome and Increase the Regulatory T Cell Population in Adipose Tissue.” *PloS One* 7 (9).  
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0046057>.
- Pirazzi, Carlo, Martin Adiels, Maria Antonella Burza, Rosellina Margherita Mancina, Malin Levin, Marcus Ståhlman, Marja Riitta Taskinen, et al. 2012. “Patatin-like Phospholipase Domain-Containing 3 (PNPLA3) I148M (Rs738409) Affects Hepatic VLDL Secretion in Humans and in Vitro.” *Journal of Hepatology* 57 (6): 1276–82.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.07.030>.
- Plump, AS, JD Smith, T Hayek, K Aalto, A Walsh, JG Verstuyft, EM Rubin, and JL Breslow. 1992. “Severe Hypercholesterolemia and Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice Created by Homologous Recombination in ES Cells.” *Cell* 71 (2): 343–53.  
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90362-G](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90362-G).
- Porter, W P, S M Green, N L Debbink, and I Carlson. 1993. “Groundwater Pesticides: Interactive Effects of Low Concentrations of Carbamates Aldicarb and Methomyl and the Triazine Metribuzin on Thyroxine and Somatotropin Levels in White Rats.” *Journal of Toxicology and Environmental Health* 40 (1): 15–34.  
<https://doi.org/10.1080/15287399309531773>.
- Puche, Juan E, Yedidya Saiman, and Scott L Friedman. 2013. “Hepatic Stellate Cells and Liver Fibrosis.” *Comprehensive Physiology* 3 (4): 1473–92.  
<https://doi.org/10.1002/CPHY.C120035>.
- Püschel, GP. 2004. “Control of Hepatocyte Metabolism by Sympathetic and Parasympathetic Hepatic Nerves.” *The Anatomical Record. Part A, Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology* 280 (1): 854–67. <https://doi.org/10.1002/AR.A.20091>.
- Qatanani, Mohammed, Jun Zhang, and David D. Moore. 2005. “Role of the Constitutive Androstane Receptor in Xenobiotic-Induced Thyroid Hormone Metabolism.” *Endocrinology* 146 (3): 995–1002. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1350>.
- Qazi, Mousumi Rahman, Mohammad R. Abedi, B. Dean Nelson, Joseph W. DePierre, and Manuchehr Abedi-Valugerdi. 2010. “Dietary Exposure to Perfluorooctanoate or



- Perfluorooctane Sulfonate Induces Hypertrophy in Centrilobular Hepatocytes and Alters the Hepatic Immune Status in Mice.” *International Immunopharmacology* 10 (11): 1420–27. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.08.009>.
- Quinn, Matthew A., Xiaojiang Xu, Melania Ronfani, and John A. Cidlowski. 2018. “Estrogen Deficiency Promotes Hepatic Steatosis via a Glucocorticoid Receptor-Dependent Mechanism in Mice.” *Cell Reports* 22 (10): 2690. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2018.02.041>.
- Rada, Patricia, Águeda González-Rodríguez, Carmelo García-Monzón, and Ángela M. Valverde. 2020. “Understanding Lipotoxicity in NAFLD Pathogenesis: Is CD36 a Key Driver?” *Cell Death & Disease* 2020 11:9 11 (9): 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03003-w>.
- Rappaport, A. M., Z. J. Borowy, W. M. Lougheed, and W. N. Lotto. 1954. “Subdivision of Hexagonal Liver Lobules into a Structural and Functional Unit. Role in Hepatic Physiology and Pathology.” *The Anatomical Record* 119 (1): 11–33. <https://doi.org/10.1002/ar.1091190103>.
- Régnier, Marion, Arnaud Polizzi, Yannick Lippi, Edwin Fouché, Géraldine Michel, Céline Lukowicz, Sarra Smati, et al. 2018. “Insights into the Role of Hepatocyte PPAR $\alpha$  Activity in Response to Fasting.” *Molecular and Cellular Endocrinology* 471 (August): 75–88. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.07.035>.
- Ritchie, Matthew E., Belinda Phipson, Di Wu, Yifang Hu, Charity W. Law, Wei Shi, and Gordon K. Smyth. 2015. “Limma Powers Differential Expression Analyses for RNA-Sequencing and Microarray Studies.” *Nucleic Acids Research* 43 (7): e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>.
- Rodríguez, Esteban M., Juan L. Blázquez, Francisco E. Pastor, Belén Peláez, Patricio Peña, Bruno Peruzzo, and Pedro Amat. 2005. “Hypothalamic Tanycytes: A Key Component of Brain–Endocrine Interaction.” *International Review of Cytology* 247 (January): 89–164. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(05\)47003-5](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(05)47003-5).
- Rosen, Mitchell B, Janice S Lee, Hongzu Ren, Beena Vallanat, Jie Liu, Michael P Waalkes, Barbara D Abbott, Christopher Lau, and J Christopher Corton. 2008. “Toxicogenomic Dissection of the Perfluorooctanoic Acid Transcript Profile in Mouse Liver: Evidence for the Involvement of Nuclear Receptors PPAR $\alpha$  and CAR.” *Toxicological Sciences* 103 (1): 46–56. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn025>.
- Roth, Adrian, Renate Looser, Michel Kaufmann, Sharon M. Blättler, Franck Rencurel, Wendong Huang, David D. Moore, and Urs A. Meyer. 2008. “Regulatory Cross-Talk between Drug Metabolism and Lipid Homeostasis: Constitutive Androstane Receptor and Pregnane X Receptor Increase Insig-1 Expression.” *Molecular Pharmacology* 73 (4): 1282–89. <https://doi.org/10.1124/MOL.107.041012>.
- Sadler, Natalie C., Bobbie-Jo M. Webb Robertson, Therese R. Clauss, Joel G. Pounds, Richard Corley, and Aaron T. Wright. 2018. “High-Fat Diets Alter the Modulatory Effects of Xenobiotics on Cytochrome P450 Activities.” *Chemical Research in Toxicology* 31 (5): 308. <https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMRESTOX.8B00008>.
- Safadi, Rifaat, Fred M Konikoff, Mahmud Mahamid, Shira Zelber-Sagi, Maya Halpern, Tuvia Gilat, and Ran Oren. 2014. “The Fatty Acid-Bile Acid Conjugate Aramchol Reduces Liver Fat Content in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease.” *Clinical Gastroenterology and Hepatology : The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association* 12 (12): 2085-2091.e1. <https://doi.org/10.1016/J.CGH.2014.04.038>.
- Sanyal, AJ, N Chalasani, KV Kowdley, A McCullough, AM Diehl, NM Bass, BA Neuschwander-Tetri, et al. 2010. “Pioglitazone, Vitamin E, or Placebo for Nonalcoholic Steatohepatitis.” *The New England Journal of Medicine* 362 (18): 1675–85.

- <https://doi.org/10.1056/NEJMOA0907929>.
- Satapathy, Sanjaya K., Vanessa Kuwajima, Jeffrey Nadelson, Omair Atiq, and Arun J. Sanyal. 2015. "Drug-Induced Fatty Liver Disease: An Overview of Pathogenesis and Management." *Annals of Hepatology* 14 (6): 789–806.  
<https://doi.org/10.5604/16652681.1171749>.
- Schlezing, J J, H Puckett, J Oliver, G Nielsen, W Heiger-Bernays, and T F Webster. 2020. "Perfluorooctanoic Acid Activates Multiple Nuclear Receptor Pathways and Skews Expression of Genes Regulating Cholesterol Homeostasis in Liver of Humanized PPAR $\alpha$  Mice Fed an American Diet." *Toxicology and Applied Pharmacology* 405 (October). <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2020.115204>.
- Schwimmer, JB, JE Lavine, LA Wilson, BA Neuschwander-Tetri, SA Xanthakos, R Kohli, SE Barlow, et al. 2016. "In Children With Nonalcoholic Fatty Liver Disease, Cysteamine Bitartrate Delayed Release Improves Liver Enzymes but Does Not Reduce Disease Activity Scores." *Gastroenterology* 151 (6): 1141-1154.e9.  
<https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2016.08.027>.
- Senmaru, T, M Fukui, H Okada, Y Mineoka, M M, Yamazaki, M Tsujikawa, G Hasegawa, J Kitawaki, H Obayashi, and N Nakamura. 2013. "Testosterone Deficiency Induces Markedly Decreased Serum Triglycerides, Increased Small Dense LDL, and Hepatic Steatosis Mediated by Dysregulation of Lipid Assembly and Secretion in Mice Fed a High-Fat Diet." *Metabolism: Clinical and Experimental* 62 (6): 851–60.  
<https://doi.org/10.1016/J.METABOL.2012.12.007>.
- Sharifnia, Torfay, Joseph Antoun, Thomas G.C. Verriere, Giovanni Suarez, Julia Wattacheril, Keith T. Wilson, Richard M. Peek, Najj N. Abumrad, and Charles R. Flynn. 2015. "Hepatic TLR4 Signaling in Obese NAFLD." *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 309 (4): G270–78.  
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00304.2014>.
- Sharma, Arya M., and Bart Staels. 2007. "Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  and Adipose Tissue—Understanding Obesity-Related Changes in Regulation of Lipid and Glucose Metabolism." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 92 (2): 386–95. <https://doi.org/10.1210/JC.2006-1268>.
- Shehata, Awad A., Wieland Schrödl, Alaa A. Aldin, Hafez M. Hafez, and Monika Krüger. 2013. "The Effect of Glyphosate on Potential Pathogens and Beneficial Members of Poultry Microbiota in Vitro." *Current Microbiology* 66 (4): 350–58.  
<https://doi.org/10.1007/S00284-012-0277-2>.
- Shizu, Ryota, Satoshi Benoki, Yuki Numakura, Susumu Kodama, Masaaki Miyata, Yasushi Yamazoe, and Kouichi Yoshinari. 2013. "Xenobiotic-Induced Hepatocyte Proliferation Associated with Constitutive Active/Androstane Receptor (CAR) or Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) Is Enhanced by Pregnane X Receptor (PXR) Activation in Mice." *PloS One* 8 (4).  
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0061802>.
- Shrestha, Srishti, Michael S Bloom, Recai Yucel, Richard F Seegal, Robert Rej, Robert J McCaffrey, Qian Wu, Kurunthachalam Kannan, and Edward F Fitzgerald. 2017. "Perfluoroalkyl Substances, Thyroid Hormones, and Neuropsychological Status in Older Adults." *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 220 (4): 679–85.  
<https://doi.org/10.1016/J.IJHEH.2016.12.013>.
- Silins, Ilona, and Johan Högberg. 2011. "Combined Toxic Exposures and Human Health: Biomarkers of Exposure and Effect." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 8 (3): 629–47. <https://doi.org/10.3390/IJERPH8030629>.
- Silverman, Jan F, Kevin F O'Brien, Stuart Long, Nancy Leggett, Prabhaker G Khazanie, Walter J Pories, H Thomas Norris, and Jose F Caro. 1990. "Liver Pathology in Morbidly

- Obese Patients with and without Diabetes.” *American Journal of Gastroenterology* 85 (10): 1349–55.  
<http://web.a.ebscohost.com/abstract?site=ehost&scope=site&jrnl=00029270&AN=16089595&h=0%2F559gJFwsSuldt7RjzDkMb1knWGuTMm7dLAv%2FPrQVEbPWpTuy1XTQmWqY8hlw7SKHMTIS%2FwjkwZfkhNqSFA%3D%3D&crl=c&resultLocal=ErrCrlnResults&resultNs=Ehost&crlhashurl=login.aspx%3Fdirect%3Dtrue%26profile%3Dehost%26scope%3Dsite%26authype%3Dcrawler%26jrnl%3D00029270%26AN%3D16089595>.
- Skanes, Blake, Jordan Ho, Keith Warriner, and Ryan S. Prosser. 2020. “Degradation of Boscalid, Pyraclostrobin, Fenbuconazole, and Glyphosate Residues by an Advanced Oxidative Process Utilizing Ultraviolet Light and Hydrogen Peroxide.” *BioRxiv*, November, 2020.11.13.382440. <https://doi.org/10.1101/2020.11.13.382440>.
- Slotkin, Theodore A., Kathleen K. Brown, and Frederic J. Seidler. 2005. “Developmental Exposures of Rats to Chlorpyrifos Elicits Sex-Selective Hyperlipidemia and Hyperinsulinemia in Adulthood.” *Environmental Health Perspectives* 113 (10): 1291–94. <https://doi.org/10.1289/EHP.8133>.
- Smagris, Eriks, Soumik Basuray, John Li, Yongcheng Huang, Ka Man V. Lai, Jesper Gromada, Jonathan C. Cohen, and Helen H. Hobbs. 2015. “Pnpla3<sup>I148M</sup> Knockin Mice Accumulate PNPLA3 on Lipid Droplets and Develop Hepatic Steatosis.” *Hepatology* 61 (1): 108–18. <https://doi.org/10.1002/hep.27242>.
- Smink, Agnes, Nuria Ribas-Fito, Raquel Garcia, Maties Torrent, Michelle A Mendez, Joan O Grimalt, and Jordi Sunyer. 2008. “Exposure to Hexachlorobenzene during Pregnancy Increases the Risk of Overweight in Children Aged 6 Years.” *Acta Paediatrica* 97 (10): 1465–69. <https://doi.org/10.1111/J.1651-2227.2008.00937.X>.
- Soldin, Offie P., and Donald R. Mattison. 2009. “Sex Differences in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics.” *Clinical Pharmacokinetics*. Clin Pharmacokinet. <https://doi.org/10.2165/00003088-200948030-00001>.
- Son, Hee Young, Sang Hyun Kim, Hong In Shin, Han Ik Bae, and Jae Ho Yang. 2008. “Perfluorooctanoic Acid-Induced Hepatic Toxicity Following 21-Day Oral Exposure in Mice.” *Archives of Toxicology* 82 (4): 239–46. <https://doi.org/10.1007/s00204-007-0246-x>.
- Sookoian, Silvia, and Carlos J. Pirola. 2011. “Meta-Analysis of the Influence of I148M Variant of Patatin-like Phospholipase Domain Containing 3 Gene (PNPLA3) on the Susceptibility and Histological Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease.” *Hepatology* 53 (6): 1883–94. <https://doi.org/10.1002/hep.24283>.
- Srivastava, Ritesh Kumar, Brijesh K. Singh, and Dinesh Mani. 2013. “Adsorption and Persistence of Ziram Fungicide in Allahabad Region Soils Influence by Organic Matter.” *Asian Journal of Chemistry* 25 (7): 3947–51. <https://doi.org/10.14233/AJCHEM.2013.13853>.
- Staels, Bart, A Rubenstrunk, B Noel, G Rigou, P Delataille, LJ Millatt, M Baron, et al. 2013. “Hepatoprotective Effects of the Dual Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha/Delta Agonist, GFT505, in Rodent Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease/Nonalcoholic Steatohepatitis.” *Hepatology (Baltimore, Md.)* 58 (6): 1941–52. <https://doi.org/10.1002/HEP.26461>.
- Stephenson, Kristen, Lindsey Kennedy, Laura Hargrove, Jennifer Demieville, Joanne Thomson, Gianfranco Alpini, and Heather Francis. 2017. “Updates on Dietary Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Current Studies and Insights.” *Gene Expression* 18 (1): 5–17. <https://doi.org/10.3727/105221617x15093707969658>.
- Steves, Alyse N, Adam Turry, Brittany Gill, Danielle Clarkson-Townsend, Joshua M Bradner, Ian Bachli, W Michael Caudle, Gary W Miller, Anrhony W S Chan, and

- Charles A Easley. 2018. “Per- and Polyfluoroalkyl Substances Impact Human Spermatogenesis in a Stem-Cell-Derived Model.” *Systems Biology in Reproductive Medicine* 64 (4): 225–39. <https://doi.org/10.1080/19396368.2018.1481465>.
- Sueyoshi, Tatsuya, William D. Green, Kellie Vinal, Tyler S. Woodrum, Rick Moore, and Masahiko Negishi. 2011. “Garlic Extract Diallyl Sulfide (DAS) Activates Nuclear Receptor CAR to Induce the Sult1e1 Gene in Mouse Liver.” *PLOS ONE* 6 (6): e21229. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0021229>.
- Sun, Hong, Ou-Xi Shen, Xiao-Lin Xu, Lin Song, and Xin-Ru Wang. 2008. “Carbaryl, 1-Naphthol and 2-Naphthol Inhibit the Beta-1 Thyroid Hormone Receptor-Mediated Transcription in Vitro.” *Toxicology* 249 (2–3): 238–42. <https://doi.org/10.1016/J.TOX.2008.05.008>.
- Sun, Quancai, Weipeng Qi, Jeremy J Yang, Kyong Sup Yoon, John M Clark, and Yeonhwa Park. 2016. “Fipronil Promotes Adipogenesis via AMPK $\alpha$ -Mediated Pathway in 3T3-L1 Adipocytes.” *Food and Chemical Toxicology* 92 (June): 217–23. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2016.04.011>.
- Suzuki, Atsushi, Atsushi Iwana, Hitoshi Miyashita, Hiromitsu Nakauchi, and Hideki Taniguchi. 2003. “Role for Growth Factors and Extracellular Matrix in Controlling Differentiation of Prospectively Isolated Hepatic Stem Cells.” *Development* 130 (11): 2513–24. <https://doi.org/10.1242/dev.00459>.
- Sztalryd, Carole, and Dawn L. Brasaemle. 2017. “The Perilipin Family of Lipid Droplet Proteins: Gatekeepers of Intracellular Lipolysis.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1862 (10 Pt B): 1221. <https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2017.07.009>.
- Takaki, Akinobu, Daisuke Kawai, and Kazuhide Yamamoto. 2013. “Multiple Hits, Including Oxidative Stress, as Pathogenesis and Treatment Target in Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH).” *International Journal of Molecular Sciences* 14 (10): 20704–28. <https://doi.org/10.3390/IJMS141020704>.
- Takeuchi, Shinji, Tadashi Matsuda, Satoshi Kobayashi, Tetsuo Takahashi, and Hiroyuki Kojima. 2006. “In Vitro Screening of 200 Pesticides for Agonistic Activity via Mouse Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) $\alpha$  and PPAR $\gamma$  and Quantitative Analysis of in Vivo Induction Pathway.” *Toxicology and Applied Pharmacology* 217 (3): 235–44. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.08.011>.
- Takizawa, Daichi, Satoru Kakizaki, Norio Horiguchi, Yuichi Yamazaki, Hiroki Tojima, and Masatomo Mori. 2011. “Constitutive Active/Androstane Receptor Promotes Hepatocarcinogenesis in a Mouse Model of Non-Alcoholic Steatohepatitis.” *Carcinogenesis* 32 (4): 576–83. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq277>.
- Tan, Xiaobing, Guoxiang Xie, Xiuhua Sun, Qiong Li, Wei Zhong, Peter Qiao, Xinguo Sun, Wei Jia, and Zhanxiang Zhou. 2013. “High Fat Diet Feeding Exaggerates Perfluorooctanoic Acid-Induced Liver Injury in Mice via Modulating Multiple Metabolic Pathways.” *PLoS ONE* 8 (4): 61409. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0061409>.
- Taylor, J R, J B Selhorst, S A Houff, and A J Martinez. 1978. “Chlordecone Intoxication in Man. I. Clinical Observations.” *Neurology* 28 (7): 626–30. <https://doi.org/10.1212/WNL.28.7.626>.
- Tukey, R. H., and C. P. Strassburg. 2000. “Human UDP-Glucuronosyltransferases: Metabolism, Expression, and Disease.” *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. Annu Rev Pharmacol Toxicol. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.40.1.581>.
- Uhlén, Mathias, Linn Fagerberg, Bjö M. Hallström, Cecilia Lindskog, Per Oksvold, Adil Mardinoglu, Åsa Sivertsson, et al. 2015. “Tissue-Based Map of the Human Proteome.” *Science* 347 (6220). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1260419>.
- Ukropec, J., Z. Radikova, M. Huckova, J. Koska, A. Kocan, E. Sebokova, B. Drobna, et al.

2010. "High Prevalence of Prediabetes and Diabetes in a Population Exposed to High Levels of an Organochlorine Cocktail." *Diabetologia* 2010 53:5 53 (5): 899–906. <https://doi.org/10.1007/S00125-010-1683-2>.
- Usmani, Khawja A., Randy L. Rose, and Ernest Hodgson. 2003. "Inhibition and Activation of the Human Liver Microsomal and Human Cytochrome P450 3A4 Metabolism of Testosterone by Deployment-Related Chemicals." *Drug Metabolism and Disposition* 31 (4): 384–91. <https://doi.org/10.1124/dmd.31.4.384>.
- Varlamov, Oleg, Cynthia L. Bethea, and Charles T. Roberts. 2014. "Sex-Specific Differences in Lipid and Glucose Metabolism." *Frontiers in Endocrinology* 5 (DEC): 241. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00241>.
- Velázquez, Kandy T., Reilly T. Enos, Jackie E. Bader, Alexander T. Sougiannis, Meredith S. Carson, Ioulia Chatzistamou, James A. Carson, Prakash S. Nagarkatti, Mitzi Nagarkatti, and E. Angela Murphy. 2019. "Prolonged High-Fat-Diet Feeding Promotes Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Alters Gut Microbiota in Mice." *World Journal of Hepatology* 11 (8): 619–37. <https://doi.org/10.4254/wjh.v11.i8.619>.
- Velmurugan, Ganesan, Tharmarajan Ramprasath, Krishnan Swaminathan, Gilles Mithieux, Jeyaprakash Rajendhran, Mani Dhivakar, Ayothi Parthasarathy, et al. 2017. "Gut Microbial Degradation of Organophosphate Insecticides-Induces Glucose Intolerance via Gluconeogenesis." *Genome Biology* 18 (1). <https://doi.org/10.1186/S13059-016-1134-6>.
- Vilar-Gomez, E, and N Chalasani. 2018. "Non-Invasive Assessment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Clinical Prediction Rules and Blood-Based Biomarkers." *Journal of Hepatology* 68 (2): 305–15. <https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2017.11.013>.
- Wagner, Martin, Emina Halilbasic, Hanns Ulrich Marschall, Gernot Zollner, Peter Fickert, Cord Langner, Kurt Zatloukal, Helmut Denk, and Michael Trauner. 2005. "CAR and PXR Agonists Stimulate Hepatic Bile Acid and Bilirubin Detoxification and Elimination Pathways in Mice." *Hepatology* 42 (2): 420–30. <https://doi.org/10.1002/hep.20784>.
- Wahlang, Banrida, Juliane I. Beier, Heather B. Clair, Heather J. Bellis-Jones, K. Cameron Falkner, Craig J. McClain, and Matt C. Cave. 2013. "Toxicant-Associated Steatohepatitis." *Toxicologic Pathology* 41 (2): 343. <https://doi.org/10.1177/0192623312468517>.
- Wambaugh, John F., Hugh A. Barton, and R. Woodrow Setzer. 2008. "Comparing Models for Perfluorooctanoic Acid Pharmacokinetics Using Bayesian Analysis." *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics* 35 (6): 683–712. <https://doi.org/10.1007/S10928-008-9108-2>.
- Wang, Jinsong, Yueqian Zhu, Xiang Cai, Jinming Yu, Xiaoping Yang, and Jinxia Cheng. 2011. "Abnormal Glucose Regulation in Pyrethroid Pesticide Factory Workers." *Chemosphere* 82 (7): 1080–82. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2010.10.065>.
- Wang, Lei, Alexandros G. Asimakopoulos, and Kurunthachalam Kannan. 2015. "Accumulation of 19 Environmental Phenolic and Xenobiotic Heterocyclic Aromatic Compounds in Human Adipose Tissue." *Environment International* 78 (May): 45–50. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2015.02.015>.
- Wang, Ling, Yu Wang, Yong Liang, Jia Li, Yuchen Liu, Jie Zhang, Aiqian Zhang, Jianjie Fu, and Guibin Jiang. 2013. "Specific Accumulation of Lipid Droplets in Hepatocyte Nuclei of PFOA-Exposed BALB/c Mice." *Scientific Reports* 3 (Table 1): 1–5. <https://doi.org/10.1038/srep02174>.
- Wang, Pan, Hui-Ping Wang, Ming-Yuan Xu, Yu-Jie Liang, Ying-Jian Sun, Lin Yang, Li Li, Wei Li, and Yi-Jun Wu. 2014. "Combined Subchronic Toxicity of Dichlorvos with Malathion or Pirimicarb in Mice Liver and Serum: A Metabonomic Study." *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 70: 222–30. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2014.05.027>.

- Wang, Suqing, Nian Shi, Zhiying Ji, and Graziano Pinna. 2002. "Effects of Pyrethroids on the Concentrations of Thyroid Hormones in the Rat Serum and Brain." *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi* 20 (3): 173–76. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14694632/>.
- Wang, Xiaolin, Yan Lu, E. Wang, Zhijian Zhang, Xuelian Xiong, Huijie Zhang, Jieli Lu, et al. 2015. "Hepatic Estrogen Receptor  $\alpha$  Improves Hepatosteatosis through Upregulation of Small Heterodimer Partner." *Journal of Hepatology* 63 (1): 183–90. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.02.029>.
- Webber, Emily S., Antonello Bonci, and Michael J. Krashes. 2015. "The Elegance of Energy Balance: Insight from Circuit-Level Manipulations." *Synapse* 69 (9): 461–74. <https://doi.org/10.1002/SYN.21837>.
- Wei, Ping, Jun Zhang, Margarete Egan-Hafley, Shuguang Liang, and David D. Moore. 2000. "The Nuclear Receptor CAR Mediates Specific Xenobiotic Induction of Drug Metabolism." *Nature* 407 (6806): 920–23. <https://doi.org/10.1038/35038112>.
- Westerouen Van Meeteren, Menso J., Joost P.H. Drenth, and Eric T.T.L. Tjwa. 2020. "Elafibranor: A Potential Drug for the Treatment of Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH)." *Expert Opinion on Investigational Drugs* 29 (2): 117–23. <https://doi.org/10.1080/13543784.2020.1668375>.
- Wiwi, Christopher A., Minita Gupte, and David J. Waxman. 2004. "Sexually Dimorphic P450 Gene Expression in Liver-Specific Hepatocyte Nuclear Factor 4 $\alpha$ -Deficient Mice." *Molecular Endocrinology* 18 (8): 1975–87. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0129>.
- Wolf, Douglas C, Tanya Moore, Barbara D Abbott, Mitchell B Rosen, Kaberi P Das, Robert D Zehr, Andrew B Lindstrom, Mark J Strynar, and Christopher Lau. 2008. "Comparative Hepatic Effects of Perfluorooctanoic Acid and WY 14,643 in PPAR-Alpha Knockout and Wild-Type Mice." *Toxicologic Pathology* 36 (4): 632–39. <https://doi.org/10.1177/0192623308318216>.
- Wu, Xinmou, Guojie Xie, Xiaoxiao Xu, Wei Wu, and Bin Yang. 2018. "Adverse Bioeffect of Perfluorooctanoic Acid on Liver Metabolic Function in Mice." *Environmental Science and Pollution Research* 25 (5): 4787–93. <https://doi.org/10.1007/S11356-017-0872-7>.
- Xia, F, X Xu, H Zhai, Y Meng, H Zhang, S Du, H Xu, H Wu, and Y Lu. 2013. "Castration-Induced Testosterone Deficiency Increases Fasting Glucose Associated with Hepatic and Extra-Hepatic Insulin Resistance in Adult Male Rats." *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E* 11 (1). <https://doi.org/10.1186/1477-7827-11-106>.
- Xiao, Lei, Xinni Xie, and Yonggong Zhai. 2010. "Functional Crosstalk of CAR-LXR and ROR-LXR in Drug Metabolism and Lipid Metabolism." *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.07.006>.
- Xiao, Xiao, Yoo Kim, Daeyoung Kim, Kyong Sup Yoon, John M Clark, and Yeonhwa Park. 2017. "Permethrin Alters Glucose Metabolism in Conjunction with High Fat Diet by Potentiating Insulin Resistance and Decreases Voluntary Activities in Female C57BL/6J Mice." *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 108 (Pt A): 161. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2017.07.053>.
- Xie, Wen, Mei Fei Yeuh, Anna Radomska-Pandya, Simrat P.S. Saini, Yoichi Negishi, Bobbie Sue Bottroff, Geraldine Y. Cabrera, Robert H. Tukey, and Ronald M. Evans. 2003. "Control of Steroid, Heme, and Carcinogen Metabolism by Nuclear Pregnane X Receptor and Constitutive Androstane Receptor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (7): 4150–55. <https://doi.org/10.1073/pnas.0438010100>.
- Yamamoto, Akihiro, Ming Yih Liu, Katsuhisa Kurogi, Yoichi Sakakibara, Yuichi Saeki, Masahito Suiko, and Ming Cheh Liu. 2015. "Sulphation of Acetaminophen by the



- Human Cytosolic Sulfotransferases: A Systematic Analysis.” *Journal of Biochemistry* 158 (6): 497–504. <https://doi.org/10.1093/jb/mvv062>.
- Yamazaki, Yuichi, Satoru Kakizaki, Norio Horiguchi, Naondo Sohara, Ken Sato, Hitoshi Takagi, Masatomo Mori, and Masahiko Negishi. 2007. “The Role of the Nuclear Receptor Constitutive Androstane Receptor in the Pathogenesis of Non-Alcoholic Steatohepatitis.” *Gut* 56 (4): 565–74. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.093260>.
- Yan, Jiong, Baian Chen, Jing Lu, and Wen Xie. 2015. “Deciphering the Roles of the Constitutive Androstane Receptor in Energy Metabolism.” *Nature Publishing Group* 36: 62–70. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.102>.
- Yan, Shengmin, Hongxia Zhang, Fei Zheng, Nan Sheng, Xuejiang Guo, and Jiayin Dai. 2015. “Perfluorooctanoic Acid Exposure for 28 Days Affects Glucose Homeostasis and Induces Insulin Hypersensitivity in Mice.” *Scientific Reports* 5 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep11029>.
- Yang, Xia, Eric E. Schadt, Susanna Wang, Hui Wang, Arthur P. Arnold, Leslie Ingram-Drake, Thomas A. Drake, and Aldons J. Lusis. 2006. “Tissue-Specific Expression and Regulation of Sexually Dimorphic Genes in Mice.” *Genome Research* 16 (8): 995–1004. <https://doi.org/10.1101/gr.5217506>.
- Yilmaz, Y. 2012. “Review Article: Is Non-Alcoholic Fatty Liver Disease a Spectrum, or Are Steatosis and Non-Alcoholic Steatohepatitis Distinct Conditions?” *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1111/apt.12046>.
- Ylinen, M, and S Auriola. 1990. “Tissue Distribution and Elimination of Perfluorodecanoic Acid in the Rat after Single Intraperitoneal Administration.” *Pharmacology & Toxicology* 66 (1): 45–48. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0773.1990.TB00700.X>.
- Yoshioka, Naoki, Masatoshi Ishigami, Yasuko Watanabe, Hajime Sumi, Masao Doisaki, Takeo Yamaguchi, Takanori Ito, et al. 2020. “Effect of Weight Change and Lifestyle Modifications on the Development or Remission of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Sex-Specific Analysis.” *Scientific Reports* 2020 10:1 10 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57369-9>.
- Younossi, Zobair M., Aaron B. Koenig, Dinan Abdelatif, Yousef Fazel, Linda Henry, and Mark Wymer. 2016. “Global Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease—Meta-Analytic Assessment of Prevalence, Incidence, and Outcomes.” *Hepatology* 64 (1): 73–84. <https://doi.org/10.1002/hep.28431>.
- Younossi, Zobair, Yusuf Yilmaz, Mohammed El Kassas, Vincent Wai-Sun Wong, Ajay Kumar Duseja, Nahúm Méndez-Sanchez, Jacob George, et al. 2020. “Significant Knowledge Gap about Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) in Real-World Practices: A Global Survey of Hepatologists, Gastroenterologists, Endocrinologists and Primary Care Physicians.” *Journal of Hepatology* 73 (August): S440. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(20\)31361-1](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(20)31361-1).
- Yu, Jinsheng, Sharon Marsh, Junbo Hu, Wenke Feng, and Chaodong Wu. 2016. “The Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Interplay between Diet, Gut Microbiota, and Genetic Background.” *Gastroenterology Research and Practice*. Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2016/2862173>.
- Zhang, Jianyun, Jing Zhang, Rui Liu, Jay Gan, Jing Liu, and Weiping Liu. 2016. “Endocrine-Disrupting Effects of Pesticides through Interference with Human Glucocorticoid Receptor.” *Environmental Science and Technology* 50 (1): 435–43. <https://doi.org/10.1021/ACS.EST.5B03731>.
- Zhao, Roong, and Stephen A. Duncan. 2005. “Embryonic Development of the Liver.” *Hepatology*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/hep.20691>.
- Zheng, Fei, Nan Sheng, Hongxia Zhang, Shengmin Yan, Jianhai Zhang, and Jianshe Wang.

2017. "Perfluorooctanoic Acid Exposure Disturbs Glucose Metabolism in Mouse Liver."  
*Toxicology and Applied Pharmacology* 335 (November): 41–48.  
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.09.019>.

## Figure Legends

### **Figure 1 : CAR deletion exacerbates HFD-induced body weight gain only in female mice.**

Body weight was monitored during 16 weeks of HFD in WT and CAR<sup>-/-</sup> male (A) and female (B) mice and mean body weight gain was assessed. C, D: Following 16 weeks of diet, subcutaneous and epididymal white adipose tissues (WAT) were harvested and weighed (BW: averaged by grams of body weight).

### **Figure 2 : CAR deletion exacerbates HFD-induced hyperglycaemia and hyperinsulinemia.**

At week 10 of HFD, an oral glucose tolerance test was performed (A, B). Data are presented as the percentage of initial glycaemia with corresponding area under the curve (AUC). Glycaemia and insulinemia levels were assessed in fasted state (C, D).

### **Figure 3 : CAR deletion exacerbates HFD-induced hepatic steatosis and injury.**

Following 16 weeks of HFD, histological sections of liver were stained with hematoxylin-eosin (HE, magnification x20) and a score ranging in severity from 1 to 3 was assigned for hepatocellular steatosis (A, B). Hepatic cholesterol esters and triglycerides (C, D) were analyzed by gas chromatography (GC-FID). Scoring of inflammation was performed on HE slices and gene expression of inflammation marker *Tnfa* was assessed by qPCR (E, F). Plasmatic levels of Alanine Aminotransferase (ALT) and Aspartate Aminotransferase (AST) were assayed using a biochemical analyser (G, H).

### **Figure 4 : CAR deletion does not affect liver fibrosis.**

Histological sections of liver were stained with Sirius Red (A, B, magnification x20). Circles indicate peri-sinusoidal fibrosis and rectangles indicate peri-portal fibrosis. Scoring of lobular fibrosis was performed on Sirius Red slices and gene expression of fibrosis marker *Pdgfr1β* was assessed by qPCR (C, D).

### **Figure 5 : Dimorphic impact of CAR deletion on hepatic transcriptome.**

A microarray analysis of hepatic transcriptome was performed. A: Principal component analysis (PCA) with separation of data by two dimensions. B: Heat-map representation of gene expression for each individual; the hierarchical clustering was obtained using Ward's criterion and Pearson's correlation coefficient. Red and green respectively indicate values above and below the mean averaged, centered and scaled expression values (Z-score). Black indicates values close to the mean.

Venn diagrams with number of up-regulated (C) or down-regulated (D) genes in CAR<sup>-/-</sup> mice. Sex-specific variations were further analysed and enrichment of Kegg pathways is reported with gene number and corresponding p-value. E: The 36 genes of NAFLD pathway which are specifically up-regulated in CAR<sup>-/-</sup> females were represented for both male and females.

**Figure 6 : Positive correlation between transcriptomic signatures of CAR<sup>-/-</sup> and ER $\alpha$ <sup>-/-</sup> females.** A: The differentially expressed gene list of CAR<sup>-/-</sup> male and female mice were compared in *Base Space Correlation Engine (Illumina)* to publicly available datasets. All correlations present a significant p-value of overlap ( $-\log(\text{pvalue overlap}) > -\log(0,05)$ ). Males fed a Choline/Folic deficient diet (GSE57524); LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup> males fed a western diet WD (GSE38083); ER $\alpha$ <sup>-/-</sup> females fed a HFD (GSE95283). Venn diagrams representing common up-regulated (B) and down-regulated genes (C) between CAR<sup>-/-</sup> and ER $\alpha$ <sup>-/-</sup> females. Common genes were further analysed for enriched Kegg pathways using *Enrichr (BioTools)* (D, E).

**Figure 7 : CAR deletion associates with hypothalamic astrogliosis in HFD-fed females.**

A: Histological slices of brain of WT and CAR<sup>-/-</sup> females were stained for GFAP expression, an astrocyte marker in the arcuate (AN) and paraventricular (PVN) nuclei of hypothalamus (A). Quantification of GFAP fluorescence in AN and PVN (B), Cortex (CTX), Dentate Gyrus (DG) and White Matter (WM) of females (C).

**Supplementary Figure 1 : CAR deletion does not affect food and water intake of mice.**

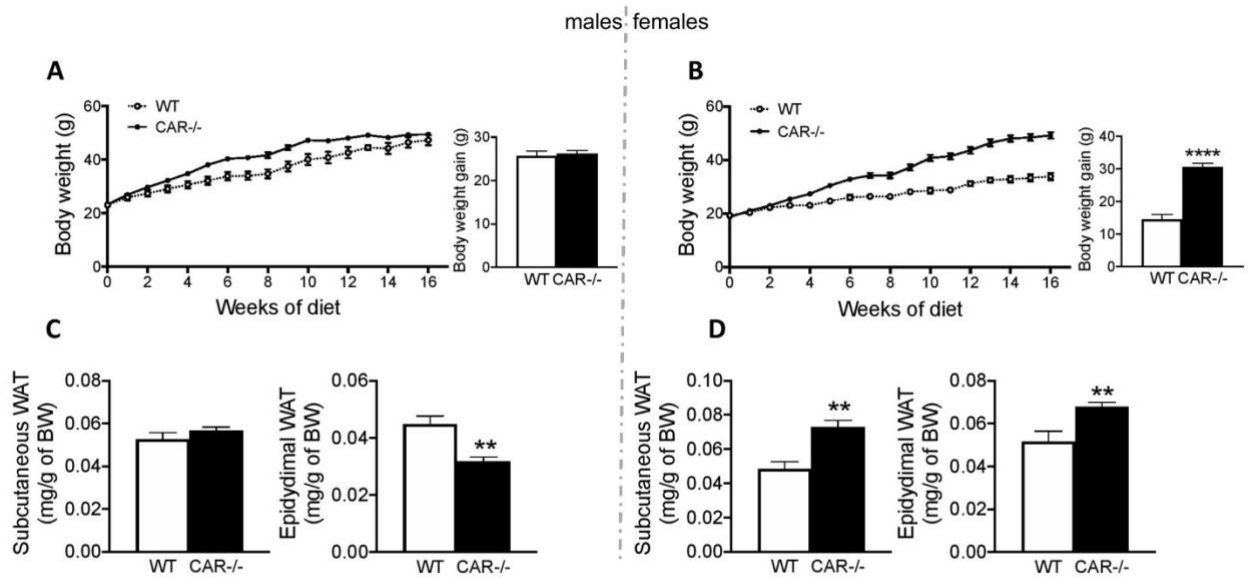
Food (A, B) and water (C, D) intake of males and females were measured weekly for each cage throughout the 16 weeks of HFD and averaged by day and by grams of mean body weight (BW) per cage (n=2 cages per group). An overall average of the 16 weeks was calculated.

**Supplementary Figure 2 : CAR deletion induces dimorphic central adaptations. A:**

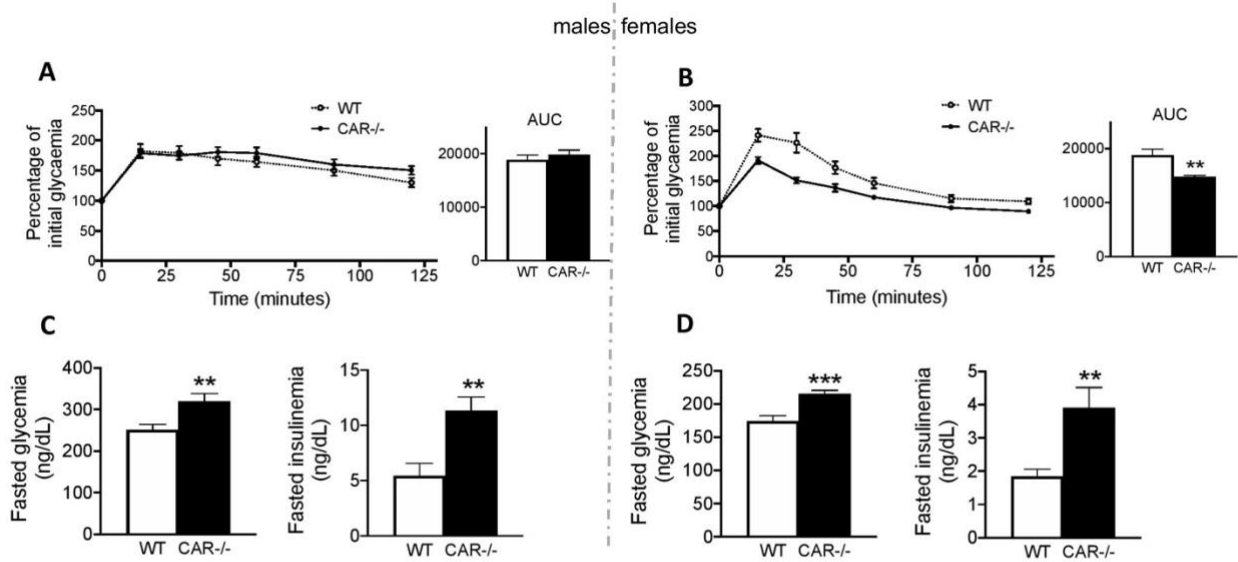
Quantification of GFAP expression in males, in the arcuate (AN) and paraventricular (PVN) nuclei of hypothalamus, Cortex (CTX), Dentate Gyrus (DG) and White Matter (WM). Histological slices were also stained for IBA1 expression, a microglial marker, in the same regions in males (B) and females (C).

**Supplementary Table 1 : Kegg pathway enrichment of cluster 3 and 7 of heat map.**

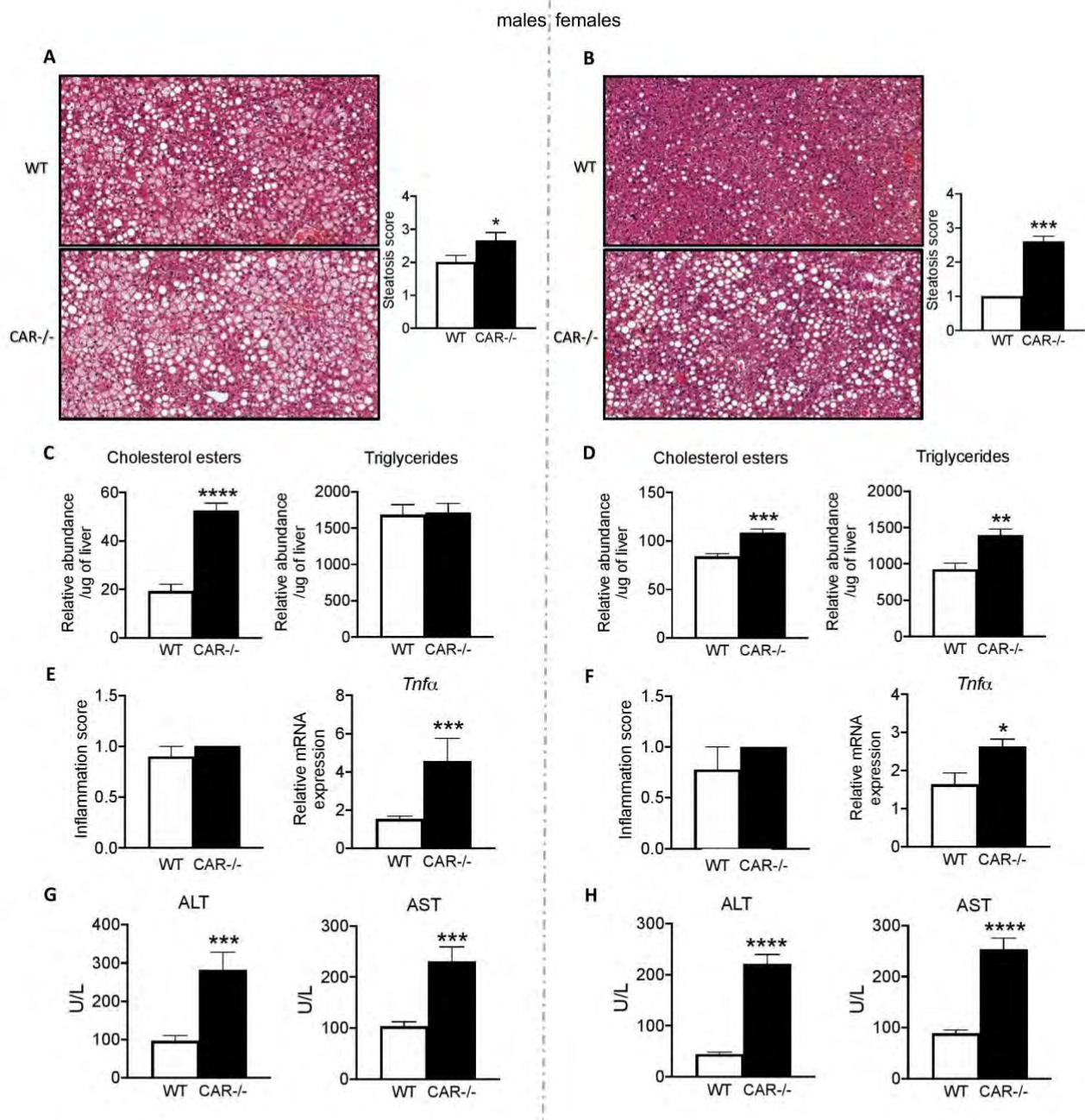
Clusters 3 and 7 of the heat map presented in Figure 5 were analysed using *Enrichr*, the 7 most significant Kegg pathways are reported in this table.



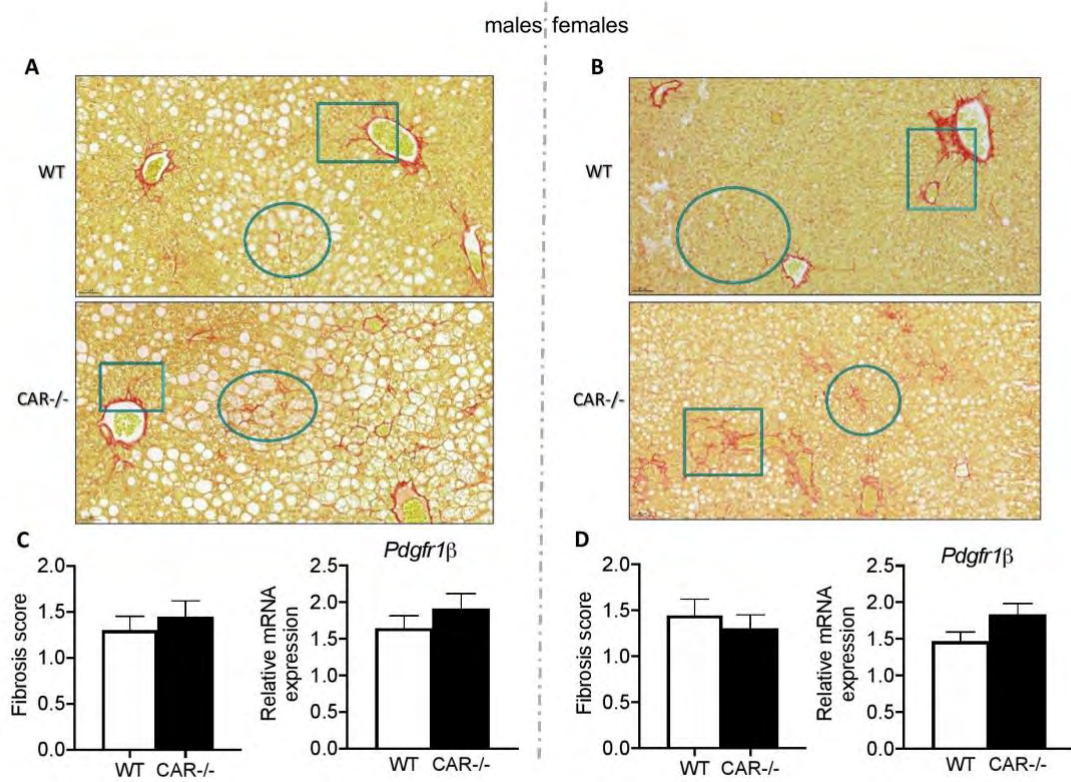
**Figure 1 :** CAR deletion exacerbates HFD-induced body weight gain only in female mice



**Figure 2 :** CAR deletion exacerbates HFD-induced hyperglycemia and hyperinsulinemia

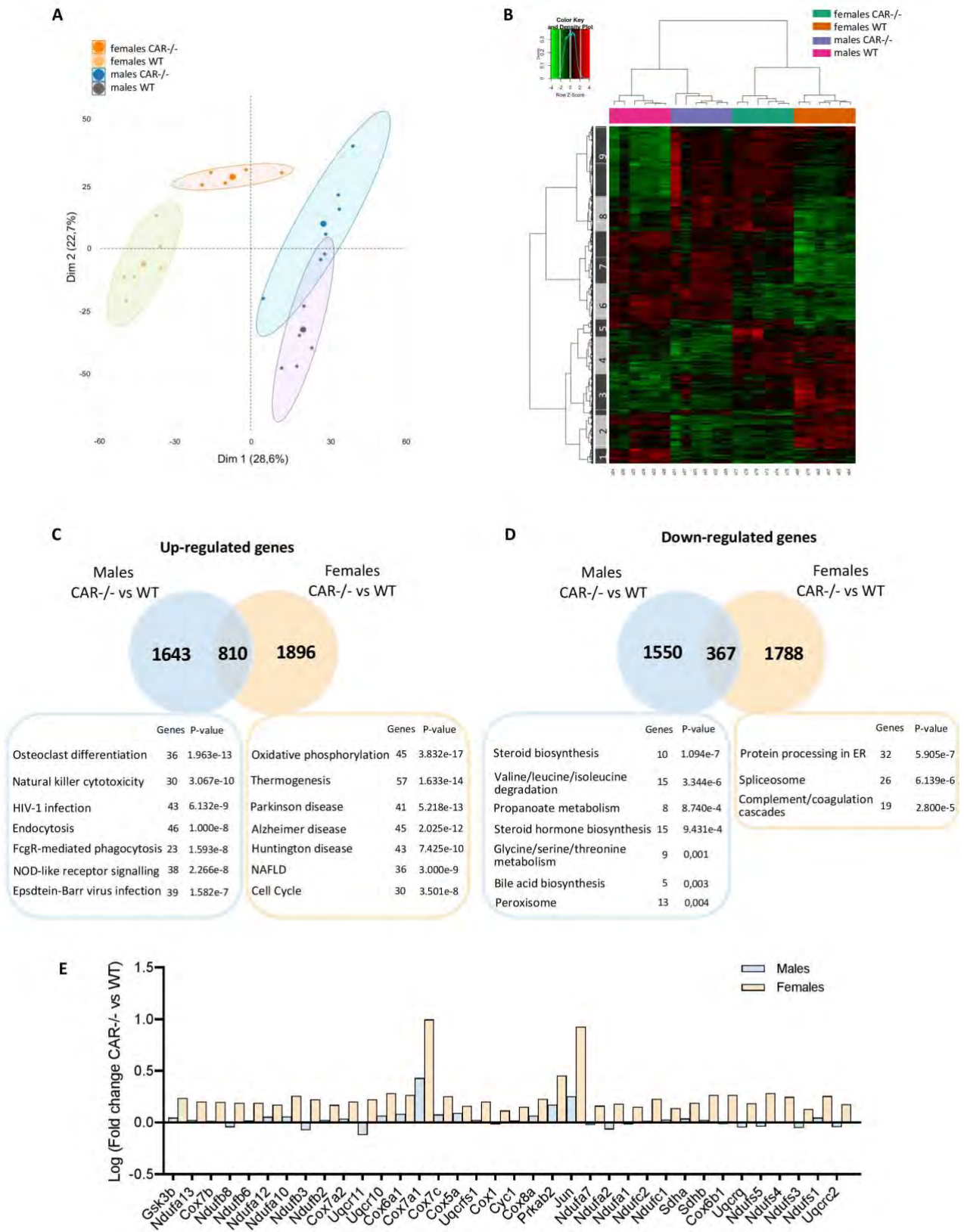


**Figure 3** : CAR deletion exacerbates HFD-induced hepatic steatosis and liver injury

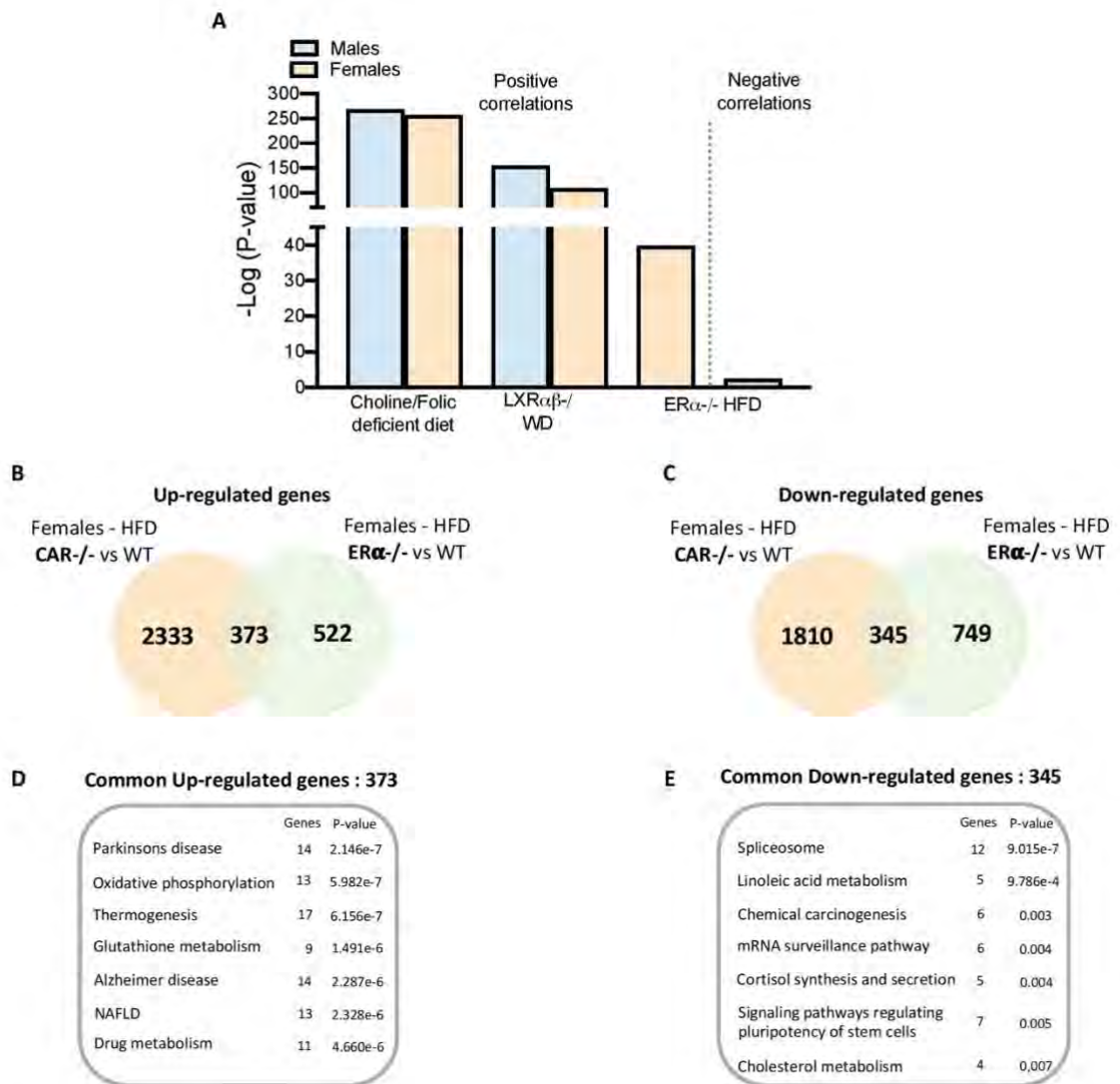


**Figure 4** : CAR deletion does not affect liver fibrosis

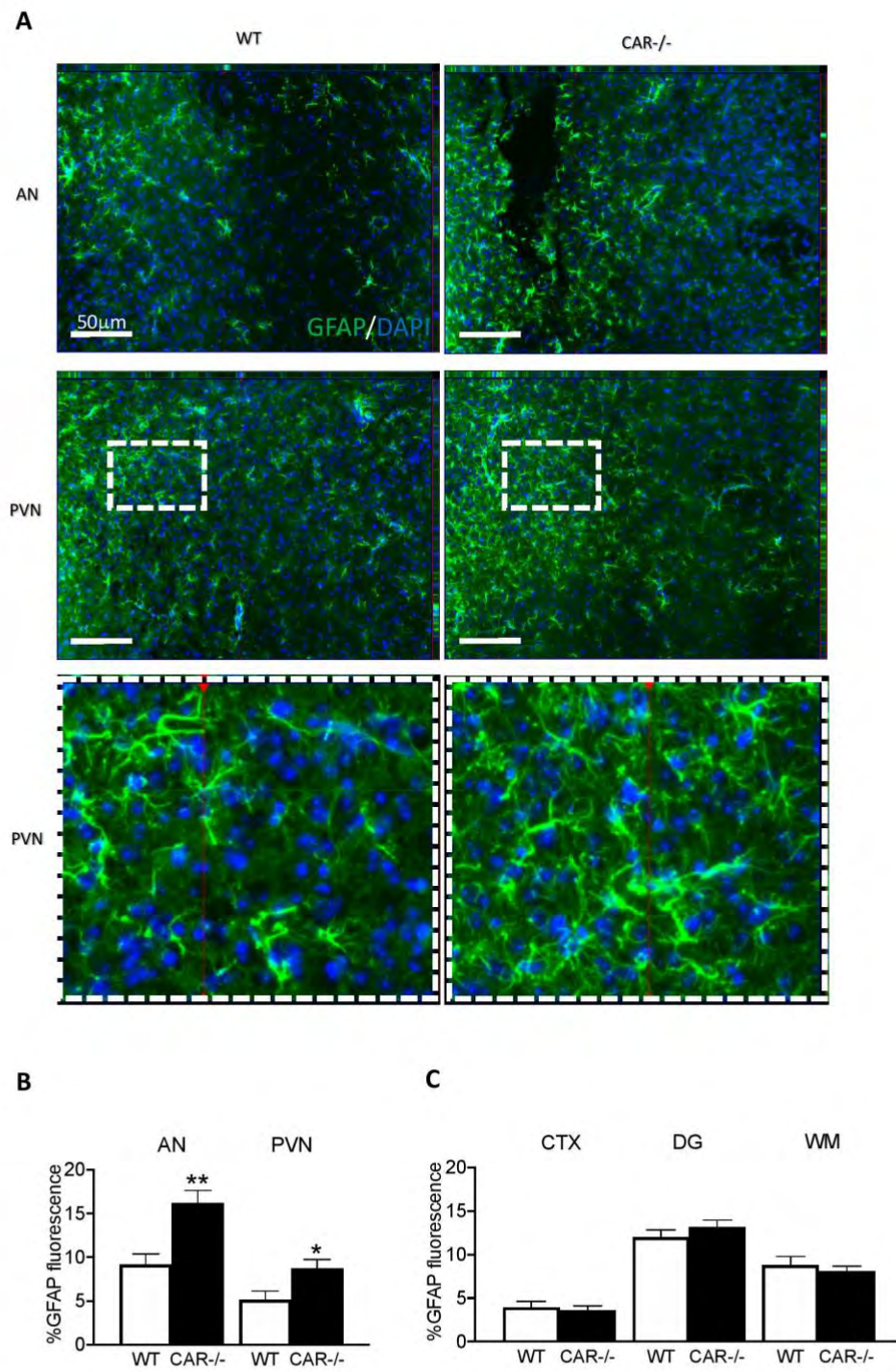




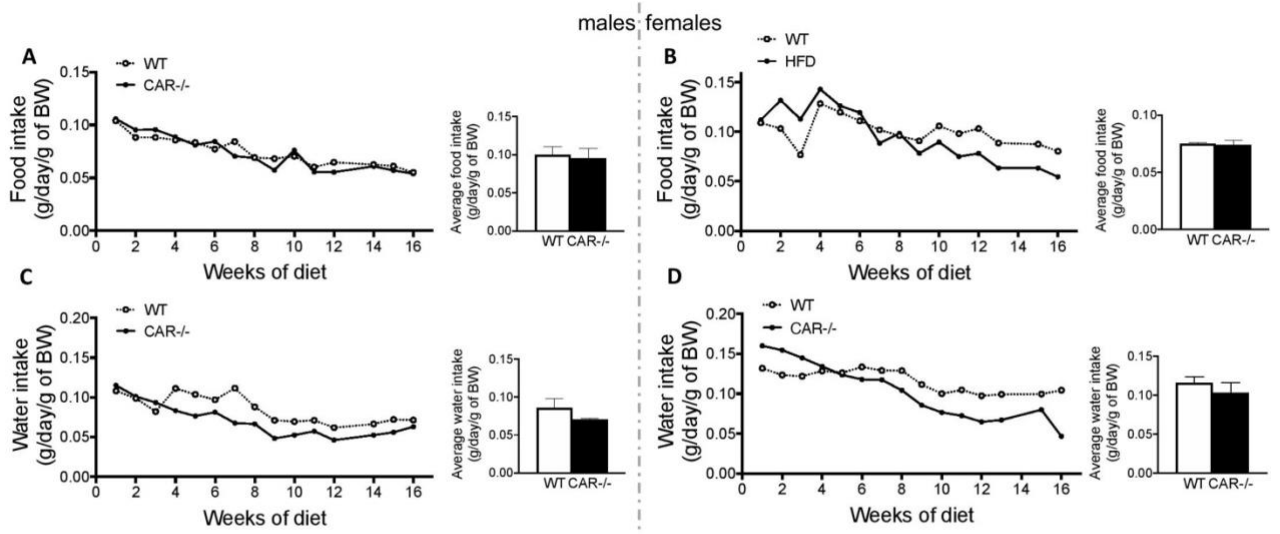
**Figure 5 : Dimorphic impact of CAR deletion on hepatic transcriptome**



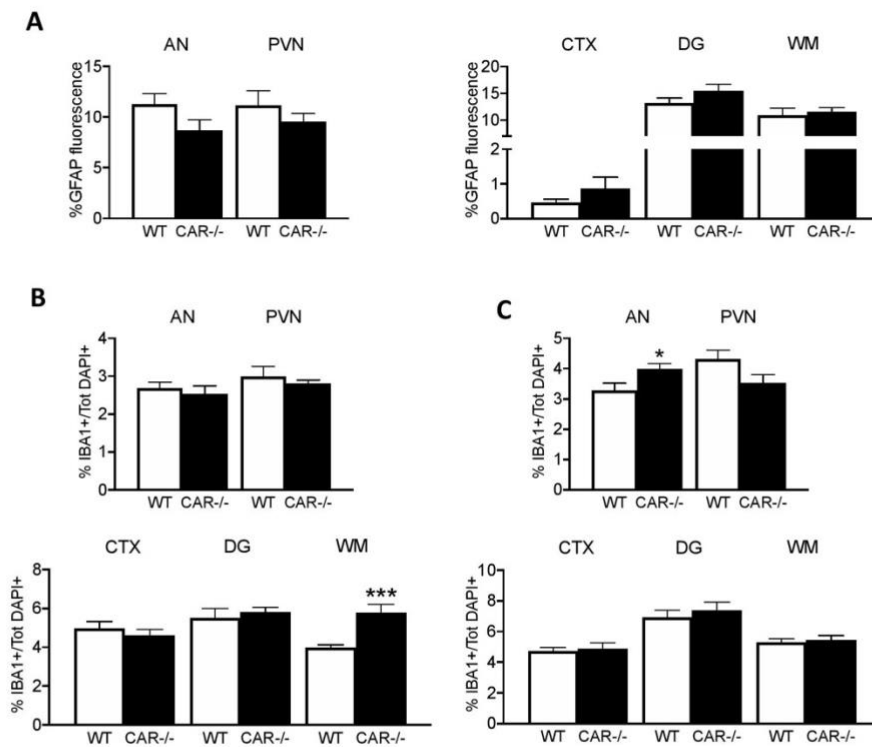
**Figure 6** : Positive correlation between transcriptomic signatures of **CAR**<sup>-/-</sup> and **ERα**<sup>-/-</sup> females



**Figure 7 : CAR deletion associates with hypothalamic astrogliosis in HFD-fed females**



**Supplementary Figure 1 : CAR deletion does not affect food and water intake of mice.**



**Supplementary Figure 2 : CAR deletion induces dimorphic central adaptations.**



**Supplementary Table 1** : Kegg pathway enrichment of cluster 3 and 7 of heat map.

	Kegg pathways	P-value	Gene names
Cluster 3	Ribosome	1.134e-9	RPL30;RPL3;RPS5;MRPL15;RPL8;RPL9;RPL7;RPS26;RPS28;RPS27;RPS15A;RPS18;RPS3;RPL26;RPL15;RPS10;RPL28;RPS13
	Linoleic acid metabolism	2.431e-5	CYP2C68;CYP3A41A;CYP3A11;CYP3A44;CYP2C40;CYP2C70;CYP3A16
	Complement and coagulation cascades	1.515e-4	FGB;C3;F7;F10;SERPINF2;CFI;CFB;KNG1
	Chemical carcinogenesis	2.398e-4	ALDH3B2;CYP2C68;CYP3A41A;CYP3A11;CYP3A44;CYP2C40;CYP2C70;CYP3A16
	Steroid hormone biosynthesis	9.389e-4	CYP2C68;CYP3A41A;CYP3A11;CYP3A44;CYP2C40;CYP2C70;CYP3A16
	Retinol metabolism	0.001	CYP2C68;CYP3A41A;CYP3A11;CYP3A44;CYP2C40;CYP2C70;CYP3A16
	Adipocytokine signaling pathway	0.008	LEPR;AKT1;IRS2;PRKAB1;CAMKK2
Cluster 7	Drug metabolism	2.649e-8	UGT2B36;UGT2B35;MGST1;HPRT;FMO5;UGT1A6B;CES2B;CES2C;CES2E;GSTA3;CES1E;GSTA2;CMPK1;AOX1;GSTM6
	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	1.239e-5	AKR7A5;UGT2B36;UGT2B35;GSTA3;GSTA2;MGST1;CYP1A1;UGT1A6B;GSTM6
	Ascorbate and aldarate metabolism	2.054e-5	UGDH;ALDH2;UGT2B36;UGT2B35;ALDH7A1;UGT1A6B
	Valine, leucine and isoleucine degradation	2.673e-5	BCKDHA;ECHS1;AUH;ALDH2;AGXT2;AOX1;ALDH7A1;HSD17B10
	Parkinson disease	3.183e-4	NDUF55;NDUFA3;NDUFA10;NDUFB3;NDUFA2;UQCRC1;COX7A2;UQCRC11;PARK7;PRKACA;GNAI1
	Alzheimer disease	4.645e-4	NDUF55;NDUFA3;NDUFA10;NDUFB3;NDUFA2;UQCRC1;FAS;COX7A2;UQCRC11;CAPN1;GAPDH;HSD17B10
	Thermogenesis	5.641e-4	COX19;NDUFA3;NDUFA10;NDUFB3;NDUFA2;UQCRC11;COX7A2;ARID1B;ADCY6;NDUF55;UQCRC1;PPARG;PRKACA;COA6

## ETUDES EXPERIMENTALES

### *Partie II*

#### Étude du rôle du récepteur CAR dans la pathogenèse de la stéatose hépatique induite par l'acide perfluorooctanoïque (PFOA)

L'objectif de la deuxième partie de mes travaux de recherche a été d'étudier le rôle du récepteur CAR dans la pathogenèse de la stéatose hépatique induite par l'exposition au PFOA. Des souris mâles ou femelles, de génotype WT ou CAR<sup>-/-</sup> ont été exposées à de fortes doses de PFOA en aiguë (3 jours, 100mg/kg/jour). Dans cette étude, comme dans la précédente, trois facteurs sont présents dont le facteur sexe, génotype et traitement. Dans cette étude, l'objectif était d'étudier le rôle de CAR dans un contexte de stress xénobiotique lié à l'exposition au PFOA. Nous avons donc comparé la réponse à une exposition au PFOA de souris WT et de souris délétées pour CAR. Une première analyse a permis de générer un « fold change » (traité au PFOA vs contrôle) pour chacun des génotypes et des sexes. Les « fold change » représentant l'effet du PFOA chez les souris WT ont ensuite été comparés à ceux des CAR<sup>-/-</sup> pour les deux sexes.

Les résultats de cette étude révèlent une implication dimorphique du récepteur CAR dans les effets du PFOA. L'exposition au PFOA induit une activation du récepteur CAR ainsi qu'une hépatomégalie partiellement dépendante de CAR, car moins importante chez les souris CAR<sup>-/-</sup> que les WT. Ce composé induit également une accumulation de lipides au niveau hépatique chez les souris WT et CAR<sup>-/-</sup>. Chez les mâles, la délétion de CAR n'affecte pas les contenus lipidiques hépatiques, alors que les femelles CAR<sup>-/-</sup> présentent une accumulation moins importante de triglycérides en réponse au PFOA que les WT. De plus, les gouttelettes lipidiques formées chez les souris CAR<sup>-/-</sup> sont de plus petite taille que celles formées chez les

souris WT, dans les deux sexes. Pour comprendre les mécanismes impliqués dans la stéatose induite par l'exposition au PFOA, nous avons analysé le profil lipidique plasmatique ainsi que l'expression de gènes impliqués dans l'import et l'export de lipides hépatiques, la lipogenèse *de novo*, la  $\beta$ -oxydation et la formation des gouttelettes lipidiques. Une diminution des triglycérides (TG) et des acides gras libres (AGL) plasmatiques et une induction de l'expression de *Cd36*, un gène impliqué dans l'import d'AGL suggèrent que l'augmentation de l'import lipidique hépatique est un mécanisme clé dans la stéatose induite par le PFOA. Ces mécanismes ne sont pas impactés par la délétion de CAR chez les mâles. En revanche, chez les femelles, la diminution de TG et d'AGL en réponse au PFOA est plus importante chez les WT que chez les *CAR*<sup>-/-</sup>. Nous avons également étudié l'effet du PFOA sur des souris mâles *PXR*<sup>-/-</sup>. Ce récepteur est activé par le PFOA et est en partie impliqué dans l'hépatomégalie induite par ce toxique. Comme chez les souris *CAR*<sup>-/-</sup>, les gouttelettes lipidiques formées chez les souris *PXR*<sup>-/-</sup> semblent être de plus petite taille que celles formées chez les souris WT. Les résultats obtenus dans cette étude font l'objet d'un article en préparation.



# **Role of nuclear receptor CAR in the development of PFOA-associated fatty liver disease**

Oliviero F et al., article in preparation.

## **Abstract**

Environmental contaminants are suspected to play a role in the pathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD), the incidence of which is increasing in the western countries. Perfluorooctanoic acid (PFOA) is a persistent pollutant known to disrupt the hepatic lipid metabolism. The aim of this study is to explore the role of nuclear receptors CAR and PXR in hepatic steatosis induced by PFOA. For this, an acute exposure to high doses of PFOA (100mg/kg/j) was performed on male and female WT, CAR<sup>-/-</sup> and PXR<sup>-/-</sup> mice. This study reveals a significant accumulation of lipids in the liver of mice exposed to PFOA. A further study of the mechanisms involved shows a decrease in plasmatic triglycerides and free fatty acids as well as an up-regulation of the *Cd36* transporter involved in the import of fatty acids to the liver. Histological analysis of the liver allowed the detection of lipid droplets of smaller size in CAR<sup>-/-</sup> and PXR<sup>-/-</sup> mice exposed to PFOA, suggesting an unknown role of these receptors in the formation of lipid droplets.

## **Introduction**

Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and Non-Alcoholic SteatoHepatitis (NASH) are currently the leading causes of liver diseases in western countries. They represent a set of hepatic pathologies ranging from a steatosis which is a simple accumulation of hepatic fat, to inflammation with or without fibrosis known as NASH, which can progress into cirrhosis and hepatocellular carcinoma (Cohen 2011).

The prevalence of NAFLD has doubled over the past 20 years, reaching 30% of total population in industrialized countries and 10% in developing countries (Farrell et al. 2007). Environmental contaminants have been suspected to play a role in the onset of this pathology and its progression to more serious forms. The term TAFLD (Toxic-Associated Fatty Liver Disease) recently used in the literature suggests that toxicants considered as environmental obesogens could also participate in the development of fatty liver disease (Wahlang et al. 2013).

Perfluoroalkylated substances are a subset of the large anthropogenic group of perfluorinated compounds manufactured for over 60 years. Due to their unique physico-chemical characteristics, they have been widely used for several industrial purposes and consumer-related applications (IARC 2016). Because of their long half-life in human body, health risks of perfluorinated compounds are an important concern. PFOA, one of the major representatives of perfluoroalkylates carboxylates, displays a large set of adverse effects in humans and animal models, especially hepatotoxicity. Studies in rodents have shown that PFOA is a potent modifier of lipid metabolism and causes fatty liver disease (Das et al. 2017; Kudo et al. 2011). However, the molecular mechanisms involved in the effects of PFOA remain to be elucidated. Some studies suggest that PFOA interferes with mitochondrial  $\beta$ -oxidation of fatty acids while others suggest an action through activation of the PPAR $\alpha$  receptor which plays an important role in the regulation of hepatic lipid metabolism (Rosen et al. 2008). However, the use of PPAR $\alpha$  genetically deficient mice (PPAR $\alpha$  -/-) reveals that the steatosis induced by PFOA and other perfluorinated compounds is independent of PPAR $\alpha$  (Wolf et al. 2008; Pastoor et al. 1987). This suggests an involvement of other nuclear receptors such as CAR, PXR and LXR which are activated in response to PFOA (Rosen et al. 2008).

The aim of this study is to assess the role of CAR and PXR receptors in PFOA-induced steatosis. These receptors are mainly expressed in the liver and are particularly interesting because of their function at the crossroads between detoxification, endocrinology and energy metabolism (di Masi et al. 2009). In fact, CAR and PXR can modulate genes involved in lipid metabolism (Lynch et al. 2014; J. Yan et al. 2015; di Masi et al. 2009) and their activation leads to lipid accumulation in the liver (Marmugi et al. 2016; Knebel et al. 2019). Therefore, CAR and PXR are interesting targets to study the steatosis induced by PFOA. Because NAFLD is a dimorphic pathogenesis, both male and female mice were included in this study.

In this study we demonstrate that PFOA-induced steatosis occurs in both males and females and that it involves an import of fatty acids from the circulation to the liver. We also reveal an involvement of CAR and PXR in the size of lipid droplets accumulated in the liver in response to a PFOA exposure.

## **Material and methods**

### **Animal experiments**

All in vivo experiments were conducted following French national and European laws and regulations relating to the housing and use of animals. These experiments have been approved by an independent ethics committee (“Toxcom thique, INRA ToxAlim, Toulouse, France”). CAR knock-out or PXR knock-out mice backcrossed on the C57BL/6J background were provided by Dr. Urs A. Meyer (Biocenter, University Basel, Switzerland). 8 week old male or female C57BL6/J, CAR<sup>-/-</sup> and PXR<sup>-/-</sup> mice were divided into two groups (**Table 1**) treated by oral gavage with either tap water or PFOA once a day for three days (100 mg/kg/day). Mice were euthanised on day 4 of experiment. Mice had access to food and water ad libitum with 12 hour light/dark cycle (23 $\pm$ 2°C).

**Table 1 : Description of experimental groups**

Sex	Genotype	Treatment	n
♂	C57BL6/J	Vehicle/Control (C)	12
	C57BL6/J	PFOA (P)	12
♀	C57BL6/J	C	6
	C57BL6/J	P	6
♂	CAR <sup>-/-</sup>	C	12
	CAR <sup>-/-</sup>	P	12
♀	CAR <sup>-/-</sup>	C	6
	CAR <sup>-/-</sup>	P	6
♂	PXR <sup>-/-</sup>	C	6
	PXR <sup>-/-</sup>	P	6

**Blood and organ sampling.**

Before euthanasia, blood was collected in fed state from the sub-mandibular vein using a lancet into lithium-heparin coated tubes (BD Microtainer). Plasma was obtained by centrifugation (1500xg, 10min, 4°C) and stored at -80°C. Plasmatic triglycerides, free fatty acids and total cholesterol were assayed using a PENTRA 400 biochemical analyser (Anexplo facility, Toulouse, France). Liver tissue was collected, weighed, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Liver samples (50 mg) were kept in tissue TEK.

**RT-qPCR analysis.**

Total hepatic RNA was extracted from liver samples with TRIzol® reagent (Sigma-Aldrich). For real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR), total RNA samples (2 µg) were reverse-transcribed using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Primers for SYBR Green assays are presented in Supplementary Table 1.

Amplifications were performed on an ABI Prism 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems). qPCR data were normalized by TATA-box binding protein mRNA levels and analyzed with LinRegPCR (2015.3 version).

### **Liver and histological sections**

Liver samples were also in tissue TEK (ref), snap frozen in isopentane (ref) and sliced into xx- $\mu$ m sections, and stained with Oil-red-O (ref). Staining was visualized with a Leica microscope DM4000 B equipped with a Leica DFC450 C camera (Leica Microsystems).

### **Hepatic neutral lipid analysis**

Hepatic neutral lipid contents were determined as described previously (Régnier et al. 2018). Liver samples were homogenized in methanol/5 mM EGTA (2:1, v/v); lipids were extracted with chloroform/methanol/water (2.5:2.5:2.1, v/ v/v), in the presence of glyceryl trinonadecanoate, stigmasterol, and cholesteryl heptadecanoate (Sigma) as internal standards. Triglycerides, free cholesterol, and cholesterol esters were analysed by gas-liquid chromatography on a Focus Thermo Electron system.

### **Data representation and statistical analysis.**

All data are presented as mean +/- SEM. Statistical analyses were performed using Mann-Whitney statistical test on GraphPad Prism for Windows (version 8.00; GraphPad Software). Significance threshold was set at  $p < 0,05$  (\*).

## Results

### **CAR-dependent PFOA induction of CAR and PPAR $\alpha$ target genes**

3 days exposure to PFOA induces transcription of *Cyp2b10* and *Cyp2c29* in WT males (Figure 1A) and in WT females (Figure 1B). These are prototypical genes of CAR, thus their increased transcription reflects CAR activation. In CAR<sup>-/-</sup> males and females, PFOA induction of *Cyp2b10* and *Cyp2c29* is lower than in WT, revealing a CAR-dependent induction of these genes by PFOA. PFOA exposure also induces transcription of prototypical PPAR $\alpha$  genes *Cyp4a10* and *Cyp4a14* in both male and female WT mice (Figure 1C-D). However, CAR deletion impacts PFOA up-regulation of PPAR $\alpha$  target genes differently in males and females. CAR<sup>-/-</sup> male mice have a minor increase of transcription of *Cyp4a10* and *Cyp4a14* compared to WT revealing a CAR-dependent PPAR $\alpha$  activation. CAR<sup>-/-</sup> females present higher levels of transcription of PPAR $\alpha$  target genes compared to WT females (Figure 1C-D).

In addition, PFOA increases mRNA expression of PXR prototypical genes *Cyp3a11* and *Cyp2c55* in WT male mice independently of PXR as PXR deletion does not affect PFOA effect on these genes (Supp Figure 1A).

### **PFOA induces CAR-dependent hepatomegaly and hepatic steatosis**

Acute PFOA exposure increases liver weight of 2 fold in WT males (Figure 2A) and females (Figure 2B). In CAR<sup>-/-</sup> mice liver weight is only increased of 1,5 fold in both sexes (Figure 2A, B) revealing a partially CAR-dependent hepatomegaly induced by PFOA. PFOA induces lipid droplet accumulation in the liver, as revealed by Oil Red-O staining of histological liver slices in both WT males (Figure 2C) and WT females (Figure 2D). In CAR<sup>-/-</sup> mice, lipid accumulation induced by PFOA seems to be less important in quantity and in size of lipid droplets (Figure 2C, D).



Hepatic neutral lipids were extracted and quantified to support histological observation and revealed that PFOA-induced steatosis is mainly comprised of triglycerides, increasing of a 6 fold in WT males (Figure 2E) and of a 5 fold in WT females (Figure 2F). Cholesterol esters are not affected by PFOA exposure in WT mice, with a fold change close to 1 (Figure 2E, F). CAR deletion does not affect neutral lipid quantities in males, however, in females, CAR deletion reduces PFOA-induced triglyceride accumulation (Figure 2E, F).

The effect of PFOA on liver weight is slightly more important in WT male mice than in PXR male mice, revealing a partially PXR-dependent effect of PFOA on liver weight (Supp Figure 1B). As for CAR<sup>-/-</sup> mice, PFOA-induced lipid droplet accumulation in PXR<sup>-/-</sup> male mice seems to be less important in quantity and in size of lipid droplets compared to WT male mice (Supp Figure 1C).

### **PFOA increases lipid uptake in the liver**

PFOA administration decreases plasma levels of triglycerides (TGs) and free fatty acids (FFAs) in WT and CAR<sup>-/-</sup> males (Figure 3A). In WT females, plasma TGs are decreased in PFOA-treated WT and CAR<sup>-/-</sup> mice (Figure 3B), however, plasma FFAs are more importantly decreased in PFOA-treated WT than in CAR<sup>-/-</sup> mice.

PFOA-induced hepatic steatosis can be the result of different mechanisms represented in figure 4A such as increased lipid uptake, increased *de novo lipogenesis*, decreased  $\beta$ -oxydation or decreased lipid export. An analysis of these pathways was assessed by qPCR and revealed that PFOA increases mRNA levels of *Cd36*, a major actor of FFA uptake in the liver in males (15 fold) and females (13 fold) (Figure 4B, C). The induction of *Cd36* is not dependent of CAR since its expression is not affected by CAR deletion.

*De novo lipogenesis* limiting enzymes such as *Scd1*, *Acc* and *Fasn* are not impacted in males (Figure 4D, E). However, in WT females, PFOA increases *de novo lipogenesis* in a partially CAR-dependent way as this effect is less important in CAR<sup>-/-</sup> mice (Figure 4D, E).

$\beta$ -oxydation genes (*Acox1*, *Cpt1a*, *Eci*) are up-regulated in PFOA-treated WT and CAR<sup>-/-</sup> males and females (Figure 4F, G). Finally, perilipin proteins involved in lipid droplet formation (*Plin2*, *Plin5*) are up-regulated in PFOA-treated WT males and females (Figure 4H, I). CAR deletion exacerbates PFOA-induced *Plin2* up-regulation in females and *Plin5* up-regulation in males (Figure 4H, I).

## Discussion

The results presented in this study reveal that an acute exposure to PFOA leads to activation of nuclear receptor CAR, hepatomegaly and accumulation of lipids in the liver of male and female WT mice. Analysis of PFOA effects on CAR<sup>-/-</sup> and PXR<sup>-/-</sup> mice revealed a partial involvement of both receptors in hepatomegaly and accumulation of lipids in the liver.

The PPAR $\alpha$  receptor is considered to be the primary target of PFOA. In this study we reveal that in addition to activating PPAR $\alpha$ , PFOA also activates CAR as demonstrated by other studies (Schlezinger et al. 2020). CAR can be activated directly by its pharmacological agonist TCPOBOP or indirectly by phenobarbital (Oliviero et al. 2020). A study suggests an indirect activation of PFOA by CAR without direct binding (Abe et al. 2017). In this study we reveal that the activation of PPAR $\alpha$  depends on the receptor CAR in a different way in males compared to females. In males, the activation of PPAR $\alpha$  is less important in the absence of CAR, whereas in females PPAR $\alpha$  activation is more important when CAR is absent.

Studies using PPAR $\alpha$ <sup>-/-</sup> mice revealed that PPAR $\alpha$  is not involved in the steatosis induced by PFOA (Wolf et al. 2008; Pastoor et al. 1987). In this study, we reveal that PFOA, in the absence of CAR induces a steatosis which is not identical to the one induced when CAR is present.

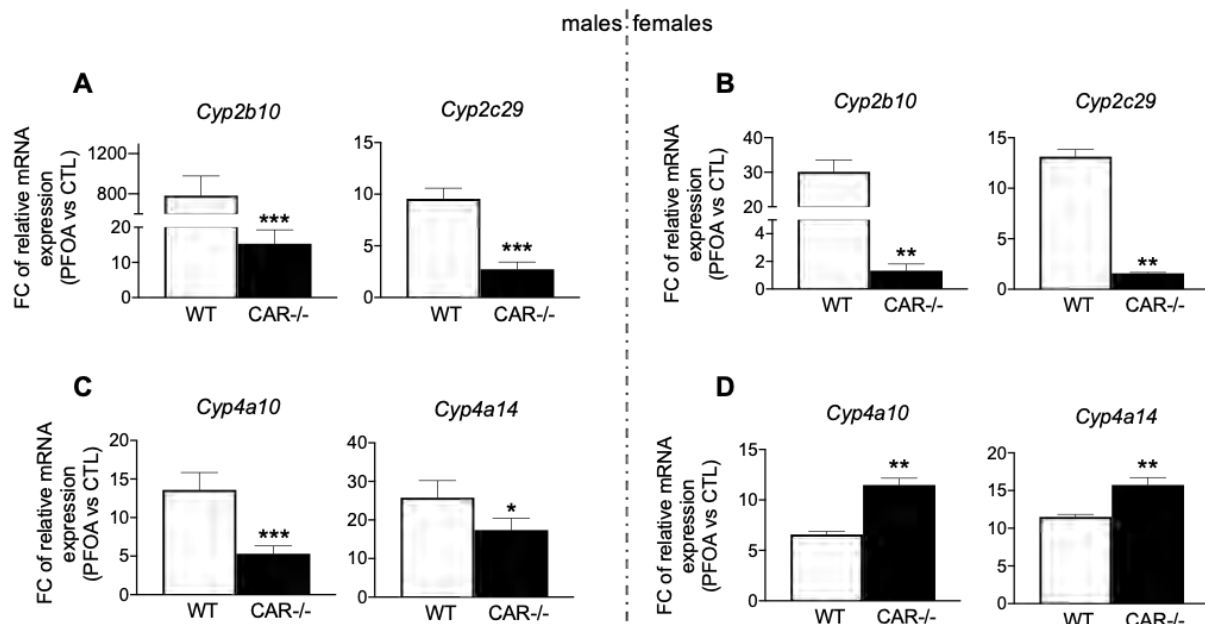
The absence of CAR leads to a lower quantity of lipids mainly in females (Figure 2F) and to lipid droplets of smaller size, in both males and females (Figure 2C, D). These results suggest an undescribed role of CAR in the formation of lipid droplets. An on-going proteomic analysis aims at comparing the proteome of lipid droplets from CAR<sup>-/-</sup> and WT mice exposed to PFOA. Interestingly, the lipid droplets formed in the presence of PFOA are composed mainly of triglycerides whereas those induced by high fat diets usually contain both triglycerides and cholesterol esters (Ito et al. 2007).

The accumulation of lipids in the liver can be the consequence of different mechanisms such as a *de novo* synthesis through lipogenesis, an inhibition of fatty acid catabolism, an activation of fatty acids uptake or an inhibition of lipid export (Figure 4A). The q-PCR analysis of genes involved in these metabolic pathways reveals that PFOA leads to an up-regulation of the *Cd36* gene involved in fatty acid uptake. These results are supported by a decrease in plasma fatty acids in mice exposed to PFOA. Our results are in accordance with other data demonstrating that PFOA affects hepatic lipid metabolism by disrupting fatty acid trafficking (Hui, Li, and Chen 2017). The results obtained in this study reveal that lipid import does not depend on CAR receptor since the same effects are observed in CAR<sup>-/-</sup> and WT mice. However, these results highlight an involvement of CAR in the formation of lipid droplets in response to PFOA. PXR receptor is structurally and functionally similar to CAR and also seems to be involved in the formation of lipid droplets even though its activation by PFOA is less important than observed for CAR (Supplementary figure 1).

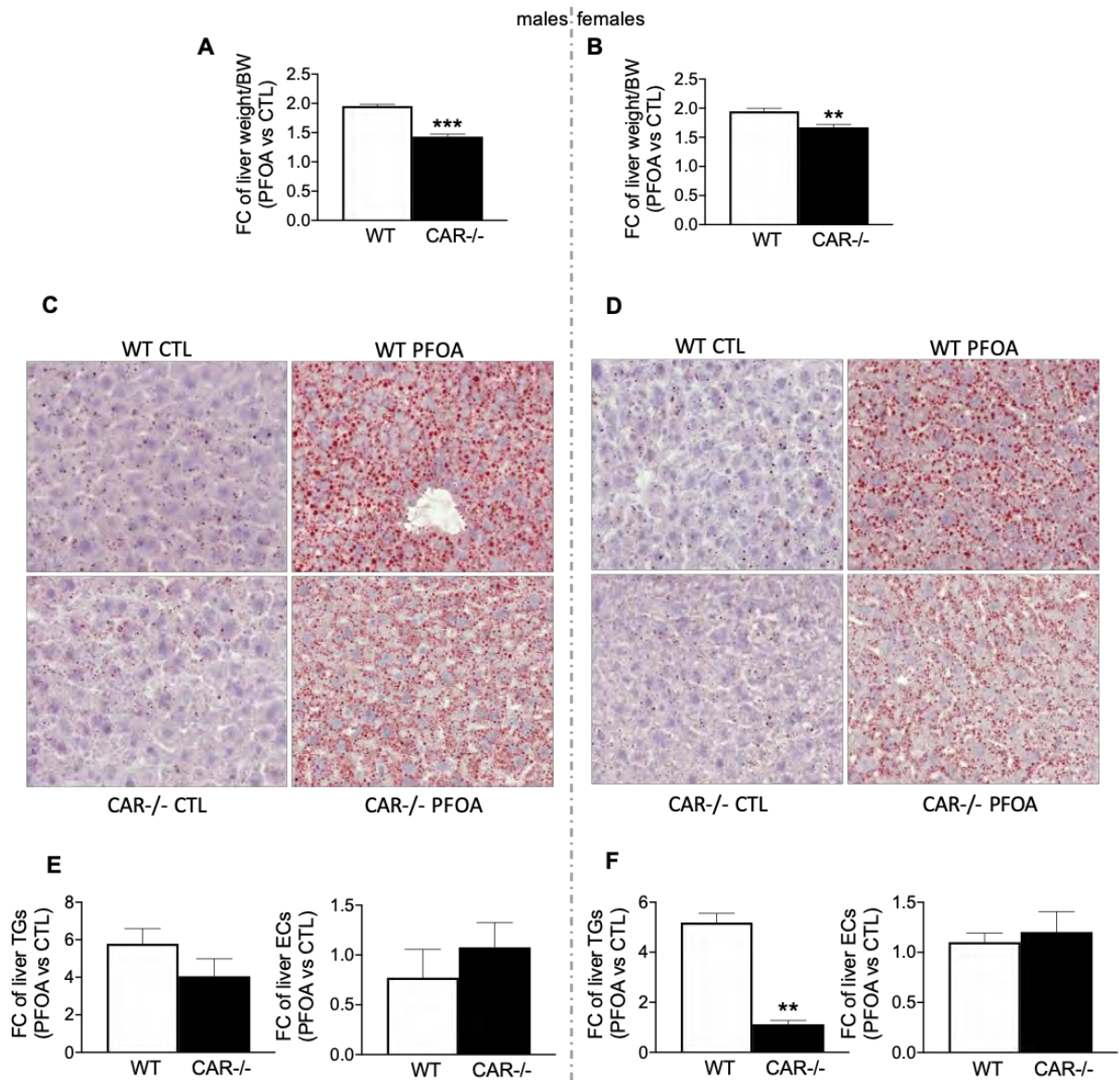
This study raises several questions regarding the purpose of PFOA-induced lipid accumulation in the liver. Why does the liver produce lipids in response to the presence of a toxic compound? This lipid production could be part of a detoxification process through which the liver could neutralize the toxins by trapping them in lipid droplets while awaiting their elimination.

To explore this hypothesis, we set out to locate PFOA in order to determine if this compound is internalized inside the lipid droplets. To do so, an on-going TOF-SIMS analysis will allow to locate PFOA-specific fluorine ions in the liver.

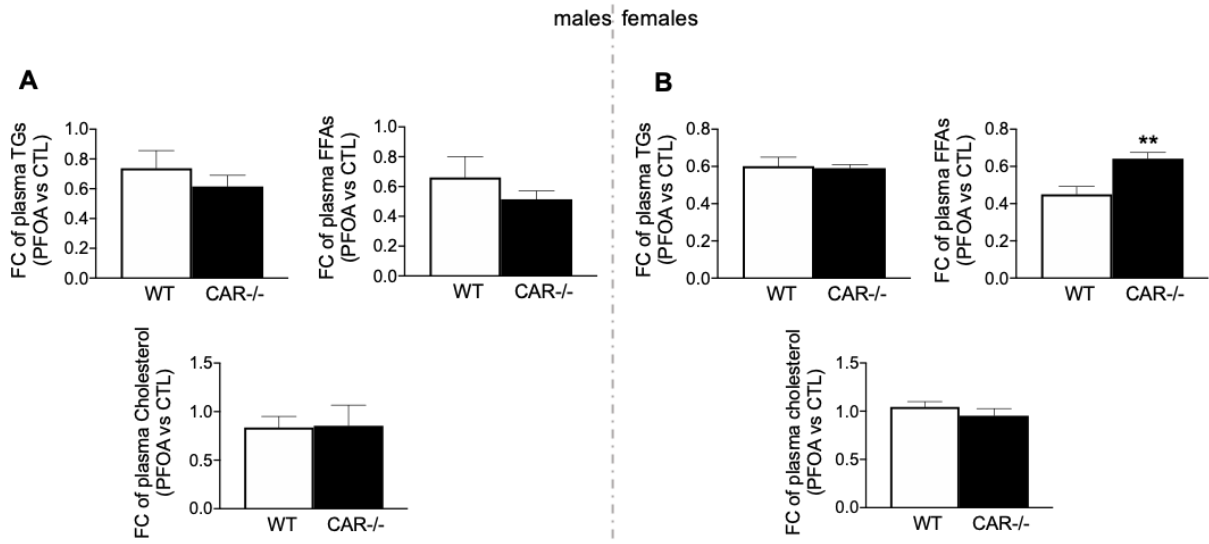
Taken together, these results provide new data on the mechanism by which PFOA induces an accumulation of lipids in the liver. This study reveals an involvement of the CAR receptor in the formation of lipid droplets.



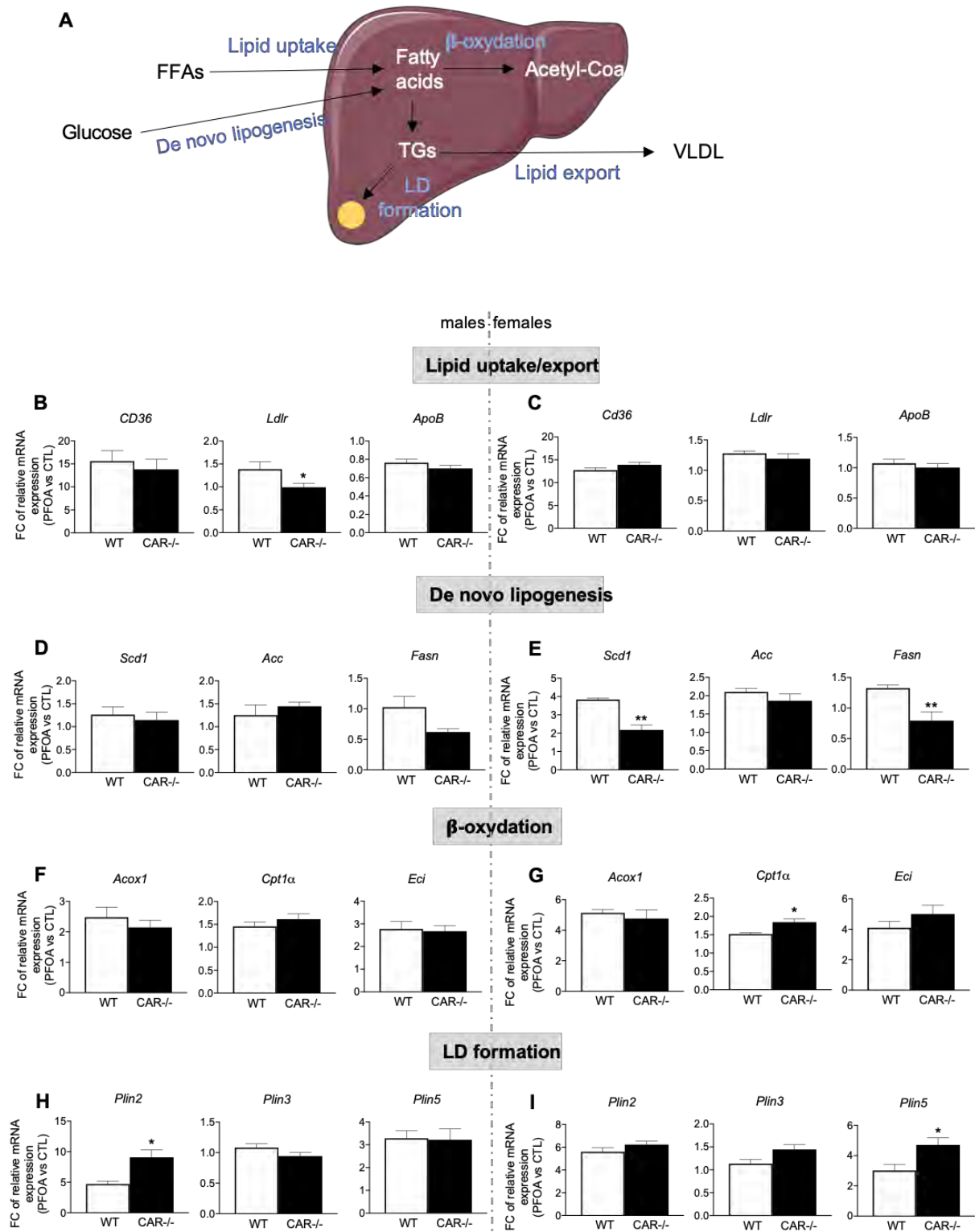
**Figure 1 : CAR-dependent PFOA induction of CAR and PPAR $\alpha$  target genes**



**Figure 2** : PFOA induces CAR-dependent hepatomegaly and hepatic steatosis

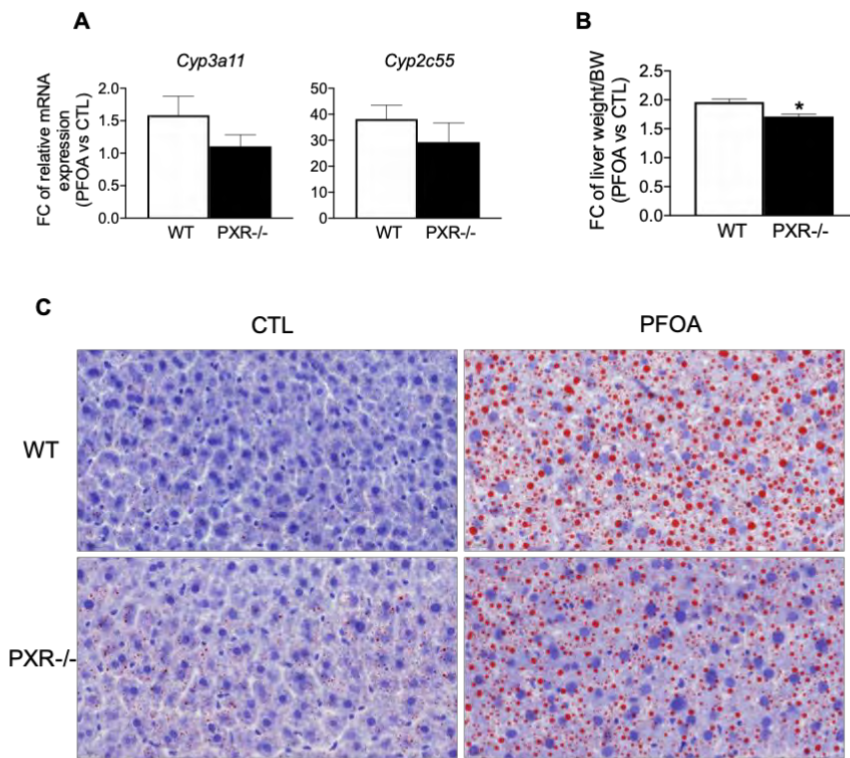


**Figure 3** : PFOA decreases plasma triglycerides and free fatty acids.



**Figure 4 : PFOA increases lipid uptake in the liver**





**Supplementary Figure 1** : PFOA-induced hepatomegaly and hepatic steatosis are not dependent on PXR activation

## Figure Legends

### Figure 1 : CAR-dependent PFOA induction of CAR and PPAR $\alpha$ target genes

RT-qPCR of CAR prototypical target genes *Cyp2b10* and *Cyp2c29* in the liver of WT and CAR<sup>-/-</sup> males (A) and females (B), and PPAR $\alpha$  prototypical target genes *Cyp4a10* and *Cyp4a14* in WT and CAR<sup>-/-</sup> males (C) and females (D) following 3 days of PFOA exposure.

### Figure 2 : PFOA induces CAR-dependent hepatomegaly and hepatic steatosis

Livers were harvested after 3 days of PFOA administration, weighed and liver weight was normalized by body weight (BW, A, B). Histological slices of liver were stained with oil red-O (C, D, magnification x100). Hepatic neutral lipids were extracted and quantified by gas chromatography (GC-FID).

**Figure 3 : PFOA decreases plasma triglycerides and free fatty acids**

Plasmatic analysis of triglycerides (TGs), free fatty acids (FFAs) and total cholesterol were analysed in fed-state using a biochemical analyzer in males (**A**) and females (**B**).

**Figure 4 : PFOA increases lipid uptake and export and  $\beta$ -oxidation**

**A** : schematic representation of mechanisms that could be involved in PFOA-induced hepatic steatosis. qPCR assays were performed on liver samples and genes involved in lipid uptake and export (**B, C**), de novo lipogenesis (**D, E**),  $\beta$ -oxydation (**F, G**) and LD formation (**H, I**) were analysed.

**Supplementary Figure 1 : PFOA-induced hepatomegaly and hepatic steatosis are not dependent on PXR activation.**

Livers of WT and PXR<sup>-/-</sup> male mice were harvested after 3 days of PFOA administration, weighed and liver weight was normalized by body weight (BW, **A, B**). Histological slices of liver were stained with oil red-O (**C, D**, magnification x100).

## ETUDES EXPERIMENTALES

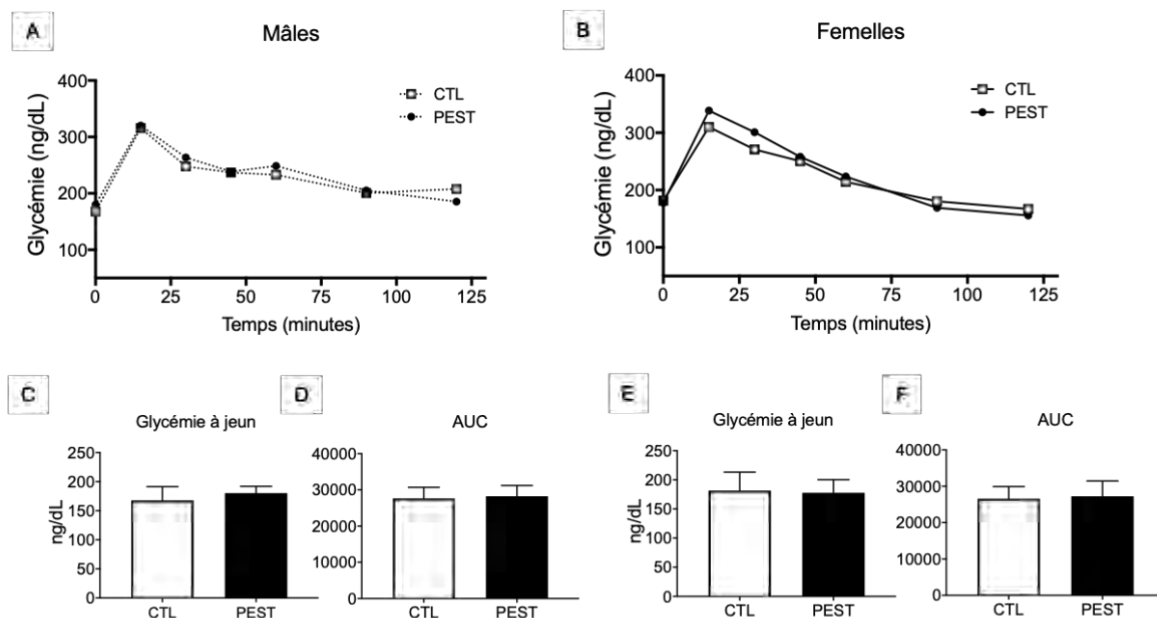
### *Partie III*

Une exposition chronique à un mélange de pesticides induit des adaptations du comportement, des altérations neurophysiologiques et une activation des voies de détoxification hépatiques.

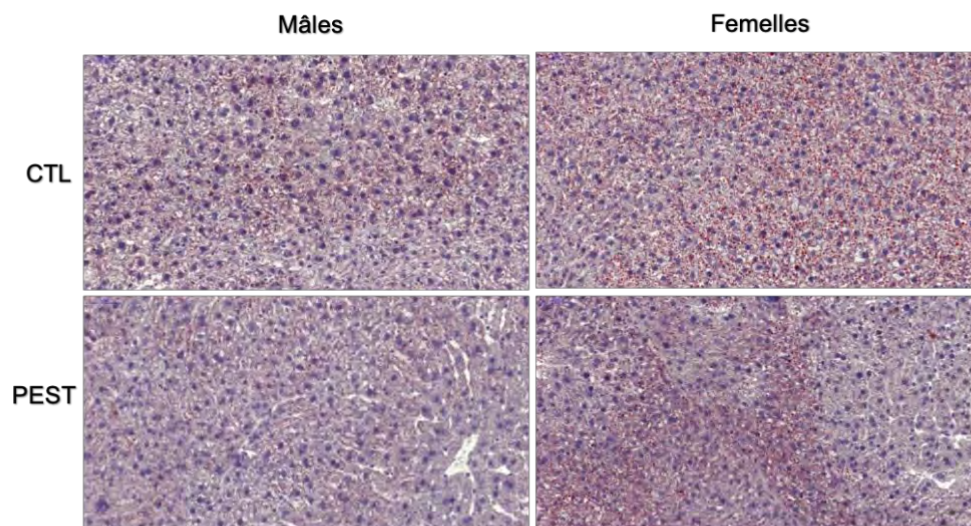
Le but de la troisième partie de mes travaux de thèse a été d'évaluer l'effet d'une exposition chronique à un mélange de pesticides sur l'axe foie-cerveau en utilisant un modèle murin (souris C57BL6/J). Le mélange utilisé est un mélange de 6 pesticides fréquemment utilisés dans l'agriculture des pommiers dans le sud de la France (ziram, chlorpyrifos, thiachlopride, boscalide, thiofanate et captan) (EFSA 2015). D'après le rapport de l'EFSA en 2015, ces pesticides sont retrouvés dans les pommes vendues en France ou exportées dans d'autres pays de l'Union Européenne. Ce mélange de pesticides a été incorporé dans l'aliment des souris à la DJA pour chacun d'entre eux. Des souris mâles et femelles ont été exposées à ce mélange à partir du sevrage (3 semaines) pendant 12 mois.

Dans cette étude, l'exposition aux pesticides n'induit pas de perturbations du métabolisme glucidique ni de l'accumulation de lipides hépatiques. Des tests de tolérance au glucose effectués à 2, 4, et 11 mois d'exposition n'ont pas mis en évidence d'altération de la tolérance au glucose suite à l'exposition aux pesticides (11 mois, **Figure 9**). Des coupes histologiques de foie colorées à l'huile rouge révèlent une légère accumulation de lipides dans les deux sexes à 12 mois qui ne semble pas dépendre de l'exposition aux pesticides (**Figure 10**). Nous supposons un changement physiologique lié au vieillissement des souris comme le démontrent certaines études qui révèlent que la sénescence hépatocellulaire chez la souris favorise l'accumulation lipidique hépatique (Ogrodnik et al. 2017).

En revanche, l'exposition aux pesticides induit des troubles du comportement, des adaptations morphologiques cérébrales ainsi qu'une activation des voies de détoxification hépatiques et rénales et des voies métaboliques hépatiques. L'exposition chronique à ce mélange de pesticides induit des perturbations du comportement qui suggèrent un état d'anxiété surtout chez les souris mâles. Des altérations neurophysiologiques dimorphiques ont été détectées au niveau de l'hippocampe. Une astrogliose est observée chez les mâles et des modifications pro-fibrotiques sont observés dans les deux sexes. Enfin, une analyse de l'activation de différents récepteurs nucléaires (CAR, PXR et PPAR $\alpha$ ) a révélé une activation du récepteur PPAR $\alpha$  au niveau hépatique et rénal ainsi qu'une induction de l'expression de gènes impliqués dans la  $\beta$ -oxydation hépatique, une voie métabolique PPAR $\alpha$ -dépendante. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans le journal « Neuroscience » dans laquelle les données négatives sur le métabolisme énergétique n'ont pas été intégrées.



**Figure 9 : Une exposition chronique à un mélange de pesticides n'induit pas de perturbations du métabolisme glucidique.** Des souris mâles et femelles C57BL6/J ont été exposées à un mélange de pesticides (ziram, chlorpyrifos, thiachlopride, boscalide, thiofanate et captan) pendant 12 mois. Un test de tolérance oral au glucose (OGTT) a été effectué à 11 mois d'exposition (A, B). L'AUC représente l'air sous la courbe de l'OGTT (C, E). Un dosage de la glycémie a été effectué suite à 6 heures de jeûne (D, F). CTL : contrôle, PEST : pesticides.



**Figure 10 : Une exposition chronique à un mélange de pesticides n'induit pas de stéatose hépatique.** Suite à 12 mois d'exposition à un mélange de pesticides chez des souris C57BL6/J (ziram, chlorpyrifos, thiachlopride, boscalide, thiofanate et captan), des coupes histologiques de foie ont été colorées à l'huile rouge pour mettre en évidence les lipides neutres. (Grossissement x50) CTL : contrôle, PEST : pesticides.



## Life-long Dietary Pesticide Cocktail Induces Astrogliosis Along with Behavioral Adaptations and Activates p450 Metabolic Pathways

Wendy Klement,<sup>a,†</sup> Fabiana Oliviero,<sup>b,†</sup> Giuseppe Gangarossa,<sup>c</sup> Emma Zub,<sup>a</sup> Frederic De Bock,<sup>a</sup> Isabel Forner-Piquer,<sup>a</sup> Marine Blaquiere,<sup>a</sup> Frederic Lasserre,<sup>b</sup> Jean-Marc Pascussi,<sup>a</sup> Tanguy Maurice,<sup>d</sup> Etienne Audinat,<sup>a</sup> Sandrine Ellero-Simatos,<sup>b</sup> Laurence Gamet-Payrastra,<sup>b</sup> Laila Mselli-Lakhal<sup>b</sup> and Nicola Marchi<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Functional Genomics (UMR 5203 CNRS – U 1191 INSERM, University of Montpellier), Montpellier, France

<sup>b</sup> Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRAE, ENVT, INP-Purpan, UPS, 31300 Toulouse, France

<sup>c</sup> Université de Paris, BFA, UMR 8251, CNRS, F-75013 Paris, France

<sup>d</sup> MMDN, University of Montpellier, EPHE, INSERM, UMR\_S1198, Montpellier, France

**Abstract**—Exposure to environmental contaminants is a public health concern. However, pre-clinical studies that examine the impact of pesticides at low-dose and the long-term consequences are uncommon. Here, C57BL6/j male and female mice were daily fed from weaning and up to 12 months, corresponding to early-childhood into middle-age in humans, using chow pellets containing a cocktail of pesticides at tolerable daily intake levels. We found that 12 months of dietary exposure to pesticides was associated with a moderate perivascular or perivascular astrogliosis in specific hippocampal sub-regions. The expression of platelet-derived growth factor receptor beta was modified at the perivascular level. Examination of Iba1<sup>+</sup> microglial cells did not reveal sizeable changes. Concomitantly to astrogliosis, spontaneous spatial memory and sociability were modified in males at 12 months of dietary exposure to pesticides. Telemetry electrocorticographic explorations ruled out the presence of epileptiform activity or theta-gamma wave modifications in these conditions. Long-term pesticides impacted the periphery where the hepatic P450 metabolic cytochromes Cyp4a14 and Cyp4a10 were significantly upregulated in male and female mice during the 12 months of exposure. The expression of  $\beta$ -oxidation genes, such as Acox1, Cpt1a and Eci, was also significantly increased in male and female mice in response to pesticides. Collectively, our results indicate that a life-long exposure to a pesticide cocktail elicits sex-dependent, spatio-temporally restricted brain modifications and significant activation of P450 pathways in the periphery. These brain-peripheral adjustments are discussed as time or age-dependent vulnerability elements. © 2020 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Key words:** Pesticide cocktail, Behavior, P450, Metabolism, Astrocytes, Aging.

### INTRODUCTION

Epidemiological studies indicate environmental contaminant exposure as a significant risk factor for the development of central nervous system (CNS) and peripheral metabolic disorders (Kamel and Hoppin, 2004; Hernandez et al., 2016). Because of the widespread use and the omnipresence of pesticide cocktails in agricultural crops, which lead to an involuntary and continuous consumption, the relevance to public health is high. However, these accumulating epidemiological

alarms are not properly harmonized with experimental studies examining the health effects of pesticides using long-term protocols, cocktails, and dose ranges relevant to exposure in humans. In rodents, the impact of pesticides has been examined by using high doses of single molecules, often organophosphates, mimicking intoxication scenarios and not threshold chronic exposure (Banks and Lein, 2012; Ojo et al., 2014; Lushchak et al., 2018; Czajka et al., 2019; Pu et al., 2020). Under these conditions, neuroinflammation and cognitive impairments were reported (Banks and Lein, 2012). However, most studies do not address the critical question of whether a long-term dietary exposure to a low dose pesticide cocktail may promote similar pathological deviations.

In this study, attention is also directed to the link between long-term exposure to pesticides and peripheral P450 detoxification or metabolic pathways.

\*Corresponding author. Address: Cerebrovascular and Glia Research, Institut de Génétique Fonctionnelle (CNRS UMR5203, INSERM U1191, University of Montpellier), 141 rue de la Cardonille, 34094 Montpellier Cedex 5, France.

E-mail address: nicola.marchi@igf.cnrs.fr (N. Marchi).

<sup>†</sup> Equal contribution.

Abbreviations: Cyp, cytochromes; PDGFR $\beta$ , platelet-derived growth factor receptor beta; qPCR, quantitative polymerase chain reaction.



The rationale stems from accumulating evidence indicating a pathological interplay between peripheral metabolic diseases and neurological functions (Donovan et al., 1998; Miller and Spencer, 2014; Sureka et al., 2015; Bogush et al., 2017; Guillemot-Legris and Muccioli, 2017; Rom et al., 2019). Previous results published by our consortium indicated that a long-term exposure to a pesticide cocktail, identical to the one used here, promotes obesogenic and diabetogenic effects (Lukowicz et al., 2018). Others have shown that a single high dose of pesticides can induce the expression of P450 cytochromes (Cyp) (Abass et al., 2012). However, the possibility that a chronic exposure to a cocktail of pesticides at low dose may trigger modifications of P450 detoxification and metabolic pathways *in vivo* remains to be fully confirmed.

Here, we tracked and quantified a set of *in vivo* brain readouts and analyzed peripheral metabolic and detoxification pathways during a long-term exposure to dietary pesticides. To achieve this goal, we developed a protocol where C57BL/6j male and female mice were fed, starting from weaning (PN21) and for an age period of 12 months, with chow pellets containing a specific cocktail of pesticides that could be relevant to agriculture, as suggested by the European Food Safety Authority (EFSA) reports (Lukowicz et al., 2018). Six pesticides were incorporated in the food pellets, exposing mice to the tolerable daily intake for each pesticide.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Vertebrate animals

Research was conducted in accordance to the institutional guidelines for laboratory animal usage (European Union Council September 22, 2010 (2010/63). Protocols were approved by the French ethical committee (Apafis#13145-2018012216217153 v3). C57BL/6j male and female mice were housed (food and water *ad libitum*) in a 12 h light/dark cycle, minimizing animal discomfort. The specific number of mice used for each experiment is detailed in the sections below and in the Figure legends.

### Pesticides chow preparation

Male and female C57BL/6j mice were fed starting from weaning (PN21) using standard (control) or pesticides chow. The selected cocktail contains fungicides and insecticides (ziram, thiophanate, captan, chlorpyrifos, boscalid, and thiaclopride). The chow is routinely prepared by our research consortium, as previously reported (Lukowicz et al., 2018). In this study, mice were exposed to the tolerable daily intake (TDI; mg/kg body weight/day; see Table 1, readapted from (Lukowicz et al., 2018) for each pesticide. TDI is defined for humans by the EFSA and by the Joint Food and Agriculture Organization (United Nations, World Health Organization). TDI levels defined for human exposure were adjusted to mice body weight (BW). In our study, we considered a mouse BW of 30 grams and a daily chow intake of 5 g. Table 1 specifies the quantities for each pesticide incorporated

in the diet. Chow preparation: pesticides were dissolved individually in a 9:1 volume/volume methanol:acetone and mixed together. The solution was dispersed on Vitaminic powder mixture-200 (Scientific Animal Food Engineering) and homogenized using a Rotavapor (Laborota 4000™; BUCHI Switzerland) for 30 min at 45 °C and then at room temperature for 50 min to evaporate the solvents. The resulting powder was incorporated into the pellet (SAAJ-RAF National Research Institute for Agriculture, Food and the Environment, INRAE). Control diet was concomitantly prepared without adding pesticides. Pesticide levels in the pellet were re-analyzed by gas chromatography–tandem mass spectrometry and liquid chromatography–tandem mass spectrometry (Eurofins), confirming concentrations (Table 1; see also (Lukowicz et al., 2018)).

### Brain immunohistochemistry and quantifications

Analyses were performed by using: (i)  $n = 8$  pesticide diet and  $n = 8$  standard diet male mice at 3 months; (ii)  $n = 7$  pesticide diet and  $n = 8$  standard diet female mice at 3 months; (iii)  $n = 8$  pesticide diet and  $n = 8$  standard diet male mice at 12 months; (iv)  $n = 8$  pesticide diet and  $n = 8$  standard diet female mice at 12 months (Figs. 1 and 2). After intracardial perfusion with PBS, mice brains were dissected and fixed in PFA 4% solution. Fixed brains were immersed in sucrose 15% for 24 h followed by sucrose 30%. Brains were then snap frozen and stored at  $-80$  °C. Slices (20–25  $\mu$ m) were obtained using a cryostat. Immunohistochemistry was performed after PBS washes. Slices were added with blocking solution (PBS, triton 0.5%, horse serum 20%) at room temperature for 1 h. Primary antibodies (See Supplemental Table 1) were diluted in blocking solution and brain slices incubated overnight at 4 °C. After PBS washes, secondary antibody was added in PBS for 2 h at room temperature. After PBS washes, slices were mounted using Vectashield containing DAPI.

For all quantifications,  $20\times$  Z-stack images ( $Z = 12$ – $15$  planes, each of 1  $\mu$ m) were analyzed using Fiji. Slices were examined for each mouse to quantify signals in the regions of interest (ROI): hippocampal CA1/CA2, CA3/DG, and neocortex (CTX), identified by DAPI maps. Prior to analysis, all Z-stacks images were combined (Z-project, sum) using Fiji. *GFAP quantification*: images were converted into RGB stack format and signal threshold was adjusted at around 200 units for each image. Area of GFAP signal was calculated setting a threshold sensitivity equal for each image. GFAP data are expressed as percentage of ROI total pixels. *Iba1 quantification*: a cell counter tool was used to calculate the total number of DAPI cells and the number of Iba1<sup>+</sup> cells in each ROI. Data are expressed as percentage (Iba1<sup>+</sup>/tot DAPI<sup>+</sup>)  $\times 100$ . *CD13 pericyte quantification*: a skeleton plug-in was used to track CD13 signals and drawn vessels. The analysis was automated by setting threshold sensitivity identical for each image. Length was calculated as pixels. Platelet-derived growth factor receptor beta (*PDGFR $\beta$* ) *quantification*: signals were quantified using a Fiji



**Table 1.** Characteristics and tolerable daily intake (TDI) of each pesticide. Expected and measured pesticide concentrations ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  food) in the food pellet. Adapted from (Lukowicz et al., 2018)

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

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

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

<sup>b</sup> Ziram was not at detectible level ( $<0.01$  mg/kg).

freehand line tool to select signals associated and proximal to the IsoB4<sup>+</sup> vessels. The ROI Fiji manager was used to collect the dataset. Total vascular IsoB4 length was calculated using the skeleton Fiji tools for each image and used as reference.

### Behavioral testing

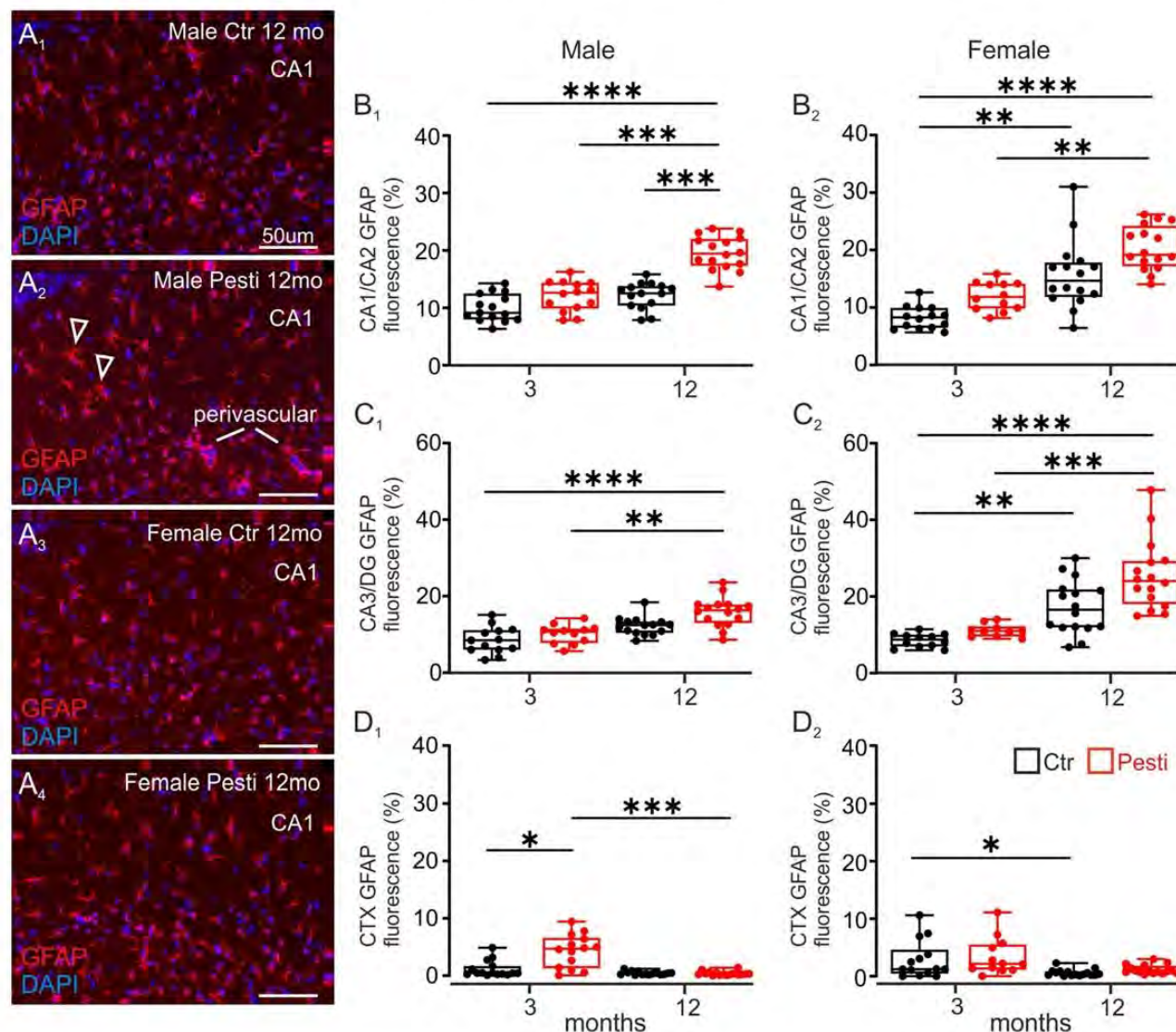
We performed two sessions of behavioral tests (3 and 12 months of age). We analyzed:  $n = 10$  pesticide diet male,  $n = 9$  standard diet male,  $n = 9$  pesticide diet female,  $n = 10$  standard diet female mice at 3 and 12 months (Figs. 3 and 4). *Open field (OF)*. Spontaneous exploratory behavior was monitored in an OF (opaque black plastic arena, 35 cm width  $\times$  50 cm length  $\times$  20 cm height) for 10 min. The center zone was defined as a virtual perimeter within 5 cm from the sides of the arena. Experiments were videotaped and an observer scored the time spent in the center and the number of transitions in the center zone. The arena was cleaned with 70% ethanol after each experiment. *Spatial working memory, spontaneous alternation in the Y-maze*. Each mouse was placed at the end of one arm in a gray polyvinylchloride Y-maze and allowed to freely explore during a single session (8 min). Arm entries, including possible returns into the same arm, were recorded visually. Alternation was defined as alternated entries into the three arms during consecutive trials. The percentage (%) was calculated as actual alternations/maximum alternations  $\times$  100. Measured parameters included the percentage of alternation (working memory index) and total number of arm entries (exploration index). All arms were cleaned with 70% ethanol between two sessions. *Light/Dark Transition test*. The apparatus consists of a cage (21  $\times$  42  $\times$  25cm) divided into two chambers, dark and bright, of equal size by a partition with door. Mice were allowed to move freely between the two chambers during 10 min. The number of entries into the bright chamber and the time spent were measured by videotracking (Viewpoint, Lissieu, France). After each trial, all chambers were cleaned with 70% ethanol. *Elevated-Plus-Maze (EPM)*. The EPM is a 4-arms maze elevated 40 cm above the floor. The 4 arms intersect to form a plus sign (dimension of each arm: length 30 cm, width 5 cm, and center region 5  $\times$  5 cm<sup>2</sup>). Two of the arms are closed on three sides by 15 cm high walls, and the other two are open. Animals were placed in the

center of the apparatus and allowed to freely explore the maze for 10 min. Score for entries and time spent in open arms were measured. All arms were cleaned with 70% ethanol after each experiment. *Social Interaction*. The apparatus is a rectangular 3-chambered polycarbonate box divided in three chambers. The test mouse was placed into the middle chamber and allowed to explore freely for 10 min. The test was video-tracked (Viewpoint). Time spent in each chamber was analyzed to measure the side preference bias. Each of the two sides contained an inverted empty wire cup. After the habituation period, the test mouse was retired, an unfamiliar mouse was introduced into one of the empty wire cups. The test mouse was reintroduced and the time spent sniffing each wire cup was analyzed for 10 min.

### Freely moving, telemetry video-electrocorticography monitoring

A total of 16 male and 16 female C57Bl/6 mice were monitored at 3 and 12 months ( $n = 4/\text{group}$ , pesticides and control) by using telemetry. Because of technical issues (defective implants) two mice were excluded from the analysis. Surgical procedure: animals were anesthetized using i.p. chloral hydrate and xylazine (400 mg/kg; 4 mg/kg). Animals were placed on a heating pad during the procedure ensuring a physiological temperature. A telemetry implant (Physiotel transmitter ETA-F10, weight 1.6 g, 1.1 cm<sup>3</sup>, Data Science international DSI, St Paul, MN, USA) was placed into a ventral pocket. The subcutaneous tissue covering the skull was separated and the periosteum cleaned. Two screws (one bipolar electrode) are inserted in the skull corresponding to the fronto-parietal neocortex. Screws were attached to the transmitter wires. Dental cement was used to fix the two screws to the skull. The incision was closed using a non-reabsorbable 6/0 suture material (prolene polypropylene, Ethicon) and stitches. Mice were allowed to recover for 1 week. Mice were recorded (Dataquest ART software DSI) for at least 24 h, equally distributed between day and night. Signals were acquired at 500 Hz and analyzed using Neuroscore. Video analysis was executed by an operator to rule out motion artifacts (e.g., eating, drinking or chewing). Trace portions (1–5 min/extract, for a total of 30 min/mouse) were chosen considering light vs. dark phases, awake/exploratory vs. sleep/immobility,





**Fig. 1.** Spatio-temporally delimited hippocampal astrogliosis during pesticides exposure in the long term. **(A1–A4)** Examples of GFAP and DAPI immunostaining in the CA1 regions of male and female mice at 12 months. Examples of reactive astrocytes in the parenchyma and perivascular are indicated in A2 (*arrowheads and lines*). **(B1, B2, and C1, C2)** Quantification of percentage GFAP fluorescence in the sub-hippocampal regions. **(D1, D2)** Analysis of GFAP immunoreactivity in the neocortex. Each dot represents the quantitation from one brain slice. Number of mice/group: (i)  $n = 8$  pesticide diet,  $n = 8$  standard diet male mice at 3 months; (ii)  $n = 7$  pesticide diet;  $n = 8$  standard diet female mice at 3 months; (iii)  $n = 8$  pesticide diet,  $n = 8$  standard diet male mice; (iv)  $n = 8$  pesticide diet,  $n = 8$  standard diet female mice at 12 months. One or two brain slices/mouse were used. Data are analyzed using non-parametric Kruskal–Wallis ANOVA and Dunn’s multiple comparisons test: **(B1)**  $H_3 = 36.02$ ,  $p < 0.0001$ , **(B2)**  $H_3 = 37.20$ ,  $p < 0.0001$ , **(C1)**  $H_3 = 21.93$ ,  $p < 0.0001$ , **(C2)**  $H_3 = 34.61$ ,  $p < 0.0001$ , **(D1)**  $H_3 = 21.36$ ,  $p < 0.0001$ , **(D2)**  $H_3 = 15.44$ ,  $p = 0.015$ . The Dunn’s test was used for multiple comparisons between groups: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  (as reported in the figure).

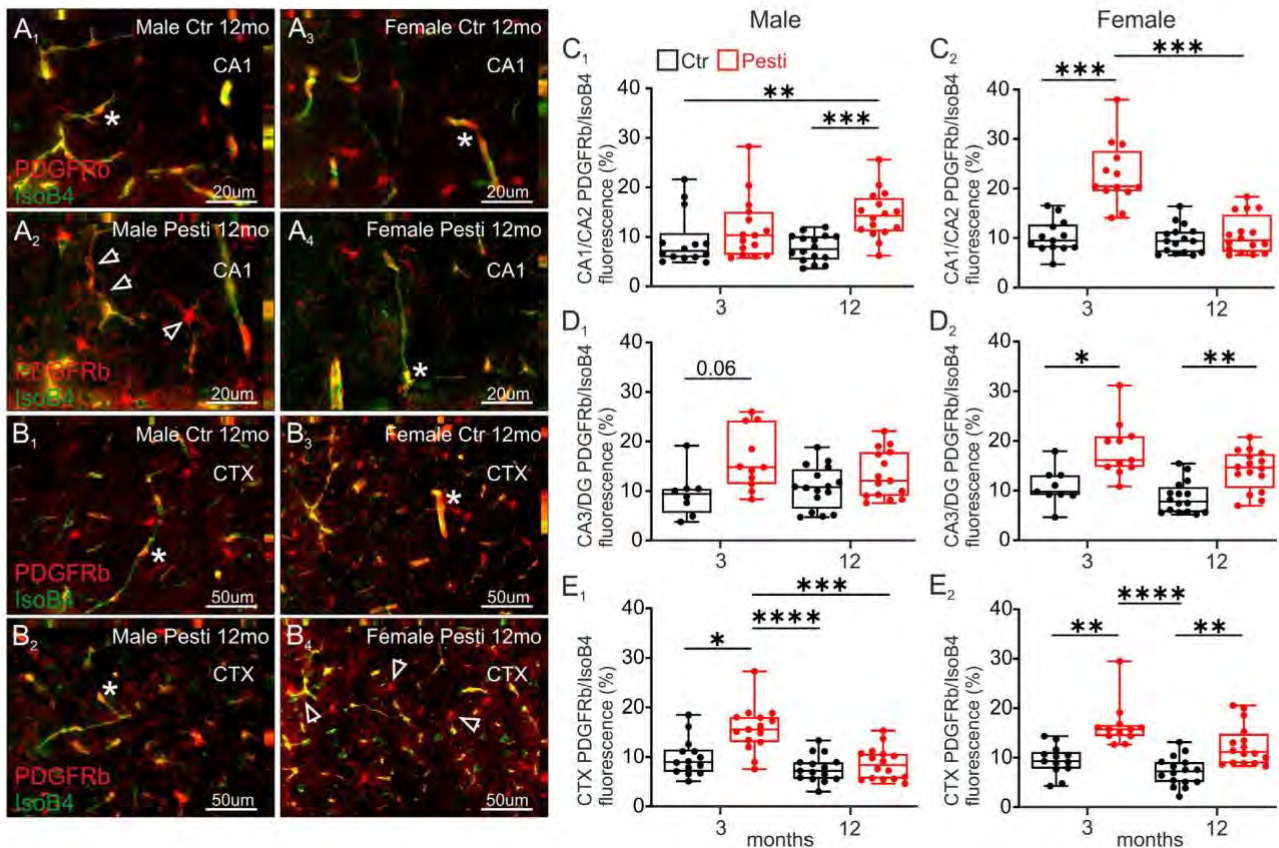
and avoiding all motion artifacts. Periodogram Power Bands (Neuroscore) was calculated for all EEG and the relative abundance of each 0.5 Hz increment (0.5–80 Hz) was quantified (Boussadia et al., 2016; Boussadia et al., 2018; Ichkova et al., 2020).

#### qPCR studies

We analyzed a total of  $n = 6$  and  $n = 8$  mice of both sex at 3 and 12 months (Figs. 6–8). Liver total RNA was extracted with TRIzol® reagent (Sigma-Aldrich). For

real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR), total RNA samples (2  $\mu$ g) were reverse-transcribed using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Primers for SYBR Green assays are presented in Supplemental Table 1. Amplifications were performed on an ABI Prism 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems). qPCR data were normalized by TATA-box binding protein mRNA levels and analyzed with LinRegPCR (2015.3 version). Identical protocol was used for kidney tissues.





**Fig. 2.** Pattern of PDGFR $\beta$  brain expression during long-term pesticide exposure. (A1–A4, B1–B4) Examples of PDGFR $\beta$  and cerebrovascular IsoB4 immunostaining in the CA1 region and fronto-parietal neocortex of male and female mice at 12 months. Arrowheads indicate parenchymal cells and perivascular PDGFR $\beta$  reactivity in the pesticide exposed groups. Asterisks indicate capillary pericytes. (C1, C2 and D1, D2) Quantification of PDGFR $\beta$ /IsoB4 fluorescence in the sub-hippocampal regions. (E1, E2) Analysis of cortical PDGFR $\beta$  immunoreactivity. Number of mice/group: (i)  $n = 8$  pesticide diet,  $n = 8$  standard diet male mice at 3 months; (ii)  $n = 7$  pesticide diet;  $n = 8$  standard diet female mice at 3 months; (iii)  $n = 8$  pesticide diet,  $n = 8$  standard diet male mice; (iv)  $n = 8$  pesticide diet,  $n = 8$  standard diet female mice at 12 months. One or two brain slices/mouse were used. Data are analyzed using non-parametric Kruskal–Wallis ANOVA and Dunn’s multiple comparisons test: (C1)  $H_3 = 16.95$ ,  $p = 0.0007$ , (C2)  $H_3 = 27.22$ ,  $p < 0.0001$ , (D1)  $H_3 = 8.208$ ,  $p = 0.042$ , (D2)  $H_3 = 23.13$ ,  $p < 0.0001$ , (E1)  $H_3 = 22.64$ ,  $p < 0.0001$ , (E2)  $H_3 = 29.78$ ,  $p < 0.0001$ . The Dunn’s test was used for multiple comparisons between groups: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  (as reported in the figure).

## Statistics

All data were analyzed using Prism 8.3.1. Dataset were not normally distributed (Shapiro–Wilk test) or did not present equal variance (Brown–Forsythe test) therefore a non-parametric ANOVA Kruskal–Wallis followed by Dunn’s multiple comparisons test was used for analysis of male and female groups. Results are reported as box and whiskers plots with single points and indicating median, interquartile ranges and min–max range. Significance threshold was set at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

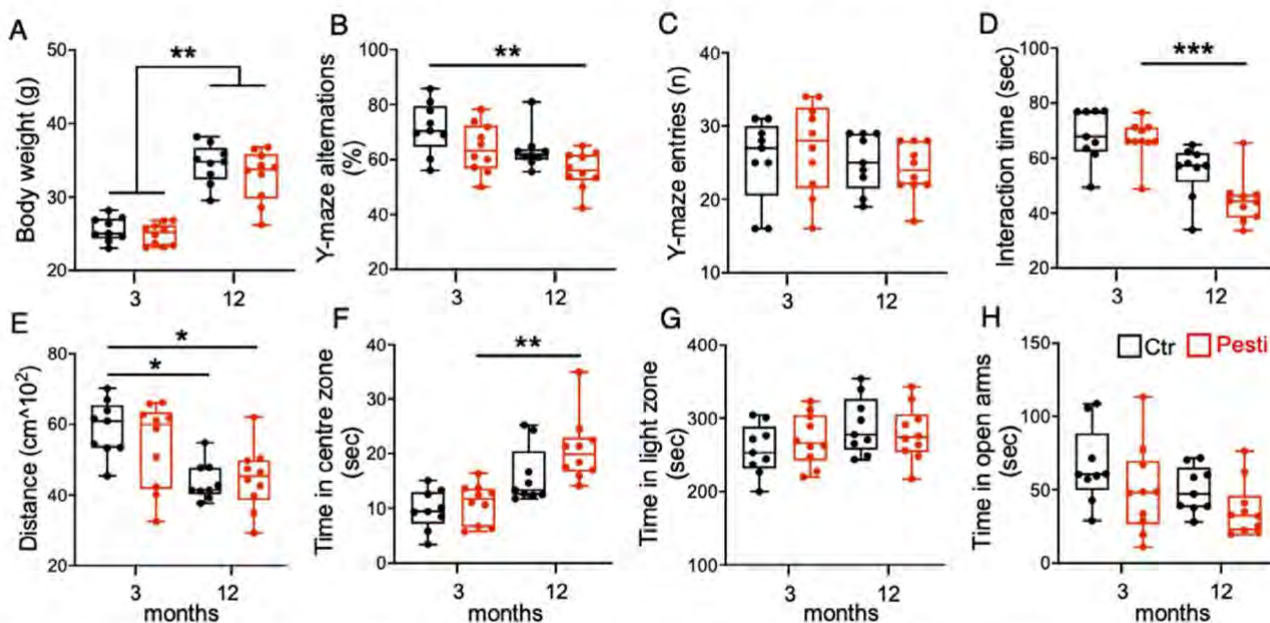
### Impact of long-term pesticide cocktail exposure on brain cells

We examined the effects of long-term dietary pesticides on histological biomarkers of parenchymal and perivascular neuroinflammation, specifically glial fibrillary actin protein (GFAP), PDGFR $\beta$  expression, microglial Iba1, and CD13

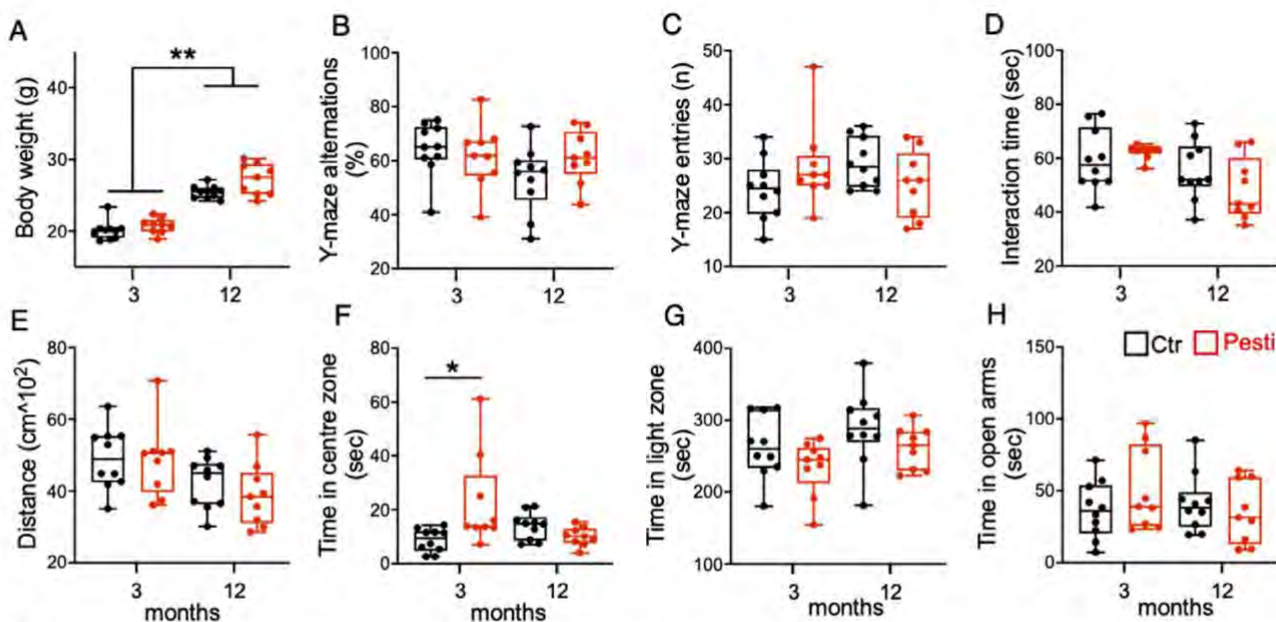
pericytes. In male mice, a moderate astrogliosis occurred in the CA1/CA2 hippocampal regions following 12 months of exposure to dietary pesticides, as compared to other groups (Fig. 1B1). Increased GFAP expression occurred at the parenchyma and perivascular levels (Fig. 1A1, A2). In female mice, a trend in GFAP increase was observed after 12 months of pesticides exposure in the CA1/CA2 region as compared to sex and age matched control (Kruskal–Wallis and Dunn multiple comparisons test,  $p = 0.14$ ; Fig. 1B2). Female mice displayed a significant effect of aging, impacting GFAP reactivity in the hippocampus (Fig. 1B2, C2). GFAP reactivity was variable in females as compared to males, as assessed long-term in the CA hippocampal regions (Fig. 1B1, B2 and C1, C2). In the neocortex, no significant GFAP astrogliosis was observed following pesticide-exposure, except for an increase at 3 months in male mice (Fig. 1D1).

PDGFR $\beta$  reactivity, a proposed sign of pro-fibrotic tissue modifications (Kyyriäinen et al., 2017; Riew et al.,





**Fig. 3.** Long-term exposure to pesticides and behavioral adaptations in males. (A) body weight (g); (B) spontaneous alternation behavior (%) and (C) total number of arm entries in the Y-maze; (D) time of social interaction test; (E) locomotor activity (distance in cm) in the open field; anxiety-like behaviors, including time spent in the center zone of the open field (F), in the light zone of the light/dark transition apparatus (G) and in the open arms of the EPM (H). Number of mice per group: control males 3–12 months ( $n = 9$ ), pesticides males 3–12 months ( $n = 10$ ). Data are analyzed using the non-parametric Kruskal–Wallis ANOVA: (A)  $H_3 = 26.62$ ,  $p < 0.0001$ , (B)  $H_3 = 10.92$ ,  $p = 0.0122$ , (C)  $H_3 = 2.34$ ,  $p = 0.5048$ , (D)  $H_3 = 23.52$ ,  $p < 0.0001$ , (E)  $H_3 = 12.62$ ,  $p = 0.0055$ , (F)  $H_3 = 20.66$ ,  $p < 0.0001$ , (G)  $H_3 = 3.011$ ,  $p = 0.3899$ , (H)  $H_3 = 6.509$ ,  $p = 0.0893$ . The Dunn's test was used for multiple comparisons between groups: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  (as reported in the figure).



**Fig. 4.** Long-term exposure to pesticides does not elicit behavioral modifications in females. (A) body weight (g); (B) spontaneous alternation behavior (%) and (C) total number of arm entries in the Y-maze; (D) time of social interaction test; (E) locomotor activity (distance in cm) in the open field; anxiety-like behaviors, including time spent in the center zone of the open field (F), in the light zone of the light/dark transition apparatus (G) and in the open arms of the EPM (H). Number of mice per group: control females 3–12 months ( $n = 10$ ), pesticides females 3–12 months ( $n = 9$ ). Data are analyzed using the non-parametric Kruskal–Wallis ANOVA: (A)  $H_3 = 29.09$ ,  $p < 0.0001$ , (B)  $H_3 = 6.05$ ,  $p = 0.1092$ , (C)  $H_3 = 4.632$ ,  $p = 0.2009$ , (D)  $H_3 = 6.693$ ,  $p = 0.0824$ , (E)  $H_3 = 7.027$ ,  $p = 0.0710$ , (F)  $H_3 = 11.56$ ,  $p = 0.0091$ , (G)  $H_3 = 7.43$ ,  $p = 0.0594$ , (H)  $H_3 = 1.717$ ,  $p = 0.6332$ . The Dunn's test was used for multiple comparisons between groups: \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  (as reported in the figure).



2018; Klement et al., 2019; Giannoni et al., 2020), was significantly increased in the CA1/CA2 hippocampal regions of male mice at 12 months during pesticide exposure (Fig. 2C1). Qualitatively, the increased of PDGFR $\beta$  signal occurred around the IsoB4<sup>+</sup> capillaries and in the parenchyma where PDGFR $\beta$ <sup>+</sup> cells were visible (Fig. 2A1, A2). Female mice presented a significant increase in PDGFR $\beta$ <sup>+</sup> cells at 3 months during pesticides exposure (Fig. 2C2). In the CA3/DG regions, the pesticides-induced PDGFR $\beta$  reactivity was more pronounced in female as compared to male mice, with no effect of aging (Fig. 2D1, D2). A similar pattern was observed (Fig. 2B1–B4) and quantified (Fig. 2E1, E2) in the neocortex. In these experimental conditions, the percentage of hippocampal Iba1<sup>+</sup> microglial cells remained at a control level of ~10% (Li and Barres, 2018), except for a transient and minor increase in the CA3/DG region at 3 months during pesticides exposure (data not shown, Kruskal–Wallis and Dunn multiple comparisons test,  $p = 0.015$ ). As a corollary, we observed a lower number of microglial cells in female as compared to male mice at 12 months independently from pesticide exposure (data not shown). Finally, the number and the length of CD13<sup>+</sup> pericytes were generally unmodified by pesticides exposure, except for a localized increase of pericytes number in the CA1/CA2 hippocampal region in female mice at 12 months (Kruskal–Wallis and Dunn multiple comparisons test,  $p = 0.037$ ). Age dependent effects were observed for female mice in the hippocampus (data not shown). Finally, qPCR analysis of pro-inflammatory cytokines, chemokines, or adhesion molecules (TNF $\alpha$ , CCL2, CXCL12, CXCL5, ICAM1, VCAM) did not reveal significant changes across groups (data not shown). These results outline discrete and regional hippocampal cellular modifications, e.g., astrogliosis, following chronic dietary exposure to pesticides. Our results show the influence of aging on GFAP hippocampal reactivity.

### Behavior analyses during long-term exposure to pesticides

A battery of behavioral assessments was performed by tracking and re-testing each cohort of male and female (Figs. 3 and 4 respectively) mice at 3 and 12 months during dietary exposure to pesticides. Body weight variations are indicated in Fig. 3A and 4A. Because cellular modifications were studied in the hippocampus, here we tested the spatial working memory. A significant impairment in the spontaneous alternation behavior was observed for male mice exposed to pesticides during 12 months as compared to 3 months control mice (Fig. 3B). This deficit was not accompanied by an altered number of entries in the Y-maze arms (Fig. 3C). No differences in spatial working memory (Y-maze) were detected in females (Fig. 4B, C). Male mice exposed to long-term (12 months) dietary pesticides also showed a significant reduction in social interaction time as assessed in the three-chambers test as compared to the 3 months group (Fig. 3D). Using the OF test we observed a reduction in the spontaneous locomotor activity during the entire study which may indicate age-dependent, but likely pesticides-

independent, impairments (Fig. 3E). The reduced locomotor drive was accompanied by an increase of time spent in the center zone of the OF in mice exposed to long-term dietary pesticides, suggesting a reduced anxiety behavior (Fig. 3F). However, when tested in purely anxiety-related paradigms (light/dark box and EPM), pesticides-exposed male mice did not show modifications as compared to control mice (Fig. 3G, H). In female mice, except for a small and transient increase in the time spent in the center zone of the OF at 3 months during pesticides exposure (Fig. 4F), no major anxiety-related deficits were observed (Fig. 4B–H). Altogether, these results indicate that long-term dietary pesticides impact on specific, but not generalized, behavioral outputs particularly in male mice and with increased age.

### Neurophysiological explorations during long-term exposure to pesticides

Using a dedicated cohort of mice, we monitored the electro-corticographic activity at 3 and 12 months during pesticides exposure. The analysis of all traces ruled out the presence of repetitive spike activity, seizures or pro-epileptiform modifications in our experimental conditions (Fig. 5A1–A4). We next examined the patterns of theta and gamma brain waves distribution, as indicators of neurological dysfunction (Iaccarino et al., 2018; Kitchigina, 2018; Mably and Colgin, 2018; Ichkova et al., 2020) during sleep/immobility and awake/exploration periods. Fig. 5B1–B4 provides the entire spectrograms (0.5–80 Hz) calculated for each mouse monitored. Pesticides exposure did not result in significant corticographic modifications as compared to sham, except for a transient segregation of theta (4–7 Hz) and gamma (40–50 Hz) frequencies occurring at 3 months between sham and pesticides exposed female mice during awake periods (Fig. 5C3). These results indicate that, in these experimental conditions, long-term exposure to dietary pesticides does not associate with generalized electrographic modifications that can be detected at the cortical level in vivo.

### Activation of peripheral P450 metabolic and detoxification pathways during exposure to pesticides

The dietary exposure to the pesticide cocktail used here was previously shown to induce diabetogenic effects in vivo (Lukowicz et al., 2018). Consistent with this existing research, we examined the effects of chronic pesticides exposure on the regulation of metabolic and detoxification pathways. To this end, the expression levels of target genes of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR $\alpha$ ), constitutive androstane and pregnane xenobiotic receptors (CAR, PXR) were quantified in the liver. The mRNA levels of the PPAR $\alpha$  target genes Cyp4a14 and Cyp4a10 were increased in both male and female mice exposed to pesticides during 12 months (Fig. 6A1–A4), with a trend increase already at 3 months. Levels of CAR controlled Cyp2b10 and Cyp2C29 were unmodified except for an

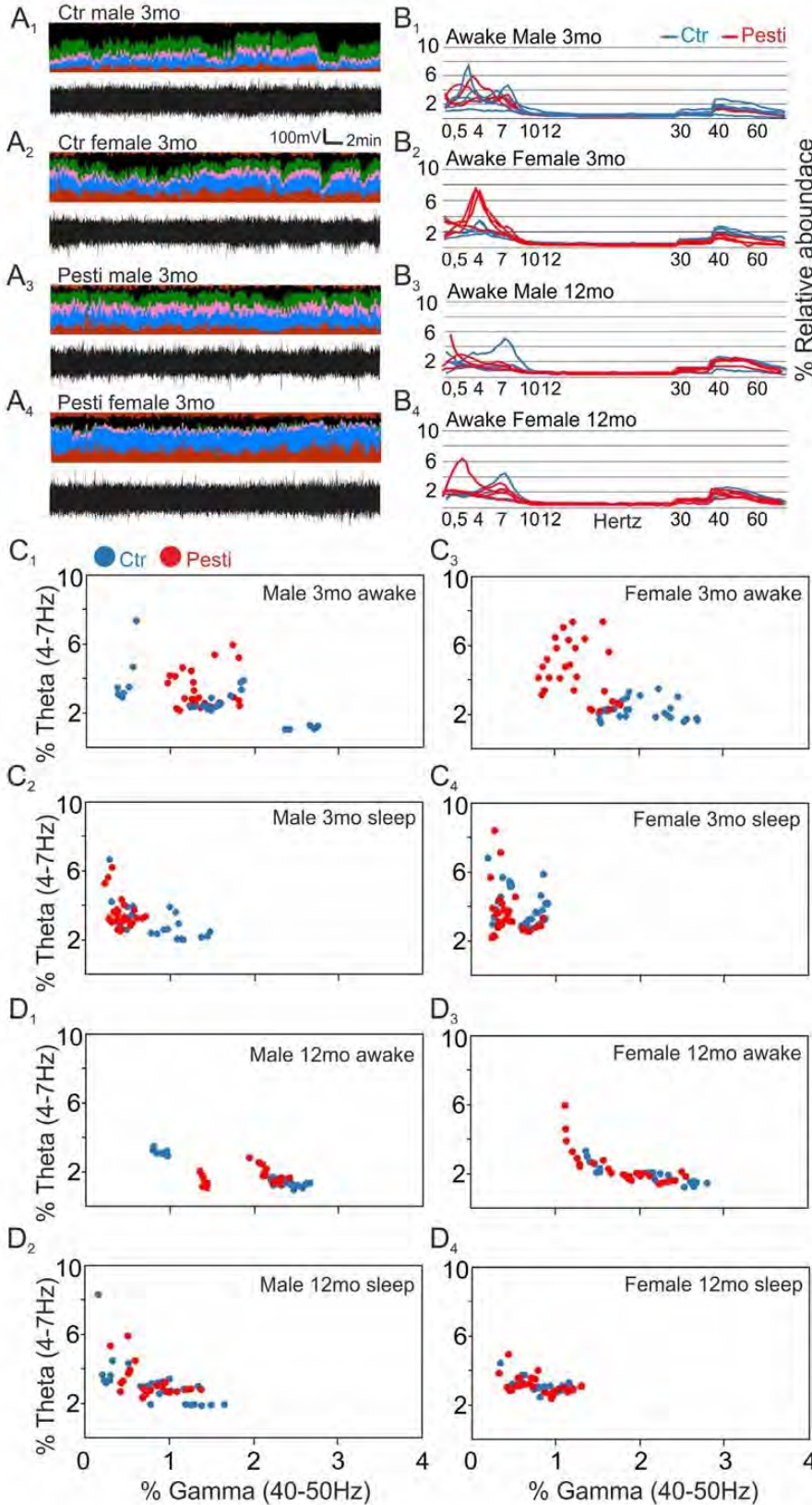


increase of Cyp2b10 specifically in male mice at 3 months (Fig. 6B1–B4). The PXR controlled Cyp2c55 and

Cyp3a11 enzymes were increased during pesticides exposure at 12 months, both in male and female mice

and as compared to 3 months, indicating a predominant effect of aging (Fig. 6C1–C4). Cyp2c55 was increased at 12 months in the pesticides exposed group. As a corollary, the patterns of Cyp expression were analyzed in kidney samples available from pesticides exposed animals at 12 months. Cyp4a14 and Cyp4a10 levels were increased over time in this organ in male and female mice in response to pesticides exposure (Fig. 8A1, A2).

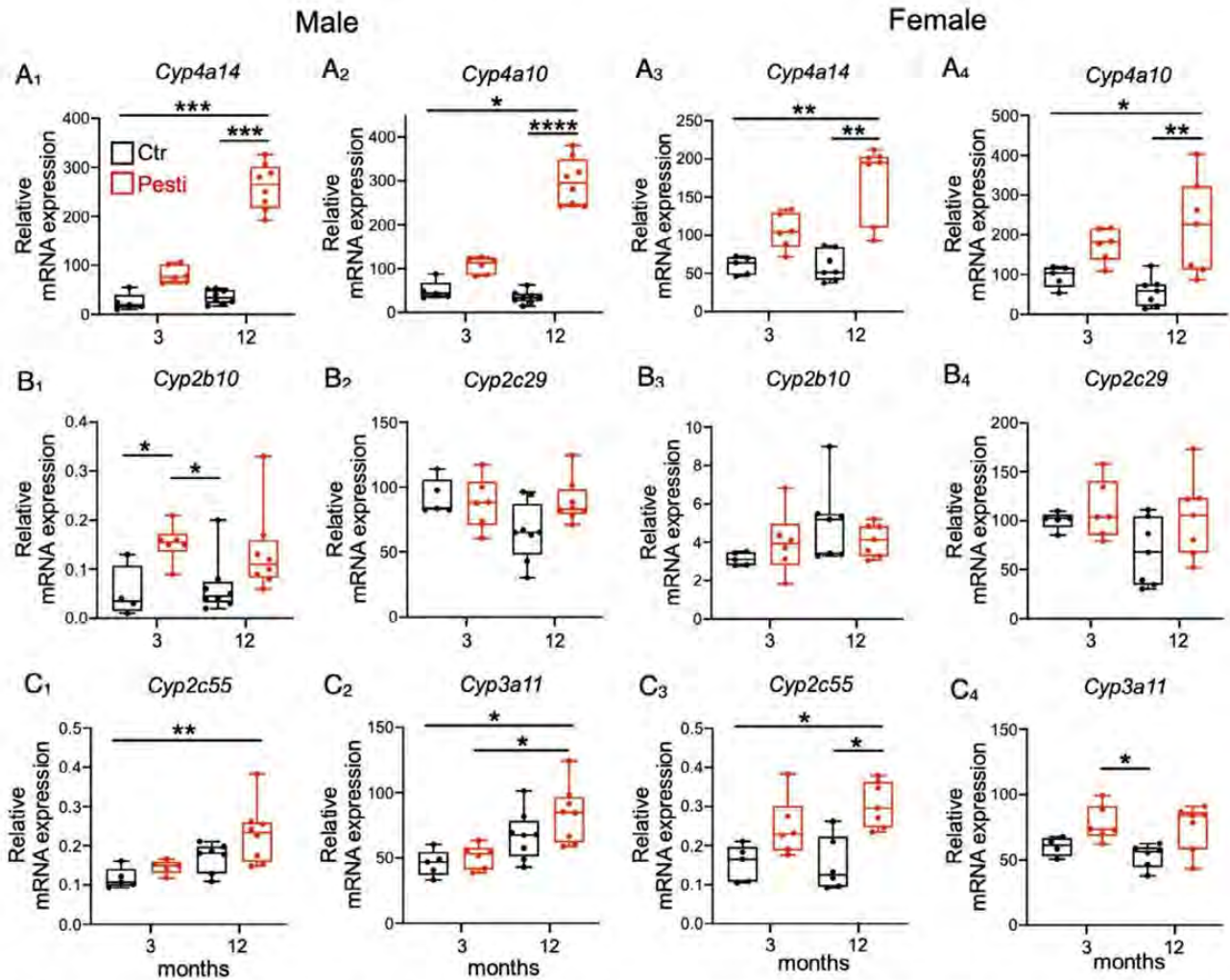
At the metabolic level and consistent with PPAR $\alpha$  activation, the genes involved in  $\beta$ -oxidation (Acox1, Cpt1 $\alpha$  and Eci) and hepatic lipid transport (Cd36) were up-regulated following 12 months of pesticide exposure in males and females as compared to age and sex matched controls (Fig. 7A1–A6 and B1, B3). Gene expression of Glut2, involved in glucose transport, was not modified by pesticides exposure (Fig. 7B2, B4). Collectively, these results indicate that a life-long exposure to dietary pesticides induces a significant activation of specific nuclear receptors and enzymes involved in detoxification processes and in lipid metabolism.



## DISCUSSION

In this study, we report spatio-temporally delimited astrogliosis and signs of perivascular profibrotic modifications along with specific sex-dependent behavioral modifications elicited after long-term, but not short-term, dietary exposure to pesticides. Simultaneously, a significant activation of peripheral P450 metabolic and detoxification pathways was triggered and endured during pesticides exposure. We report a compounded effect from age and continuous exposure to pesticides. If the direct association between the reported brain and peripheral changes remains to be fully examined, our results, together with our previously published data (Lukowicz et al., 2018), suggest that the outcome of a life-long exposure to low dose pesticides may be a





**Fig. 6.** Exposure to pesticides leads to the up-regulation of key P450 cytochromes (Cyp) in the liver. Cyp expression levels were assessed by qPCR. Typical Cyp that are controlled by nuclear the receptors PPAR $\alpha$  ((A1–A4) *Cyp4a14*, *Cyp4a10*), CAR ((B1–B4) *Cyp2b10*, *Cyp2c29*) and PXR ((C1–C4) *Cyp2c55*, *Cyp3a11*) were quantified at 3 months ( $n = 6$ ) and 12 months of pesticides exposure ( $n = 8$ ). Data are analyzed using the non-parametric Kruskal–Wallis ANOVA: (A1)  $H_3 = 22.58$ ,  $p < 0.0001$ , (A2)  $H_3 = 22.35$ ,  $p < 0.0001$ , (A3)  $H_3 = 18.22$ ,  $p = 0.0004$ , (A4)  $H_3 = 14.71$ ,  $p = 0.0021$ , (B1)  $H_3 = 11.61$ ,  $p = 0.0088$ , (B2)  $H_3 = 6.180$ ,  $p = 0.1032$ , (B3)  $H_3 = 5.696$ ,  $p = 0.1274$ , (B4)  $H_3 = 4.092$ ,  $p = 0.2517$ , (C1)  $H_3 = 12.34$ ,  $p = 0.0063$ , (C2)  $H_3 = 13.14$ ,  $p = 0.0044$ , (C3)  $H_3 = 13.66$ ,  $p = 0.0034$ , (C4)  $H_3 = 9.629$ ,  $p = 0.0220$ . The Dunn's test was used for multiple comparisons between groups: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  (as reported in the figure).

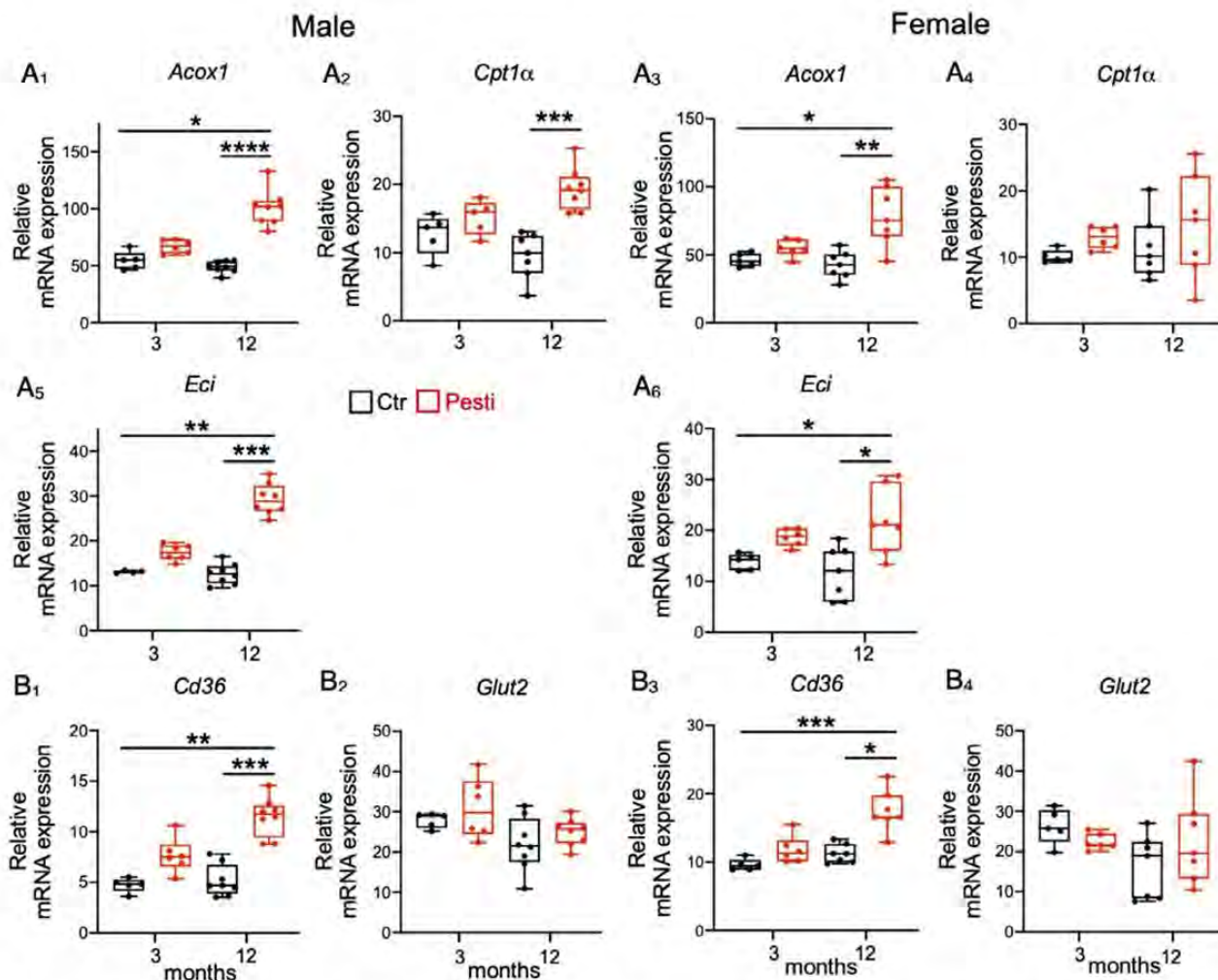
vulnerability condition. The latter could be relevant during second pathological insults or stress settings, supporting the significance of a 2-hits hypothesis. By study design, mice ingested the pesticide cocktail at every meal and during a significant portion of their lifespan, whereas human consumers may not experience such frequent intake and they are not daily exposed to TDI levels.

**Fig. 5.** Outcome of electroencephalographic telemetry explorations during long-term pesticides exposure. (A1–A4) Examples of EEG traces and color-coded waves distributions (mo: months). Pathological spike or seizure activity were not detected in these experimental conditions. (B1–B4) Entire frequency spectrograms (0.5–80 Hz; blue line: control; red line: pesticide). Each line corresponds to one individual mouse. (C1–C4, D1–D4) Example of percentage distributions of specific theta and gamma wave ranges in male and female mice at 3 and 12 months during pesticides exposure.

### Long-term pesticides exposure, astrogliosis and behavior: Is there a potential association?

We report discrete and age-dependent astrogliosis along with specific behavioral alterations during long-term dietary pesticides exposure in male mice. Because microglia and pro-inflammatory cytokines expression were not significantly modified, the reported astrogliosis may suggest metabolic cellular dysfunctions. Thus, by performing glycogenesis and lipid metabolism, astrocytes are important for nutrients support to neurons, ensuring proper synaptic transmission (Deitmer et al., 2019; Morita et al., 2019). We also report sex-specific patterns of astrogliosis in response to pesticides exposure. Importantly, differences in astrocytes' number, activation patterns (Morrison and Filosa, 2016; Tassoni et al., 2019) and bioenergetic functions (Jaber





**Fig. 7.** Exposure to pesticides increases metabolic  $\beta$ -oxidation and lipid transport in the liver. Hepatic gene levels involved in metabolic pathways such as  $\beta$ -oxidation ((A1–A6) *Acox1*, *Cpt1 $\alpha$* , *Eci*), lipid ((B1, B3) *Cd36*) and glucose ((B2, B4) *Glut2*) transport were quantified by qPCR in male and female mice at 3 months ( $n = 6$ ) and at 12 months of exposure ( $n = 8$ ). Data are analyzed using the non-parametric Kruskal–Wallis ANOVA: (A1)  $H_3 = 22.02$ ,  $p < 0.0001$ , (A2)  $H_3 = 17.02$ ,  $p = 0.0007$ , (A3)  $H_3 = 13.72$ ,  $p = 0.0033$ , (A4)  $H_3 = 3.645$ ,  $p = 0.3024$ , (A5)  $H_3 = 20.66$ ,  $p = 0.0001$ , (A6)  $H_3 = 14.36$ ,  $p = 0.0001$ , (B1)  $H_3 = 19.75$ ,  $p = 0.0002$ , (B2)  $H_3 = 6.190$ ,  $p = 0.1027$ , (B3)  $H_3 = 17.57$ ,  $p = 0.0005$ , (B4)  $H_3 = 5.107$ ,  $p = 0.1641$ . The Dunn's test was used for multiple comparisons between groups: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  (as reported in the figure).

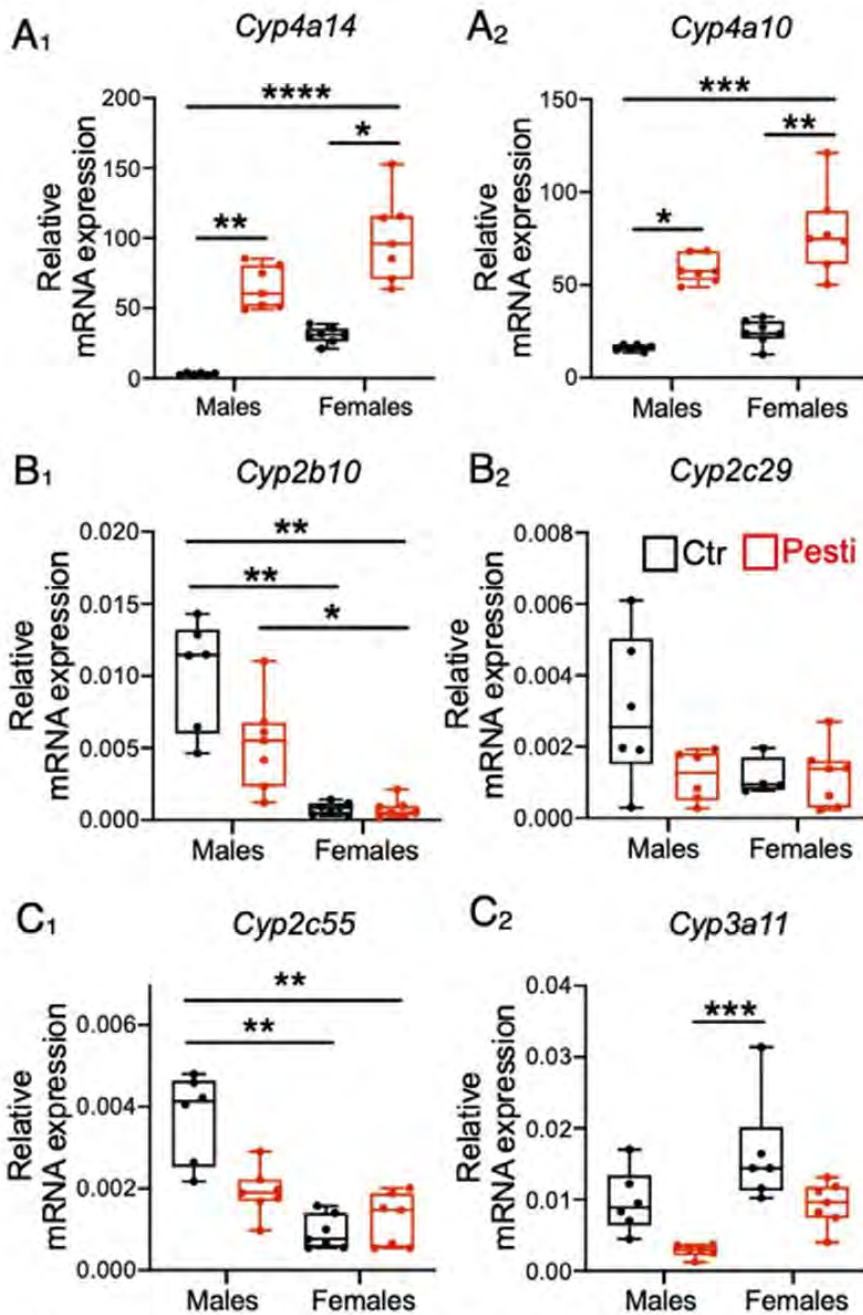
et al., 2018) are sex-dependent and were previously reported in physiological (Mouton et al., 2002) and disease conditions (Santos-Galindo et al., 2011).

In general, astrocytes contribute to neurophysiology and maladaptive alterations of the astrocyte-neuron coupling are critical to cognitive functions (Suzuki et al., 2011; Dallerac and Rouach, 2016; Pekny et al., 2016). The behavioral adaptations here reported suggest that long-term exposure to dietary pesticides may represent a permissive, but a not entirely sufficient, risk factor for long-term pathology. Female mice presented no behavioral changes, supporting sex-specificity for the pesticide effects. We recognized that we did not control for estrus cycle, an important caveat as estradiol levels were shown to impact behavior (Azcoitia et al., 2010). We here discuss that the performed in vivo electrophysiological

explorations did not reveal significant changes when comparing pesticides exposed to control animals. More sensitive monitoring tools are available to study single unit neuronal activity in vivo or in vitro and they should be used for next explorations in these experimental settings.

Experimental evidence has shown that intoxication by single pesticides (e.g., organophosphates) elicits an acute inflammatory response (Banks and Lein, 2012; Gangemi et al., 2016). Here, we report astrogliosis occurring in a spatio-temporal manner during long-term pesticides exposure. However, our GFAP analysis did not allow distinguishing between astrocytes accumulation and altered morphology. Our results may fit within the proposed link between hippocampal astrogliosis and memory or sociability negative outcomes (Sofroniew, 2014; Stevenson and Caldwell, 2014; Pekny et al.,





**Fig. 8.** Exposure to pesticides leads to the up-regulation of P450 cytochromes in kidneys. Renal P450 cytochromes (Cyp) expression levels were assessed by qPCR. Typical Cyp that are controlled by nuclear receptors PPAR $\alpha$  ((A1, A2) *Cyp4a14*, *Cyp4a10*), CAR ((B1, B2) *Cyp2b10*, *Cyp2c29*) and PXR ((C1, C2) *Cyp2c55*, *Cyp3a11*) were quantified at 12 months of exposure. Data are analyzed using the non-parametric Kruskal-Wallis ANOVA: (A1)  $H_3 = 23.06$ ,  $p < 0.0001$ , (A2)  $H_3 = 21.84$ ,  $p < 0.0001$ , (B1)  $H_3 = 19.93$ ,  $p = 0.0002$ , (B2)  $H_3 = 5.477$ ,  $p = 0.1400$ , (C1)  $H_3 = 17.38$ ,  $p = 0.0006$ , (C2)  $H_3 = 16.45$ ,  $p = 0.0009$ . The Dunn's test was used for multiple comparisons between groups: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  (as reported in the figure).

2016; Li et al., 2017). Interestingly, exposure to the herbicide glyphosate during pre- and post-natal stages was previously reported to elicit hippocampal GFAP reactivity and cognitive impairments (Ait-Bali et al., 2020). A link between glyphosate exposure, modification of brain soluble epoxide hydrolases expression, inflammation, and

autism spectrum disorder was also proposed (Pu et al., 2020). Furthermore, available evidence showed an increase of hippocampal GFAP expression in mice exposed to chlorpyrifos or to malathion (Lim et al., 2011; dos Santos et al., 2016). Cell cultures from fetal rat telencephalon exposed to high levels of parathion and chlorpyrifos displayed increased GFAP immunostaining (Zurich et al., 2004). Dissecting the individual effects for each pesticide in our cocktail is important and it should be studied in male and female mice. The notion of a cocktail effect was previously investigated for chlorpyrifos and abamectin, examining neurotoxicity following 30 days of exposure (Nasr et al., 2016). The combination of chlorpyrifos, permethrin and pyridostigmine bromide elicited significant GFAP reactivity, as compared to each compound tested individually (Ojo et al., 2014).

#### Peripheral-brain pathology during chronic pesticides exposure: initial clues

Epidemiological evidence links dietary pesticides to the increased risk for peripheral pathological modifications, including diabetes, obesity or insulin resistance (Casals-Casas and Desvergne, 2011; Al-Eryani et al., 2015; Evangelou et al., 2016), with a possible extension to brain diseases (Kamel and Hoppin, 2004; Gangemi et al., 2016; Hernandez et al., 2016). Importantly, diabetes mellitus is associated with neurological disorders and signs of neuro-inflammation (Donovan et al., 1998; Sureka et al., 2015; Bogush et al., 2017; Rom et al., 2019). Obesity represents a risk factor for cognitive defects (Miller and Spencer, 2014; Guillemot-Legris and Muccioli, 2017). However, most epidemiological and experimental studies have focused on organochlorine pesticides (Wang et al., 2014; Evangelou et al., 2016; De Long and Holloway, 2017) and data relative to the impact of other pesticides are incomplete. Our results show a significant upregulation of peripheral P450 detoxification and metabolic pathways, while the obesogenic and



diabetonegic effects of chronic exposure to low dose pesticides were previously reported (Lukowicz et al., 2018). Chronic exposure to pesticides resulted in the upregulation of genes controlled by the nuclear receptor PPAR $\alpha$ , such as the detoxifying enzymes Cyp4a14 and Cyp4a10 in liver and kidneys, and  $\beta$ -oxidation genes. The augmented expression of metabolic enzymes can be either protective, by detoxifying pesticides or other toxins, or pathological by dysregulating the metabolism of endogenous steroids, hormones and xenobiotics, possibly leading to unpredictable drug kinetics or side-effects during the life-span. The activation of the PPAR $\alpha$  nuclear receptor in the liver can be beneficial (Nisbett and Pinna, 2018) and detrimental, and its chronic stimulation and the consequent upregulation of P450 genes may have contributed to the phenotype previously observed (Lukowicz et al., 2018). Furthermore, the possibility that pesticides exposure, as single or cocktail, could modify the expression of metabolic enzymes in the brain remains to be tested. Brain P450 enzymes were proposed to play a role in the metabolism of neurotransmitters and neurosteroids in health and disease conditions, including alcohol intoxication, inflammation, and epilepsy (Ferguson and Tyndale, 2011; Ghosh et al., 2011; Runtz et al., 2018).

In conclusion, we provide the initial indication that dietary pesticides cocktail can induce, in the long-term, delimited brain adaptations and activate P450 metabolic, or detoxification, pathways. These results require further mechanistic and molecular investigations to explore the causal link existing between a life-long exposure to pesticides and the development of susceptibility-related health elements within the brain-periphery axis.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by ANR-Hepatobrain, ANSES Epidemicmac, MUSE-iSite University of Montpellier.

## REFERENCES

- Abass K, Lamsa V, Reponen P, Kublbeck J, Honkakoski P, Mattila S, Pelkonen O, Hakkola J (2012) Characterization of human cytochrome P450 induction by pesticides. *Toxicology* 294:17–26.
- Ait-Bali Y, Ba-M'hamed S, Gambarotta G, Sassoe-Pognetto M, Giustetto M, Bennis M (2020) Pre- and postnatal exposure to glyphosate-based herbicide causes behavioral and cognitive impairments in adult mice: evidence of cortical and hippocampal dysfunction. *Arch Toxicol*. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02677-7>.
- Al-Eryani L, Wahlang B, Falkner KC, Guardiola JJ, Clair HB, Prough RA, Cave M (2015) Identification of environmental chemicals associated with the development of toxicant-associated fatty liver disease in rodents. *Toxicol Pathol* 43:482–497.
- Azcoitia I, Santos-Galindo M, Arevalo MA, Garcia-Segura LM (2010) Role of astroglia in the neuroplastic and neuroprotective actions of estradiol. *Eur J Neurosci* 32:1995–2002.
- Banks CN, Lein PJ (2012) A review of experimental evidence linking neurotoxic organophosphorus compounds and inflammation. *Neurotoxicology* 33:575–584.
- Bogush M, Heldt NA, Persidsky Y (2017) Blood brain barrier injury in diabetes: unrecognized effects on brain and cognition. *J Neuroimmune Pharmacol* 12:593–601.
- Boussadia B, Gangarossa G, Mselli-Lakhal L, Rousset MC, de Bock F, Lassere F, Ghosh C, Pascussi JM, Janigro D, Marchi N (2016) Lack of CAR impacts neuronal function and cerebrovascular integrity in vivo. *Exp Neurol* 283:39–48.
- Boussadia B, Lakhal L, Payrastra L, Ghosh C, Pascussi JM, Gangarossa G, Marchi N (2018) Pregnane X receptor deletion modifies recognition memory and electroencephalographic activity. *Neuroscience* 370:130–138.
- Casals-Casas C, Desvergne B (2011) Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annu Rev Physiol* 73:135–162.
- Czajka M, Matysiak-Kucharek M, Jodłowska-Jedrych B, Sawicki K, Fal B, Drop B, Kruszewski M, Kapka-Skrzypczak L (2019) Organophosphorus pesticides can influence the development of obesity and type 2 diabetes with concomitant metabolic changes. *Environ Res* 178 108685.
- Dallerac G, Rouach N (2016) Astrocytes as new targets to improve cognitive functions. *Prog Neurobiol* 144:48–67.
- De Long NE, Holloway AC (2017) Early-life chemical exposures and risk of metabolic syndrome. *Diabetes Metab Syndr Obes* 10:101–109.
- Deitmer JW, Theparambil SM, Ruminot I, Noor SI, Becker HM (2019) Energy dynamics in the brain: contributions of astrocytes to metabolism and pH homeostasis. *Front Neurosci* 13:1301.
- Donovan JP, Schafer DF, Shaw Jr BW, Sorrell MF (1998) Cerebral oedema and increased intracranial pressure in chronic liver disease. *Lancet* 351:719–721.
- dos Santos AA, Naime AA, de Oliveira J, Colle D, dos Santos DB, Hort MA, Moreira EL, Sunol C, de Bem AF, Farina M (2016) Long-term and low-dose malathion exposure causes cognitive impairment in adult mice: evidence of hippocampal mitochondrial dysfunction, astrogliosis and apoptotic events. *Arch Toxicol* 90:647–660.
- Evangelou E, Ntritsos G, Chondrogiorgi M, Kavvoura FK, Hernandez AF, Ntzani EE, Tzoulaki I (2016) Exposure to pesticides and diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Environ Int* 91:60–68.
- Ferguson CS, Tyndale RF (2011) Cytochrome P450 enzymes in the brain: emerging evidence of biological significance. *Trends Pharmacol Sci* 32:708–714.
- Gangemi S, Gofita E, Costa C, Teodoro M, Briguglio G, Nikitovic D, Tzanakakis G, Tsatsakis AM, Wilks MF, Spandidos DA, Fenga C (2016) Occupational and environmental exposure to pesticides and cytokine pathways in chronic diseases (Review). *Int J Mol Med* 38:1012–1020.
- Ghosh C, Puvenna V, Gonzalez-Martinez J, Janigro D, Marchi N (2011) Blood-brain barrier P450 enzymes and multidrug transporters in drug resistance: a synergistic role in neurological diseases. *Curr Drug Metab* 12:742–749.
- Giannoni P, Claeysen S, Noe F, Marchi N (2020) Peripheral routes to neurodegeneration: passing through the blood-brain barrier. *Front Aging Neurosci* 12:3.
- Guillemot-Legrès O, Muccioli GG (2017) Obesity-induced neuroinflammation: beyond the hypothalamus. *Trends Neurosci* 40:237–253.
- Hernandez AF, Gonzalez-Alzaga B, Lopez-Flores I, Lacasana M (2016) Systematic reviews on neurodevelopmental and neurodegenerative disorders linked to pesticide exposure: methodological features and impact on risk assessment. *Environ Int* 92–93:657–679.
- Iaccarino HF, Singer AC, Martorell AJ, Rudenko A, Gao F, Gillingham TZ, Mathys H, Seo J, Kritskiy O, Abdurrob F, Aidaikkan C, Canter RG, Rueda R, Brown EN, Boyden ES, Tsai LH (2018) Author Correction: Gamma frequency entrainment attenuates amyloid load and modifies microglia. *Nature* 562:E1.
- Ichkova A, Rodríguez-Grande B, Zub E, Saudi A, Fournier ML, Aussudre J, Sicard P, Obenaus A, Marchi N, Badaut J (2020) Early cerebrovascular and long-term neurological modifications ensue following juvenile mild traumatic brain injury in male mice. *Neurobiol Dis* 141 104952.
- Jaber SM, Bordt EA, Bhatt NM, Lewis DM, Gerecht S, Fiskum G, Polster BM (2018) Sex differences in the mitochondrial bioenergetics of astrocytes but not microglia at a physiologically relevant brain oxygen tension. *Neurochem Int* 117:82–90.



- Kamel F, Hoppin JA (2004) Association of pesticide exposure with neurologic dysfunction and disease. *Environ Health Perspect* 112:950–958.
- Kitchigina VF (2018) Alterations of coherent theta and gamma network oscillations as an early biomarker of temporal lobe epilepsy and Alzheimer's disease. *Front Integr Neurosci* 12:36.
- Klement W, Blaquièrre M, Zub E, deBock F, Boux F, Barbier E, Audinat E, Lerner-Natoli M, Marchi N (2019) A pericyte-glia scarring develops at the leaky capillaries in the hippocampus during seizure activity. *Epilepsia* 60:1399–1411.
- Kyyriäinen J, Ekolle Ndode-Ekane X, Pitkanen A (2017) Dynamics of PDGFRbeta expression in different cell types after brain injury. *Glia* 65:322–341.
- Li JT, Xie XM, Yu JY, Sun YX, Liao XM, Wang XX, Su YA, Liu YJ, Schmidt MV, Wang XD, Si TM (2017) Suppressed calbindin levels in hippocampal excitatory neurons mediate stress-induced memory loss. *Cell Rep* 21:891–900.
- Li Q, Barres BA (2018) Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol* 18:225–242.
- Lim KL, Tay A, Nadarajah VD, Mitra NK (2011) The effect of consequent exposure of stress and dermal application of low doses of chlorpyrifos on the expression of glial fibrillary acidic protein in the hippocampus of adult mice. *J Occup Med Toxicol* 6:4.
- Lukowicz C, Ellero-Simatos S, Regnier M, Polizzi A, Lasserre F, Montagner A, Lippi Y, Jamin EL, Martin JF, Naylies C, Canlet C, Debrauwer L, Bertrand-Michel J, Al Saati T, Theodorou V, Loiseau N, Mselli-Lakhal L, Guillou H, Gamet-Payrastré L (2018) Metabolic effects of a chronic dietary exposure to a low-dose pesticide cocktail in mice: sexual dimorphism and role of the constitutive androstane receptor. *Environ Health Perspect* 126:067007.
- Lushchak VI, Matviishyn TM, Husak VV, Storey JM, Storey KB (2018) Pesticide toxicity: a mechanistic approach. *EXCLI J* 17:1101–1136.
- Mably AJ, Colgin LL (2018) Gamma oscillations in cognitive disorders. *Curr Opin Neurobiol* 52:182–187.
- Miller AA, Spencer SJ (2014) Obesity and neuroinflammation: a pathway to cognitive impairment. *Brain Behav Immun* 42:10–21.
- Morita M, Ikeshima-Kataoka H, Kreft M, Vardjan N, Zorec R, Noda M (2019) Metabolic plasticity of astrocytes and aging of the brain. *Int J Mol Sci* 20.
- Morrison HW, Filosa JA (2016) Sex differences in astrocyte and microglia responses immediately following middle cerebral artery occlusion in adult mice. *Neuroscience* 339:85–99.
- Mouton PR, Long JM, Lei DL, Howard V, Jucker M, Calhoun ME, Ingram DK (2002) Age and gender effects on microglia and astrocyte numbers in brains of mice. *Brain Res* 956:30–35.
- Nasr HM, El-Demerdash FM, El-Nagar WA (2016) Neuro and renal toxicity induced by chlorpyrifos and abamectin in rats: Toxicity of insecticide mixture. *Environ Sci Pollut Res Int* 23:1852–1859.
- Nisbett KE, Pinna G (2018) Emerging therapeutic role of PPAR-alpha in cognition and emotions. *Front Pharmacol* 9:998.
- Ojo JO, Abdullah L, Evans J, Reed JM, Montague H, Mullan MJ, Crawford FC (2014) Exposure to an organophosphate pesticide, individually or in combination with other Gulf War agents, impairs synaptic integrity and neuronal differentiation, and is accompanied by subtle microvascular injury in a mouse model of Gulf War agent exposure. *Neuropathology* 34:109–127.
- Pekny M, Pekna M, Messing A, Steinhäuser C, Lee JM, Párpura V, Hol EM, Sofroniew MV, Verkhratsky A (2016) Astrocytes: a central element in neurological diseases. *Acta Neuropathol* 131:323–345.
- Pu Y, Yang J, Chang L, Qu Y, Wang S, Zhang K, Xiong Z, Zhang J, Tan Y, Wang X, Fujita Y, Ishima T, Wang D, Hwang SH, Hammock BD, Hashimoto K (2020) Maternal glyphosate exposure causes autism-like behaviors in offspring through increased expression of soluble epoxide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117:11753–11759.
- Riew TR, Choi JH, Kim HL, Jin X, Lee MY (2018) PDGFR-beta-positive perivascular adventitial cells expressing nestin contribute to fibrotic scar formation in the striatum of 3-NP intoxicated rats. *Front Mol Neurosci* 11:402.
- Rom S, Zuluaga-Ramirez V, Gajghate S, Seliga A, Winfield M, Heldt NA, Kolpakov MA, Bashkirova YV, Sabri AK, Persidsky Y (2019) Hyperglycemia-driven neuroinflammation compromises BBB leading to memory loss in both diabetes mellitus (DM) type 1 and type 2 mouse models. *Mol Neurobiol* 56:1883–1896.
- Runtz L, Girard B, Toussenet M, Espallergues J, Fayd'Herbe De Maudave A, Milman A, deBock F, Ghosh C, Guérineau NC, Pascussi JM, Bertaso F, Marchi N (2018) Hepatic and hippocampal cytochrome P450 enzyme overexpression during spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia* 59:123–134.
- Santos-Galindo M, Acáz-Fonseca E, Bellini MJ, Garcia-Segura LM (2011) Sex differences in the inflammatory response of primary astrocytes to lipopolysaccharide. *Biol Sex Differ* 2:7.
- Sofroniew MV (2014) Astrogliosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7:a020420.
- Stevenson EL, Caldwell HK (2014) Lesions to the CA2 region of the hippocampus impair social memory in mice. *Eur J Neurosci* 40:3294–3301.
- Sureka B, Bansal K, Patidar Y, Rajesh S, Mukund A, Arora A (2015) Neurologic manifestations of chronic liver disease and liver cirrhosis. *Curr Probl Diagn Radiol* 44:449–461.
- Suzuki A, Stern SA, Bozdagi O, Huntley GW, Walker RH, Magistretti PJ, Alberini CM (2011) Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell* 144:810–823.
- Tassoni A, Farkhondeh V, Itoh Y, Itoh N, Sofroniew MV, Voskuhl RR (2019) The astrocyte transcriptome in EAE optic neuritis shows complement activation and reveals a sex difference in astrocytic C3 expression. *Sci Rep* 9:10010.
- Wang P, Wang HP, Xu MY, Liang YJ, Sun YJ, Yang L, Li L, Li W, Wu YJ (2014) Combined subchronic toxicity of dichlorvos with malathion or pirimicarb in mice liver and serum: a metabonomic study. *Food Chem Toxicol* 70:222–230.
- Zurich MG, Honegger P, Schilter B, Costa LG, Monnet-Tschudi F (2004) Involvement of glial cells in the neurotoxicity of parathion and chlorpyrifos. *Toxicol Appl Pharmacol* 201:97–104.

## APPENDIX A. SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.07.039>.

(Received 4 April 2020, Accepted 21 July 2020)  
(Available online 28 July 2020)

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de mon projet de recherche doctoral a été d'étudier le rôle du récepteur CAR dans la pathogenèse dimorphique de la NAFLD qu'elle soit induite par l'alimentation ou par l'exposition à des xénobiotiques. Pour cela, nous avons utilisé un modèle de souris génétiquement délétées pour le récepteur CAR (CAR<sup>-/-</sup>). Nous avons inclus dans nos études expérimentales des souris mâles et femelles pour étudier les effets sexe-dépendants. Pour étudier la pathogenèse de la NAFLD induite par l'alimentation, nous avons utilisé un régime riche en gras (HFD) contenant 60% de lipides qui a été administré à partir du sevrage pendant 16 semaines. Pour la stéatose induite par des contaminants, nous avons étudié un polluant persistant, le PFOA ainsi qu'un mélange de six pesticides (ziram, chlorpyrifos, thiaclopride, boscalide, thiofanate et captan). Une exposition aiguë à de fortes doses de PFOA a été effectuée pour comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans les effets de ce toxique. Le mélange de pesticides a été administré en chronique et à de faibles doses. Les pesticides ont été introduits dans l'alimentation à la DJA pour chacun d'entre eux pour se rapprocher de l'exposition humaine.

Les résultats obtenus au cours de ce projet de recherche ont permis de démontrer un rôle dimorphique du récepteur CAR dans la pathogénèse de la NAFLD induite par un régime gras ou par l'exposition au PFOA. Ces résultats apportent de nouvelles connaissances sur le rôle de ce récepteur nucléaire. Une protection de CAR contre la stéatose et les perturbations induites par un régime HFD a été mise en évidence chez les femelles. Nous supposons l'implication d'un dialogue CAR-ER $\alpha$  dans cette protection. Cette étude révèle également un rôle dimorphique de CAR dans des adaptations neurologiques en réponse à un régime HFD qui n'a jamais été décrit auparavant.



Ce récepteur est également impliqué dans la formation de gouttelettes lipidiques hépatiques en réponse au PFOA que l'on suppose être un mécanisme protecteur du foie. L'exposition chronique au mélange de pesticides n'a pas induit de stéatose hépatique mais d'autres troubles délétères ont été détectés. Ce mélange de pesticides induit des troubles du comportement, des adaptations morphologiques cérébrales ainsi qu'une activation des voies de détoxification hépatiques et rénales et de voies métaboliques hépatiques.

### **Implication des récepteurs CAR et ER $\alpha$ dans la pathogenèse dimorphique de la NAFLD induite par un régime HFD**

Une étude publiée par mon équipe d'accueil au début de ma thèse rapporte un rôle dimorphique du récepteur CAR dans la régulation du métabolisme énergétique (Lukowicz et al. 2019). Cette étude démontre que les souris mâles invalidés pour CAR développent au cours du vieillissement, de nombreuses perturbations métaboliques. Les souris mâles CAR $^{-/-}$  développent une obésité, une stéatose hépatique, une intolérance au glucose, une insensibilité à l'insuline, une dyslipidémie, et un hypercorticisme (Lukowicz et al. 2019). Ces dernières modifications étant absentes, ou mineures, chez les souris femelles CAR $^{-/-}$ .

L'étude réalisée au cours de ma thèse a eu pour objectif d'étudier la réponse de souris CAR $^{-/-}$  jeunes à un régime HFD et a permis de démontrer un effet délétère de l'absence de CAR plus important chez les femelles. L'ensemble de ces études démontre que les femelles CAR $^{-/-}$  qui toléraient plutôt bien l'absence de CAR dans la première étude le font moins bien face au stress métabolique constitué par le régime HFD.

Ce dernier résultat est intéressant car il peut être mis en lien avec les études cliniques démontrant une protection des femmes pré-ménopausées vis-à-vis du développement de la NAFLD (Balakrishnan et al. 2021).

Les résultats obtenus dans notre étude sont en accord avec ces observations cliniques car sous régime HFD, les souris mâles WT présentent une prise de poids et une stéatose hépatique beaucoup plus importantes que celles observées chez les souris femelles WT (**Figure 3**, article II). Notre étude démontre un rôle de CAR dans cette protection des femelles contre un stress métabolique puisque quand CAR est invalidé, la protection est levée. Ces données sont confortées par les analyses transcriptomiques qui révèlent en l'absence de CAR une signature transcriptomique caractéristique de stéatohépatite (NASH) qui n'est observée que chez les femelles CAR<sup>-/-</sup>. Ces résultats suggèrent une protection potentielle de ce récepteur contre la progression de la NAFLD vers des stades plus graves tels que la NASH. Une administration prolongée du régime HFD permettrait d'évaluer l'apparition de marqueurs histologiques caractéristiques de NASH tels qu'une inflammation et une fibrose hépatique (Ito et al. 2007) qui n'ont pas été détectés dans notre étude. De plus, l'utilisation d'un régime inducteur de NASH comme le régime « western diet » ou le régime MCD permettrait également d'approfondir le rôle de CAR dans la transition NAFLD-NASH.

Le dimorphisme sexuel observé sur le métabolisme lipidique n'est pas retrouvé au niveau du métabolisme glucidique puisqu'une hyperglycémie et hyperinsulinémie à jeun sont observées aussi bien chez les mâles que chez les femelles CAR<sup>-/-</sup> sous HFD (**Figure 2**, article II).

Plusieurs études ont démontré une implication des œstrogènes et du récepteur ER $\alpha$  dans la protection des femmes pré-ménopausées du développement de la NAFLD (Kamada et al. 2011; Bryzgalova et al. 2006). Néanmoins, les mécanismes moléculaires impliqués dans l'effet protecteur des œstrogènes ne sont pas entièrement élucidés. Dans cette étude, nous avons mis en évidence une corrélation positive entre la signature transcriptomique hépatique des femelles CAR<sup>-/-</sup> et des femelles ER $\alpha$ <sup>-/-</sup> qui suggère un dialogue CAR-ER $\alpha$  dans la protection contre la NAFLD.

Ces résultats ouvrent de nombreuses pistes pour comprendre les mécanismes impliqués dans la protection des femelles contre le développement de la NAFLD. Une étude effectuée sur des cellules HepG2 démontre un cross-talk inhibiteur entre CAR et ER $\alpha$  (Min et al. 2002). L'activation de CAR par son agoniste le TCPOBOP, réprime l'activité transcriptionnelle du récepteur ER $\alpha$  *via* une compétition pour un coactivateur commun GRIP1 chez la souris. Un agoniste inverse de CAR, l'androsténol diminue la répression de CAR sur ER $\alpha$ . Une deuxième étude révèle que le récepteur ER $\alpha$  induit l'activation de CAR en absence d'oestrogènes et de ligands de CAR (Min 2010). En revanche, en présence d'agonistes des deux récepteurs (TCPOBOP et Moxestrol), ER $\alpha$  réprime la transactivation de CAR. Ces résultats contradictoires démontrent que ER $\alpha$  peut avoir des effets activateurs ou inhibiteurs sur la transactivation de CAR en fonction de la présence de leurs ligands. Le dialogue CAR-ER $\alpha$  en conditions de régime gras pourrait être évalué sur des modèles cellulaires permettant l'étude de ces mécanismes moléculaires. Le régime HFD peut être mimé en culture cellulaire par l'incubation des cellules avec des acides gras (Beyaz et al. 2016).

Le modèle le plus utilisé pour étudier l'implication des œstrogènes est l'ovariectomie qui permet de supprimer la voie majeure de production endogène d'œstrogènes. Les souris ovariectomisées développent spontanément des troubles métaboliques dont une stéatose hépatique (Fu et al. 2016). Il serait intéressant de déterminer si la modulation de l'activité de CAR (activation au TCPOBOP ou répression à l'androsténol) chez des souris ovariectomisées permet de compenser les effets délétères induits par l'ablation des ovaires. Cela pourrait élucider l'implication de CAR dans l'effet protecteur des œstrogènes.

De plus, CAR étant impliqué dans le catabolisme des œstrogènes (Sueyoshi et al. 2011), il serait intéressant de déterminer les taux d'œstrogènes circulants et le niveau d'activité du récepteur ER $\alpha$  chez des souris femelles CAR-/- sous régime gras.

Si les taux d'œstrogènes sont diminuées, l'administration d'œstrogènes pour tenter de reverser le phénotype des femelles CAR<sup>-/-</sup> permettrait de confirmer l'implication des œstrogènes dans les effets délétères de la délétion de CAR.

Pour évaluer la pertinence clinique de notre hypothèse sur l'implication de CAR dans la protection contre la NAFLD, il serait intéressant de déterminer si chez l'Homme, il existe des polymorphismes de CAR qui pourraient être impliqués dans le développement de la NAFLD. On pourrait également se demander si l'activité de CAR est perturbée chez des patients atteints de NAFLD ou de NASH. La confirmation du rôle protecteur de CAR chez l'Homme permettrait de prendre ce récepteur en compte dans la recherche de cibles thérapeutiques pour le traitement de la NAFLD.

### **Rôle de CAR dans les adaptations neurologiques induites par un régime HFD**

Le régime HFD induit des modifications adaptatives au niveau du système nerveux central qui ont pour but de protéger le cerveau des effets délétères d'un régime gras (Buckman et al. 2015). Au cours de ce projet, nous nous sommes intéressés aux astrocytes, un type cellulaire qui n'est que depuis peu considéré pour son rôle métabolique. Dans un contexte de régime HFD, l'astrogliose a été décrite comme un mécanisme de protection métabolique qui diminue la prise alimentaire en réponse au régime (Buckman et al. 2015). Dans cette étude, nous avons mis en évidence la présence d'adaptations du système nerveux central chez les souris CAR<sup>-/-</sup> sous régime HFD qui sont différentes de celles observées chez les souris WT. On observe une astrogliose hypothalamique plus sévère chez les souris CAR<sup>-/-</sup> que chez les WT suggérant un rôle de CAR dans cette adaptation cérébrale qui n'est observée que chez les femelles.

La première question soulevée par ces résultats est de déterminer si l'effet de CAR sur les astrocytes provient de l'activité de ce récepteur au niveau hépatique ou extra-hépatique. En effet, CAR est majoritairement exprimé au niveau du foie mais est également exprimé au niveau du système nerveux central. En revanche, son expression n'est pas entièrement cartographiée au niveau cérébral. Certaines études effectuées chez le rongeur et chez l'humain suggèrent l'expression de CAR dans différentes régions telles que le cortex cérébral, l'hippocampe, l'hypothalamus et l'amygdale mais les types cellulaires qui expriment CAR ne sont pas connus (Lamba et al. 2004). Il serait donc intéressant d'explorer l'expression et l'activité de CAR dans les astrocytes pour déterminer si le CAR-astrocytaire est impliqué dans les adaptations métaboliques du système nerveux central en réponse à un régime gras.

Une cartographie complète de l'expression de CAR au niveau central permettrait également de cibler certains types cellulaires tels que les astrocytes pour générer des modèles de délétion de CAR spécifiquement dans certaines régions et types cellulaires du cerveau. Cela permettrait d'étudier le lien entre les perturbations centrales et périphériques induites par un régime gras et de déterminer si une délétion astrocyte-spécifique de CAR est suffisante pour induire une astroglie hypothalamique. De plus, cela permettrait d'explorer les conséquences au niveau hépatique d'une délétion astrocyte-spécifique de CAR, et de comprendre le rôle de CAR dans l'axe cerveau-foie.

A l'inverse, pour étudier l'implication de CAR-hépatique et son rôle dans l'axe foie-cerveau, nous avons généré un modèle de souris délétées pour CAR spécifiquement au niveau hépatocytaire.



## Rôle de CAR hépatique dans les effets délétères du régime HFD

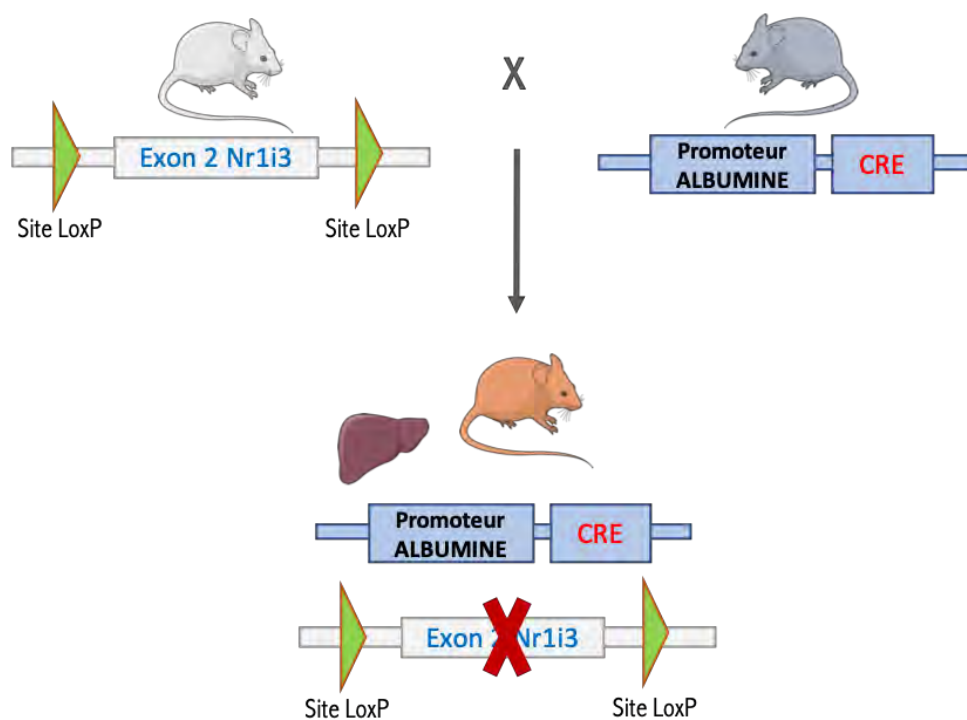
Dans notre étude, nous avons observé des effets de la délétion de CAR et du régime HFD sur de multiples organes comme le foie, le système nerveux central et le tissu adipeux. Les effets extra-hépatiques observés soulèvent de nombreux questionnements quant au rôle de CAR.

Comme décrit dans le paragraphe précédent, les effets observés sur les astrocytes hypothalamiques pourraient être attribués à CAR-hépatique ou CAR-cérébral. De la même manière, le récepteur CAR n'est pas exprimé au niveau du tissu adipeux (Uhlén et al. 2015), ce qui soulève la question de l'effet de CAR-hépatique sur cet organe. En effet, la délétion de CAR exacerbe l'effet du régime gras sur l'accumulation du tissu adipeux chez les femelles. Pour comprendre quels effets parmi ceux observés dépendent de l'activité de CAR au niveau hépatique, nous avons généré une lignée de souris génétiquement délétées pour le récepteur CAR spécifiquement au niveau hépatocytaire. Pour cela, nous avons croisé une lignée de souris exprimant la CRE recombinase sous le contrôle du promoteur de l'albumine (protéine spécifiquement hépatocytaire) et une lignée de souris présentant une construction génétique avec des sites LoxP de part et d'autre de l'exon 2 du gène Nr1i3 codant pour CAR (**Figure 11**). L'exon 2 du gène Nr1i3 code pour le domaine de liaison à l'ADN de ce récepteur. Les souris knock-out pour CAR spécifiquement au niveau hépatocytaire (CAR<sup>hep</sup>-/-) présentent donc une version tronquée du récepteur CAR qui ne pourra se fixer sur ses domaines de liaison à l'ADN et ne pourra effectuer son action transcriptionnelle.

Une expérimentation est prévue au cours de laquelle des souris CAR<sup>hep</sup>-/- mâles et femelles seront soumises à un régime gras pendant 16 semaines. La comparaison du profil métabolique des souris délétées de manière totale ou hépato-spécifique pour CAR et soumises à un régime HFD permettra de comprendre l'implication de CAR-hépatique dans les effets délétères du régime.

Si l'astroglie hypothalamique est retrouvée chez les femelles CAR<sup>hep</sup>⁻/⁻, cela suggérerait que c'est la délétion de CAR au niveau hépatique qui induit les effets au niveau central.

Enfin, un autre élément qui permettrait d'étudier l'implication du foie dans les effets observés sur le système nerveux central est un dosage de la lipocaline 2 chez les souris CAR<sup>-/-</sup> et CAR<sup>hep</sup>⁻/⁻. La lipocaline 2 est une protéine spécifiquement produite par le foie et qui est un médiateur important dans la neuro-inflammation observée en conditions de NASH (Mondal et al. 2020). Cela confirmerait l'implication du foie dans les effets observés sur le système nerveux central.



**Figure 11 : Génération de la lignée de souris invalidées pour CAR spécifiquement au niveau hépatocytaire.** Deux lignées de souris ont été croisées, une exprimant des sites LoxP de part et d'autre de l'exon 2 du gène Nr1i3 codant pour le DBD de CAR (DNA binding domain) et l'autre exprimant la CRE-recombinase sous le contrôle d'un promoteur hépatocyte-spécifique, le promoteur de l'albumine. Le croisement de ces deux lignées permet l'obtention de souris exprimant la CRE-recombinase uniquement dans les hépatocytes et donc une excision de l'exon 2 codant pour la protéine CAR uniquement au niveau hépatocytaire.

## **Rôle de CAR dans la formation des gouttelettes lipidiques induite par l'exposition au PFOA**

Les gouttelettes lipidiques ont longtemps été considérées uniquement comme des structures de stockage des lipides. Néanmoins, plusieurs études récentes ont décrit les gouttelettes lipidiques comme de véritables organelles impliquées dans de nombreux processus physiologiques (Fujimoto and Parton 2011). Les gouttelettes lipidiques sont entourées d'une monocouche de phospholipides dans laquelle s'encastrent plusieurs types de protéines. Ces protéines dont les périlipines, sont impliquées dans la formation, la maturation et la fusion des gouttelettes lipidiques (Sztalryd and Brasaemle 2017).

Quelques études ont exploré le rôle de différents récepteurs nucléaires dans la régulation de protéines impliquées dans la formation des gouttelettes lipidiques. Néanmoins, ces études ont porté uniquement sur les gouttelettes lipidiques du tissu adipeux. Une implication des récepteurs PPAR $\gamma$  et ER $\alpha$  a été mise en évidence dans la régulation de Plin1, une périlipine impliquée dans la régulation de la taille des gouttelettes lipidiques adipocytaires (Christian 2013). La différence de taille de gouttelettes chez nos animaux WT et CAR $^{-/-}$  suggère une implication de CAR dans la formation et la maturation des gouttelettes lipidiques. Nous supposons une implication de CAR dans la régulation de l'expression de protéines impliquées dans ces processus. Si cette hypothèse est vérifiée, l'altération de la formation des gouttelettes lipidiques chez les souris CAR $^{-/-}$  pourrait résulter dans des gouttelettes lipidiques de plus petite taille. Il faudrait dans un premier temps confirmer cette observation visuelle par une analyse quantitative de la taille des gouttelettes lipidiques à l'aide d'un logiciel d'analyse d'images (Image-J). Ensuite, pour explorer cette hypothèse, une analyse protéomique des gouttelettes lipidiques des souris WT et CAR $^{-/-}$  est en cours. Pour cela, l'optimisation d'un protocole de purification des gouttelettes lipidiques par ultracentrifugation est une étape essentielle.

Les gouttelettes lipidiques étant des structures très proches d'autres organelles telles que le réticulum endoplasmique, il existe un risque de contamination par des protéines qui ne sont pas originaires des gouttelettes lipidiques (Fujimoto and Parton 2011). L'étape de purification est donc critique pour n'obtenir que des protéines des gouttelettes lipidiques. Ces analyses nous permettront de déterminer si l'absence de CAR affecte le protéome des gouttelettes lipidiques et pourrait donc perturber leur formation et maturation. Cela révélerait un rôle nouveau de CAR dans la formation de gouttelettes lipidiques au niveau hépatique en réponse à un toxique environnemental.

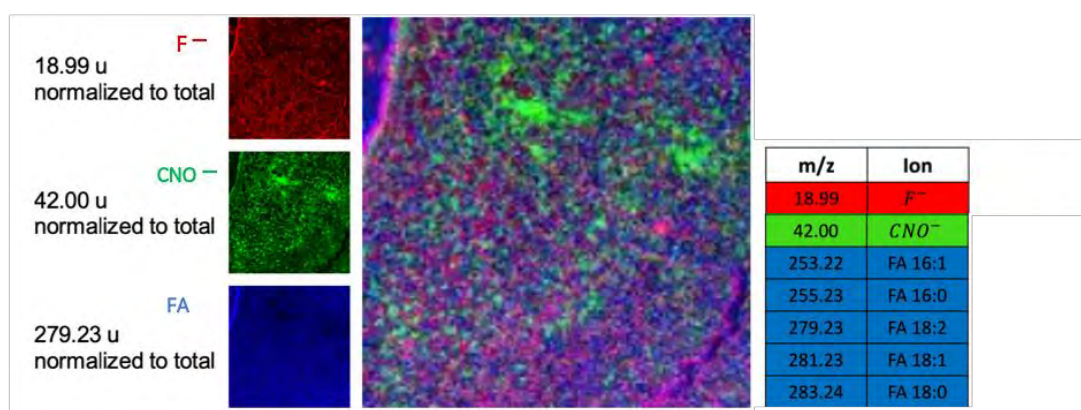
Une autre question soulevée par ce travail est de déterminer pourquoi est-ce que le foie répond à la présence de certains contaminants environnementaux en produisant des gouttelettes lipidiques.

### **Pourquoi certains toxiques environnementaux induisent-ils une stéatose hépatique ?**

Plusieurs études ont décrit une accumulation de toxiques lipophiles dans le tissu adipeux (Lei Wang, Asimakopoulos, and Kannan 2015). Cette accumulation est un moyen de neutraliser ces toxiques les empêchant d'exercer leur toxicité sur les autres tissus. Ceci nous a conduit à nous demander si les gouttelettes lipidiques produites par le foie n'auraient pas comme vocation de piéger les composés toxiques dans l'attente de leur élimination.

Le PFOA est un composé qui s'accumule principalement au niveau hépatique (Han, Kemper, and Jepson 2005). De plus, il n'est pas métabolisé par l'organisme et très peu excrété. La production de gouttelettes lipidiques par le foie en réponse à l'exposition au PFOA pourrait permettre au foie de neutraliser ce toxique dans l'attente de l'éliminer.

Pour mieux comprendre le lien entre l'exposition au PFOA et le développement d'une stéatose hépatique, il serait intéressant de déterminer si la stéatose induite par le PFOA perdure dans le temps ou si elle peut être réversible en cas d'arrêt d'exposition. Une expérimentation incluant une période de « wash-out » après l'exposition au PFOA permettrait de répondre à cette question. Pour explorer l'hypothèse d'une stéatose induite comme mécanisme de détoxification, nous collaborons avec une équipe de ToxAlim (NGN) et une équipe du laboratoire LIST du Luxembourg. Dans le cadre de cette collaboration, nous avons demandé à l'équipe du Luxembourg de nous aider à déterminer si le PFOA se localise à l'intérieur des gouttelettes lipidiques hépatiques. Ils utilisent pour cela des techniques d'imageries TOF-SIMS qui permettent de localiser les ions fluorure du PFOA. Des résultats préliminaires ont permis de démontrer une colocalisation des ions fluorure du PFOA avec des acides gras (acide palmitoléique, acide palmitique, acide linoléique, acide oléique, acide stéarique) (**Figure 12**). Une analyse plus poussée est en cours (TOF-SIMS et HIM-SIMS) qui permettra une localisation plus précise des ions fluorures pour déterminer s'ils sont présents à l'intérieur des gouttelettes lipidiques.



**Figure 12 : Colocalisation du PFOA avec des acides gras.**

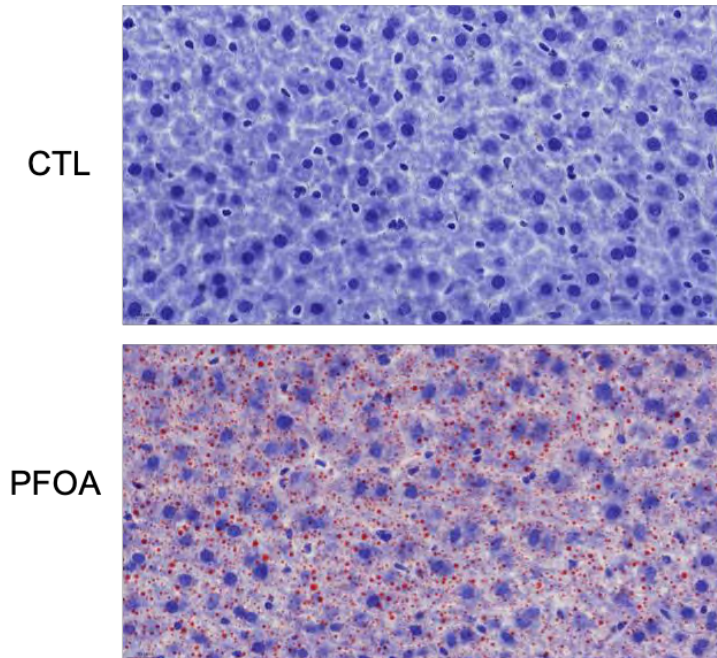
Des coupes histologiques de foie de souris mâles WT traitées au PFOA (exposition aiguë 3 jours, 100mg/kg/jour) ont été analysées par TOFSIMS pour la détection d'ions F<sup>-</sup> (PFOA), CNO<sup>-</sup> (protéines) et d'acides gras (FA) : FA16:1 acide palmitoléique, FA16:0 acide palmitique, FA18:2 acide linoléique, FA18:1 acide oléique, FA18:0 acide stéarique.



### Doses d'exposition humaine et TAFLD induite par le PFOA

Cette première étude d'exposition aiguë à de fortes doses de PFOA avait pour but d'explorer le rôle de CAR dans les mécanismes moléculaires impliqués dans les effets du PFOA. Des études sont en cours pour déterminer l'impact du PFOA à des doses et des durées d'exposition plus représentatives de l'exposition humaine.

Des résultats préliminaires ont été obtenus sur une exposition de 90 jours au PFOA à des doses proches de la DJA établie pour l'Homme (1,5 ng/kg/jour). Cette exposition chez des souris C57BL6/J, induit une accumulation de lipides au niveau hépatique (**Figure 12**). En revanche, une analyse transcriptionnelle n'a pas mis en évidence d'activation de CAR, PXR ou de PPAR $\alpha$  suite à 90 jours d'exposition. Il serait intéressant de déterminer si ces récepteurs ne sont pas activés à ces doses de PFOA ou si une activation a lieu au cours des 90 jours mais qui ne perdure pas au cours du temps.



**Figure 13 : Une exposition de 90 jours au PFOA induit une stéatose hépatique**

Des souris C57BL6/J ont été exposées à 1,5ng/kg/jour pendant 90 jours. Après 90 jours, des coupes histologiques de foies ont été colorées à l'huile rouge pour mettre en évidence les lipides neutres hépatiques (grossissement x100).

## Effet d'une exposition chronique à un mélange de pesticides

L'Homme est exposé de manière chronique à un mélange de toxiques environnementaux (Silins and Högberg 2011). Pour nous rapprocher de l'exposition humaine aux xénobiotiques, nous avons également étudié l'effet cocktail dans le développement de troubles métaboliques. Pour cela, nous avons exposé via l'alimentation, des souris mâles et femelles à un mélange de 6 pesticides à la DJA pour chacun d'entre eux. Ces doses sont supposées être non-toxiques mais des effets qui pourraient être délétères ont été observés. Dans cette étude, l'exposition à ce mélange de pesticides n'induit pas de stéatose hépatique. En revanche, nous avons mis en évidence une induction de gènes impliqués dans des voies de détoxification (Cyp4a10 et Cyp4a14) qui sont également des gènes cibles prototypique de PPAR $\alpha$  et qui reflètent donc son activation (**Figure 6, 9**, article III).

Des résultats préliminaires obtenus suite à une exposition aiguë pendant 3 jours, à ce même mélange de pesticides et aux mêmes doses n'a pas révélé d'activation de PPAR $\alpha$ . Ces résultats soulèvent plusieurs questions quant à l'activation de PPAR $\alpha$  suite à l'exposition chronique aux pesticides. Certains pesticides du mélange sont considérés comme polluants organiques persistants dans l'environnement et l'organisme tels que le boscalide, le chlorpyrifos, le thiaclopride et le captan (Skanes et al. 2020; Giesy et al. 2014; Abdourahime et al. 2019; C. Y. Li and Nelson 1985). A l'inverse, les pesticide ziram et thiofanate sont considérés comme faiblement persistants (Srivastava, Singh, and Mani 2013; Fleeker et al. 1974). Une des hypothèses est que l'accumulation au cours du temps de certains pesticides dans le foie induirait l'activation de PPAR $\alpha$ .

Une deuxième hypothèse pourrait reposer sur un effet indirect de l'activation de PPAR $\alpha$  suite à l'exposition aux pesticides. Ce mélange de pesticides pourrait avoir un effet sur le tissu adipeux par exemple, qui libèrerait des acides gras ligands de PPAR $\alpha$  au niveau hépatique.

Une analyse du profil d'acides gras plasmatiques en réponse à l'exposition aux pesticides permettrait d'identifier la présence de ligands activateurs de PPAR $\alpha$ .

Pour aller plus loin dans l'exploration des effets de ce mélange de pesticides sur l'activation de récepteurs nucléaires, des études sont en cours en collaboration avec le Dr. Patrick Balaguer (IRCM Montpellier). L'utilisation de lignées cellulaires rapportrices pour plusieurs récepteurs nucléaires murins (PPAR $\alpha$ , CAR et PXR) permettront de déterminer si ce mélange de pesticides peut activer de manière directe le récepteur PPAR $\alpha$ . Ces pesticides seront également testés sur des lignées rapportrices exprimant les formes humaines des récepteurs nucléaires pour évaluer la pertinence clinique des résultats obtenus.

L'activation de voies de détoxification induite par une exposition chronique à un mélange de pesticides est considérée comme un mécanisme permettant la métabolisation et l'élimination de composés toxiques. Néanmoins, l'activation chronique de ces voies peut entraîner des effets délétères (Pawlak, Lefebvre, and Staels 2015). En effet, l'activation de PPAR $\alpha$  permet l'induction d'enzymes p450 de détoxification mais également l'induction de gènes impliqués dans des voies métaboliques telles que la  $\beta$ -oxydation. L'activation chronique de PPAR $\alpha$  pourrait donc perturber l'homéostasie énergétique hépatique.

De plus, l'exposition à ce mélange de pesticides induit des troubles du comportement et des adaptations neurologiques (astrogliose, adaptations pro-fibrotiques) qui pourraient entraîner une susceptibilité plus importante à développer des troubles neurologiques ou métaboliques. Il serait intéressant d'associer à cette exposition chronique aux pesticides, un régime riche en gras (HFD) pour déterminer si les pesticides exacerbent les effets délétères du régime HFD.

## **Rôle de CAR dans la pathogenèse de la NAFLD et de la TAFLD**

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce projet de recherche démontre un rôle controversé du récepteur CAR dans la pathogenèse de la stéatose hépatique. Suite à un stress métabolique tel qu'un régime gras, le récepteur CAR semble protéger d'une stéatose hépatique et des troubles métaboliques associés. Dans le cas d'un stress xénobiotique induit par l'exposition à un toxique tel que le PFOA, CAR semble participer à la formation et au développement de gouttelettes lipidiques. Néanmoins, ce mécanisme pourrait être considéré comme un mécanisme protecteur pour neutraliser le PFOA à l'intérieur des gouttelettes lipidiques. Dans la pathogenèse de la NAFLD, l'accumulation de lipides entraîne une lipotoxicité qui peut induire une progression de la pathologie vers des stades NASH (Cusi 2009). De la même manière, l'inclusion de PFOA dans les gouttelettes lipidiques semble être un mécanisme protecteur mais qui à long-terme pourrait être toxique et induire une évolution d'une TAFLD vers une TASH.

Chez l'Homme, l'apparition d'une NAFLD et d'une TAFLD sont souvent concomitantes. En effet, des perturbations métaboliques telles que l'obésité modifient la réponse aux xénobiotiques et certains toxiques qualifiés « d'obésogènes environnementaux » sont impliqués dans le développement d'obésité, un facteur de risque de la NAFLD (Sadler et al. 2018). Une étude démontre que l'administration d'un régime gras potentialise les effets du PFOA sur l'accumulation de lipides hépatiques, l'inflammation et la nécrose (Tan et al. 2013). Il serait intéressant d'explorer le rôle de CAR en situation de co-administration de HFD et de toxiques tels que le PFOA ou les pesticides.

L'exploration des différences entre une stéatose hépatique induite par l'alimentation ou par des toxiques environnementaux suscite également beaucoup d'intérêt. Le transporteur CD36 joue un rôle clé dans la pathogenèse de la NAFLD induite par un régime HFD.

Des souris présentant une délétion hépatocytaire de Cd36 sont protégées du développement de stéatose hépatique induite par un régime HFD (Rada et al. 2020). Dans notre étude d'exposition au PFOA, nous avons identifié l'implication de Cd36 dans l'import lipidique comme mécanisme du PFOA pour induire une accumulation de lipides hépatiques. Cela démontre des mécanismes similaires entre la stéatose induite par le régime HFD et par le PFOA. Il serait intéressant de déterminer si les souris présentant une délétion hépatocytaire de Cd36 sont également protégées du développement de la stéatose induite par le PFOA et si ces souris éliminent moins bien ce composé. L'expression de Cd36 est également induite suite à 12 mois d'exposition au mélange de pesticides (**Figure 7**, article III).

La nature des lipides accumulés dans le cadre d'une NAFLD et d'une TAFLD serait également intéressante à explorer. Notre étude montre que la stéatose induite par le HFD est composée de triglycérides et d'esters de cholestérol alors que celle induite par le PFOA est principalement composée de triglycérides (**Figure 3**, article I et **Figure 2**, article II).

De la même manière, il serait intéressant de déterminer si ce sont les mêmes adaptations neurologiques qui sont mises en place suite à un stress métabolique comme le régime HFD ou un stress xénobiotique comme l'exposition à un mélange de pesticides. L'astroglie en réponse au régime HFD est observée au niveau de l'hypothalamus (**Figure 1**, article III et **Figure 7**, article I) alors qu'une astroglie au niveau de l'hippocampe est observée suite à l'exposition au mélange de pesticides. Il serait intéressant de déterminer si l'astroglie induite par un toxique est un mécanisme protecteur comme dans le cas d'un régime HFD.

Enfin, l'utilisation du modèle de souris invalidées pour CAR spécifiquement au niveau hépatocytaire permettra d'étudier le rôle de CAR-hépatique dans la réponse à un stress métabolique comme un régime gras ainsi que dans la réponse à un stress xénobiotique comme l'exposition à des toxiques environnementaux.



De nombreuses études ont porté sur la pathogenèse de la NAFLD et de la TAFLD mais les mécanismes moléculaires impliqués ne sont pas totalement élucidés (Z. Younossi et al. 2020; Yu et al. 2016). La littérature existante sur le récepteur CAR suggère son implication dans la régulation de l'homéostasie énergétique et dans la pathogenèse de la NAFLD (M. C. Cave et al. 2016). Dans notre étude du rôle de CAR dans la pathogenèse de la NAFLD, nous avons choisi d'inclure des mâles et des femelles pour toutes nos expérimentations. De plus, nous avons cherché à avoir une approche multi-organes et explorer le rôle extra-hépatique de CAR en collaborant avec l'équipe du Dr. Nicola Marchi (IGF, Montpellier) avec lequel nous avons exploré le rôle de CAR au niveau du système nerveux central.

Grâce aux résultats obtenus dans le cadre de cette thèse, nous apportons des informations nouvelles sur le rôle du récepteur CAR. Nous démontrons un rôle dimorphique de CAR dans le développement de la NAFLD et potentiellement d'une transition NAFLD-NASH. De plus, nous suggérons un dialogue CAR/ER $\alpha$  qui pourrait être impliqué dans la protection des femelles du développement de la NAFLD. Concernant la TAFLD, nous suggérons une implication de CAR dans la formation de gouttelettes lipidiques induites par l'exposition au PFOA et nous proposons que celui-ci pourrait être un mécanisme de détoxification qui permettrait de neutraliser les contaminants persistants dans l'attente de leur excrétion.

Enfin, ces résultats pourraient permettre de considérer ce récepteur dans la recherche de cibles thérapeutiques potentielles pour le traitement de la NAFLD et de la TAFLD. De plus, l'activation de CAR pourrait être utilisée comme prédicteur pour évaluer le potentiel stéatogène de molécules toxiques environnementales.

## Références bibliographiques

- Abass, Khaled, and Olavi Pelkonen. 2013. "The Inhibition of Major Human Hepatic Cytochrome P450 Enzymes by 18 Pesticides: Comparison of the N-in-One and Single Substrate Approaches." *Toxicology in Vitro : An International Journal Published in Association with BIBRA* 27 (5): 1584–88. <https://doi.org/10.1016/J.TIV.2012.05.003>.
- Abdourahime, Himdata, Maria Anastassiadou, Maria Arena, Domenica Auteri, Stefania Barmaz, Alba Brancato, Daniela Brocca, et al. 2019. "Peer Review of the Pesticide Risk Assessment of the Active Substance Thiacloprid." *EFSA Journal* 17 (3). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2019.5595>.
- Abe, Taiki, Mirei Takahashi, Makoto Kano, Yuto Amaike, · Chizuru Ishii, Kazuhiro Maeda, Yuki Kudoh, et al. 2017. "Activation of Nuclear Receptor CAR by an Environmental Pollutant Perfluorooctanoic Acid." *Arch Toxicol* 3: 2365–74. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1888-3>.
- Akinrodoye, MA, and F Lui. 2020. "Neuroanatomy, Somatic Nervous System." *StatPearls*, April. <http://europepmc.org/books/NBK556027>.
- Akmayev, I. G., and A. P. Popov. 1977. "Morphological Aspects of the Hypothalamic-Hypophyseal System." *Cell and Tissue Research* 1977 180:2 180 (2): 263–82. <https://doi.org/10.1007/BF00231958>.
- Al-Eryani, Laila, Banrida Wahlang, K C Falkner, J J Guardiola, H B Clair, R A Prough, and Matt Cave. 2015. "Identification of Environmental Chemicals Associated with the Development of Toxicant-Associated Fatty Liver Disease in Rodents." *Toxicologic Pathology* 43 (4): 482–97. <https://doi.org/10.1177/0192623314549960>.
- Al-Lahham, Rabab, James H. Deford, and John Papaconstantinou. 2016. "Mitochondrial-Generated ROS down Regulates Insulin Signaling via Activation of the P38MAPK Stress Response Pathway." *Molecular and Cellular Endocrinology* 419 (January): 1–11. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2015.09.013>.
- Ali, AH, EJ Carey, and KD Lindor. 2015. "Recent Advances in the Development of Farnesoid X Receptor Agonists." *Annals of Translational Medicine* 3 (1). <https://doi.org/10.3978/J.ISSN.2305-5839.2014.12.06>.
- Almad, Akshata, and Nicholas J Maragakis. 2018. "A Stocked Toolbox for Understanding the Role of Astrocytes in Disease." *Nature Reviews. Neurology* 14 (6): 351–62. <https://doi.org/10.1038/S41582-018-0010-2>.

- Anand, B. K., and J. R. Brobeck. 1951. "Hypothalamic Control of Food Intake in Rats and Cats." *The Yale Journal of Biology and Medicine* 24 (2): 123–40.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2599116/>.
- Anderson, Gail D. 2005. "Sex and Racial Differences in Pharmacological Response: Where Is the Evidence? Pharmacogenetics, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics." *Journal of Women's Health*. Mary Ann Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/jwh.2005.14.19>.
- Anses. 2011. "Etude de l'alimentation Totale Française 2 (EAT2)" Tome 1.
- . 2015. "NOTE de l'Anses Relative à l'état Des Connaissances Sur Les Usages, Les Sources d'exposition et La Toxicité de Plusieurs Perfluorés et Phtalates: Présentation de La Question Posée et Organisation de l'expertise" RAPPORT de l'Anses ... (Connaissances relatives aux données de contamination et aux expositions par des composés de la famille des Perfluorés).
- Arguello, Graciela, Elisa Balboa, Marco Arrese, and Silvana Zanlungo. 2015. "Recent Insights on the Role of Cholesterol in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.05.015>.
- Arias, Clorinda, Angélica Zepeda, Karina Hernández-Ortega, Perla Leal-Galicia, Cinthia Lojero, and Ignacio Camacho-Arroyo. 2009. "Sex and Estrous Cycle-Dependent Differences in Glial Fibrillary Acidic Protein Immunoreactivity in the Adult Rat Hippocampus." *Hormones and Behavior* 55 (1): 257–63.  
<https://doi.org/10.1016/J.YHBEH.2008.10.016>.
- Armstrong, Laura E., Maureen V. Driscoll, Vijay R. More, Ajay C. Donepudi, Jialin Xu, Angela Baker, Lauren M. Aleksunes, Jason R. Richardson, and Angela L. Slitt. 2013. "Effects of Developmental Deltamethrin Exposure on White Adipose Tissue Gene Expression." *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 27 (2): 165–71.  
<https://doi.org/10.1002/JBT.21477>.
- Balakrishnan, Maya, Parth Patel, Sydney Dunn-Valadez, Cecilia Dao, Vinshi Khan, Hiba Ali, Laith El-Serag, et al. 2021. "Women Have a Lower Risk of Nonalcoholic Fatty Liver Disease but a Higher Risk of Progression vs Men: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Clin Gastroenterol Hepatol* 19 (1): 61–71.
- Ballestri, Stefano, Fabio Nascimbeni, Enrica Baldelli, Alessandra Marrazzo, Dante Romagnoli, and Amedeo Lonardo. 2017. "NAFLD as a Sexual Dimorphic Disease: Role of Gender and Reproductive Status in the Development and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Inherent Cardiovascular Risk." *Advances in Therapy*. Springer

- Healthcare. <https://doi.org/10.1007/s12325-017-0556-1>.
- Baskin-Bey, Edwina S, Akira Anan, Hajime Isomoto, Steven F Bronk, and Gregory J Gores. 2007. "Constitutive Androstane Receptor Agonist, TCPOBOP, Attenuates Steatohepatitis in the Methionine Choline-Deficient Diet-Fed Mouse." *World Journal of Gastroenterology : WJG* 13 (42): 5635. <https://doi.org/10.3748/WJG.V13.I42.5635>.
- Beggs, Kevin M., Steven R. McGreal, Alex McCarthy, Sumedha Gunewardena, Jed N. Lampe, Christopher Lau, and Udayan Apte. 2016. "The Role of Hepatocyte Nuclear Factor 4-Alpha in Perfluorooctanoic Acid- and Perfluorooctanesulfonic Acid-Induced Hepatocellular Dysfunction." *Toxicology and Applied Pharmacology* 304 (August): 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.05.001>.
- Bélangier, Mireille, Igor Allaman, and Pierre J. Magistretti. 2011. "Brain Energy Metabolism: Focus on Astrocyte-Neuron Metabolic Cooperation." *Cell Metabolism*. Cell Metab. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.08.016>.
- Benjamini, Yoav. 2010. "Discovering the False Discovery Rate." *Journal of the Royal Statistical Society. Series B: Statistical Methodology* 72 (4): 405–16. <https://doi.org/10.1111/j.1467-9868.2010.00746.x>.
- Beyaz, Semir, Miyeko D. Mana, Jatin Roper, Dmitriy Kedrin, Assieh Saadatpour, Sue Jean Hong, Khristian E. Bauer-Rowe, et al. 2016. "High-Fat Diet Enhances Stemness and Tumorigenicity of Intestinal Progenitors." *Nature* 531 (7592): 53–58. <https://doi.org/10.1038/NATURE17173>.
- Bhaskar, Rakesh, and Banalata Mohanty. 2014. "Pesticides in Mixture Disrupt Metabolic Regulation: In Silico and in Vivo Analysis of Cumulative Toxicity of Mancozeb and Imidacloprid on Body Weight of Mice." *General and Comparative Endocrinology* 205 (September): 226–34. <https://doi.org/10.1016/J.YGCEN.2014.02.007>.
- Biegel, Lisa B, Mark E Hurtt, Steven R Frame, John C O'Connor, and Jon C Cook. 2001. "Mechanisms of Extrahepatic Tumor Induction by Peroxisome Proliferators in Male CD Rats | Toxicological Sciences | Oxford Academic." *Toxicological Sciences*. March 2001. <https://academic.oup.com/toxsci/article/60/1/44/1686497>.
- Bieghs, Veerle, Patrick J. Van Gorp, Kristiaan Wouters, Tim Hendriks, Marion J. Gijbels, Marc van Bilsen, Jaap Bakker, et al. 2012. "LDL Receptor Knock-Out Mice Are a Physiological Model Particularly Vulnerable to Study the Onset of Inflammation in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *PLOS ONE* 7 (1): e30668. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0030668>.
- Bjork, J. A., J. L. Butenhoff, and K. B. Wallace. 2011. "Multiplicity of Nuclear Receptor

- Activation by PFOA and PFOS in Primary Human and Rodent Hepatocytes.” *Toxicology* 288 (1–3): 8–17. <https://doi.org/10.1016/J.TOX.2011.06.012>.
- Bjork, James A, and Kendall B Wallace. 2009. “Structure-Activity Relationships and Human Relevance for Perfluoroalkyl Acid-Induced Transcriptional Activation of Peroxisome Proliferation in Liver Cell Cultures.” *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology* 111 (1): 89–99. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFP093>.
- Bolstad, B. M., R. A. Irizarry, M. Åstrand, and T. P. Speed. 2003. “A Comparison of Normalization Methods for High Density Oligonucleotide Array Data Based on Variance and Bias.” *Bioinformatics* 19 (2): 185–93. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/19.2.185>.
- Bradl, Monika, and Hans Lassmann. 2010. “Oligodendrocytes: Biology and Pathology.” *Acta Neuropathol* 119: 37–53. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0601-5>.
- Brobeck, J. R. 1946. “Mechanism of the Development of Obesity in Animals with Hypothalamic Lesions.” *Physiological Reviews* 26 (4): 541–59. <https://doi.org/10.1152/physrev.1946.26.4.541>.
- Bryzgalova, G., H. Gao, B. Ahren, J.R. Zierath, D. Galuska, T.L. Steiler, K. Dahlman-Wright, 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* 2006 49:3 49 (3): 588–97. <https://doi.org/10.1007/S00125-005-0105-3>.
- Buckman, Laura B., Misty M. Thompson, Rachel N. Lippert, Timothy S. Blackwell, Fiona E. Yull, and Kate L.J. Ellacott. 2015. “Evidence for a Novel Functional Role of Astrocytes in the Acute Homeostatic Response to High-Fat Diet Intake in Mice.” *Molecular Metabolism* 4 (1): 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2014.10.001>.
- Bugianesi, Moscatiello, Ciaravella, and Marchesini. 2010. “Insulin Resistance in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease.” *Curr Pharm Des. Curr Pharm Des.* <https://doi.org/10.2174/138161210791208875>.
- Cariou, B, R Hanf, S Lambert-Porcheron, Y Zaïr, V Sauvinet, B Noël, L Flet, H Vidal, B Staels, and M Laville. 2013. “Dual Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\alpha/\delta$  Agonist GFT505 Improves Hepatic and Peripheral Insulin Sensitivity in Abdominally Obese Subjects.” *Diabetes Care* 36 (10): 2923–30. <https://doi.org/10.2337/DC12-2012>.
- Casals-Casas, Cristina, a atrice Desvergne. 2011. “Endocrine Disruptors: From Endocrine to Metabolic Disruption.” *Annual Review of Physiology* 73: 135–62. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHYSIOL-012110-142200>.
- Castera, Laurent, Mireen Friedrich-Rust, and Rohit Loomba. 2019. “Noninvasive Assessment

- of Liver Disease in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease.” *Gastroenterology*. W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.12.036>.
- Cave, Matt, Keith Cameron Falkner, and Craig McClain. 2012. “Occupational and Environmental Hepatotoxicity.” *Zakim and Boyer’s Hepatology*, 476–92. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0881-3.00027-9>.
- Cave, Matthew C., Heather B. Clair, Josiah E. Hardesty, K. Cameron Falkner, Wenke Feng, Barbara J. Clark, Jennifer Sidey, et al. 2016. “Nuclear Receptors and Nonalcoholic Fatty Liver Disease.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1859 (9): 1083–99. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGRM.2016.03.002>.
- Cave, Matthew, Ion Deaciuc, Christian Mendez, Zhenyuan Song, Swati Joshi-barve, Shirish Barve, and Craig McClain. 2007. “Nonalcoholic Fatty Liver Disease : Predisposing Factors and the Role of Nutrition B” 18: 184–95. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2006.12.006>.
- Christian, Mark. 2013. “Nuclear Receptor-Mediated Regulation of Lipid Droplet-Associated Protein Gene Expression in Adipose Tissue.” *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* 14 (3): 87–97. <https://doi.org/10.1515/HMBCI-2013-0028>.
- Claus, Sandrine P., Hervé Guillou, and Sandrine Ellero-Simatos. 2016. “The Gut Microbiota: A Major Player in the Toxicity of Environmental Pollutants?” *Npj Biofilms and Microbiomes* 2 (May). <https://doi.org/10.1038/NPJBIOFILMS.2016.3>.
- Clodfelter, Karl H., Minita G. Holloway, Paul Hodor, Soo Hee Park, William J. Ray, and David J. Waxman. 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.” *Molecular Endocrinology* 20 (6): 1333–51. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0489>.
- Clotman, Frédéric, and Frédéric P. Lemaigre. 2006. “Control of Hepatic Differentiation by Activin/TGFβ Signaling.” *Cell Cycle*. Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.4161/cc.5.2.2341>.
- Cohen. 2011. “NIH Public Access.” *Science* 332 (6037): 1519–23. <https://doi.org/10.1126/science.1204265.Human>.
- Cole, Susan P.C. 2014. “Multidrug Resistance Protein 1 (Mrp1, Abcc1), a ‘Multitasking’ Atp-Binding Cassette (Abc,) Transporter.” *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc. <https://doi.org/10.1074/jbc.R114.609248>.



- Cone, R. D., M. A. Cowley, A. A. Butler, W. Fan, D. L. Marks, and M. J. Low. 2001. "The Arcuate Nucleus as a Conduit for Diverse Signals Relevant to Energy Homeostasis." *International Journal of Obesity* 25: S63–67. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801913>.
- Coumoul, Xavier, Monique Diry, and Robert Barouki. 2002. "PXR-Dependent Induction of Human CYP3A4 Gene Expression by Organochlorine Pesticides." *Biochemical Pharmacology* 64 (10): 1513–19. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)01298-4](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(02)01298-4).
- Cui, Lin, Chun-yang Liao, Qun-fang Zhou, Tong-mei Xia, Zhao-jun Yun, and Gui-bin Jiang. 2010. "Excretion of PFOA and PFOS in Male Rats during a Subchronic Exposure." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 58 (1): 205–13. <https://doi.org/10.1007/S00244-009-9336-5>.
- Cusi, Kenneth. 2009. "Role of Insulin Resistance and Lipotoxicity in Non-Alcoholic Steatohepatitis." *Clinics in Liver Disease*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2009.07.009>.
- Das, Kaberi P., Carmen R. Wood, Mimi J. Lin, Anatoly A. Starkov, Christopher Lau, Kendall B. Wallace, J. Christopher Corton, and Barbara D. Abbott. 2017. "Perfluoroalkyl Acids-Induced Liver Steatosis: Effects on Genes Controlling Lipid Homeostasis." *Toxicology* 378 (March): 37–52. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.12.007>.
- Decaens, Thomas, Cécile Godard, Aurélien De Reyniès, David S. Rickman, François Tronche, Jean Pierre Couty, Christine Perret, and Sabine Colnot. 2008. "Stabilization of  $\beta$ -Catenin Affects Mouse Embryonic Liver Growth and Hepatoblast Fate." *Hepatology* 47 (1): 247–58. <https://doi.org/10.1002/hep.21952>.
- Dobbins, R, P Gholam, S ERTel, N Furey, GM Baskaran, Z Goodman, D Oldach, and P Fernandes. n.d. "Solithromycin Treatment for 13 Weeks Improves Histological.... EASL LiverTree™. Gholam P. Apr 22 2017; 168249." Accessed July 9, 2021. <https://liver.tree.easl.eu/easl/2017/international.liver.congress/168249/pierre.gholam.solithromycin.treatment.for.13.weeks.improves.histological.html>.
- Domitrović, Robert, Hrvoje Jakovac, Jelena Tomac, and Ivana Šain. 2009. "Liver Fibrosis in Mice Induced by Carbon Tetrachloride and Its Reversion by Luteolin." *Toxicology and Applied Pharmacology* 241 (3): 311–21. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2009.09.001>.
- Dong, Bingning, Ju-Seog Lee, Yun-Yong Park, Feng Yang, Ganyu Xu, Wendong Huang, Milton J. Finegold, and David D. Moore. 2015. "Activating CAR and  $\beta$ -Catenin Induces Uncontrolled Liver Growth and Tumorigenesis." *Nature Communications* 2015 6:1 6 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms6944>.
- Dong, Bingning, Pradip K. Saha, Wendong Huang, Wenling Chen, Lutfi A. Abu-Elheiga,

- Salih J. Wakil, Robert D. Stevens, et al. 2009. "Activation of Nuclear Receptor CAR Ameliorates Diabetes and Fatty Liver Disease." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (44): 18831–36.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0909731106>.
- Dongiovanni, Paola, Benedetta Donati, Roberta Fares, Rosa Lombardi, Rosellina Margherita Mancina, Stefano Romeo, and Luca Valenti. 2013. "PNPLA3 I148M Polymorphism and Progressive Liver Disease." *World Journal of Gastroenterology : WJG* 19 (41): 6969.  
<https://doi.org/10.3748/WJG.V19.I41.6969>.
- Du, G, H Huang, J Hu, Y Qin, D Wu, L Song, Y Xia, and X Wang. 2013. "Endocrine-Related Effects of Perfluorooctanoic Acid (PFOA) in Zebrafish, H295R Steroidogenesis and Receptor Reporter Gene Assays." *Chemosphere* 91 (8): 1099–1106.  
<https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2013.01.012>.
- Du, Guizhen, Ouxi Shen, Hong Sun, Juan Fei, Chuncheng Lu, Ling Song, Yankai Xia, Shoulin Wang, and Xinru Wang. 2010. "Assessing Hormone Receptor Activities of Pyrethroid Insecticides and Their Metabolites in Reporter Gene Assays." *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology* 116 (1): 58–66.  
<https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFQ120>.
- Dulai, PS, S Singh, J Patel, M Soni, LJ Prokop, Z Younossi, G Sebastiani, et al. 2017. "Increased Risk of Mortality by Fibrosis Stage in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Systematic Review and Meta-Analysis." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 65 (5): 1557–65.  
<https://doi.org/10.1002/HEP.29085>.
- Dzierlenga, Anika L, Veronica G Robinson, Suramya Waidyanatha, Michael J DeVito, Max A Eifrid, Seth T Gibbs, Courtney A Granville, and Chad R Blystone. 2020. "Toxicokinetics of Perfluorohexanoic Acid (PFHxA), Perfluorooctanoic Acid (PFOA) and Perfluorodecanoic Acid (PFDA) in Male and Female Hsd:Sprague Dawley SD Rats Following Intravenous or Gavage Administration." *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems* 50 (6): 722–32.  
<https://doi.org/10.1080/00498254.2019.1683776>.
- EFSA. 2015. "The 2013 European Union Report on Pesticide Residues in Food." *EFSA Journal* 13 (3). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2015.4038>.
- Evangelou, Evangelos, Georgios Ntritsos, Maria Chondrogiorgi, Fotini K. Kavvoura, Antonio F. Hernández, Evangelia E. Ntzani, and Ioanna Tzoulaki. 2016. "Exposure to Pesticides and Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Environment International* 91 (May): 60–68. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2016.02.013>.

- Everett, Charles J, and Eric M Matheson. 2010. “Biomarkers of Pesticide Exposure and Diabetes in the 1999-2004 National Health and Nutrition Examination Survey.” *Environment International* 36 (4): 398–401.  
<https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2010.02.010>.
- Fabbrini, Elisa, B. Selma Mohammed, Kevin M. Korenblat, Faidon Magkos, Jennifer McCrea, Bruce W. Patterson, and Samuel Klein. 2010. “Effect of Fenofibrate and Niacin on Intrahepatic Triglyceride Content, Very Low-Density Lipoprotein Kinetics, and Insulin Action in Obese Subjects with Nonalcoholic Fatty Liver Disease.” *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 95 (6): 2727. <https://doi.org/10.1210/JC.2009-2622>.
- Fargion, Silvia, Marianna Porzio, and Anna Ludovia Fracanzani. 2014. “Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Vascular Disease: State-of-the-Art.” *World Journal of Gastroenterology* 20 (37): 13306–24. <https://doi.org/10.3748/WJG.V20.I37.13306>.
- Farrell, Geoffrey C., Jacob George, Pauline de la M. Hall, and Arthur J. McCullough. 2007. *Fatty Liver Disease: NASH and Related Disorders*. *Fatty Liver Disease: NASH and Related Disorders*. wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470987438>.
- Fernandes, Prabhavathi, Taishi Hashiguchi, Masato Fujii, and Hiroyuki Yoneyama. 2014. “850f Anti-NASH Effects of Solithromycin in NASH-HCC Mouse Model.” *Gastroenterology* 146 (5): S-145-S-146. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(14\)60517-5](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(14)60517-5).
- Fernández-Miranda, C., M. Pérez-Carreras, F. Colina, G. López-Alonso, C. Vargas, and J. A. Solís-Herruzo. 2008. “A Pilot Trial of Fenofibrate for the Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease.” *Digestive and Liver Disease* 40 (3): 200–205.  
<https://doi.org/10.1016/J.DLD.2007.10.002>.
- Filgo, Adam J., Erin M. Quist, Mark J. Hoenerhoff, Amy E. Brix, Grace E. Kissling, and Suzanne E. Fenton. 2015. “Perfluorooctanoic Acid (PFOA)–Induced Liver Lesions in Two Strains of Mice Following Developmental Exposures:PPAR $\alpha$  Is Not Required.” *Toxicologic Pathology* 43 (4): 558–68. <https://doi.org/10.1177/0192623314558463>.
- Fleeker, James R., H. Morgan Lacy, R. Schultz Imogene, and Everin C. Houkom. 1974. “Persistence and Metabolism of Thiophanate-Methyl in Soil.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 22 (4): 592–95. <https://doi.org/10.1021/JF60194A046>.
- Fragki, Styliani, Hubert Dirven, Tony Fletcher, Bettina Grasl-Kraupp, Kristine Bjerve Gützkw, Ron Hoogenboom, Sander Kersten, et al. 2021. “Systemic PFOS and PFOA Exposure and Disturbed Lipid Homeostasis in Humans: What Do We Know and What

- Not?” *Critical Reviews in Toxicology* 51 (2): 141–64.  
<https://doi.org/10.1080/10408444.2021.1888073>.
- Frawley, Rachel P, Matthew Smith, Mark F Cesta, Schantel Hayes-Bouknight, Chad Blystone, Grace E Kissling, Shawn Harris, and Dori Germolec. 2018. “Immunotoxic and Hepatotoxic Effects of Perfluoro-n-Decanoic Acid (PFDA) on Female Harlan Sprague-Dawley Rats and B 6 C 3 F 1/N Mice When Administered by Oral Gavage for 28 Days.” *Journal of Immunotoxicology* 15 (1): 41–52.  
<https://doi.org/10.1080/1547691X.2018.1445145>.
- Frayling, Cameron, Ruth Britton, and Nicholas Dale. 2011. “ATP-Mediated Glucosensing by Hypothalamic Tanycytes.” *The Journal of Physiology* 589 (9): 2275–86.  
<https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2010.202051>.
- Fromme, Hermann, Sheryl A Tittlemier, Wolfgang Völkel, Michael Wilhelm, and Dorothee Twardella. 2009. “Perfluorinated Compounds--Exposure Assessment for the General Population in Western Countries.” *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 212 (3): 239–70. <https://doi.org/10.1016/J.IJHEH.2008.04.007>.
- Fu, Xiaohua, Lili Xing, Weihai Xu, and Jing Shu. 2016. “Treatment with Estrogen Protects against Ovariectomy-Induced Hepatic Steatosis by Increasing AQP7 Expression.” *Molecular Medicine Reports* 14 (1): 425–31. <https://doi.org/10.3892/MMR.2016.5236>.
- Fuchs, Michael, and Arun J. Sanyal. 2012. “Lipotoxicity in NASH.” *Journal of Hepatology*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.05.019>.
- Fuda, Hirotoishi, Young C. Lee, Chikara Shimizu, Norman B. Javitt, and Charles A. Strott. 2002. “Mutational Analysis of Human Hydroxysteroid Sulfotransferase SULT2B1 Isoforms Reveals That Exon 1B of the SULT2B1 Gene Produces Cholesterol Sulfotransferase, Whereas Exon 1A Yields Pregnenolone Sulfotransferase.” *Journal of Biological Chemistry* 277 (39): 36161–66. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207165200>.
- Fujii, Yukiko, Tamon Niisoe Niisoe, Kouji H Harada, Shinji Uemoto, Yasuhiro Ogura, Katsunobu Takenaka, and Akio Koizumi. 2015. “Toxicokinetics of Perfluoroalkyl Carboxylic Acids with Different Carbon Chain Lengths in Mice and Humans.” *Journal of Occupational Health* 57 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1539/JOH.14-0136-OA>.
- Fujimoto, Toyoshi, and Robert G. Parton. 2011. “Not Just Fat: The Structure and Function of the Lipid Droplet.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (3): 1–17.  
<https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A004838>.
- Gao, Bei, Xiaoming Bian, Ridwan Mahbub, and Kun Lu. 2017. “Sex-Specific Effects of Organophosphate Diazinon on the Gut Microbiome and Its Metabolic Functions.”

- Environmental Health Perspectives* 125 (2): 198–206. <https://doi.org/10.1289/EHP202>.
- Gao, J, J He, Y Zhai, T Wada, and W Xie. 2009. “The Constitutive Androstane Receptor Is an Anti-Obesity Nuclear Receptor That Improves Insulin Sensitivity.” *The Journal of Biological Chemistry* 284 (38): 25984–92. <https://doi.org/10.1074/JBC.M109.016808>.
- Geer, Eliza B., and Wei Shen. 2009. “Gender Differences in Insulin Resistance, Body Composition, and Energy Balance.” *Gender Medicine* 6 (Suppl 1): 60. <https://doi.org/10.1016/J.GENM.2009.02.002>.
- Ghafour-Rashidi, Zahra, Elham Dermenaki-Farahani, Atousa Aliahmadi, Hadi Esmaily, Azadeh Mohammadirad, Seyed Nasser Ostad, and Mohammad Abdollahi. 2007. “Protection by CAMP and CGMP Phosphodiesterase Inhibitors of Diazinon-Induced Hyperglycemia and Oxidative/Nitrosative Stress in Rat Langerhans Islets Cells: Molecular Evidence for Involvement of Non-Cholinergic Mechanisms.” *Pesticide Biochemistry and Physiology* 87 (3): 261–70. <https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2006.08.007>.
- Ghareeb, Doaa A, Hani S Hafez, Hend M Hussien, and Nihal F Kabapy. 2011. “Non-Alcoholic Fatty Liver Induces Insulin Resistance and Metabolic Disorders with Development of Brain Damage and Dysfunction.” *Metabolic Brain Disease* 26 (4): 253–67. <https://doi.org/10.1007/S11011-011-9261-Y>.
- Giesy, John P, Keith R Solomon, Don Mackay, and Julie Anderson. 2014. “Evaluation of Evidence That the Organophosphorus Insecticide Chlorpyrifos Is a Potential Persistent Organic Pollutant (POP) or Persistent, Bioaccumulative, and Toxic (PBT).” *Environmental Sciences Europe* 2014 26:1 26 (1): 1–20. <https://doi.org/10.1186/S12302-014-0029-Y>.
- Glass, Lisa M., Christine M. Hunt, Michael Fuchs, and Grace L. Su. 2019. “Comorbidities and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The Chicken, the Egg, or Both?” *Federal Practitioner* 36 (2): 64. [/pmc/articles/PMC6411365/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3411365/).
- Goecke, C M, B M Jarnot, and N V Reo. 1992. “A Comparative Toxicological Investigation of Perfluorocarboxylic Acids in Rats by Fluorine-19 NMR Spectroscopy.” *Chemical Research in Toxicology* 5 (4): 512–19. <https://doi.org/10.1021/TX00028A009>.
- González-Granillo, Marcela, Luisa A. Helguero, Eliana Alves, Amena Archer, Christina Savva, Matteo Pedrelli, Osman Ahmed, et al. 2019. “Sex-Specific Lipid Molecular Signatures in Obesity-Associated Metabolic Dysfunctions Revealed by Lipidomic Characterization in Ob/Ob Mouse.” *Biology of Sex Differences* 2019 10:1 10 (1): 1–17. <https://doi.org/10.1186/S13293-019-0225-Y>.

- Grün, Felix, and Bruce Blumberg. 2009. "Endocrine Disrupters as Obesogens." *Molecular and Cellular Endocrinology* 304 (1–2): 19–29.  
<https://doi.org/10.1016/J.MCE.2009.02.018>.
- Guillaume, Maeva, Elodie Riant, Aurélie Fabre, Isabelle Raymond-Letron, Melissa Buscato, Morgane Davezac, Blandine Tramunt, et al. 2019. "Selective Liver Estrogen Receptor  $\alpha$  Modulation Prevents Steatosis, Diabetes, and Obesity Through the Anorectic Growth Differentiation Factor 15 Hepatokine in Mice." *Hepatology Communications* 3 (7): 908–24. <https://doi.org/10.1002/hep4.1363>.
- Han, X, R A Kemper, and G W Jepson. 2005. "Subcellular Distribution and Protein Binding of Perfluorooctanoic Acid in Rat Liver and Kidney." *Drug and Chemical Toxicology* 28 (2): 197–209. <https://doi.org/10.1081/DCT-52547>.
- Hansson, Göran K. 2005. "Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease." *The New England Journal of Medicine* 352 (16): 1685–95.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMRA043430>.
- Hetherington, A. W. 1944. "Non-production of Hypothalamic Obesity in the Rat by Lesions Rostral or Dorsal to the Ventro-medial Hypothalamic Nuclei." *Journal of Comparative Neurology* 80 (1): 33–45. <https://doi.org/10.1002/cne.900800104>.
- Honda, Yasushi, Takaomi Kessoku, Yuji Ogawa, Wataru Tomeno, Kento Imajo, Koji Fujita, Masato Yoneda, et al. 2017. "Pemafibrate, a Novel Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Modulator, Improves the Pathogenesis in a Rodent Model of Nonalcoholic Steatohepatitis." *Scientific Reports* 7 (February).  
<https://doi.org/10.1038/srep42477>.
- Hori, Takeshi, Kosuke Saito, Rick Moore, Gordon P Flake, and Masahiko Negishi. 2018. "Nuclear Receptor CAR Suppresses GADD45B-P38 MAPK Signaling to Promote Phenobarbital-Induced Proliferation in Mouse Liver." *Molecular Cancer Research : MCR* 16 (8): 1309–18. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-18-0118>.
- Horst, Kasper W. Ter, Pim W. Gilijamse, Barbara A. De Weijer, Murat Kilicarslan, Mariette T. Ackermans, Aart J. Nederveen, Max Nieuwdorp, Johannes A. Romijn, and Mireille J. Serlie. 2015. "Sexual Dimorphism in Hepatic, Adipose Tissue, and Peripheral Tissue Insulin Sensitivity in Obese Humans." *Frontiers in Endocrinology* 6 (NOV).  
<https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00182>.
- Houngaard, Jorn. 2017. "Motor Neurons." *Comprehensive Physiology* 7 (2): 463–84.  
<https://doi.org/10.1002/CPHY.C160025>.
- Huber, Wolfgang, Vincent J. Carey, Robert Gentleman, Simon Anders, Marc Carlson,



- Benilton S. Carvalho, Hector Corrada Bravo, et al. 2015. “Orchestrating High-Throughput Genomic Analysis with Bioconductor.” *Nature Methods* 12 (2): 115–21. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3252>.
- Hui, Zongguang, Rujiang Li, and Li Chen. 2017. “The Impact of Exposure to Environmental Contaminant on Hepatocellular Lipid Metabolism.” *Gene* 622 (July): 67–71. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2017.04.024>.
- IARC. 2016. “PERFLUOROOCTANOIC ACID IARC 2016.”
- Itagaki, Hiroko, Kazuhiko Shimizu, Shunichi Morikawa, Kenji Ogawa, and Taichi Ezaki. 2013. “Morphological and Functional Characterization of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Induced by a Methionine-Choline-Deficient Diet in C57BL/6 Mice.” *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 6 (12): 2683. <https://doi.org/10.1016/j.ijcep.2013.12.001>.
- Ito, Makoto, Jun Suzuki, Shigeharu Tsujioka, Minoru Sasaki, Akira Gomori, Takashi Shirakura, Hiroyasu Hirose, et al. 2007. “Longitudinal Analysis of Murine Steatohepatitis Model Induced by Chronic Exposure to High-Fat Diet.” *Hepatology Research* 37 (1): 50–57. <https://doi.org/10.1111/J.1872-034X.2007.00008.X>.
- Jakubowski, Marek, and Malgorzata Trzcinka-Ochocka. 2005. “Biological Monitoring of Exposure: Trends and Key Developments.” *Journal of Occupational Health* 47 (1): 22–48. <https://doi.org/10.1539/JOH.47.22>.
- Jessen, Kristjan R. 2004. “Glial Cells.” *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36 (10): 1861–67. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2004.02.023>.
- Jia, Y, JK Yee, C Wang, L Nikolaenko, M Diaz-Arjonilla, JN Cohen, SW French, et al. 2018. “Testosterone Protects High-Fat/Low-Carbohydrate Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Castrated Male Rats Mainly via Modulating Endoplasmic Reticulum Stress.” *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 314 (4): E366–76. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00124.2017>.
- Jin, Yuanxiang, Xiaojian Lin, Wenyu Miao, Tao Wu, Hangjie Shen, Shan Chen, Yanhong Li, Qiaoqiao Pan, and Zhengwei Fu. 2014. “Chronic Exposure of Mice to Environmental Endocrine-Disrupting Chemicals Disturbs Their Energy Metabolism.” *Toxicology Letters* 225 (3): 392–400. <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2014.01.006>.
- Jones, Margaret E.E., Anne W. Thorburn, Kara L. Britt, Kylie N. Hewitt, Marie L. Misso, Nigel G. Wreford, Joseph Proietto, et al. 2001. “Aromatase-Deficient (ArKO) Mice Accumulate Excess Adipose Tissue.” *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 79 (1–5): 3–9. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(01\)00136-4](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(01)00136-4).

- Joshi-Barve, Swati, Irina Kirpich, Matthew C. Cave, Luis S. Marsano, and Craig J. McClain. 2015. “Alcoholic, Nonalcoholic, and Toxicant-Associated Steatohepatitis: Mechanistic Similarities and Differences.” *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 1 (4): 356–67. <https://doi.org/10.1016/J.JCMGH.2015.05.006>.
- Kamada, Yoshihiro, Shinichi Kiso, Yuichi Yoshida, Norihiro Chatani, Takashi Kizu, Mina Hamano, Mayumi Tsubakio, et al. 2011. “Estrogen Deficiency Worsens Steatohepatitis in Mice Fed High-Fat and High-Cholesterol Diet.” *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 301 (6). <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00211.2011>.
- Kamiya, Akihito, Taisei Kinoshita, and Atsushi Miyajima. 2001. “Oncostatin M and Hepatocyte Growth Factor Induce Hepatic Maturation via Distinct Signaling Pathways.” *FEBS Letters* 492 (1–2): 90–94. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02140-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02140-8).
- Kemper, Raymond A, and Diane L Nabb. 2005. “In Vitro Studies in Microsomes from Rat and Human Liver, Kidney, and Intestine Suggest That Perfluorooctanoic Acid Is Not a Substrate for Microsomal UDP-Glucuronosyltransferases.” *Drug and Chemical Toxicology* 28 (3): 281–87. <https://doi.org/10.1081/DCT-200064468>.
- Kettner, Nicole M., Horatio Voicu, Milton J. Finegold, Cristian Coarfa, Arun Sreekumar, Nagireddy Putluri, Chinenye A. Katchy, Choogon Lee, David D. Moore, and Loning Fu. 2016. “Circadian Homeostasis of Liver Metabolism Suppresses Hepatocarcinogenesis.” *Cancer Cell* 30 (6): 909–24. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.10.007>.
- Kiernan, Francis. 1833. “The Anatomy and Physiology of the Liver.” *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 123 (December): 711–70. <https://doi.org/10.1098/rstl.1833.0031>.
- Kim, Donghee, W. Ray Kim, Hwa Jung Kim, and Terry M. Therneau. 2013. “Association between Noninvasive Fibrosis Markers and Mortality among Adults with Nonalcoholic Fatty Liver Disease in the United States.” *Hepatology* 57 (4): 1357–65. <https://doi.org/10.1002/hep.26156>.
- Kim, Jonggun, Yooheon Park, Kyong Sup Yoon, J. Marshall Clark, and Yeonhwa Park. 2013. “Imidacloprid, a Neonicotinoid Insecticide, Induces Insulin Resistance.” *Journal of Toxicological Sciences* 38 (5): 655–60. <https://doi.org/10.2131/JTS.38.655>.
- Kirpich, Irina A, Luis S Marsano, and Craig J McClain. 2015. “Gut-Liver Axis, Nutrition, and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease.” *Clinical Biochemistry*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.06.023>.
- Kjærgaard, Kristoffer, Anne Catrine Dugaard Mikkelsen, Charlotte Wilhelmina Wernberg, Lea Ladegaard Grønkjær, Peter Lykke Eriksen, Malene Flensburg Damholdt, Rajeshwar

- Prosad Mookerjee, Hendrik Vilstrup, Mette Munk Lauridsen, and Karen Louise Thomsen. 2021. "Cognitive Dysfunction in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease—Current Knowledge, Mechanisms and Perspectives." *Journal of Clinical Medicine* 10 (4): 673. <https://doi.org/10.3390/JCM10040673>.
- Klaunig, James E., Xilin Li, and Zemin Wang. 2018. "Role of Xenobiotics in the Induction and Progression of Fatty Liver Disease." *Toxicology Research* 7 (4): 664–80. <https://doi.org/10.1039/C7TX00326A>.
- Kleiner, David E., Elizabeth M. Brunt, Mark Van Natta, Cynthia Behling, Melissa J. Contos, Oscar W. Cummings, Linda D. Ferrell, et al. 2005. "Design and Validation of a Histological Scoring System for Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Hepatology* 41 (6): 1313–21. <https://doi.org/10.1002/hep.20701>.
- Kliwer, Steven A., and David J. Mangelsdorf. 2015. "Bile Acids as Hormones: The FXR-FGF15/19 Pathway." *Digestive Diseases (Basel, Switzerland)* 33 (3): 327. <https://doi.org/10.1159/000371670>.
- Knebel, Constanze, Thorsten Buhrke, Roderich Süßmuth, Alfonso Lampen, Philip Marx-Stoelting, and Albert Braeuning. 2019. "Pregnane X Receptor Mediates Steatotic Effects of Propiconazole and Tebuconazole in Human Liver Cell Lines." *Archives of Toxicology* 93 (5): 1311–22. <https://doi.org/10.1007/S00204-019-02445-2>.
- Kojima, H, F Sata, S Takeuchi, T Sueyoshi, and T Nagai. 2010. "Comparative Study of Human and Mouse Pregnane X Receptor Agonistic Activity in 200 Pesticides Using in Vitro Reporter Gene Assays." *Toxicology* 280 (3): 77–87. <https://doi.org/10.1016/J.TOX.2010.11.008>.
- Kojima, Hiroyuki, Shinji Takeuchi, and Tadanori Nagai. 2010. "Endocrine-Disrupting Potential of Pesticides via Nuclear Receptors and Aryl Hydrocarbon Receptor." *Journal of Health Science* 56 (4): 374–86. <https://doi.org/10.1248/JHS.56.374>.
- Koliwad, Suneil K., Ryan S. Streeper, Mara Monetti, Ivo Cornelissen, Liana Chan, Koji Terayama, Stephen Naylor, Meghana Rao, Brian Hubbard, and Robert V. Farese. 2010. "DGAT1-Dependent Triacylglycerol Storage by Macrophages Protects Mice from Diet-Induced Insulin Resistance and Inflammation." *Journal of Clinical Investigation* 120 (3): 756–67. <https://doi.org/10.1172/JCI36066>.
- Kowdley, K.V, L.A Wilson, ML Van Natta, R.K Pai, and AJ Sanyal. 2015. "Efficacy and Safety of Vitamin E in Nonalcoholic Steatohepatitis Patients With and Without Diabetes: Pooled Analysis from the PIVENS and FLINT NIDDK NASH CRN Trials."
- Kudo, Naomi, Tohru Yamazaki, Takeshi Sakamoto, Katsuyoshi Sunaga, Tadashi Tsuda,

- Atsushi Mitsumoto, and Yoichi Kawashima. 2011. "Effects of Perfluorinated Fatty Acids with Different Carbon Chain Length on Fatty Acid Profiles of Hepatic Lipids in Mice." *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 34 (6): 856–64.  
<https://doi.org/10.1248/bpb.34.856>.
- Kumari, Manju, Gabriele Schoiswohl, Chandramohan Chitraju, Margret Paar, Irina Cornaciu, Ashraf Y. Rangrez, Nuttaporn Wongsiriroj, et al. 2012. "Adiponutrin Functions as a Nutritionally Regulated Lysophosphatidic Acid Acyltransferase." *Cell Metabolism* 15 (5): 691–702. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.04.008>.
- Kutsuno, Yuki, Tomoo Itoh, Robert H. Tukey, and Ryoichi Fujiwara. 2014. "Glucuronidation of Drugs and Drug-Induced Toxicity in Humanized UDP-Glucuronosyltransferase 1 Mice." *Drug Metabolism and Disposition* 42 (7): 1146–52.  
<https://doi.org/10.1124/dmd.114.057083>.
- Lake, Brian G, Roger J Price, and Thomas G Osimitz. 2015. "Mode of Action Analysis for Pesticide-Induced Rodent Liver Tumours Involving Activation of the Constitutive Androstane Receptor: Relevance to Human Cancer Risk." *Pest Management Science* 71 (6): 829–34. <https://doi.org/10.1002/PS.3854>.
- Lamba, Jatinder K, Vishal Lamba Lamba, Kazuto Yasuda, Yvonne S Lin, Mahfoud Assem, Emma Thompson, Stephen Strom Strom, and Erin Schuetz. 2004. "Expression of Constitutive Androstane Receptor Splice Variants in Human Tissues and Their Functional Consequences." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 311 (2): 811–21. <https://doi.org/10.1124/JPET.104.069310>.
- Lasram, Mohamed Montassar, Ines Bini Dhouib, Alya Annabi, Saloua El Fazaa, and Najoua Gharbi. 2014. "A Review on the Molecular Mechanisms Involved in Insulin Resistance Induced by Organophosphorus Pesticides." *Toxicology* 322 (August): 1–13.  
<https://doi.org/10.1016/J.TOX.2014.04.009>.
- Lasram, Mohamed Montassar, Ines Bini Dhouib, Kahna Bouzid, Aicha Jrad Lamine, Alya Annabi, Nadia Belhadjhmida, Malika Ben Ahmed, Saloua El Fazaa, Jaouida Abdelmoula, and Najoua Gharbi. 2014. "Association of Inflammatory Response and Oxidative Injury in the Pathogenesis of Liver Steatosis and Insulin Resistance Following Subchronic Exposure to Malathion in Rats." *Environmental Toxicology and Pharmacology* 38 (2): 542–53. <https://doi.org/10.1016/J.ETAP.2014.08.007>.
- Lassailly, G, R Caiazzo, D Buob, M Pigeyre, H Verkindt, J Labreuche, V Raverdy, et al. 2015. "Bariatric Surgery Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis in Morbidly Obese Patients." *Gastroenterology* 149 (2): 379–88.

- <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2015.04.014>.
- Lassen, C, J Kjolholt, S Mikkelsen, M Warming, and Allan A Jensen. 2015. "Polyfluoroalkyl Substances (PFASs) in Textiles for Children. Survey of Chemical Substances in Consumer Products." [https://www.researchgate.net/publication/299229536\\_Polyfluoroalkyl\\_substances\\_PFAS\\_s\\_in\\_textiles\\_for\\_children\\_Survey\\_of\\_chemical\\_substances\\_in\\_consumer\\_products](https://www.researchgate.net/publication/299229536_Polyfluoroalkyl_substances_PFAS_s_in_textiles_for_children_Survey_of_chemical_substances_in_consumer_products).
- Lassiter, T. Leon, and Stephen Brimijoin. 2008. "Rats Gain Excess Weight after Developmental Exposure to the Organophosphorothionate Pesticide, Chlorpyrifos." *Neurotoxicology and Teratology* 30 (2): 125–30. <https://doi.org/10.1016/J.NTT.2007.10.004>.
- Lassiter, T. Leon, Ian T. Ryde, Emiko A. MacKillop, Kathleen K. Brown, Edward D. Levin, Frederic J. Seidler, and Theodore A. Slotkin. 2008. "Exposure of Neonatal Rats to Parathion Elicits Sex-Selective Reprogramming of Metabolism and Alters the Response to a High-Fat Diet in Adulthood." *Environmental Health Perspectives* 116 (11): 1456–62. <https://doi.org/10.1289/EHP.11673>.
- LeBaron, Matthew J., Reza J. Rasoulpour, B. Bhaskar Gollapudi, Radhakrishna Sura, H. Lynn Kan, Melissa R. Schisler, Lynn H. Pottenger, Sabitha Papineni, and David L. Eisenbrandt. 2014. "Characterization of Nuclear Receptor-Mediated Murine Hepatocarcinogenesis of the Herbicide Pronamide and Its Human Relevance." *Toxicological Sciences* 142 (1): 74–92. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFU155>.
- Lee, Chanbin, Jieun Kim, and Youngmi Jung. 2019. "Potential Therapeutic Application of Estrogen in Gender Disparity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease/Nonalcoholic Steatohepatitis." *Cells*. NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/cells8101259>.
- Lee, Duk-Hee, Michael W Steffes, Andreas Sjödin, Richard S Jones, Larry L Needham, and David R Jacobs. 2010. "Low Dose of Some Persistent Organic Pollutants Predicts Type 2 Diabetes: A Nested Case-Control Study." *Environmental Health Perspectives* 118 (9): 1235–42. <https://doi.org/10.1289/EHP.0901480>.
- Lemaire, Géraldine, Wissem Mnif, Jean-Marc Pascussi, Arnaud Pillon, Fanja Rabenoelina, H lène Fenet, Elena Gomez, et al. 2006. "Identification of New Human Pregnane X Receptor Ligands among Pesticides Using a Stable Reporter Cell System." *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology* 91 (2): 501–9. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFJ173>.
- Li, Ching Y, and Earl E Nelson. 1985. "Persistence of Benomyl and Captan and Their Effects on Microbial Activity in Field Soils." *Bull. Environ. Contam. Toxicol* 34: 533–40.

- Li, Daochuan, Bryan MacKowiak, Timothy G. Brayman, Michael Mitchell, Lei Zhang, Shiew Mei Huang, and Hongbing Wang. 2015. "Genome-Wide Analysis of Human Constitutive Androstane Receptor (CAR) Transcriptome in Wild-Type and CAR-Knockout HepaRG Cells." *Biochemical Pharmacology* 98 (1): 190–202. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2015.08.087>.
- Li, Xia, Hang T Pham, Amanda S Janesick, and Bruce Blumberg. 2012. "Triflumizole Is an Obesogen in Mice That Acts through Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma (PPAR $\gamma$ )." *Environmental Health Perspectives* 120 (12): 1720–26. <https://doi.org/10.1289/EHP.1205383>.
- Lim, Soo, Sun Young Ahn, In Chan Song, Myung Hee Chung, Hak Chul Jang, Kyong Soo Park, Ki Up Lee, Youngmi Kim Pak, and Hong Kyu Lee. 2009. "Chronic Exposure to the Herbicide, Atrazine, Causes Mitochondrial Dysfunction and Insulin Resistance." *PLoS ONE* 4 (4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0005186>.
- Lin, HY, IC Yu, RS Wang, YT Chen, NC Liu, S Altuwaijri, CL Hsu, et al. 2008. "Increased Hepatic Steatosis and Insulin Resistance in Mice Lacking Hepatic Androgen Receptor." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 47 (6): 1924–35. <https://doi.org/10.1002/HEP.22252>.
- Liu, Yanwei, Ting Ruan, Yongfeng Lin, Aifeng Liu, Miao Yu, Runzeng Liu, Mei Meng, Yawei Wang, Jiyan Liu, and Guibin Jiang. 2017. "Chlorinated Polyfluoroalkyl Ether Sulfonic Acids in Marine Organisms from Bohai Sea, China: Occurrence, Temporal Variations, and Trophic Transfer Behavior." *Environmental Science and Technology* 51 (8): 4407–14. <https://doi.org/10.1021/ACS.EST.6B06593>.
- Lombardi, Rosa, Silvia Fargion, and Anna Ludovica Fracanzani. 2019. "Brain Involvement in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD): A Systematic Review." *Digestive and Liver Disease : Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 51 (9): 1214–22. <https://doi.org/10.1016/J.DLD.2019.05.015>.
- Loomba, Rohit, Zeid Kayali, Mazen Nouredin, Peter Ruane, Eric J. Lawitz, Michael Bennett, Lulu Wang, et al. 2018. "GS-0976 Reduces Hepatic Steatosis and Fibrosis Markers in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Gastroenterology* 155 (5): 1463-1473.e6. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2018.07.027>.
- Lu, Meiya, Jie Du, Peixue Zhou, Hao Chen, Chensheng Lu, and Quan Zhang. 2015. "Endocrine Disrupting Potential of Fipronil and Its Metabolite in Reporter Gene Assays." *Chemosphere* 120 (February): 246–51. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2014.07.015>.



- Luciano-Mateo, F., N. Cabré, G. Baiges, A. Hernández-Aguilera, S. Fernández-Arroyo, J. Camps, and J. Joven. 2018. “The Multifactorial Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Connecting Inflammation and Oxidation.” *Journal of Hepatology* 68 (April): S340. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(18\)30901-2](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(18)30901-2).
- Luisier, Raphaëlle, Harri Lempiäinen, Nina Scherbichler, Albert Braeuning, Miriam Geissler, Valerie Dubost, Arne Müller, et al. 2014. “Phenobarbital Induces Cell Cycle Transcriptional Responses in Mouse Liver Humanized for Constitutive Androstane and Pregnane X Receptors.” *Toxicological Sciences* 139 (2): 501–11. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFU038>.
- Lukowicz, Céline, Sandrine Ellero-Simatos, Marion Régnier, Fabiana Oliviero, Frédéric Lasserre, Arnaud Polizzi, Alexandra Montagner, et al. 2019. “Dimorphic Metabolic and Endocrine Disorders in Mice Lacking the Constitutive Androstane Receptor.” *Scientific Reports* 9 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56570-0>.
- Lukowicz, Céline, Sandrine Ellero Simatos, Marion Régnier, Arnaud Polizzi, Frédéric Lasserre, Alexandra Montagner, Yannick Lippi, et al. 2018. “Metabolic Effects of Achronic Dietaryexposure to a Low-Dose Pesticide Cocktail in Mice: Sexual Dimorphism and Role of the Constitutive and Rostane Receptor.” *Environmental Health Perspectives* 126 (6). <https://doi.org/10.1289/EHP2877>.
- Lundsgaard, Anne Marie, and Bente Kiens. 2014. “Gender Differences in Skeletal Muscle Substrate Metabolism - Molecular Mechanisms and Insulin Sensitivity.” *Frontiers in Endocrinology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00195>.
- Lynch, Caitlin, Yongmei Pan, Linhao Li, Scott Heyward, Timothy Moeller, Peter W. Swaan, and Hongbing Wang. 2014. “Activation of the Constitutive Androstane Receptor Inhibits Gluconeogenesis without Affecting Lipogenesis or Fatty Acid Synthesis in Human Hepatocytes.” *Toxicology and Applied Pharmacology* 279 (1): 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.05.009>.
- Macsween, R.M.N, A.D Burt, B.C Portmann, K.G Ishak, P.J Scheurer, P.P Anthony, and E. Weisenberg. 2003. “Pathology of the Liver.” *Diagn. Cytopathol.* 29: 43–43.
- Maglich, Jodi M., David C. Lobe, and John T. Moore. 2009. “The Nuclear Receptor CAR (NR1I3) Regulates Serum Triglyceride Levels under Conditions of Metabolic Stress.” *Journal of Lipid Research* 50 (3): 439–45. <https://doi.org/10.1194/JLR.M800226-JLR200>.
- Malhi, Harmeet, Steven F. Bronk, Nathan W. Werneburg, and Gregory J. Gores. 2006. “Free Fatty Acids Induce JNK-Dependent Hepatocyte Lipoapoptosis.” *Journal of Biological*

- Chemistry* 281 (17): 12093–101. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510660200>.
- Mall, F P. 1906. “A Study of the Structural Unit of the Liver.” *Am J Anat* 5: 227–308.
- Maradonna, F, V Nozzi, S Santangeli, I Traversi, P Gallo, E Fattore, D G Mita, A Mandich, and O Carnevali. 2015. “Xenobiotic-Contaminated Diets Affect Hepatic Lipid Metabolism: Implications for Liver Steatosis in Sparus Aurata Juveniles.” *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 167 (October): 257–64. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2015.08.006>.
- Marmugi, Alice, Céline Lukowicz, Frederic Lasserre, Alexandra Montagner, Arnaud Polizzi, Simon Ducheix, Adeline Goron, et al. 2016. “Activation of the Constitutive Androstane Receptor Induces Hepatic Lipogenesis and Regulates Pnpla3 Gene Expression in a LXR-Independent Way.” *Toxicology and Applied Pharmacology* 303 (July): 90–100. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2016.05.006>.
- Martini, Claudia N., Matías Gabrielli, Javier N. Brandani, and María del C. Vila. 2016. “Glyphosate Inhibits PPAR Gamma Induction and Differentiation of Preadipocytes and Is Able to Induce Oxidative Stress.” *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 30 (8): 404–13. <https://doi.org/10.1002/JBT.21804>.
- Masi, Alessandra di, Elisabetta De Marinis, Paolo Ascenzi, and Maria Marino. 2009. “Nuclear Receptors CAR and PXR: Molecular, Functional, and Biomedical Aspects.” *Molecular Aspects of Medicine* 30 (5): 297–343. <https://doi.org/10.1016/J.MAM.2009.04.002>.
- Masuyama, Hisashi, and Yuji Hiramatsu. 2012. “Treatment with Constitutive Androstane Receptor Ligand during Pregnancy Prevents Insulin Resistance in Offspring from High-Fat Diet-Induced Obese Pregnant Mice.” <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00167.2012> *303* (2): 293–300. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00167.2012>.
- Mavier, P. 2004. “La Fibrose Hépatique : Physiopathologie-Perspectives Thérapeutiques.”
- McBain, Chris J., and A. Fisahn. 2001. “Interneurons Unbound.” *Nature Reviews Neuroscience* 2001 2:12 (1): 11–23. <https://doi.org/10.1038/35049047>.
- McColl, BW, SM Allan, and NJ Rothwell. 2009. “Systemic Infection, Inflammation and Acute Ischemic Stroke.” *Neuroscience* 158 (3): 1049–61. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2008.08.019>.
- McCorry, Laurie Kelly. 2007. “Physiology of the Autonomic Nervous System.” *American Journal of Pharmaceutical Education* 71 (4). <https://doi.org/10.5688/AJ710478>.
- Medjakovic, Svjetlana, Alfred Zöchling, Petra Gerster, Margarita M Ivanova, Yun Teng, Carolyn M Klinge, Barbara Schildberger, Michael Gartner, and Alois Jungbauer. 2014.

- “Effect of Nonpersistent Pesticides on Estrogen Receptor, Androgen Receptor, and Aryl Hydrocarbon Receptor.” *Environmental Toxicology* 29 (10): 1201–16.  
<https://doi.org/10.1002/TOX.21852>.
- Mellinger, Jessica L, Karol M Pencina, Joseph M Massaro, Udo Hoffmann, Sudha Seshadri, Caroline S Fox, Christopher J O’Donnell, and Elizabeth K Speliotes. 2015. “Hepatic Steatosis and Cardiovascular Disease Outcomes: An Analysis of the Framingham Heart Study.” *Journal of Hepatology* 63 (2): 470–76.  
<https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2015.02.045>.
- Mendez, Michelle A., Raquel Garcia-Esteban, Mónica Guxens, Martine Vrijheid, Manolis Kogevinas, Fernando Goñi, Silvia Fochs, and Jordi Sunyer. 2011. “Prenatal Organochlorine Compound Exposure, Rapid Weight Gain, and Overweight in Infancy.” *Environmental Health Perspectives* 119 (2): 272–78.  
<https://doi.org/10.1289/EHP.1002169>.
- Min, Gyesik. 2010. “Estrogen Modulates Transactivations of SXR-Mediated Liver X Receptor Response Element and CAR-Mediated Phenobarbital Response Element in HepG2 Cells.” *Experimental & Molecular Medicine* 42:11 42 (11): 731–38.  
<https://doi.org/10.3858/emm.2010.42.11.074>.
- Min, Gyesik, Hwajin Kim, Yangjin Bae, Larry Petz, and Jongsook Kim Kemper. 2002. “Inhibitory Cross-Talk between Estrogen Receptor (ER) and Constitutively Activated Androstane Receptor (CAR): CAR INHIBITS ER-MEDIATED SIGNALING PATHWAY BY SQUELCHING P160 COACTIVATORS \*.” *Journal of Biological Chemistry* 277 (37): 34626–33. <https://doi.org/10.1074/JBC.M205239200>.
- Molnár, Ferdinand, Jenni Küblbeck, Johanna Jyrkkärinne, Viktória Prantner, and Paavo Honkakoski. 2013. “An Update on the Constitutive Androstane Receptor (CAR).” *Drug Metabolism and Drug Interactions* 28 (2): 79–93. <https://doi.org/10.1515/DMDI-2013-0009>.
- Mondal, Ayan, Dipro Bose, Punnag Saha, Sutapa Sarkar, Ratanesh Seth, Diana Kimono, Muayad Albadrani, Mitzi Nagarkatti, Prakash Nagarkatti, and Saurabh Chatterjee. 2020. “Lipocalin 2 Induces Neuroinflammation and Blood-Brain Barrier Dysfunction through Liver-Brain Axis in Murine Model of Nonalcoholic Steatohepatitis.” *Journal of Neuroinflammation* 2020 17:1 17 (1): 1–15. <https://doi.org/10.1186/S12974-020-01876-4>.
- Montague, Carl T., and Stephen O’Rahilly. 2000. “The Perils of Portliness: Causes and Consequences of Visceral Adiposity.” *Diabetes*. American Diabetes Association Inc.

- <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.6.883>.
- Montgomery, MP, F Kamel, TM Saldana, MC Alavanja, and DP Sandler. 2008. "Incident Diabetes and Pesticide Exposure among Licensed Pesticide Applicators: Agricultural Health Study, 1993-2003." *American Journal of Epidemiology* 167 (10): 1235–46. <https://doi.org/10.1093/AJE/KWN028>.
- Moreno-Aliaga, M J, and F Matsumura. 1999. "Endrin Inhibits Adipocyte Differentiation by Selectively Altering Expression Pattern of CCAAT/Enhancer Binding Protein-Alpha in 3T3-L1 Cells." *Molecular Pharmacology* 56 (1): 91–101. <https://doi.org/10.1124/MOL.56.1.91>.
- Morselli, E., A. P. Frank, B. F. Palmer, C. Rodriguez-Navas, A. Criollo, and D. J. Clegg. 2016. "A Sexually Dimorphic Hypothalamic Response to Chronic High-Fat Diet Consumption." *International Journal of Obesity* 40 (2): 206–9. <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.114>.
- Mudaliar, S, RR Henry, AJ Sanyal, L Morrow, HU Marschall, M Kipnes, L Adorini, et al. 2013. "Efficacy and Safety of the Farnesoid X Receptor Agonist Obeticholic Acid in Patients with Type 2 Diabetes and Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Gastroenterology* 145 (3). <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2013.05.042>.
- Namjou, Bahram, Todd Lingren, Yongbo Huang, Sreeja Parameswaran, Beth L. Cobb, Ian B. Stanaway, John J. Connolly, et al. 2019. "GWAS and Enrichment Analyses of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Identify New Trait-Associated Genes and Pathways across EMERGE Network." *BMC Medicine* 17 (1): 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12916-019-1364-z>.
- Nelson, David R., Luc Koymans, Tetsuya Kamataki, John J. Stegeman, René Feyereisen, David J. Waxman, Michael R. Waterman, et al. 1996. "P450 Superfamily: Update on New Sequences, Gene Mapping, Accession Numbers and Nomenclature." *Pharmacogenetics*. Pharmacogenetics. <https://doi.org/10.1097/00008571-199602000-00002>.
- Nikolaenko, L., Y. Jia, C. Wang, M. Diaz-Arjonilla, J. K. Yee, S. W. French, P. Y. Liu, et al. 2014. "Testosterone Replacement Ameliorates Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Castrated Male Rats." *Endocrinology* 155 (2): 417. <https://doi.org/10.1210/EN.2013-1648>.
- Nonogaki, K. 2000. "New Insights into Sympathetic Regulation of Glucose and Fat Metabolism." *Diabetologia* 2000 43:5 43 (5): 533–49. <https://doi.org/10.1007/S001250051341>.

- Ogrodnik, Mikolaj, Satomi Miwa, Tamar Tchkonja, Dina Tiniakos, Caroline L. Wilson, Albert Lahat, Christopher P. Day, et al. 2017. “Cellular Senescence Drives Age-Dependent Hepatic Steatosis.” *Nature Communications* 2017 8:1 8 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms15691>.
- Olivares, Ana Maria, Oscar Andrés Moreno-Ramos, and Neena B. Haider. 2015. “Role of Nuclear Receptors in Central Nervous System Development and Associated Diseases.” *Journal of Experimental Neuroscience* 9 (Suppl 2): 93. <https://doi.org/10.4137/JEN.S25480>.
- Oliviero, Fabiana, Céline Lukowicz, Badreddine Boussadia, Isabel Forner-Piquer, Jean-Marc Pascussi, Nicola Marchi, and Laila Mselli-Lakhal. 2020. “Constitutive Androstane Receptor: A Peripheral and a Neurovascular Stress or Environmental Sensor.” *Cells* 9 (11). <https://doi.org/10.3390/CELLS9112426>.
- OMS. 2010. “Code International de Conduite Pour La Distribution et l’Utilisation Des Pesticides Directives Pour La Publicité Des Pesticides.”
- Panahi, Parastoo, Sanaz Vosough-Ghanbari, Shirin Pournourmohammadi, Seyed Naser Ostad, Shekoufeh Nikfar, Bagher Minaie, and Mohammad Abdollahi. 2006. “Stimulatory Effects of Malathion on the Key Enzymes Activities of Insulin Secretion in Langerhans Islets, Glutamate Dehydrogenase and Glucokinase.” *Toxicology Mechanisms and Methods* 16 (4): 161–67. <https://doi.org/10.1080/15376520500191623>.
- Parkash, Jyoti, Andrea Messina, Fanny Langlet, Irene Cimino, Anne Loyens, Danièle Mazur, Sarah Gallet, et al. 2015. “Semaphorin7A Regulates Neuroglial Plasticity in the Adult Hypothalamic Median Eminence.” *Nature Communications* 2015 6:1 6 (1): 1–17. <https://doi.org/10.1038/ncomms7385>.
- Pastoor, T P, K P Lee, M A Perri, and P J Gillies. 1987. “Biochemical and Morphological Studies of Ammonium Perfluorooctanoate-Induced Hepatomegaly and Peroxisome Proliferation.” *Experimental and Molecular Pathology* 47 (1): 98–109. [https://doi.org/10.1016/0014-4800\(87\)90011-6](https://doi.org/10.1016/0014-4800(87)90011-6).
- Patel, Chirag J, Jayanta Bhattacharya, and Atul J Butte. 2010. “An Environment-Wide Association Study (EWAS) on Type 2 Diabetes Mellitus.” *PloS One* 5 (5). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0010746>.
- Pawlak, Michal, Philippe Lefebvre, and Bart Staels. 2015. “Molecular Mechanism of PPAR $\alpha$  Action and Its Impact on Lipid Metabolism, Inflammation and Fibrosis in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease.” *Journal of Hepatology* 62 (3): 720–33. <https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2014.10.039>.

- Peden-Adams, Margie M, Jennifer M Keller, Jackie G Eudaly, Jennifer Berger, Gary S Gilkeson, and Deborah E Keil. 2008. "Suppression of Humoral Immunity in Mice Following Exposure to Perfluorooctane Sulfonate." *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology* 104 (1): 144–54.  
<https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFN059>.
- Pelletier, Catherine, Jean-Pierre Després, and Angelo Tremblay. 2002. "Plasma Organochlorine Concentrations in Endurance Athletes and Obese Individuals." *Medicine and Science in Sports and Exercise* 34 (12): 1971–75.  
<https://doi.org/10.1249/01.MSS.0000040820.48707.99>.
- Pelletier, Catherine, P Imbeault, and A Tremblay. 2003. "Energy Balance and Pollution by Organochlorines and Polychlorinated Biphenyls." *Obesity Reviews : An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity* 4 (1): 17–24.  
<https://doi.org/10.1046/J.1467-789X.2003.00085.X>.
- Peris-Sampedro, Fiona, Maria Cabre, Pia Basaure, Ingrid Reverte, Jose L Domingo, and Maria Teresa Colomina. 2015. "Adulthood Dietary Exposure to a Common Pesticide Leads to an Obese-like Phenotype and a Diabetic Profile in ApoE3 Mice." *Environmental Research* 142 (October): 169–76.  
<https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2015.06.036>.
- Pettersson, US, TB Wal n, PO Carlsson, L Jansson, and M Phillipson. 2012. "Female Mice Are Protected against High-Fat Diet Induced Metabolic Syndrome and Increase the Regulatory T Cell Population in Adipose Tissue." *PloS One* 7 (9).  
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0046057>.
- Pirazzi, Carlo, Martin Adiels, Maria Antonella Burza, Rosellina Margherita Mancina, Malin Levin, Marcus Ståhlman, Marja Riitta Taskinen, et al. 2012. "Patatin-like Phospholipase Domain-Containing 3 (PNPLA3) I148M (Rs738409) Affects Hepatic VLDL Secretion in Humans and in Vitro." *Journal of Hepatology* 57 (6): 1276–82.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.07.030>.
- Plump, AS, JD Smith, T Hayek, K Aalto, A Walsh, JG Verstuyft, EM Rubin, and JL Breslow. 1992. "Severe Hypercholesterolemia and Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice Created by Homologous Recombination in ES Cells." *Cell* 71 (2): 343–53.  
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90362-G](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90362-G).
- Porter, W P, S M Green, N L Debbink, and I Carlson. 1993. "Groundwater Pesticides: Interactive Effects of Low Concentrations of Carbamates Aldicarb and Methomyl and the Triazine Metribuzin on Thyroxine and Somatotropin Levels in White Rats." *Journal*



- of Toxicology and Environmental Health* 40 (1): 15–34.  
<https://doi.org/10.1080/15287399309531773>.
- Puche, Juan E, Yedidya Saiman, and Scott L Friedman. 2013. “Hepatic Stellate Cells and Liver Fibrosis.” *Comprehensive Physiology* 3 (4): 1473–92.  
<https://doi.org/10.1002/CPHY.C120035>.
- Püschel, GP. 2004. “Control of Hepatocyte Metabolism by Sympathetic and Parasympathetic Hepatic Nerves.” *The Anatomical Record. Part A, Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology* 280 (1): 854–67. <https://doi.org/10.1002/AR.A.20091>.
- Qatanani, Mohammed, Jun Zhang, and David D. Moore. 2005. “Role of the Constitutive Androstane Receptor in Xenobiotic-Induced Thyroid Hormone Metabolism.” *Endocrinology* 146 (3): 995–1002. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1350>.
- Qazi, Mousumi Rahman, Mohammad R. Abedi, B. Dean Nelson, Joseph W. DePierre, and Manuchehr Abedi-Valugerdi. 2010. “Dietary Exposure to Perfluorooctanoate or Perfluorooctane Sulfonate Induces Hypertrophy in Centrilobular Hepatocytes and Alters the Hepatic Immune Status in Mice.” *International Immunopharmacology* 10 (11): 1420–27. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.08.009>.
- Quinn, Matthew A., Xiaojiang Xu, Melania Ronfani, and John A. Cidlowski. 2018. “Estrogen Deficiency Promotes Hepatic Steatosis via a Glucocorticoid Receptor-Dependent Mechanism in Mice.” *Cell Reports* 22 (10): 2690.  
<https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2018.02.041>.
- Rada, Patricia, Águeda González-Rodríguez, Carmelo García-Monzón, and Ángela M. Valverde. 2020. “Understanding Lipotoxicity in NAFLD Pathogenesis: Is CD36 a Key Driver?” *Cell Death & Disease* 2020 11:9 11 (9): 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03003-w>.
- Rappaport, A. M., Z. J. Borowy, W. M. Loughheed, and W. N. Lotto. 1954. “Subdivision of Hexagonal Liver Lobules into a Structural and Functional Unit. Role in Hepatic Physiology and Pathology.” *The Anatomical Record* 119 (1): 11–33.  
<https://doi.org/10.1002/ar.1091190103>.
- Régnier, Marion, Arnaud Polizzi, Yannick Lippi, Edwin Fouché, Géraldine Michel, Céline Lukowicz, Sarra Smati, et al. 2018. “Insights into the Role of Hepatocyte PPAR $\alpha$  Activity in Response to Fasting.” *Molecular and Cellular Endocrinology* 471 (August): 75–88. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.07.035>.
- Ritchie, Matthew E., Belinda Phipson, Di Wu, Yifang Hu, Charity W. Law, Wei Shi, and Gordon K. Smyth. 2015. “Limma Powers Differential Expression Analyses for RNA-

- Sequencing and Microarray Studies.” *Nucleic Acids Research* 43 (7): e47.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>.
- Rodríguez, Esteban M., Juan L. Blázquez, Francisco E. Pastor, Belén Peláez, Patricio Peña, Bruno Peruzzo, and Pedro Amat. 2005. “Hypothalamic Tanycytes: A Key Component of Brain–Endocrine Interaction.” *International Review of Cytology* 247 (January): 89–164.  
[https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(05\)47003-5](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(05)47003-5).
- Rosen, Mitchell B, Janice S Lee, Hongzu Ren, Beena Vallanat, Jie Liu, Michael P Waalkes, Barbara D Abbott, Christopher Lau, and J Christopher Corton. 2008. “Toxicogenomic Dissection of the Perfluorooctanoic Acid Transcript Profile in Mouse Liver: Evidence for the Involvement of Nuclear Receptors PPARα and CAR.” *Toxicological Sciences* 103 (1): 46–56. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn025>.
- Roth, Adrian, Renate Looser, Michel Kaufmann, Sharon M. Blättler, Franck Rencurel, Wendong Huang, David D. Moore, and Urs A. Meyer. 2008. “Regulatory Cross-Talk between Drug Metabolism and Lipid Homeostasis: Constitutive Androstane Receptor and Pregnane X Receptor Increase Insig-1 Expression.” *Molecular Pharmacology* 73 (4): 1282–89. <https://doi.org/10.1124/MOL.107.041012>.
- Sadler, Natalie C., Bobbie-Jo M. Webb Robertson, Therese R. Clauss, Joel G. Pounds, Richard Corley, and Aaron T. Wright. 2018. “High-Fat Diets Alter the Modulatory Effects of Xenobiotics on Cytochrome P450 Activities.” *Chemical Research in Toxicology* 31 (5): 308. <https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMRESTOX.8B00008>.
- Safadi, Rifaat, Fred M Konikoff, Mahmud Mahamid, Shira Zelber-Sagi, Maya Halpern, Tuvia Gilat, and Ran Oren. 2014. “The Fatty Acid-Bile Acid Conjugate Aramchol Reduces Liver Fat Content in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease.” *Clinical Gastroenterology and Hepatology : The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association* 12 (12): 2085-2091.e1.  
<https://doi.org/10.1016/J.CGH.2014.04.038>.
- Sanyal, AJ, N Chalasani, KV Kowdley, A McCullough, AM Diehl, NM Bass, BA Neuschwander-Tetri, et al. 2010. “Pioglitazone, Vitamin E, or Placebo for Nonalcoholic Steatohepatitis.” *The New England Journal of Medicine* 362 (18): 1675–85.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMOA0907929>.
- Satapathy, Sanjaya K., Vanessa Kuwajima, Jeffrey Nadelson, Omair Atiq, and Arun J. Sanyal. 2015. “Drug-Induced Fatty Liver Disease: An Overview of Pathogenesis and Management.” *Annals of Hepatology* 14 (6): 789–806.  
<https://doi.org/10.5604/16652681.1171749>.

- Schlezing, J J, H Puckett, J Oliver, G Nielsen, W Heiger-Bernays, and T F Webster. 2020. "Perfluorooctanoic Acid Activates Multiple Nuclear Receptor Pathways and Skews Expression of Genes Regulating Cholesterol Homeostasis in Liver of Humanized PPAR $\alpha$  Mice Fed an American Diet." *Toxicology and Applied Pharmacology* 405 (October). <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2020.115204>.
- Schwimmer, JB, JE Lavine, LA Wilson, BA Neuschwander-Tetri, SA Xanthakos, R Kohli, SE Barlow, et al. 2016. "In Children With Nonalcoholic Fatty Liver Disease, Cysteamine Bitartrate Delayed Release Improves Liver Enzymes but Does Not Reduce Disease Activity Scores." *Gastroenterology* 151 (6): 1141-1154.e9. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2016.08.027>.
- Senmaru, T, M Fukui, H Okada, Y Mineoka, M M, Yamazaki, M Tsujikawa, G Hasegawa, J Kitawaki, H Obayashi, and N Nakamura. 2013. "Testosterone Deficiency Induces Markedly Decreased Serum Triglycerides, Increased Small Dense LDL, and Hepatic Steatosis Mediated by Dysregulation of Lipid Assembly and Secretion in Mice Fed a High-Fat Diet." *Metabolism: Clinical and Experimental* 62 (6): 851–60. <https://doi.org/10.1016/J.METABOL.2012.12.007>.
- Sharifnia, Torfay, Joseph Antoun, Thomas G.C. Verriere, Giovanni Suarez, Julia Wattacheril, Keith T. Wilson, Richard M. Peek, Najj N. Abumrad, and Charles R. Flynn. 2015. "Hepatic TLR4 Signaling in Obese NAFLD." *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 309 (4): G270–78. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00304.2014>.
- Sharma, Arya M., and Bart Staels. 2007. "Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  and Adipose Tissue—Understanding Obesity-Related Changes in Regulation of Lipid and Glucose Metabolism." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 92 (2): 386–95. <https://doi.org/10.1210/JC.2006-1268>.
- Shehata, Awad A., Wieland Schrödl, Alaa A. Aldin, Hafez M. Hafez, and Monika Krüger. 2013. "The Effect of Glyphosate on Potential Pathogens and Beneficial Members of Poultry Microbiota in Vitro." *Current Microbiology* 66 (4): 350–58. <https://doi.org/10.1007/S00284-012-0277-2>.
- Shizu, Ryota, Satoshi Benoki, Yuki Numakura, Susumu Kodama, Masaaki Miyata, Yasushi Yamazoe, and Kouichi Yoshinari. 2013. "Xenobiotic-Induced Hepatocyte Proliferation Associated with Constitutive Active/Androstane Receptor (CAR) or Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) Is Enhanced by Pregnane X Receptor (PXR) Activation in Mice." *PloS One* 8 (4).

<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0061802>.

- Shrestha, Srishti, Michael S Bloom, Recai Yucel, Richard F Seegal, Robert Rej, Robert J McCaffrey, Qian Wu, Kurunthachalam Kannan, and Edward F Fitzgerald. 2017. “Perfluoroalkyl Substances, Thyroid Hormones, and Neuropsychological Status in Older Adults.” *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 220 (4): 679–85. <https://doi.org/10.1016/J.IJHEH.2016.12.013>.
- Silins, Ilona, and Johan Högberg. 2011. “Combined Toxic Exposures and Human Health: Biomarkers of Exposure and Effect.” *International Journal of Environmental Research and Public Health* 8 (3): 629–47. <https://doi.org/10.3390/IJERPH8030629>.
- Silverman, Jan F, Kevin F O’Brien, Stuart Long, Nancy Leggett, Prabhaker G Khazanie, Walter J Pories, H Thomas Norris, and Jose F Caro. 1990. “Liver Pathology in Morbidly Obese Patients with and without Diabetes.” *American Journal of Gastroenterology* 85 (10): 1349–55. <http://web.a.ebscohost.com/abstract?site=ehost&scope=site&jrnl=00029270&AN=16089595&h=0%2F559gJFwsSuldt7RjzDkMb1knWGuTMm7dLAv%2FPrQVEbPWpTuy1XTQmWqY8hlw7SKHMTIS%2FwjkwztZfkhNqSFA%3D%3D&crl=c&resultLocal=ErrCrlNoResults&resultNs=Ehost&crlhashurl=login.aspx%3Fdirect%3Dtrue%26profile%3Dehost%26scope%3Dsite%26authtype%3Dcrawler%26jrn1%3D00029270%26AN%3D16089595>.
- Skanes, Blake, Jordan Ho, Keith Warriner, and Ryan S. Prosser. 2020. “Degradation of Boscalid, Pyraclostrobin, Fenbuconazole, and Glyphosate Residues by an Advanced Oxidative Process Utilizing Ultraviolet Light and Hydrogen Peroxide.” *BioRxiv*, November, 2020.11.13.382440. <https://doi.org/10.1101/2020.11.13.382440>.
- Slotkin, Theodore A., Kathleen K. Brown, and Frederic J. Seidler. 2005. “Developmental Exposures of Rats to Chlorpyrifos Elicits Sex-Selective Hyperlipidemia and Hyperinsulinemia in Adulthood.” *Environmental Health Perspectives* 113 (10): 1291–94. <https://doi.org/10.1289/EHP.8133>.
- Smagris, Eriks, Soumik Basuray, John Li, Yongcheng Huang, Ka Man V. Lai, Jesper Gromada, Jonathan C. Cohen, and Helen H. Hobbs. 2015. “Pnpla3<sup>I148M</sup> Knockin Mice Accumulate PNPLA3 on Lipid Droplets and Develop Hepatic Steatosis.” *Hepatology* 61 (1): 108–18. <https://doi.org/10.1002/hep.27242>.
- Smink, Agnes, Nuria Ribas-Fito, Raquel Garcia, Maties Torrent, Michelle A Mendez, Joan O Grimalt, and Jordi Sunyer. 2008. “Exposure to Hexachlorobenzene during Pregnancy Increases the Risk of Overweight in Children Aged 6 Years.” *Acta Paediatrica* 97 (10):

- 1465–69. <https://doi.org/10.1111/J.1651-2227.2008.00937.X>.
- Soldin, Offie P., and Donald R. Mattison. 2009. “Sex Differences in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics.” *Clinical Pharmacokinetics*. Clin Pharmacokinet. <https://doi.org/10.2165/00003088-200948030-00001>.
- Son, Hee Young, Sang Hyun Kim, Hong In Shin, Han Ik Bae, and Jae Ho Yang. 2008. “Perfluorooctanoic Acid-Induced Hepatic Toxicity Following 21-Day Oral Exposure in Mice.” *Archives of Toxicology* 82 (4): 239–46. <https://doi.org/10.1007/s00204-007-0246-x>.
- Sookoian, Silvia, and Carlos J. Pirola. 2011. “Meta-Analysis of the Influence of I148M Variant of Patatin-like Phospholipase Domain Containing 3 Gene (PNPLA3) on the Susceptibility and Histological Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease.” *Hepatology* 53 (6): 1883–94. <https://doi.org/10.1002/hep.24283>.
- Srivastava, Ritesh Kumar, Brijesh K. Singh, and Dinesh Mani. 2013. “Adsorption and Persistence of Ziram Fungicide in Allahabad Region Soils Influence by Organic Matter.” *Asian Journal of Chemistry* 25 (7): 3947–51. <https://doi.org/10.14233/AJCHEM.2013.13853>.
- Staels, Bart, A Rubenstrunk, B Noel, G Rigou, P Delataille, LJ Millatt, M Baron, et al. 2013. “Hepatoprotective Effects of the Dual Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha/Delta Agonist, GFT505, in Rodent Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease/Nonalcoholic Steatohepatitis.” *Hepatology (Baltimore, Md.)* 58 (6): 1941–52. <https://doi.org/10.1002/HEP.26461>.
- Stephenson, Kristen, Lindsey Kennedy, Laura Hargrove, Jennifer Demieville, Joanne Thomson, Gianfranco Alpini, and Heather Francis. 2017. “Updates on Dietary Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Current Studies and Insights.” *Gene Expression* 18 (1): 5–17. <https://doi.org/10.3727/105221617x15093707969658>.
- Steves, Alyse N, Adam Turry, Brittany Gill, Danielle Clarkson-Townsend, Joshua M Bradner, Ian Bachli, W Michael Caudle, Gary W Miller, Anrhony W S Chan, and Charles A Easley. 2018. “Per- and Polyfluoroalkyl Substances Impact Human Spermatogenesis in a Stem-Cell-Derived Model.” *Systems Biology in Reproductive Medicine* 64 (4): 225–39. <https://doi.org/10.1080/19396368.2018.1481465>.
- Sueyoshi, Tatsuya, William D. Green, Kellie Vinal, Tyler S. Woodrum, Rick Moore, and Masahiko Negishi. 2011. “Garlic Extract Diallyl Sulfide (DAS) Activates Nuclear Receptor CAR to Induce the Sult1e1 Gene in Mouse Liver.” *PLOS ONE* 6 (6): e21229. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0021229>.

- Sun, Hong, Ou-Xi Shen, Xiao-Lin Xu, Lin Song, and Xin-Ru Wang. 2008. "Carbaryl, 1-Naphthol and 2-Naphthol Inhibit the Beta-1 Thyroid Hormone Receptor-Mediated Transcription in Vitro." *Toxicology* 249 (2–3): 238–42.  
<https://doi.org/10.1016/J.TOX.2008.05.008>.
- Sun, Quancai, Weipeng Qi, Jeremy J Yang, Kyong Sup Yoon, John M Clark, and Yeonhwa Park. 2016. "Fipronil Promotes Adipogenesis via AMPK $\alpha$ -Mediated Pathway in 3T3-L1 Adipocytes." *Food and Chemical Toxicology* 92 (June): 217–23.  
<https://doi.org/10.1016/J.FCT.2016.04.011>.
- Suzuki, Atsushi, Atsushi Iwana, Hitoshi Miyashita, Hiromitsu Nakauchi, and Hideki Taniguchi. 2003. "Role for Growth Factors and Extracellular Matrix in Controlling Differentiation of Prospectively Isolated Hepatic Stem Cells." *Development* 130 (11): 2513–24. <https://doi.org/10.1242/dev.00459>.
- Sztalryd, Carole, and Dawn L. Brasaemle. 2017. "The Perilipin Family of Lipid Droplet Proteins: Gatekeepers of Intracellular Lipolysis." *Biochimica et Biophysica Acta* 1862 (10 Pt B): 1221. <https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2017.07.009>.
- Takaki, Akinobu, Daisuke Kawai, and Kazuhide Yamamoto. 2013. "Multiple Hits, Including Oxidative Stress, as Pathogenesis and Treatment Target in Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH)." *International Journal of Molecular Sciences* 14 (10): 20704–28.  
<https://doi.org/10.3390/IJMS141020704>.
- Takeuchi, Shinji, Tadashi Matsuda, Satoshi Kobayashi, Tetsuo Takahashi, and Hiroyuki Kojima. 2006. "In Vitro Screening of 200 Pesticides for Agonistic Activity via Mouse Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) $\alpha$  and PPAR $\gamma$  and Quantitative Analysis of in Vivo Induction Pathway." *Toxicology and Applied Pharmacology* 217 (3): 235–44. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.08.011>.
- Takizawa, Daichi, Satoru Kakizaki, Norio Horiguchi, Yuichi Yamazaki, Hiroki Tojima, and Masatomo Mori. 2011. "Constitutive Active/Androstane Receptor Promotes Hepatocarcinogenesis in a Mouse Model of Non-Alcoholic Steatohepatitis." *Carcinogenesis* 32 (4): 576–83. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq277>.
- Tan, Xiaobing, Guoxiang Xie, Xiuhua Sun, Qiong Li, Wei Zhong, Peter Qiao, Xinguo Sun, Wei Jia, and Zhanxiang Zhou. 2013. "High Fat Diet Feeding Exaggerates Perfluorooctanoic Acid-Induced Liver Injury in Mice via Modulating Multiple Metabolic Pathways." *PLoS ONE* 8 (4): 61409. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0061409>.
- Taylor, J R, J B Selhorst, S A Houff, and A J Martinez. 1978. "Chlordecone Intoxication in Man. I. Clinical Observations." *Neurology* 28 (7): 626–30.



- <https://doi.org/10.1212/WNL.28.7.626>.
- Tukey, R. H., and C. P. Strassburg. 2000. "Human UDP-Glucuronosyltransferases: Metabolism, Expression, and Disease." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.40.1.581>.
- Uhlén, Mathias, Linn Fagerberg, Bjö M. Hallström, Cecilia Lindskog, Per Oksvold, Adil Mardinoglu, Åsa Sivertsson, et al. 2015. "Tissue-Based Map of the Human Proteome." *Science* 347 (6220). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1260419>.
- Ukropec, J., Z. Radikova, M. Huckova, J. Koska, A. Kocan, E. Sebkova, B. Drobna, et al. 2010. "High Prevalence of Prediabetes and Diabetes in a Population Exposed to High Levels of an Organochlorine Cocktail." *Diabetologia* 2010 53:5 53 (5): 899–906.  
<https://doi.org/10.1007/S00125-010-1683-2>.
- Usmani, Khawja A., Randy L. Rose, and Ernest Hodgson. 2003. "Inhibition and Activation of the Human Liver Microsomal and Human Cytochrome P450 3A4 Metabolism of Testosterone by Deployment-Related Chemicals." *Drug Metabolism and Disposition* 31 (4): 384–91. <https://doi.org/10.1124/dmd.31.4.384>.
- Varlamov, Oleg, Cynthia L. Bethea, and Charles T. Roberts. 2014. "Sex-Specific Differences in Lipid and Glucose Metabolism." *Frontiers in Endocrinology* 5 (DEC): 241.  
<https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00241>.
- Velázquez, Kandy T., Reilly T. Enos, Jackie E. Bader, Alexander T. Sougiannis, Meredith S. Carson, Ioulia Chatzistamou, James A. Carson, Prakash S. Nagarkatti, Mitzi Nagarkatti, and E. Angela Murphy. 2019. "Prolonged High-Fat-Diet Feeding Promotes Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Alters Gut Microbiota in Mice." *World Journal of Hepatology* 11 (8): 619–37. <https://doi.org/10.4254/wjh.v11.i8.619>.
- Velmurugan, Ganesan, Tharmarajan Ramprasath, Krishnan Swaminathan, Gilles Mithieux, Jeyaprakash Rajendhran, Mani Dhivakar, Ayothi Parthasarathy, et al. 2017. "Gut Microbial Degradation of Organophosphate Insecticides-Induces Glucose Intolerance via Gluconeogenesis." *Genome Biology* 18 (1). <https://doi.org/10.1186/S13059-016-1134-6>.
- Vilar-Gomez, E, and N Chalasani. 2018. "Non-Invasive Assessment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Clinical Prediction Rules and Blood-Based Biomarkers." *Journal of Hepatology* 68 (2): 305–15. <https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2017.11.013>.
- Wagner, Martin, Emina Halilbasic, Hanns Ulrich Marschall, Gernot Zollner, Peter Fickert, Cord Langner, Kurt Zatloukal, Helmut Denk, and Michael Trauner. 2005. "CAR and PXR Agonists Stimulate Hepatic Bile Acid and Bilirubin Detoxification and Elimination

- Pathways in Mice.” *Hepatology* 42 (2): 420–30. <https://doi.org/10.1002/hep.20784>.
- Wahlang, Banrida, Juliane I. Beier, Heather B. Clair, Heather J. Bellis-Jones, K. Cameron Falkner, Craig J. McClain, and Matt C. Cave. 2013. “Toxicant-Associated Steatohepatitis.” *Toxicologic Pathology* 41 (2): 343. <https://doi.org/10.1177/0192623312468517>.
- Wambaugh, John F., Hugh A. Barton, and R. Woodrow Setzer. 2008. “Comparing Models for Perfluorooctanoic Acid Pharmacokinetics Using Bayesian Analysis.” *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics* 35 (6): 683–712. <https://doi.org/10.1007/S10928-008-9108-2>.
- Wang, Jinsong, Yueqian Zhu, Xiang Cai, Jinming Yu, Xiaoping Yang, and Jinxia Cheng. 2011. “Abnormal Glucose Regulation in Pyrethroid Pesticide Factory Workers.” *Chemosphere* 82 (7): 1080–82. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2010.10.065>.
- Wang, Lei, Alexandros G. Asimakopoulos, and Kurunthachalam Kannan. 2015. “Accumulation of 19 Environmental Phenolic and Xenobiotic Heterocyclic Aromatic Compounds in Human Adipose Tissue.” *Environment International* 78 (May): 45–50. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2015.02.015>.
- Wang, Ling, Yu Wang, Yong Liang, Jia Li, Yuchen Liu, Jie Zhang, Aiqian Zhang, Jianjie Fu, and Guibin Jiang. 2013. “Specific Accumulation of Lipid Droplets in Hepatocyte Nuclei of PFOA-Exposed BALB/c Mice.” *Scientific Reports* 3 (Table 1): 1–5. <https://doi.org/10.1038/srep02174>.
- Wang, Pan, Hui-Ping Wang, Ming-Yuan Xu, Yu-Jie Liang, Ying-Jian Sun, Lin Yang, Li Li, Wei Li, and Yi-Jun Wu. 2014. “Combined Subchronic Toxicity of Dichlorvos with Malathion or Pirimicarb in Mice Liver and Serum: A Metabonomic Study.” *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 70: 222–30. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2014.05.027>.
- Wang, Suqing, Nian Shi, Zhiying Ji, and Graziano Pinna. 2002. “Effects of Pyrethroids on the Concentrations of Thyroid Hormones in the Rat Serum and Brain.” *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi* 20 (3): 173–76. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14694632/>.
- Wang, Xiaolin, Yan Lu, E. Wang, Zhijian Zhang, Xuelian Xiong, Huijie Zhang, Jieli Lu, et al. 2015. “Hepatic Estrogen Receptor  $\alpha$  Improves Hepatosteatosis through Upregulation of Small Heterodimer Partner.” *Journal of Hepatology* 63 (1): 183–90. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.02.029>.
- Webber, Emily S., Antonello Bonci, and Michael J. Krashes. 2015. “The Elegance of Energy

- Balance: Insight from Circuit-Level Manipulations.” *Synapse* 69 (9): 461–74.  
<https://doi.org/10.1002/SYN.21837>.
- Wei, Ping, Jun Zhang, Margarete Egan-Hafley, Shuguang Liang, and David D. Moore. 2000. “The Nuclear Receptor CAR Mediates Specific Xenobiotic Induction of Drug Metabolism.” *Nature* 407 (6806): 920–23. <https://doi.org/10.1038/35038112>.
- Westerouen Van Meeteren, Menso J., Joost P.H. Drenth, and Eric T.T.L. Tjwa. 2020. “Elafibranor: A Potential Drug for the Treatment of Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH).” *Expert Opinion on Investigational Drugs* 29 (2): 117–23.  
<https://doi.org/10.1080/13543784.2020.1668375>.
- Wiwi, Christopher A., Minita Gupte, and David J. Waxman. 2004. “Sexually Dimorphic P450 Gene Expression in Liver-Specific Hepatocyte Nuclear Factor 4 $\alpha$ -Deficient Mice.” *Molecular Endocrinology* 18 (8): 1975–87. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0129>.
- Wolf, Douglas C, Tanya Moore, Barbara D Abbott, Mitchell B Rosen, Kaberi P Das, Robert D Zehr, Andrew B Lindstrom, Mark J Strynar, and Christopher Lau. 2008. “Comparative Hepatic Effects of Perfluorooctanoic Acid and WY 14,643 in PPAR-Alpha Knockout and Wild-Type Mice.” *Toxicologic Pathology* 36 (4): 632–39.  
<https://doi.org/10.1177/0192623308318216>.
- Wu, Xinmou, Guojie Xie, Xiaoxiao Xu, Wei Wu, and Bin Yang. 2018. “Adverse Bioeffect of Perfluorooctanoic Acid on Liver Metabolic Function in Mice.” *Environmental Science and Pollution Research* 25 (5): 4787–93. <https://doi.org/10.1007/S11356-017-0872-7>.
- Xia, F, X Xu, H Zhai, Y Meng, H Zhang, S Du, H Xu, H Wu, and Y Lu. 2013. “Castration-Induced Testosterone Deficiency Increases Fasting Glucose Associated with Hepatic and Extra-Hepatic Insulin Resistance in Adult Male Rats.” *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E* 11 (1). <https://doi.org/10.1186/1477-7827-11-106>.
- Xiao, Lei, Xinni Xie, and Yonggong Zhai. 2010. “Functional Crosstalk of CAR-LXR and ROR-LXR in Drug Metabolism and Lipid Metabolism.” *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.07.006>.
- Xiao, Xiao, Yoo Kim, Daeyoung Kim, Kyong Sup Yoon, John M Clark, and Yeonhwa Park. 2017. “Permethrin Alters Glucose Metabolism in Conjunction with High Fat Diet by Potentiating Insulin Resistance and Decreases Voluntary Activities in Female C57BL/6J Mice.” *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 108 (Pt A): 161.  
<https://doi.org/10.1016/J.FCT.2017.07.053>.
- Xie, Wen, Mei Fei Yeuh, Anna Radomska-Pandya, Simrat P.S. Saini, Yoichi Negishi,

- Bobbie Sue Bottroff, Geraldine Y. Cabrera, Robert H. Tukey, and Ronald M. Evans. 2003. "Control of Steroid, Heme, and Carcinogen Metabolism by Nuclear Pregnane X Receptor and Constitutive Androstane Receptor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (7): 4150–55. <https://doi.org/10.1073/pnas.0438010100>.
- Yamamoto, Akihiro, Ming Yih Liu, Katsuhisa Kurogi, Yoichi Sakakibara, Yuichi Saeki, Masahito Suiko, and Ming Cheh Liu. 2015. "Sulphation of Acetaminophen by the Human Cytosolic Sulfotransferases: A Systematic Analysis." *Journal of Biochemistry* 158 (6): 497–504. <https://doi.org/10.1093/jb/mvv062>.
- Yamazaki, Yuichi, Satoru Kakizaki, Norio Horiguchi, Naondo Sohara, Ken Sato, Hitoshi Takagi, Masatomo Mori, and Masahiko Negishi. 2007. "The Role of the Nuclear Receptor Constitutive Androstane Receptor in the Pathogenesis of Non-Alcoholic Steatohepatitis." *Gut* 56 (4): 565–74. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.093260>.
- Yan, Jiong, Baian Chen, Jing Lu, and Wen Xie. 2015. "Deciphering the Roles of the Constitutive Androstane Receptor in Energy Metabolism." *Nature Publishing Group* 36: 62–70. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.102>.
- Yan, Shengmin, Hongxia Zhang, Fei Zheng, Nan Sheng, Xuejiang Guo, and Jiayin Dai. 2015. "Perfluorooctanoic Acid Exposure for 28 Days Affects Glucose Homeostasis and Induces Insulin Hypersensitivity in Mice." *Scientific Reports* 5 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep11029>.
- Yang, Xia, Eric E. Schadt, Susanna Wang, Hui Wang, Arthur P. Arnold, Leslie Ingram-Drake, Thomas A. Drake, and Aldons J. Lusis. 2006. "Tissue-Specific Expression and Regulation of Sexually Dimorphic Genes in Mice." *Genome Research* 16 (8): 995–1004. <https://doi.org/10.1101/gr.5217506>.
- Yilmaz, Y. 2012. "Review Article: Is Non-Alcoholic Fatty Liver Disease a Spectrum, or Are Steatosis and Non-Alcoholic Steatohepatitis Distinct Conditions?" *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1111/apt.12046>.
- Ylinen, M, and S Auriola. 1990. "Tissue Distribution and Elimination of Perfluorodecanoic Acid in the Rat after Single Intraperitoneal Administration." *Pharmacology & Toxicology* 66 (1): 45–48. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0773.1990.TB00700.X>.
- Yoshioka, Naoki, Masatoshi Ishigami, Yasuko Watanabe, Hajime Sumi, Masao Doisaki, Takeo Yamaguchi, Takanori Ito, et al. 2020. "Effect of Weight Change and Lifestyle Modifications on the Development or Remission of Nonalcoholic Fatty Liver Disease:

- Sex-Specific Analysis.” *Scientific Reports* 2020 10:1 10 (1): 1–10.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-57369-9>.
- Younossi, Zobair M., Aaron B. Koenig, Dinan Abdelatif, Yousef Fazel, Linda Henry, and Mark Wymer. 2016. “Global Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease—Meta-Analytic Assessment of Prevalence, Incidence, and Outcomes.” *Hepatology* 64 (1): 73–84. <https://doi.org/10.1002/hep.28431>.
- Younossi, Zobair, Yusuf Yilmaz, Mohammed El Kassas, Vincent Wai-Sun Wong, Ajay Kumar Duseja, Nahúm Méndez-Sánchez, Jacob George, et al. 2020. “Significant Knowledge Gap about Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) in Real-World Practices: A Global Survey of Hepatologists, Gastroenterologists, Endocrinologists and Primary Care Physicians.” *Journal of Hepatology* 73 (August): S440.  
[https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(20\)31361-1](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(20)31361-1).
- Yu, Jinsheng, Sharon Marsh, Junbo Hu, Wenke Feng, and Chaodong Wu. 2016. “The Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Interplay between Diet, Gut Microbiota, and Genetic Background.” *Gastroenterology Research and Practice*. Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2016/2862173>.
- Zhang, Jianyun, Jing Zhang, Rui Liu, Jay Gan, Jing Liu, and Weiping Liu. 2016. “Endocrine-Disrupting Effects of Pesticides through Interference with Human Glucocorticoid Receptor.” *Environmental Science and Technology* 50 (1): 435–43.  
<https://doi.org/10.1021/ACS.EST.5B03731>.
- Zhao, Roong, and Stephen A. Duncan. 2005. “Embryonic Development of the Liver.” *Hepatology*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/hep.20691>.
- Zheng, Fei, Nan Sheng, Hongxia Zhang, Shengmin Yan, Jianhai Zhang, and Jianshe Wang. 2017. “Perfluorooctanoic Acid Exposure Disturbs Glucose Metabolism in Mouse Liver.” *Toxicology and Applied Pharmacology* 335 (November): 41–48.  
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.09.019>.