



HAL
open science

Evaluations des effets cytotoxiques et métaboliques des dithiocarbamates manèbe et mancozèbe dans des modèles *in vitro* de cellules hépatiques

Kilian Petitjean

► **To cite this version:**

Kilian Petitjean. Evaluations des effets cytotoxiques et métaboliques des dithiocarbamates manèbe et mancozèbe dans des modèles *in vitro* de cellules hépatiques. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2022. Français. NNT : 2022REN1B058 . tel-04319579

HAL Id: tel-04319579

<https://theses.hal.science/tel-04319579v1>

Submitted on 3 Dec 2023

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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

ECOLE DOCTORALE N° 605

BIOLOGIE SANTE

Spécialité : Toxicologie

Par

Kilian PETITJEAN

Evaluations des effets cytotoxiques et métaboliques des dithiocarbamates manèbe et mancozèbe dans des modèles *in vitro* de cellules hépatiques

Thèse présentée et soutenue à Rennes le 2 Décembre 2022

Unité de recherche : UMR 1241 Institut NuMeCaN « Nutrition, Métabolisme et Cancer » INSERM

Rapporteurs avant soutenance :

Laurence Gamet-Payrastra

Directeur de recherche, UMR 1331 TOXALIM INRAE, Toulouse

Xavier Coumoul

Professeur des universités, UMR S 1124 METATOX INSERM, Université Paris Cité

Composition du Jury :

Laurence Gamet-Payrastra, *Rapporteur*

Directeur de recherche, UMR 1331 TOXALIM INRAE, Toulouse

Xavier Coumoul, *Rapporteur*

Professeur des universités, UMR S 1124 METATOX INSERM, Université Paris Cité

Brigitte Le Magueresse-Battistoni, *Examineur*

Directeur de recherche, U1060 1397 CarMeN INSERM INRAE, Université Claude Bernard Lyon

Hélène Gilgenkrantz, *Présidente*

Directeur de recherche, Centre de Recherche sur l'inflammation Hepato-gastroenterologie INSERM, Paris

Pascal Loyer, *Directeur de thèse*

Directeur de recherche, U1241 NuMeCan INSERM INRAE, Rennes

Anne Corlu, *Co-directrice de thèse*

Directeur de recherche, U1241 NuMeCan INSERM INRAE, Rennes

Bernard Fromenty, *Examineur*

Directeur de recherche, U1241 NuMeCan INSERM INRAE, Rennes

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier Anne Corlu et Pascal Loyer pour m'avoir impliqué dans deux projets précédant ma thèse et bien évidemment je les remercie pour leur confiance renouveler et le mal qu'ils se sont donnés pour la réalisation de mon doctorat au sein de l'Institut. Je suis tout particulièrement reconnaissant envers eux puisque sans leur soutien je ne prétendrais probablement pas au titre de docteur.

Bernard Fromenty, étant le porteur du projet Pestifat, il est la troisième personne que je souhaite remercier pour la confiance qu'il m'a accordé pour la réalisation de ce projet.

Je tiens à souligner votre implication, votre intérêt, vos précieux conseils et vos différents domaines d'expertise qui ont permis de mener à bien mes travaux de thèse et surtout de les enrichir. Vos connaissances scientifiques et techniques, votre esprit critique et votre expérience m'ont énormément apporté et permis de m'épanouir en tant que chercheur. Je ne pourrais assez-vous remercier pour tout ce que vous m'avez offert et j'espère que ces lignes sauront retranscrire toute la gratitude que j'ai envers vous trois.

Je tiens à souligner l'honneur que me font le Docteur Laurence Gamet-Payrastra de l'université Paul Sabatier de Toulouse et le Professeur Xavier Coumoul de l'Université Paris Cité pour l'intérêt et le temps qu'ils accordent à mes travaux de thèse en tant que rapporteurs de mon jury.

De même, j'ai l'honneur de remercier le Docteur Brigitte Le Magueresse-Battistoni de l'université de Lyon et le Docteur Hélène Gilgenkrantz de l'université de Paris pour leur participation à l'évaluation de mes travaux de thèses en tant que membre de mon jury.

Je remercie à nouveau Brigitte le Magueresse-Battistoni pour avoir suivi, évalué et orienté mes travaux de thèse lors des comités de suivi individuels. J'en profite pour remercier Camille Savary pour avoir activement participé et porté la demande de financement Pestifat qui a conduit à mon contrat doctoral, ainsi que pour son implication dans ce projet de par sa participation aux comités de suivi individuels.

Parce qu'une thèse c'est aussi un travail d'équipe, je remercie Elise Vène et Catherine pour avoir débuté le projet PeNiCa qu'elles m'ont légué et pour m'avoir accueilli. Elles ont été très présentes lors de mes années de thèse et je suis ravi d'avoir travaillé avec elle et appris de leur savoir.

J'ai également eu la chance de pouvoir enrichir mes connaissances théoriques et me former à des techniques lors de mes déplacements dans d'autres laboratoires. Ainsi, je remercie particulièrement Stéphane Servais pour m'avoir accueilli, malgré le contexte sanitaire, dans l'unité U1069 de l'INSERM à Tours, où il m'a formé à l'utilisation et à la mesure des différents paramètres liés à la respiration par oxygraphie. De même, je remercie Naïg Guegen, du département Biochimie et Biologie moléculaire du CHU d'Angers pour sa disponibilité et son expertise, auprès de qui j'ai beaucoup appris sur la mesure de l'activité des complexes mitochondriaux.

Dans le cadre du projet Pestifat j'ai eu la chance de collaborer avec Nicole Baran, Laurence Amalric et Sébastien Bristeau du BRGM. Je tiens à les remercier pour leurs implications, les échanges fructueux que nous avons eus et leurs connaissances indispensables pour l'identification et la quantification des pesticides et de leurs métabolites, qui ont confortés et enrichis mes travaux de thèse. J'aimerais également les remercier pour l'opportunité qu'ils m'ont offert de venir à Orléans pour assister à l'analyse de nos échantillons. Lors de ce séjour, j'ai été ravi de travailler auprès de Sébastien et je le remercie tout particulièrement pour sa disponibilité, son expertise et les connaissances qu'il m'a inculqué.

J'adresse mes remerciements à l'ensemble des stagiaires qui m'ont assisté lors de mes années de thèse, Yann, Nicolas, Korydwen et Giovanna. Les débuts du projet PeNiCa ont également été les débuts d'une amitié et je tiens à remercier Yann pour tout ce qu'il a pu m'apporter durant ces quelques années. Lors des derniers mois de ma thèse j'ai été assisté par Giovanna que je souhaite remercier chaleureusement pour tout. Son aide précieuse, malgré quelques difficultés et le timing serré, m'a permis de conclure le projet Pestifat et je sais que la conclusion de ce projet n'est pas celle de notre relation.

Puisque durant les années de thèse la vie au laboratoire est primordiale et parfois composée de mauvaises passes, je tiens à remercier l'ensemble des personnes au sein de l'Institut NuMeCan qui ont participé de près ou de loin à l'ambiance chaleureuse et conviviale, au bon déroulement de ma thèse, au soutien, aux conseils et aux échanges lors des réunions ou non. Ainsi je remercie ; Annaïg, Aude, Caroline, Claudine, Daniel, Gaëlle Angenard, Gaëlle Boudry, Grégory, Isabelle, Karima, Marie-Laure, Orlando, Patricia Leroyer, Pierre-Jean, Sandrine, Tatiana, Vincent.

Le déroulement de ma thèse a été facilité par l'aide de Adina, Michèle, Patricia Jouas et Thomas Poussou pour la logistique lors des commandes ou des déplacements et pour le côté administratif.

Ma passion pour la recherche s'est consolidée au fil des années au même titre que mon amitié avec Yoann. Je le remercie pour tout ce qu'il m'a apporté depuis nos débuts à l'Institut en tant que stagiaire. Nos échanges scientifiques et collaborations ont toujours été très enrichissants pour l'un comme pour l'autre et ce fut un plaisir de le côtoyer tant dans le milieu professionnel que privé. Son enthousiasme, son aide et son soutien quotidiens ont grandement participé à mon épanouissement dans mon travail de thèse. Par ailleurs, je remercie Alicia sa compagne, pour son entrain qui a parfois été nécessaire pour le motiver pour les activités extra-thèses.

Bien évidemment l'ensemble des doctorants, que j'ai eu la chance de côtoyer durant mes quelques années de thèse, ont su m'inspirer, me motiver, me soutenir et maintenir une ambiance conviviale et chaleureuse au laboratoire et en dehors, je tiens donc à remercier : Ambre, Clémence, Corentin, Dounia, Elise Lelou, Elise Vène, Hanadi, Hugo, Julien, Kevin Bevant, Kévin Maunand, Lise, Sarah, Simon, Thomas Gautier, Thomas Guerbette, Yann, Yoann, Youenn.

Parce que la thèse c'est aussi des rencontres et le développement de liens amicaux, je remercie; Yoann pour le partage tant dans le domaine professionnel que privé, les vacances, le sport, les afterworks et le partage de bureau

Alicia pour son entrain constant et communicatif et les vacances

Elise Lelou pour sa bonne humeur, son entrain pour toute sorte d'activité, les afterworks, les vacances, le sport.

Julien pour son enthousiasme, ses blagues, les afterworks, sa présence en culture et le partage de ses connaissances

Kevin Bevant pour le partage du bureau, sa bonne humeur, les afterworks et ses jeux de mots

Yann pour sa gentillesse, son implication et son entrain

Thomas Gautier, pour ses blagues, son entrain et les afterworks

Thomas Guerbette avec qui j'ai pris plaisir à discuter autour de nos sujets respectifs et notamment de manips, pour les afterworks, les afterbars, toutes sortes d'activités et bien sûr pour l'invitation chez eux les mardis soirs

Vincent que je suis ravi d'avoir rencontré et pour m'avoir accueilli parfois après le bar et lors des soirées du mardi

Lise pour son entrain, la course à la soutenance et les statistiques

Hugo, pour l'analyse des échantillons chez Biopredic et sa bonne humeur

Hanadi, pour sa bonne humeur constante, son sourire et pour notre lien de parenté

Kévin Maunand, pour son entrain, les hépatocytes et les afterworks

Youenn, pour sa présence en culture, son enthousiasme communicatif et son humour

Giovanna pour avoir dynamisé les derniers mois de ma thèse, son entrain et sa présence

Ces quelques mots ne sauraient retranscrire mes pensées et l'ensemble de ce qu'ils m'ont apporté et ce que nous avons partagé mais je sais qu'ils connaissent ma reconnaissance envers eux et la profonde affection que je leur porte

Puisqu'une grande journée implique une grande tasse de café, je remercie le café et l'ensemble des personnes et particulièrement les doctorants avec qui j'ai partagé des pauses cafés qui ont été des moments d'échanges scientifiques et personnelles très enrichissants et indispensables, des moments de convivialité, de joie, de réconfort, de rire et de partage.

Enfin, je tiens à témoigner ma reconnaissance envers mon père et ma mère qui à leur manière m'ont aidé tout au long de mon cursus scolaire et universitaire. Je remercie également mes deux sœurs pour leur complicité. Je remercie donc ma famille pour toute l'aide et l'amour qu'ils m'ont offert et sans qui je ne serais pas arrivé si loin.

Ces quelques lignes ne suffiraient à décrire ma gratitude envers toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont permis d'accomplir mon doctorat et d'être le chercheur que je suis. J'aimerais alors simplement vous dire « Merci ».

LISTE DES ABREVIATIONS

ACC	Acétyl-CoA carboxylase
ACLY	<i>ATP citrate lyase</i>
ACS	<i>Acyl-CoA synthétase</i>
ADI	<i>Acceptable Daily Intake / dose acceptable journalière</i>
AG	Acide gras
AGPAT	<i>Acylglycerole-3-phosphate acyltransferase</i>
AhR	<i>Aryl hydrocarbon receptor</i>
AI	<i>Adequate Intake</i>
AMPK	<i>Adenosine monophosphate-activated protein kinase</i>
AOP	<i>Adverse outcome pathway</i>
apoB	<i>Apolipoprotéine B</i>
ATF	<i>Activating Transcription Factor</i>
ATP	Adénosine triphosphate
CACT	<i>Carnitine acylcarnitine translocase</i>
CAD	<i>Acyl-CoA déhydrogénase</i>
CAR	Carbohydrate receptor
CAT	Catalases
CHOP	<i>C/EBP homology protein</i>
ChREBP	<i>Carbohydrate response element binding protein</i>
CoA	Coenzyme A
CPT	<i>Carnitine palmitoyltransférase</i>
CYP	Cytochrome P450
DG	Diacylglycérol
DGAT	<i>Diacylglycerol acyltransferase</i>
DMSO	Diméthyle-sulfoxyde
DTC	Dithiocarbamates
EBDC	Ethylène-bis-dithiocarbamates
EDA	Ethylène diamine
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EH	<i>Enoyl-CoA hydratase</i>

eIF2α	<i>Initiation factor 2</i>
EPA	<i>U.S Environmental Protection Agency</i>
ERO	<i>Espèces réactives de l'oxygène</i>
ERO1	<i>Endoplasmic reticulum oxidoreductin-1</i>
ETU	<i>Ethylène thiourée</i>
EU	<i>Ethylène urée</i>
FA	<i>Fatty acid</i>
FABPpm	<i>Fatty acid binding protein</i>
FAD	<i>Flavine adénine dinucléotide</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FAS	<i>Fatty acid synthase</i>
FAT/CD36	<i>Fatty acid translocase</i>
FATP	<i>Fatty acid transport protein</i>
FXR	<i>Farnesoid X receptor</i>
G3P	<i>Glycérol-3-phosphate</i>
GL	<i>Goutelettes lipidiques</i>
GPAT	<i>Glycerol-3-phosphate acyltransférase</i>
GPX	<i>Gluthation peroxydase</i>
GSH	<i>Glutathion réduit</i>
GST	<i>Glutathion S-transférases</i>
HAD	<i>3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase</i>
HNF4α	<i>Hepatocyte nuclear factor 4α</i>
ICP-MS	<i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>
IL-1β	<i>Interleukine 1-β</i>
IL-6	<i>Interleukine 6</i>
IMP	<i>2-Isopropyl-6-methyl-4-pyrimidinol</i>
IRE1	<i>Inositol-requiring protein 1</i>
KAT	<i>Kketoacyl-CoA thiolase</i>
LDN	<i>Lipogenèse de novo</i>
LPA	<i>Acide lysophosphatidique</i>
LXR	<i>Liver x receptor</i>
MCAD	<i>Medium-chain CAD</i>
MIE	<i>Molecular initiating events</i>

MRL	<i>Maximum residue limit</i>
MTP	<i>Mitochondrial trifunctional protein</i>
MTTP	<i>Microsomal triglyceride transfer protein</i>
NAC	N-acétylcystéine
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NAFLD	<i>Non alcoholic fatty liver disease/ stéatose hépatique</i>
NASH	<i>Non alcoholic steato-hepatitis/ stéatohépatite</i>
NOAEL	<i>No Observed Adverse Effect Level</i>
PA	Acide phosphatidique
PAP	<i>Phosphatidate phosphohydrolase</i>
PAPS	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulphate
PDI	<i>Protein disulfide isomerase</i>
PERK	<i>Protein Kinase-Like Endoplasmic Reticulum Kinase</i>
PLIN	<i>Perilipines</i>
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PXR	<i>Pregnane x receptor</i>
RE	Réticulum endoplasmique
SCAD	<i>Short-chain CAD</i>
SOD	Superoxydes dismutases
SREBP1c	<i>Sterol regulatory element binding protein 1C</i>
SULT	Sulfotransférase
TBP	<i>TATA box binding protein</i>
TCP	3,5,6-Trichloro-2-pyridinol
TG	Triglycérides
TNFα	<i>Tumor necrosis factor α</i>
TP	Thiorédoxine peroxydase
U-(H)PLC-MS	Ultra-(High) performance liquid chromatography- mass spectrometry
UCP	<i>Uncoupling proteins</i>
UDP	Uridine diphosphate
UDPAG	<i>Uridine diphosphate acide glucuronique</i>
UGT	UDP-glucuronosyltransférases
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>

VLCAD	<i>Very long-chain CAD</i>
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i> / lipoprotéines de très basse densité
XBP-1	<i>X-Box Binding Protein-1</i>
$\Delta\Psi_m$	Potentiel de membrane mitochondriale

PUBLICATIONS & COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS :

« *Beneficial effects of citrulline enteral administration on sepsis-induced T cell mitochondrial dysfunction* »

F. Reizine, M. Gregoire, M. Lesouhaitier, V. Coirier, J. Gauthier, C. Delaloy, E. Dessauge, F. Creusat, F. Uhel, A. Gacouin, F. Dessauge, C. Le Naoures, C. Moreau, C. Bendavid, Y. Daniel, **K. Petitjean**, V. Bordeaux, C. Lamaison, C. Piau, V. Cattoir, M. Roussel, B. Fromenty, C. Michelet, Y. Le Tulzo, J. Zmijewski, R. Thibault, M. Cogné, K. Tarte, J-M. Tadié

Proceedings of the National Academy of Sciences 2022

« *Cas 9-targeted nanopore sequencing reveals epigenetic heterogeneity after de novo assembly of native full-length hepatitis B virus genomes* »

C. Goldsmith, D. Cohen, A. Dubois, M. Guadalupe Martinez, **K. Petitjean**, A. Corlu, B. Testoni, H. Hernandez-Vargas, I. Chemin

Microbial Genomics 2021 ;7 :000507

« *Cytochrome P450 1A1/2, 2B6 and 3A4 HepaRG Cell-Based Biosensors to Monitor Hepatocyte Differentiation, Drug Metabolism and Toxicity* »

M. Vlach, N. Quesnot, H. Dubois-Pot-Schneider, C. Ribault, Y. Verres, **K. Petitjean**, C. Rauch, F. Morel, M. Robin, A. Corlu, P. Loyer

Sensors 2019, 19(10), 2245

COMMUNICATIONS ORALES :

« Manganese-dependent effects of the fungicides maneb and mancozeb on cellular viability, lipid accumulation and drug metabolism in human hepatocytes »

K. Petitjean, S. Bristeau, Y. Verres, N. Bruno, K. Fruit, G Dicara, C. Ribault, O. Hérault, C. Olivier, M. Ropert, O. Loréal, L. Amalric, N. Baran, B. Fromenty, A. Corlu, P. Loyer

Journée scientifique dédiée aux jeunes toxicologues de la STCM, 31 Mars **2022**, France, Présentation Orale

« Acute exposure effects of a low dose pesticide cocktail on viability and hepatocyte differentiation »

K.Petitjean, Y. Verres, E. Vene, C. Ribault, A. Corlu, P. Loyer

Colloque « Niches et Cancer », 21 Novembre **2018**, Nantes (France)

« Exposure effects of a low dose pesticide cocktail on viability and hepatocyte differentiation »

K.Petitjean, Y. Verres, E. Vene, C. Ribault, A. Corlu, P. Loyer

Réunions PeNiCa, 6 Avril et 20 Décembre **2018**, Nantes (France)

POSTERS :

« Involvement of xenobiotic metabolism in manganese-dependent toxicity of the maneb and mancozeb pesticides at low doses in human hepatocytes »

K. Petitjean, Yann Verres, Nicolas Bruno, Elise Vene, Catherine Ribault, Martine Ropert, Olivier Loreal, Olivier Hérault, Christophe Olivier, Bernard Fromenty, Anne Corlu, Pascal Loyer **Journées scientifiques ED BS 2021**, 9 et 10 Décembre **2021**, Brest (France)

« Involvement of xenobiotic metabolism in manganese-dependent toxicity of the maneb and mancozeb pesticides at low doses in human hepatocytes »

K. Petitjean, Y. Verres, N. Bruno, E. Vene, C. Ribault, O. Hérault, C. Olivier, C. Aninat, B. Fromenty, A. Corlu, P. Loyer.

VIII Colloque de Génomique Fonctionnelle du Foie, 26-28 Février **2020**, Rennes (France)

« Role of the xenobiotic metabolism in the hepatotoxicity of the pesticides maneb and mancozeb »

K. Petitjean, Y. Verres, E. Vene, C. Ribault, M. Vlach, A. Corlu, P. Loyer

9^{ème} journée recherche, 16 Janvier **2019**, Rennes (France)

« Effets d'expositions aiguës ou chroniques à de faibles doses de pesticides sur la viabilité et la différenciation hépatocytaire »

Y. Verres, **K. Petitjean**, E. Vene, C. Ribault, M. Vlach, A. Corlu, P. Loyer

12^{ème} journées du Cancéropôle Grand Ouest, 2-3 Juillet **2018**, Vannes (France)

Table des matières

INTRODUCTION	19
I-LE FOIE ET SES FONCTIONS MAJEURES.....	20
A- Métabolisme des acides gras.....	21
Absorption des acides gras libres	21
Lipogenèse <i>de novo</i>	22
Métabolisme des triglycérides.....	24
Synthèse des triglycérides	24
Stockage des triglycérides	26
Sécrétion des triglycérides	27
Catabolisme des acides gras	27
β -oxydation.....	28
B-Détoxification des xénobiotiques	31
Phase O	32
Phase I.....	32
Cytochrome P450	33
CYP1	35
CYP2	35
CYP3	35
Phase II	36
UGT.....	36
SULT.....	37
GST	37
Phase III.....	38
II-TOXICITE	40
A Espèces réactives de l'oxygène, antioxydant et stress oxydant.....	40
Espèces réactives de l'oxygène	40
ERO Mitochondriaux	40
ERO mitochondriaux et cytoplasmiques	43
ERO issues du RE	44
Antioxydants.....	46
Enzymatiques	46
Non enzymatiques	47
Stress oxydant.....	48
B-Apoptose	49
Voie extrinsèque	50
Voie intrinsèque	50
Activation de l'apoptose	51

Apoptose et xénobiotiques	51
C- Stéatose hépatique associée aux xénobiotiques.....	53
III- PESTICIDES	56
A- Définition et utilisation.....	56
B- Exposition, réglementation et limitations	57
C- Dithiocarbamates.....	63
Mancozèbe	63
Toxicité des EBDC, exemple du mancozèbe.....	64
IV-CONTEXTE ET OBJECTIFS	70
A-PeNiCa.....	70
B-Pestifat.....	71
RESULTATS.....	74
I-PeNiCa.....	75
Résumé.....	75
1. Introduction	80
2. Materials and methods.....	84
2.1. Pesticides, mixture, doses and treatments	84
2.2. Cell cultures	85
2.3. Cell viability and apoptosis assessment.....	86
2.4. Detection of reactive oxygen species (ROS).....	87
2.5. Measurement of mitochondrial respiration and complex (I-V) enzyme activities	88
2.6. High pressure liquid chromatography (HPLC)	89
2.7. LC-MS/MS analyses.	89
2.8. Quantification of Mn and Zn by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry.	90
2.9. RNA and protein expression studies	91
2.10. Data analysis.....	92
3. Results.....	93
3.1. Chronic and acute exposures to the pesticide mixture induce cytotoxicity in human hepatocytes.....	93
3.2. Maneb and mancozeb induce oxidative stress and apoptosis in human hepatocytes.....	95
3.3. Mancozeb is metabolized in hepatocytes to produce ethylene thiourea.	98
3.4. Exposure to DTCs leads to Mn overload and Zn depletion and apoptosis in hepatocytes.....	100
4. Discussion	113
5. Materials and Methods – Supporting Information 1	118
Pesticides:.....	118
Cell cultures:.....	118
List of forward and reverse primers used for RT-qPCR:.....	119

Genotoxicity assay using γ -H2AX staining:.....	119
Detection of cells with sub-G1 DNA content by flow cytometry:	120
Buffers and substrates used for measurement of mitochondrial OXPHOS complex enzyme activities:	120
6. References.....	134
Schéma bilan	147
II-PESTIFAT	148
A-Introduction	148
B-Matériel & Méthode	150
Pesticides	150
Culture cellulaire et traitements.....	150
Marquage au Nile Red et dosage des triglycérides	151
Evaluation de l'entrée des acides gras	152
Evaluation de la lipogénèse <i>de novo</i>	152
Evaluation de la β -oxydation	153
Dosage de l'apolipoprotéine B	153
Mesure de l'activité d'enzyme de phase I et II par HPLC, LC-MS/MS.....	154
Evaluation du métabolisme du chlorpyrifos et du diazinon par UPLC-MS/MS....	155
Extraction des ARN et expression génique.....	156
Analyses statistiques	157
C-Résultats	157
Le mélange de pesticide aggrave l'accumulation des lipides neutres.....	157
Les dithiocarbamates et l'ion manganèse aggravent l'accumulation des lipides neutres	159
Les dithiocarbamates et l'ion manganèse provoquent une accumulation des lipides sous forme de triglycérides.....	160
Augmentation de l'import d'acides gras par les pesticides.....	162
Impact des pesticides sur la lipogénèse <i>de novo</i>	164
Impact des pesticides sur la β -oxydation	166
Inhibition de l'export des triglycérides par la voie des VLDL	167
Impact des dithiocarbamates sur le stress du réticulum endoplasmique	169
Inhibition de l'activité et de l'expression des cytochromes P450 2E1 et 3A4 par le mélange des pesticides	170
Rôle des dithiocarbamates et du manganèse dans l'inhibition de l'activité et de l'expression des CYP2E1 et 3A4.....	172
Impact des dithiocarbamates sur les enzymes de phase I et II de biotransformation	174
Inhibition sélective de l'expression des récepteurs nucléaires par les dithiocarbamates et le manganèse	177
Impact de l'exposition du mélange de pesticides sur la biotransformation du chlorpyrifos et du diazinon	179
D-Discussion	182
E-Informations supplémentaires	190
Méthode Supplémentaire	190
Evaluation de la viabilité cellulaire par contenu en ATP	190
Informations supplémentaires	191

Figures supplémentaires.....	194
Schéma bilan	197
DISCUSSION	199
I-DITHIOCARBAMATES DE MANGANESE ET HEPATOTOXICITE	200
II- DITHIOCARBAMATES DE MANGANESE ET STEATOSE	208
III-DISCUSSION GENERALE	213
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	223

Table des figures et tableaux

FIGURES

Figure 1 : Schéma simplifié de la lipogénèse de novo.....	23
Figure 2 : Schéma simplifié de la synthèse et de l'export des triglycérides.....	25
Figure 3 : Schéma simplifié du catabolisme des acides gras par β -oxydation	30
Figure 4 : Schéma de la détoxification par les enzymes de biotransformation des xénobiotiques.....	32
Figure 5 : Schéma du cycle catalytique des cytochromes P450 et espèces réactives de l'oxygène.....	33
Figure 6 : Principaux cytochromes P450 impliqués dans la détoxification des xénobiotiques.....	34
Figure 7 : Schéma des principales réactions de la phase II de la biotransformation des xénobiotiques	38
Figure 8 : Schéma simplifié des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et espèces réactives de l'oxygène.....	42
Figure 9 : Schéma simplifié du stress du réticulum endoplasmique et de la Unfolded protein response.....	45
Figure 10 : Schéma simplifié de la production d'espèces réactives de l'oxygène et des systèmes antioxydants.....	48
Figure 11 : Schéma simplifié de l'apoptose et ses différentes voies d'activation	52
Figure 12 : Prévalence et progression des pathologies hépatiques	53
Figure 13 : Mise en place de la stéatose selon le modèle adverse outcome pathway	54
Figure 14 : Carte de la répartition de l'utilisation des pesticides en tonnes par pays pour l'année 2020.....	57
Figure 15 : Modèle cellulaire HepaRG stéatosé ou non et caractéristiques de la stéatose.....	73
Figure 16 : Effets individuels et en mélange des pesticides sur l'accumulation des lipides	158
Figure 17 : Effets des dithiocarbamates, de l'éthylène thiourée et du manganèse sur l'accumulation des lipides.....	160
Figure 18 : Effets du mélange, des dithiocarbamates et du manganèse sur l'accumulation de triglycérides.....	161
Figure 19 : Impact des dithiocarbamates et de l'ion manganèse sur l'import des acides gras ..	163
Figure 20 : Effets du mélange, des dithiocarbamates et du manganèse sur la lipogénèse de novo	165
Figure 21 : Effets du mélange, des dithiocarbamates et du manganèse sur le catabolisme des acides gras par β -oxydation.....	166
Figure 22 : Impact des dithiocarbamates et de l'ion manganèse sur la sécrétion des VLDL.....	168
Figure 23 : Expression génique de marqueurs du stress du réticulum endoplasmique.....	169
Figure 24 : Inhibition de l'activité et de l'expression génique des cytochromes P450 2E1 et 3A4 par le mélange de pesticides	171
Figure 25 : Inhibition de l'activité et de l'expression génique des cytochromes P450 2E1 et 3A4 par les dithiocarbamates et l'ion manganèse	173
Figure 26 : Altération de l'activité et de l'expression génique d'enzymes de détoxification par les dithiocarbamates et l'ion manganèse	176
Figure 27 : Impact des dithiocarbamates sur l'expression des récepteurs nucléaires	178
Figure 28 : Impact des dithiocarbamates et de l'ion manganèse sur la biotransformation du diazinon et du chlorpyrifos	181
Figure 29 : Effets des pesticides sur la prolifération des progéniteurs HepaRG et sur leur différenciation en cellules hépatocytes-like	207

Figure 30 : Expression génique de la cytokine inflammatoire IL-6 dans les cellules exposées aux pesticides	218
---	------------

Figure supplémentaire 1 : Structures et références des pesticides	191
Figure supplémentaire 2	192
Figure supplémentaire 3 : Effets individuels ou en mélange des pesticides sur la viabilité cellulaire	194
Figure supplémentaire 4 : Activité et expression génique d'enzymes majeures de détoxification après deux jours d'exposition aux dithiocarbamates et l'ion manganèse	195
Figure supplémentaire 5 : Impact de l'exposition pendant deux jours des dithiocarbamates et de l'ion manganèse sur la biotransformation du diazinon et du chlorpyrifos	196

TABLEAUX

Tableau 1 Exemple de pesticides fréquemment retrouvés dans l'alimentation.....	62
Tableau 2 : Métabolisme des pesticides fréquemment retrouvés dans l'alimentation	67
Tableau 3 : Hépatotoxicité des pesticides fréquemment retrouvés dans l'alimentation	68
Tableau 4 : Impact des pesticides fréquemment retrouvés dans l'alimentation sur la stéatose..	69

Tableau supplémentaire 1 : Acceptable Daily Intake (ADI) ou dose acceptable journalière.....	192
Tableau supplémentaire 2.....	193
Tableau supplémentaire 3 : Séquences des amorces utilisées pour les quantifications d'expression de gènes par RT-qPCR.....	193

INTRODUCTION

I-LE FOIE ET SES FONCTIONS MAJEURES**I-LE FOIE ET SES FONCTIONS MAJEURES**

Le foie est l'un des organes les plus imposant chez l'Homme avec en moyenne un poids de 1,5kg, il présente une structure et une vascularisation particulièrement complexes (Lautt and Greenway, 1987). En effet, il est organisé en lobules de forme hexagonale dans lesquels le sang entre par la veine porte et l'artère hépatique au niveau des sommets. A l'inverse, la bile rejoint l'intestin via le canal biliaire, il y a donc une circulation bilatérale du sang et de la bile. Les lobules sont composés de plusieurs types cellulaires ; les hépatocytes et les cholangiocytes constituent respectivement les premières et les deuxièmes cellules hépatiques les plus abondantes, les cellules étoilées, les cellules de Küpffer et les cellules sinusoïdales (Stanger, 2015). Chaque type cellulaire possède des fonctions uniques. En effet, les hépatocytes jouent à la fois un rôle en tant que cellules endothéliales mais également dans le maintien des fonctions du foie. Les cholangiocytes ou cellules épithéliales biliaires forment les canaux biliaires, les cellules étoilées peuvent être actives ou quiescentes et sont impliquées dans le stockage de vitamine A. Les cellules de Küpffer en tant que macrophages résidents du foie ont un rôle prédominant dans l'inflammation en cas de présence de pathogène dans le sang provenant de la veine porte. Enfin, les cellules sinusoïdales forment une barrière perméable entre le système sanguin et les hépatocytes ce qui favorise les échanges entre le sang et le parenchyme hépatique (Malarkey et al., 2005).

Cette organisation spécifique et les différents types cellulaires qui le composent, permettent au foie d'assurer ses nombreuses fonctions indispensables au maintien de l'homéostasie. Il est notamment impliqué dans la régulation du volume sanguin, l'homéostasie glucidique et lipidique, la production et la sécrétion de la bile, la synthèse d'acides aminés et de protéines ou encore la détoxification des xénobiotiques.

I-LE FOIE ET SES FONCTIONS MAJEURES**A- Métabolisme des acides gras**

L'un des rôles majeurs du foie est le métabolisme des acides gras qui proviennent non seulement de l'alimentation mais également de sources endogènes. Les acides gras issus de l'alimentation sont transportés dans le plasma à l'intérieur de chylomicrons sous forme de triglycéride formés et sécrétés par les entérocytes (Havel, 1994; Iqbal and Hussain, 2009). La plupart de ces complexes sont absorbés au niveau des tissus musculaires et adipeux, cependant, le reste des chylomicrons est endocyté par les hépatocytes ce qui conduit à la libération des triglycérides (Cohen and Fisher, 2013).

L'une des sources endogènes d'acides gras provient des tissus adipeux, en période de jeun. Associée à une faible concentration d'insuline plasmatique, les tissus adipeux sont capables de relarguer des acides gras dans la circulation sanguine. En effet, lors de la lipolyse adipocytaire, les triglycérides provenant notamment de l'alimentation et qui ont été stockés sont convertis en acides gras et peuvent ainsi être absorbés au niveau hépatique (Barrows and Parks, 2006).

Absorption des acides gras libres

Dans la circulation sanguine, les acides gras libres sont liés à l'albumine, ce qui les rend solubles et favorise leur transport (Kendall, 1941). La captation des acides gras par les hépatocytes nécessite une dissociation du complexe qui permet aux acides gras de se lier aux protéines intracellulaires impliquées dans l'absorption de ces derniers. Plusieurs protéines ont été décrites ; *plasma membrane fatty acid-binding protein* (FABPpm), *fatty acid translocase* (FAT/CD36), *fatty acid transport protein* (FATP) et *caveolin-1* (Doege et al., 2006; Pohl et al., 2002; Van Nieuwenhoven et al., 1995; Zhou et al., 1998a). Il existe également une diffusion passive des acides gras par la membrane plasmique des cellules. Enfin, l'absorption est

I-LE FOIE ET SES FONCTIONS MAJEURES

dépendante de la concentration plasmatique en acide gras, elle peut également être régulée par la modulation de l'expression de CD36 via les facteurs de transcription *aryl hydrocarbon receptor* (AhR) ou *Pregnane X receptor* (PXR) (Lee et al., 2010; Zhou et al., 2006).

Lipogenèse *de novo*

La deuxième source majeure d'acides gras endogènes provient de la lipogenèse *de novo* (LDN) (Figure 1). Ce processus a lieu lorsque les glucides sont en excès dans le foie, il permet de former des acides gras à partir du glucose (Hudgins et al., 1996). Le pyruvate synthétisé à partir du glucose par la chaîne de réactions enzymatiques appelée glycolyse est importé dans la mitochondrie. C'est dans cet organite que le pyruvate est oxydé via le cycle de Krebs et dont la première étape produit du citrate à partir de l'acétyl-CoA. Le citrate ainsi formé rejoint le cytosol où il est converti en acétyl-CoA par l'ATP citrate lyase (ACLY), cette réaction est la première étape de la *lipogenèse de novo*. La suivante est catalysée par l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) qui carboxyle l'acétyl-CoA ce qui produit le malonyl-CoA. Enfin la *fatty acid synthase* (FAS), l'enzyme clé dans la synthèse d'acides gras permet la transformation du malonyl-CoA en palmitate. Ce dernier peut ensuite être modifié en divers acides gras par l'action d'élongases et de désaturases (Ameer et al., 2014).

La régulation de la lipogenèse *de novo* est principalement due à deux facteurs de transcriptions ; la *carbohydrate response element binding protein* (ChREBP) et la *sterol regulatory element binding protein 1C* (SREBP1c). La translocation vers le noyau de ChREBP et SREBP1c est régulée, respectivement, par l'excès de glucose dans le plasma capté par le foie et la concentration d'insuline plasmatique. Ces deux facteurs de transcriptions induisent l'expression des enzymes impliqués dans la lipogenèse *de novo* (Filhoulaud et al., 2013; Horton et al., 2002; Iizuka et al., 2004).

I-LE FOIE ET SES FONCTIONS MAJEURES

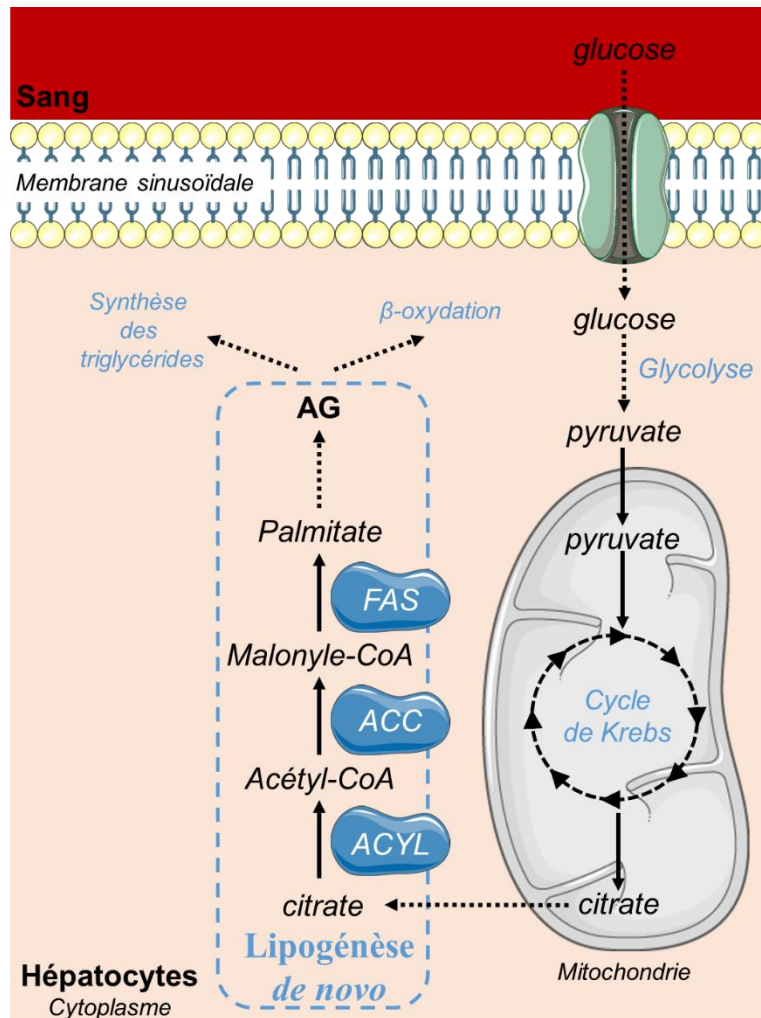


Figure 1 : Schéma simplifié de la lipogénèse de novo

Une concentration intracellulaire importante en glucose conduit à une synthèse de pyruvate par glycolyse. Lorsqu'il est importé dans la mitochondrie, il est converti en citrate à l'issue du cycle de Krebs. Le citrate nouvellement formé rejoint le cytosol où il est transformé en acétyl-CoA par l'ATP citrate lyase (ACYL) lors de la première étape de la lipogénèse de novo. L'étape suivante est catalysée par l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) ce qui forme du malonyle-CoA à partir de l'acétyl-CoA. La troisième réaction implique la fatty acid synthase (FAS) et permet la formation du palmitate. Enfin, le palmitate peut être modifié sous l'action d'un certain nombre d'élongases et de désaturases conduisant à la production de divers acides gras (AG). Ces derniers peuvent ensuite entrer dans la synthèse des triglycérides ou être dégradés par β-oxydation.

I-LE FOIE ET SES FONCTIONS MAJEURES

Métabolisme des triglycérides

Les triglycérides (TG) représentent la principale forme sous laquelle les acides gras sont stockés et exportés dans le foie. Le statut hormonal et nutritionnel régule l'équilibre entre le stockage et l'export ce qui permet de maintenir l'homéostasie des besoins énergétiques.

Synthèse des triglycérides

Dans le cytoplasme, les acides gras libres issus des sources endogènes et exogènes sont thioestérifiés en acyl-CoA (Figure 2). Cette réaction indispensable à leur activation est catalysée par l'*acyl-CoA synthétase* (ACS). Sous l'action des *glycerol-3-phosphate acyltransférase* (GPAT) microsomales et mitochondriales, l'acyl-CoA et le glycérol-3-phosphate (G3P) forment l'acide lysophosphatidique (LPA). A son tour, le LPA est acétylé à la membrane du réticulum endoplasmique (RE) par l'*acylglycerole-3-phosphate acyltransferase* (AGPAT). L'acide phosphatidique (PA) ainsi formé est converti en diacylglycérol (DG) par une déphosphorylation catalysée par la Liptin aussi appelée *phosphatidate phosphohydrolase* (PAP). La dernière étape de la synthèse des TG correspond à l'acétylation du diacylglycérol par la *diacylglycerol acyltransferase* (DGAT) (Coleman and Mashek, 2011).

La synthèse des TG est modulée à la fois par le statut hormonal et nutritionnel notamment via les facteurs de transcription SREBP-1C et ChREBP (Ericsson et al., 1997; Meegalla et al., 2002).

I-LE FOIE ET SES FONCTIONS MAJEURES

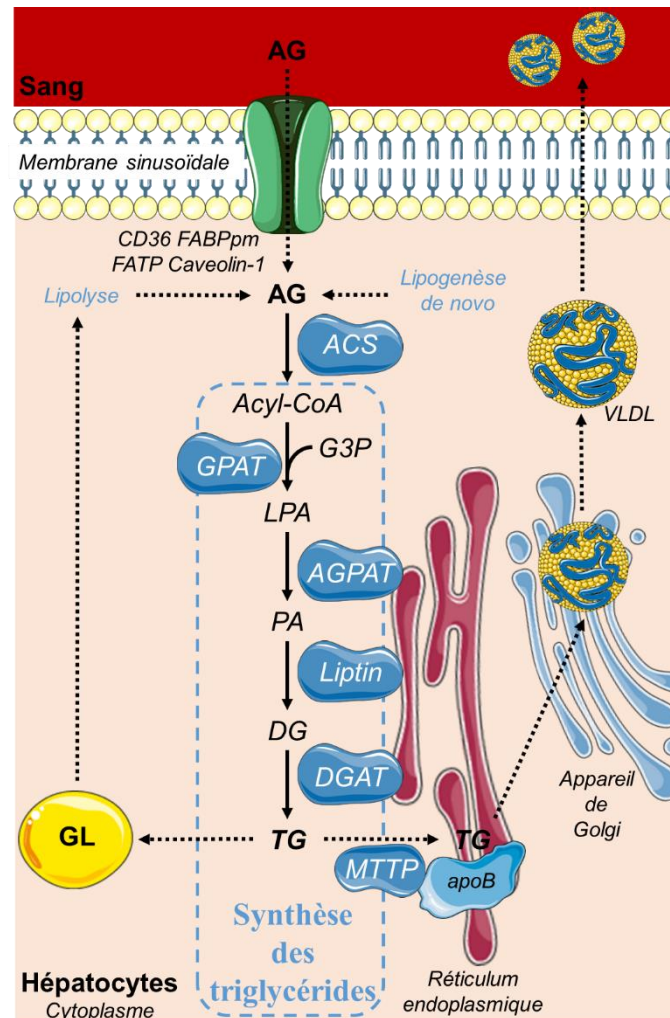


Figure 2 : Schéma simplifié de la synthèse et de l'export des triglycérides

Les acides gras (AG) issus de la circulation sanguine ou des phénomènes de lipogenèse de novo ou lipolyse sont thioestérifiés par l'acyl-CoA synthase (ACS). La première étape de la synthèse des triglycérides consiste à former l'acide lysophosphatidique (LPA) à partir de l'acyl-CoA et de glycérol-3-phosphate (G3P) par l'action de la glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT). Les trois étapes suivantes sont catalysées dans l'ordre par l'acylglycérol-3-phosphate acyltransférase (AGPAT), la liptin et la diacylglycérol acyltransférase (DGAT) qui sont présentes à la membrane du réticulum endoplasmique. Le LPA est successivement converti en acide phosphatidique (PA), en diacylglycérol (DG) et enfin en triglycérides (TG). Les TG ainsi formés peuvent être stockés sous forme de gouttelettes lipidiques (GL) qui pourront par lipolyse reformer des AG. La sécrétion des TG est initiée à la membrane du RE, la microsomal

I-LE FOIE ET SES FONCTIONS MAJEURES

triglyceride transfer protein (MTTP) incorpore un TG à l'apolipoprotéine B (apoB) nouvellement synthétisée. Ce complexe correspond à une very low density lipoprotein (VLDL) naissante, durant son transit du RE vers l'appareil de Golgi elle s'enrichit en TG. La VLDL est ensuite exportée dans une vésicule formée à partir de la membrane de l'appareil de Golgi. Cette vésicule fusionne avec la membrane sinusoidale de l'hépatocyte, libérant le VLDL dans la circulation sanguine.

Stockage des triglycérides

L'accumulation des TG nouvellement synthétisés conduit à un bourgeonnement de la membrane du RE qui, à terme, forme une gouttelette lipidique (GL) (Figure 2). Elles sont constituées de lipides neutres, majoritairement des TG, entourés d'une monocouche de phospholipides provenant du RE (Tauchi-Sato et al., 2002). Il existe un certain nombre de protéines associées à la membrane des GL dont les plus abondantes sont les *perilipines* (PLIN) mais aussi les DGAT et GPAT. La protéine PLIN1 est plutôt exprimée dans les adipocytes où elle serait impliquée dans la stabilisation des GL alors que PLIN2 et PLIN3 sont présents à la surface des GL dans les hépatocytes (Fujimoto et al., 2004; Straub et al., 2008).

La formation des GL permet non seulement de limiter la lipotoxicité inhérente des acides gras par stockage, mais est également un moyen efficace de répondre aux besoins énergétiques de la cellule. Cette deuxième fonction a récemment été illustrée par une association des GL à différents organites dépendant du statut nutritionnel (Valm et al., 2017).

I-LE FOIE ET SES FONCTIONS MAJEURES

Sécrétion des triglycérides

Le foie est capable de sécréter les TG via la synthèse de particules de lipoprotéines de très basse densité (VLDL) (Figure 2). C'est au niveau du RE que les lipides neutres, en particulier les TG sont entourés par une membrane de phospholipide et des apolipoprotéines formant ainsi les VLDL (Pan et al., 2002).

Deux étapes ont été décrites dans la formation des VLDL. La première, favorisée par l'action de la *microsomal triglyceride transfer protein* (MTTP), correspond à l'incorporation d'un TG à l'apolipoprotéine B ou apoB100 (apoB) nouvellement synthétisée au RE (Khatun et al., 2012). Cet ajout de lipides à l'apoB favorise sa demi-vie, en effet, cette protéine est rapidement adressée au protéasome en absence de lipides, la formation des VLDL est donc étroitement liée à la quantité de TG disponible (Zhou et al., 1998b). Lors de la deuxième étape, la VLDL naissante transite du RE vers l'appareil de Golgi où elle fusionne avec les TG, ce qui l'enrichit en lipides et forme la VLDL (Gusarova et al., 2007) La VLDL est ensuite exportée, dans une vésicule formée à partir de la membrane de l'appareil de Golgi, vers la membrane sinusoidale des hépatocytes avec laquelle elle fusionne ce qui libère la VLDL dans la circulation sanguine (Hossain et al., 2014). Le foie peut ainsi répondre aux besoins en acides gras des tissus adipeux ou encore des muscles en fonction de l'état nutritionnel de l'organisme.

Catabolisme des acides gras

Il existe plusieurs voies d'oxydation des acides gras impliquées dans leur catabolisme.

L' ω -oxydation, catalysée par le cytochrome P450 (CYP) et la *NADPH-cytochrome c réductase*, a lieu dans le réticulum endoplasmique (Wada et al., 1968). La β -oxydation peroxysomale, prend en charge l'oxydation des acides gras à très longue chaîne qui, une fois réduits de quelques carbones, sont dégradés par la β -oxydation mitochondriale (Wanders et al., 2020).

I-LE FOIE ET SES FONCTIONS MAJEURES

 β -oxydation

La β -oxydation mitochondriale est la voie majoritaire de dégradation des acides gras, elle est particulièrement sollicitée lorsque les taux de glucose et de glucagon sont faibles (Figure 3). En effet, elle est une source importante de production d'ATP via le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative qui sont alimentés respectivement par une production d'acétyl-CoA, une réduction de la flavine adénine dinucléotide (FAD^+) et de la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+). L'acétyl-CoA est également synthétisé en acétoacétate, acétone et 3-hydroxybutyrate lors de la cétogénèse, les corps cétoniques ainsi formés rejoignent la circulation sanguine et représentent une source d'énergie notamment pour le cerveau ou les muscles (Fukao et al., 2004).

Tout comme pour la lipogénèse *de novo*, la β -oxydation nécessite la thioestérification des acides gras libres en acyl-CoA par l'action de l'ACS. La mitochondrie étant imperméable aux acyl-CoA à longue et moyenne chaîne, leur import dans la mitochondrie nécessite le transfert du groupe acyl à la L-carnitine. Cette réaction est catalysée par la *carnitine palmitoyltransférase-1* (CPT1) présente à la membrane externe des mitochondries. Ainsi, l'acylcarnitine est transportée à l'intérieur de la mitochondrie par la *carnitine acylcarnitine translocase* (CACT) en échange d'une L-carnitine libre. Enfin, la *carnitine palmitoyltransférase-2* (CPT2), enchâssée dans la membrane interne, catalyse le transfert du groupe acyl au coenzyme A ce qui reconvertit l'acylcarnitine en acyl-CoA. Les CPT1 et CPT2 sont actives pour les acyl-CoA entre 8 et 20 carbones (C8 à C20) (Schaefer et al., 1997; Violante et al., 2010).

La β -oxydation à partir de ces acyl-CoA correspond à un cycle de quatre réactions enzymatiques qui conduisent à la perte de deux carbones de la chaîne de l'acyl-CoA. La première étape du cycle consiste à ajouter une double liaison à la chaîne de l'acyl-CoA, ce qui le transforme en trans-2-enoyl CoA par l'action de l'*acyl-CoA déshydrogénase* (CAD). Il existe différentes CAD en fonction de la longueur de l'acide gras à dégrader; la *very long-chain CAD* (VLCAD), la

I-LE FOIE ET SES FONCTIONS MAJEURES

medium-chain CAD (MCAD) et la *short-chain CAD* (SCAD). La production de FADH₂ dans cette étape conduit à un transfert d'électron à la chaîne respiratoire. Pour les acyl-CoA à longue chaîne, les trois activités enzymatiques nécessaires aux trois dernières étapes sont portées par une seule protéine, la *mitochondrial trifunctional protein* (MTP) (Carpenter et al., 1992). A l'inverse, les acyl-CoA à chaînes moyenne et courte nécessitent trois enzymes distinctes présentes dans la matrice mitochondriale (Houten and Wanders, 2010). Ainsi, lors de la seconde étape, l'hydratation du 2-trans-enoyl CoA formant le 3-hydroxyacyl-CoA est catalysée par l'*enoyl-CoA hydratase* (EH). A son tour, le 3-hydroxyacyl-CoA est oxydé en 3-ketoacyl-CoA par la *3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase* (HAD). Cette troisième étape du cycle est une source d'électron pour la chaîne respiratoire puisqu'elle réduit le NAD⁺. Enfin, la *ketoacyl-CoA thiolase* (KAT) clive le 3-ketoacyl-CoA ce qui libère un acétyl-CoA et l'acyl-CoA de départ réduit de deux carbones, qui peut de nouveau entrer dans un cycle de β -oxydation (Adeva-Andany et al., 2019).

Le catabolisme des acides gras étant majoritairement actif en période de jeûne, la β -oxydation est modulée en fonction des besoins énergétiques. Lorsque le taux d'ATP chute au profit du taux d'AMP, ce dernier active l'*AMP-activated protein kinase* (AMPK), ce qui inactive par phosphorylation l'ACC et par conséquent diminue les taux de malonyl-CoA. De même, l'activation des *Peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR) par certains acides gras induit la transcription de la *malonyl-CoA decarboxylase* (Houten et al., 2016). Ces deux régulations inhibent la synthèse du malonyl-CoA, qui est un inhibiteur de CPT1, l'enzyme clé de la β -oxydation des acides gras (McGarry et al., 1977). Cette inhibition révèle un lien direct entre LDN et β -oxydation ce qui illustre parfaitement l'équilibre de la dynamique du métabolisme des glucides et des acides gras au sein du foie.

I-LE FOIE ET SES FONCTIONS MAJEURES

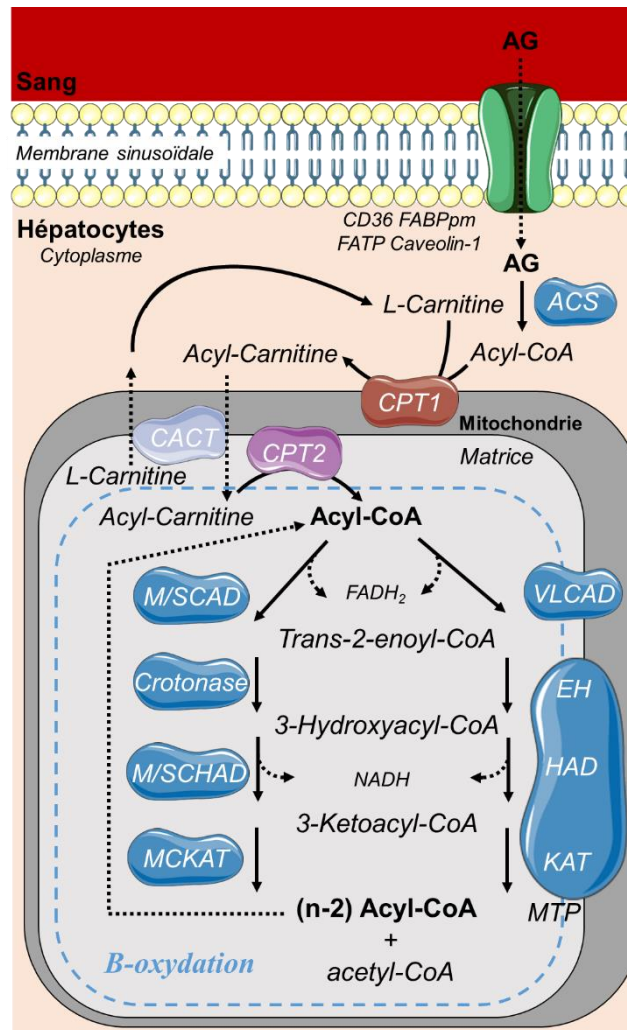


Figure 3 : Schéma simplifié du catabolisme des acides gras par β-oxydation

Les acides gras (AG) à longue et moyenne chaîne sont thioestérifiés par l'acyl-CoA synthase (ACS). Les acyl-CoA ainsi synthétisés sont incapables de passer la membrane mitochondriale. Le transfert du groupe acyl à la L-carnitine catalysé par la carnitine palmitoyltransférase-1 (CPT1) forme l'acyl-carnitine. Sous l'action de la carnitine acylcarnitine translocase (CACT), l'acyl carnitine entre dans la matrice mitochondriale et la L-carnitine en sort. La carnitine palmitoyltransférase-2 (CPT2) reconverti l'acyl carnitine en acyl-CoA. L'acyl-CoA ainsi transporté subit un cycle de quatre réactions qui permet de diminuer sa chaîne de deux carbones qui peut alors de nouveau entrer dans un cycle de β-oxydation. Si l'acyl-CoA est à chaîne longue, sa dégradation nécessite la very long-chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD) et la mitochondrial trifunctional protein (MTP) qui possèdent les activités enzymatiques ;

I-LE FOIE ET SES FONCTIONS MAJEURES

enoyl-CoA hydratase (EH), 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HAD) et ketoacyl-CoA thiolase (KAT). Pour les acyl-CoA à chaînes moyenne et courte, la première réaction est catalysée respectivement par la medium-chain CAD (MCAD) et la short-chain CAD (SCAD). Les réactions suivantes sont catalysées par la crotonase, la medium/short chain HAD (M/SCHAD) et la medium chain KAT (MCKAT). La première réaction génère la flavine adénine dinucléotide (FADH₂). De même, la troisième étape réduit la Nicotinamide adénine dinucléotide (NADH).

B-Détoxification des xénobiotiques

Un autre rôle majeur du foie est la détoxification des xénobiotiques. En effet, un important volume sanguin en provenance de l'intestin via le système porte, passe par le foie, ce qui en fait un organe de choix pour l'élimination des xénobiotiques et c'est d'ailleurs par cette voie qu'une grande partie des xénobiotiques sont éliminés. Les xénobiotiques ont été définis, par le Dr Howard Mason, comme les composés chimiques exogènes auxquels un organisme est exposé (Croom, 2012). Que ces composés exogènes soient issus de l'alimentation, l'environnement, l'industrie ou les médicaments, ils sont en règle générale apolaires ce qui favorise leur diffusion à travers les membranes biologiques. Du fait de leur nature lipophile, ils ne sont pas éliminés en tant que tels et ont tendance à s'accumuler ce qui peut provoquer une toxicité (Grant, 1991). Cependant, les réactions catalysées par les enzymes de biotransformation, lors du métabolisme des xénobiotiques, permettent d'éliminer leurs dérivés par excrétion rénale ou biliaire (Rowland et al., 2013). Les réactions du métabolisme des xénobiotiques peuvent être divisées en phases 0, I, II et III (Barnes, 1960; Döring and Petzinger, 2014) (Figure 4).

I-LE FOIE ET SES FONCTIONS MAJEURES

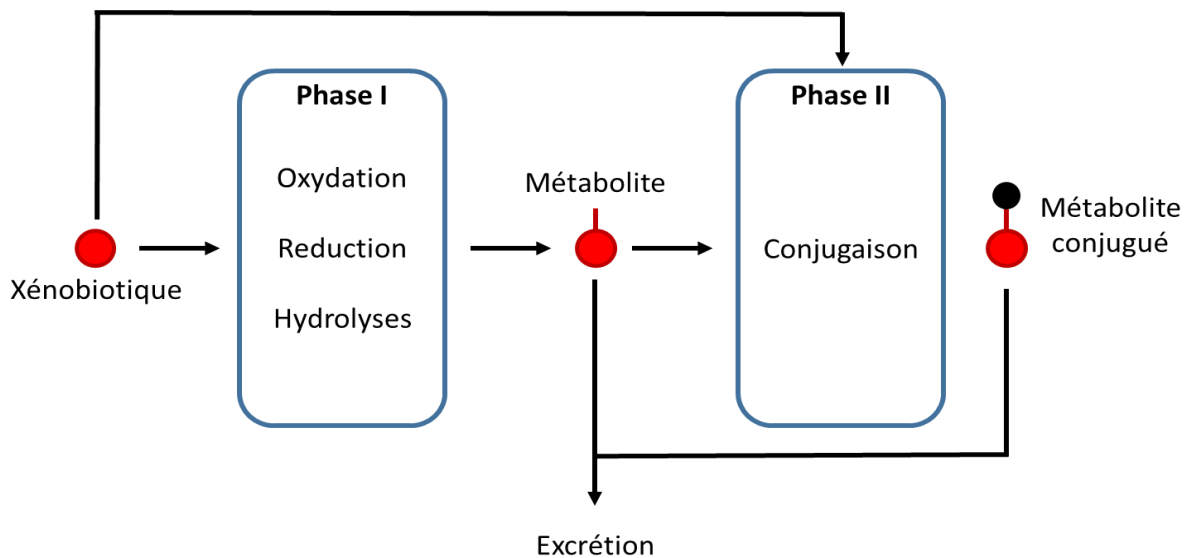


Figure 4 : Schéma de la détoxification par les enzymes de biotransformation des xénobiotiques

Adapté de Grant, 1991

Phase O

La phase O correspond à l'entrée des xénobiotiques dans la cellule. Au niveau hépatique les xénobiotiques majoritairement apolaires, contenus dans le sang passe par la membrane sinusoidale de manière passive. L'entrée des xénobiotiques polaires nécessite les transporteurs de la famille des *solute carrier* (Döring and Petzinger, 2014).

Phase I

La phase I se déroule en une seule réaction et peut être une oxydation, une réduction ou une hydrolyse. Lors de cette phase, un groupement fonctionnel (par exemple un hydroxyle) est ajouté au composé lipophile ce qui permet de le rendre hydrophile auquel cas il peut être excrété ou bien, dans la majorité des cas, entrer dans les réactions de la phase II.

I-LE FOIE ET SES FONCTIONS MAJEURES

Cytochrome P450

Parmi les enzymes de biotransformation de la phase I, les cytochromes P450 (CYP) sont impliqués dans 90% des réactions de fonctionnalisation (Rendic and Guengerich, 2015). Il existe au moins 57 gènes codant pour les CYP450 chez l'Homme. Il s'agit d'enzymes ubiquitaires présentes chez tous les êtres vivants ce qui traduit leur importance. Chez les mammifères, les gènes codant pour les CYP sont très exprimés dans le foie (Liu et al., 2021). Les CYP sont des hémoprotéines qui ont une activité monooxygénase. Malgré le grand nombre de famille et d'isoformes, la réaction de monooxygénation catalysée par les CYP est très similaire et correspond à : $\text{RH} + \text{O}_2 + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{ROH} + \text{H}_2\text{O}$ (Figure 5).

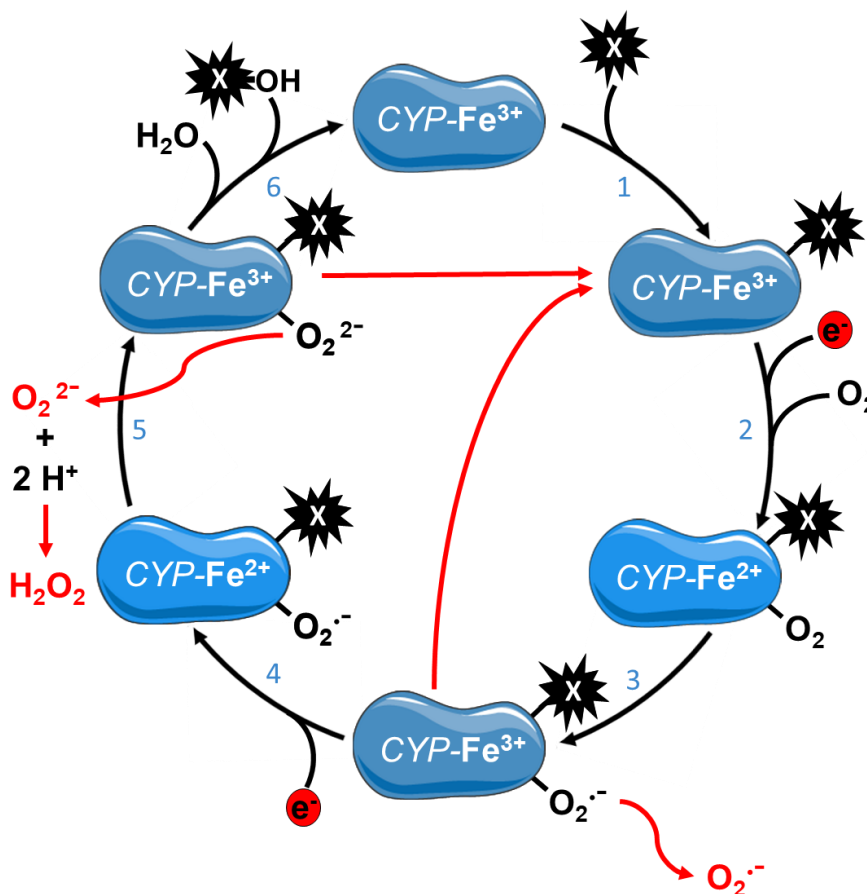


Figure 5 : Schéma du cycle catalytique des cytochromes P450 et espèces réactives de l'oxygène

I-LE FOIE ET SES FONCTIONS MAJEURES

Les xénobiotiques (X) sont liés aux cytochromes P450 (CYP) lors de la première étape du cycle catalytique (1). L'oxydation d'un CYP ferrique (CYP-Fe³⁺) en CYP ferreux (CYP-Fe²⁺) est réalisée lors de la deuxième étape (2) par la captation d'un électron (e⁻) permettant la liaison à un oxygène (O₂). Un e⁻ de l'O₂ peut être transféré à l'ion ferreux (Fe²⁺) durant la troisième étape (3), l'oxygène est alors réduit en anion superoxyde (O₂⁻). (4) Si un second e⁻ est ajouté au CYP-Fe³⁺ son ion ferrique (Fe³⁺) est de nouveau oxydé. Durant la cinquième étape (5), l'O₂⁻ peut à nouveau être réduit conduisant à un peroxyde (O₂²⁻). Enfin, l'hydroxylation (6) est catalysée par le CYP-Fe³⁺ qui transfère un atome d'oxygène (O) au X et l'autre O produit de l'eau (H₂O). Les CYP peuvent générer des espèces réactives de l'oxygène (ERO), l'O₂⁻ et l'O₂²⁻. Dans le cas d'une libération de l'O₂⁻, il devient une ERO et le CYP peut de nouveau subir l'étape 2 puisqu'il reste lié au X. De même, l'O₂²⁻ s'il est libéré, devient une ERO et peut générer avec deux protons (H⁺) un peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Adapté de (Davydov et al., 2001; Koop, 2006)

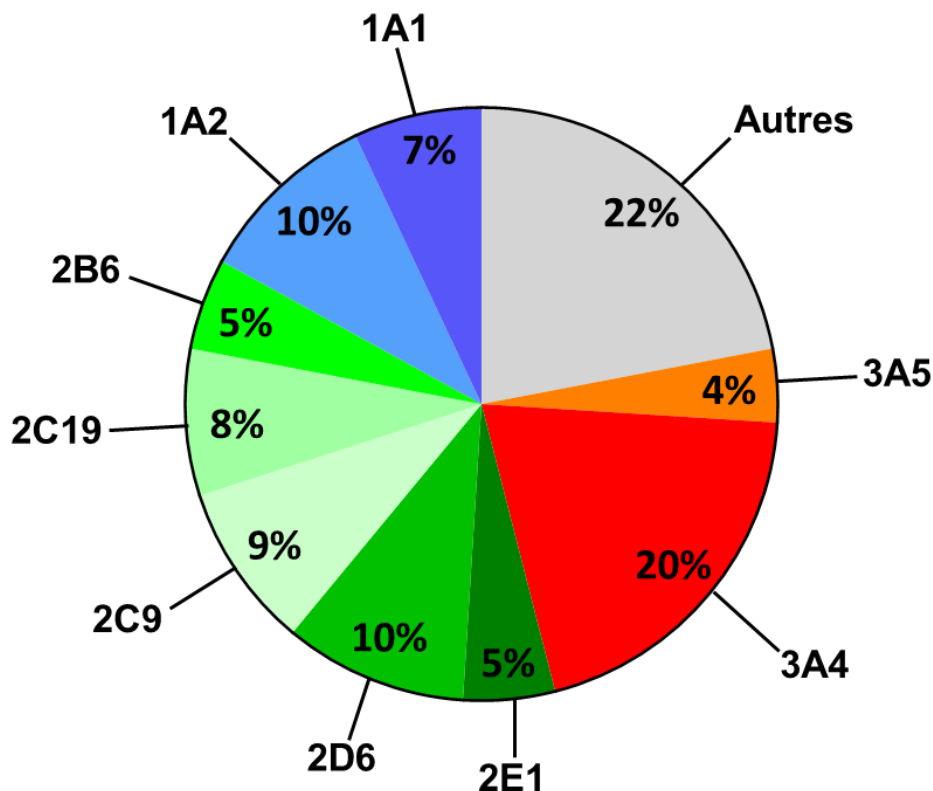


Figure 6 : Principaux cytochromes P450 impliqués dans la détoxification des xénobiotiques

La participation des cytochromes est exprimée en pourcentage et correspond à l'analyse de 1829 composés chimiques. Adapté de Rendic and Guengerich 2015

I-LE FOIE ET SES FONCTIONS MAJEURES

Les CYP sont classées en différentes familles et les isoformes des familles CYP1, CYP2 et CYP3 sont connues pour transformer la plupart des xénobiotiques (Rendic and Guengerich, 2015) (Figure 6).

CYP1

Parmi la famille CYP1, l'isoforme CYP1A1 se démarque des autres CYP car il est majoritairement exprimé dans le poumon. Le CYP1A2, quant à lui, est exprimé uniquement dans le foie.

CYP2

Cette famille comprend le plus de membres, ils ont par ailleurs des sites actifs très différents ce qui rend leurs substrats plus spécifiques que les membres des autres familles qui partagent un grand nombre de substrats (Zhao et al., 2021). Parmi les isoformes de cette famille, le CYP2B6, CYP2D6, CYP2C19 ou encore le CYP2E1 sont bien connus pour leur rôle dans la détoxification des xénobiotiques (Figure 6).

CYP3

Contrairement aux isoformes de la famille CYP2, les membres de la famille CYP3 partagent un grand nombre de substrats. La sous famille CYP3A est la famille la plus abondante dans le foie. De plus, le CYP3A4 est responsable de la métabolisation d'environ 20% des xénobiotiques (Rendic and Guengerich, 2015) (Figure 6).

I-LE FOIE ET SES FONCTIONS MAJEURES

Les enzymes de biotransformation de la phase I peuvent être modulées par un certain nombre de facteurs. En effet, l'âge, le sexe, l'environnement peuvent inhiber ou activer ces enzymes. Il faut noter que les xénobiotiques eux-mêmes sont capables de moduler l'expression des CYP via leur liaison directe aux récepteurs nucléaires et la modification de leur activité transcriptionnelle (Manikandan and Nagini, 2018). Par exemple PXR, CAR (carbohydrate receptor) et Ahr sont connus pour induire respectivement l'expression du CYP3A4, CYP2B6 et CYP1A (Tompkins and Wallace, 2007).

Phase II

Contrairement à la phase I, la phase II du métabolisme des xénobiotiques est souvent composée de plusieurs réactions chimiques. Durant cette seconde phase, les enzymes de biotransformation réalisent une conjugaison qui peut être par exemple une glucuronidation, une sulfatation ou une conjugaison de glutathion. Quel que soit le type de conjugaison, elles sont rendues possibles par la fonctionnalisation effectuée lors de la phase I. La conjugaison rend plus hydrophile et moins active chimiquement la molécule de départ et favorise une élimination efficace par le système rénal ou biliaire (Figure 4).

UGT

Les UDP-glucuronosyltransférases (UGT) catalysent la glucuronidation (Figure 7). Chez l'Homme 40 à 70% des glucuronidations de médicaments impliquent les UGT (Wells et al., 2004). Cette réaction correspond à la formation d'une liaison covalente entre le groupement fonctionnel de la molécule issue de la phase I et l'uridine diphosphate acide glucuronique conduisant à la formation d'un conjugué glucuronide et d'une uridine diphosphate (Jancova et al., 2010).

I-LE FOIE ET SES FONCTIONS MAJEURES

Chez l'Homme, il existe 4 familles d'UGT mais les familles UGT1 et UGT2 sont les plus abondamment exprimées dans le foie (Izukawa et al., 2009). De plus, les UGT1A1, 1A3, ou encore 2B7 font parties des enzymes considérées comme les plus importantes dans le métabolisme des xénobiotiques (Miners et al., 2010).

SULT

La sulfatation est une voie importante dans la détoxification des xénobiotiques (Figure 7). Cette voie est favorisée par les sulfotransférases qui permettent la conjugaison du sulfonate (SO_3^-) provenant du 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulphate (PAPS) avec un groupement hydroxyle ou amine (O-, N- ou S-) du xénobiotique (Gamage et al., 2006). Le PAPS est un donneur de sulfate produit par tous les tissus chez l'Homme. De plus, les sulfotransférases (SULT) sont exprimées dans tous les tissus ce qui en fait un système de détoxification efficace. Chez l'Homme, il existe 4 familles de SULT ; SULT1, SULT2, SULT4 et SULT6, dans le foie la SULT1A1 est la plus fortement exprimée (Jancova et al., 2010).

GST

Les glutathion S-transférases (GST) font partie des enzymes majeures de phase II en plus de jouer un rôle important dans la protection contre le stress oxydant (Figure 7). Les GST favorisent la formation d'une liaison thio-éther entre le glutathion réduit (GSH) et le xénobiotique (Jancova et al., 2010). De plus, elles sont capables de neutraliser les espèces réactives de l'oxygène (ERO) produites notamment lors de la phase I par les CYP (Sheehan et al., 2001). Il existe chez l'Homme quatre classes de GST cytosoliques nommées Alpha, Mu, Pi et Thêta.

I-LE FOIE ET SES FONCTIONS MAJEURES

Phase III

Enfin, l'excrétion des xénobiotiques rendus hydrophiles nécessite des transporteurs de la famille des *ATP binding cassette carriers* (Döring and Petzinger, 2014). Ces transporteurs permettent l'export des métabolites hydrophiles dans la bile et le sang favorisant l'élimination notamment par le système rénal et biliaire.

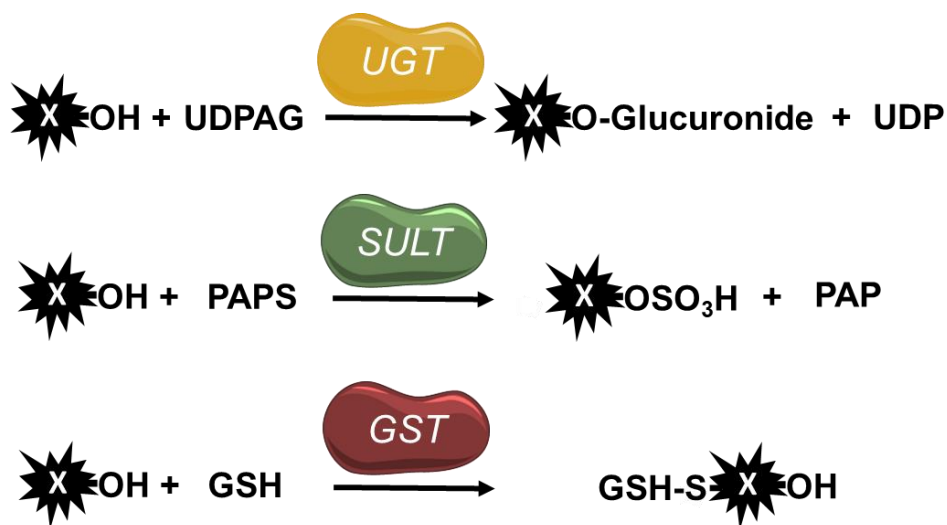


Figure 7 : Schéma des principales réactions de la phase II de la biotransformation des xénobiotiques

L'UDP-glucuronosyltransférase (UGT) catalyse la formation d'une liaison covalente entre l'hydroxyle du xénobiotique issu de la phase I et le glucuronide de l'uridine diphosphate acide glucuronique (UDPAG) formant l'uridine diphosphate (UDP) et un conjugué glucuronide. La sulfotransférase (SULT) catalyse le transfert d'un groupe sulfate (SO_3^-) depuis le 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulphate (PAPS) vers le métabolite de la phase I générant le 3'-phosphoadénosine-5'-phosphate (PAP) et un conjugué sulfaté. La glutathion S-transférase (GST) catalyse la liaison thio-éther entre le glutathion réduit (GSH) et le groupement hydroxyle du xénobiotique formant ainsi un conjugué glutathionylé.

I-LE FOIE ET SES FONCTIONS MAJEURES

Tout comme les enzymes de phase I, celles de phase II peuvent être régulées par les récepteurs nucléaires sous l'influence des xénobiotiques. Par exemple, il a été démontré que l'expression du gène codant pour UGT1A1 était modulée par le methoxychlore, la rifampicine et le benzo(a)pyrène via, respectivement, l'activation de CAR, PXR et AhR (Sugatani et al., 2004). De même, l'inhibition de l'expression de CAR par la xanthohumol est associée à une diminution notamment de SULT1A1 (Radović et al., 2010). Enfin, l'expression de GSTA2 peut être induite par les hydrocarbures aromatiques polycycliques via leur liaison à AhR (Rushmore and Pickett, 1990).

La détoxification des xénobiotiques décrite ci-dessus correspond à la majorité des réactions catalysées par les enzymes de biotransformation. Cependant, les composés exogènes peuvent également être activés par ces mêmes enzymes. Cette réaction, appelée bioactivation, conduit à la formation d'un métabolite plus réactif que la molécule de base.

Un grand nombre de pesticides sont sujets à la formation de métabolites toxiques catalysés à la fois par les enzymes de phase I et II (Hollingworth et al., 1995). Par ailleurs, sur plus de 2000 composés chimiques issus de l'environnement, 29% subissent une bioactivation. En outre, ces bioactivations sont en majeure partie due à l'action des CYP1A1, 1A2, 3A4 ou encore 2E1 (Rendic and Guengerich, 2021).

Dans le cas des composés organophosphorés, tels que le chlorpyrifos, le diazinon ou le parathion, il a été démontré, par exemple, que les CYP3A4, 2B6 ou 2C19 étaient responsables de la formation des métabolites oxon par désulfuration, qui s'avèrent être neurotoxiques (Croom et al., 2010; Mutch and Williams, 2006).

II-TOXICITE

II-TOXICITE

A Espèces réactives de l'oxygène, antioxydant et stress oxydant

Espèces réactives de l'oxygène

Les xénobiotiques, lors de cette détoxification et plus encore lors de leur bioactivation, par les enzymes de phase I, notamment les CYP, sont des sources potentielles d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Figure 5). Par exemple, l'oxydation de l'alcool par le CYP2E1 produit des ERO (Wu and Cederbaum, 1999). En outre, l'exposition aux pesticides tels que le glyphosate, l'imazalil ou encore le manèbe génère des ERO (Ben Amara et al., 2015; Jin et al., 2018; Tang et al., 2017).

Les ERO sont formées par une réduction partielle de l'oxygène (O_2), et sont par définition très réactives car elles peuvent oxyder les constituants cellulaires tels que l'ADN, les protéines ou encore les lipides, ce que l'on appelle la peroxydation lipidique. Il en existe deux types, les radicaux libres tels que les anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) et les hydroxyles ($\cdot OH$, OH^{\cdot}) ou les non radicaux, les oxydants, tel que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). La formation des ERO est due à de multiples sources qui peuvent être endogènes et exogènes.

ERO Mitochondriaux

On peut citer par exemple les ERO issues de la mitochondrie lors de la phosphorylation oxydative (Jensen, 1966) (Figure 8). Lors de ce processus, les électrons provenant des donneurs NADH et $FADH_2$ sont transférés vers les molécules d'oxygène. Le transit des électrons est la résultante des réactions des différents complexes de la chaîne respiratoire dont le passage des électrons d'un complexe vers un autre est effectué par les transporteurs d'électrons (ubiquinone

II-TOXICITE

et cytochrome C). Lorsque les électrons échappent au transit, ils peuvent alors réduire l'O₂ en O₂⁻ (Koopman et al., 2010). Le NADH-ubiquinone oxydoréductase, complexe I de la chaîne respiratoire, est considéré comme la source majeure des ERO mitochondriaux. A l'inverse, le complexe II, succinate-ubiquinone oxidoréductase, n'est pas considéré comme potentiel source des ERO en condition physiologique. Enfin, toujours en condition physiologique, les électrons pris en charge par l'ubiquinol-cytochrome c oxidoréductase (complexe III) ont peu de chance d'échapper aux réactions d'oxydoréduction puisque les réactions sont rapides (Zorov et al., 2014). Ainsi, physiologiquement, la formation des ERO par la chaîne respiratoire mitochondriale est faible, en effet une étude a mis en évidence *in vitro* que 1 à 2 % seulement de l'O₂ consommé par la respiration formait des O₂⁻, de plus les auteurs précisent que ce taux serait bien plus faible en condition *in vivo* (Boveris and Chance, 1973).

En revanche, la perturbation du transfert d'électron par l'inhibition de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire conduit à une production plus importante d'ERO, par exemple il a été démontré que l'inhibition respective des complexes I et III par la roténone et l'antimycine A provoque une augmentation des ions superoxydes (Ramsay and Singer, 1992; Starkov and Fiskum, 2001). En outre, le potentiel de membrane mitochondriale ($\Delta\Psi_m$) dû aux protons et indispensable au bon fonctionnement de la chaîne respiratoire est impliqué dans la production des ERO (Korshunov et al., 1997). Ainsi, une fuite des protons de la matrice mitochondriale vers le cytoplasme pourrait diminuer la production d'ERO par la mitochondrie (Zorov et al., 2014). De plus, les *uncoupling proteins* (UCP) impliquées dans le maintien du $\Delta\Psi_m$ modulent les ERO. En effet, l'inhibition pharmacologique de l'activité d'UCP1 ou UCP2 augmente la production de H₂O₂ et le $\Delta\Psi_m$ (Nègre-Salvayre et al., 1997). Ainsi la mitochondrie est considérée comme une source majeure des ERO.

II-TOXICITE

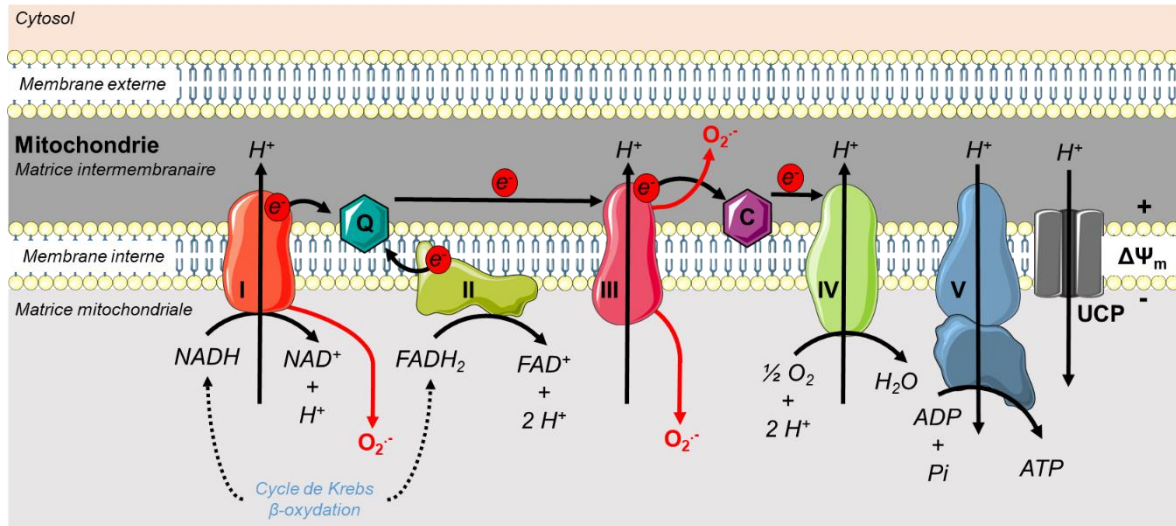


Figure 8 : Schéma simplifié des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et espèces réactives de l'oxygène

Le complexe I de la chaîne respiratoire, NADH-ubiquinone oxydoréductase (I), oxyde le NADH en NAD^+ , ce qui libère un électron (e^-) et permet le transport du proton H^+ vers la matrice intermembranaire. Le complexe II, le succinate-ubiquinone oxydoréductase (II) oxyde le FADH_2 en FAD , ce qui libère un (e^-) et permet le transport d' H^+ . Les e^- issus du complexe I et II sont transférés à l'ubiquinone (Q) qui les transporte à l'ubiquinol-cytochrome c oxydoréductase, complexe III (III) qui à son tour les transferts au cytochrome (C). Le transport des électrons se termine au complexe IV, le cytochrome C oxydase (IV) qui transporte également les H^+ vers la matrice intermembranaire. Les complexes I, II et IV permettent de maintenir le potentiel de membrane mitochondriale ($\Delta\Psi_m$) en transportant les H^+ dans le sens inverse du gradient de concentration. Le $\Delta\Psi_m$ est essentiel pour la production d'ATP par l'ATP synthase (V) qui nécessite le passage passif des H^+ vers la matrice mitochondriale. Les uncoupling protein (UCP) sont également impliquées dans le maintien du $\Delta\Psi_m$. Les e^- échappant aux complexes I et III peuvent réduire l'oxygène (O_2) en anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

II-TOXICITE

Les ERO peuvent être convertis d'une forme à une autre. De fait, les anions superoxydes mitochondriaux ($O_2^{\cdot-}$) sont rapidement convertis en H_2O_2 lors de la dismutation catalysée par les superoxydes dismutases (SOD). Les H_2O_2 peuvent alors être soit transformés en $\cdot OH$ et OH^- par l'ion ferreux lors de la réaction de Fenton, soit détoxifiés par la formation de H_2O et d' O_2 , notamment par action des catalases, glutathion peroxydase (GPX) ou thiorédoxine peroxydase (Kudryavtseva et al., 2016) (Figure 10).

ERO mitochondriaux et cytoplasmiques

Les métaux comme le fer, par la réaction de Fenton décrite ci-dessus, le manganèse ou encore le cadmium peuvent induire la production d'ERO (Ali et al., 1995; Belyaeva et al., 2006; Prousek, 2007).

A l'instar de la réaction de Fenton, certaines réactions générant des ERO peuvent avoir lieu à la fois dans le cytosol et la mitochondrie. Par exemple, la xanthine oxydase impliquée dans la conversion de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique, qui correspondent aux étapes ultimes du catabolisme des purines, possède également la capacité de réduire l' O_2 en $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 (Bortolotti et al., 2021). Il a en effet été démontré que cette réduction de l' O_2 a lieu à la fois dans le cytosol mais également au sein de la mitochondrie (Rus et al., 2007). On peut également citer le NADPH oxydase qui possède le même mode d'action et génère donc des $O_2^{\cdot-}$.

Les ERO sont directement ou non une résultante de l'oxydation des acides gras. D'une part, la β -oxydation fournit le cycle de Krebs en acétyl-CoA qui à son tour produit le NADH et le succinate nécessaires à l'activité respective des complexes I et II, ce qui peut moduler leur production d'ERO (Seifert et al., 2010). D'autre part, l'oxydation dans le peroxysome génère directement des H_2O_2 .

II-TOXICITE

ERO issues du RE

Enfin, le RE, organite ayant un rôle majeur dans la synthèse et la bonne conformation des protéines, est une source d'ERO (Figure 9). En effet, lors de la formation des ponts disulfures catalysés par la *Protein disulfide isomerase* (PDI) il y a un transfert d'électrons entre cette dernière et l'*endoplasmic reticulum oxidoreductin-1* (ERO1) qui utilise l'O₂ comme accepteur d'électron ce qui par conséquent génère des ERO (Pollard et al., 1998). De plus, une étude estime qu'environ 25% des ERO issus du RE sont dus à la formation des ponts disulfures (Tu and Weissman, 2004). Durant ce processus, il arrive que la conformation des protéines ne soit pas bien réalisée. Si les protéines malformées sont trop nombreuses, on parle alors de stress du RE. Ce stress peut être pallié par le système appelé *Unfolded Protein Response* (UPR). En condition physiologique, la protéine chaperone BiP ou Grp78 est liée à trois senseurs de l'UPR. A l'inverse, en condition de stress, lorsqu'il y a un défaut de la machinerie de conformation, Grp78 se lie aux protéines malformées ce qui libère les senseurs. Ainsi, la cellule peut mettre en place un certain nombre de réponses pour maintenir l'homéostasie de la synthèse protéique. Par exemple: l'*inositol-requiring protein 1* (IRE1) clive l'ARNm de *X-Box Binding Protein-1* (XBP-1) dont la protéine correspondante est un facteur de transcription favorisant (Sidrauski and Walter, 1997) l'expression des gènes de l'UPR (Sidrauski and Walter, 1997). La *Protein Kinase-Like Endoplasmic Reticulum Kinase* (PERK), quant à elle, phosphoryle l'*initiation factor 2* (eIF2 α) qui à son tour permet l'expression de ATF4, ces trois facteurs sont essentiels pour limiter le stress du RE notamment par l'inhibition de la traduction des ARNm (Harding et al., 2000). Enfin, l'*Activating Transcription Factor 6* (ATF6), une fois clivée, est transloquée au noyau favorisant l'expression par exemple de l'expression de GRP78 et de *C/EBP homology protein* (CHOP) (Yoshida et al., 2001). Il a par ailleurs été démontré que CHOP contribue au stress oxydant pouvant même conduire à la mort cellulaire (Marciniak et al., 2004; Song et al., 2008).

II-TOXICITE

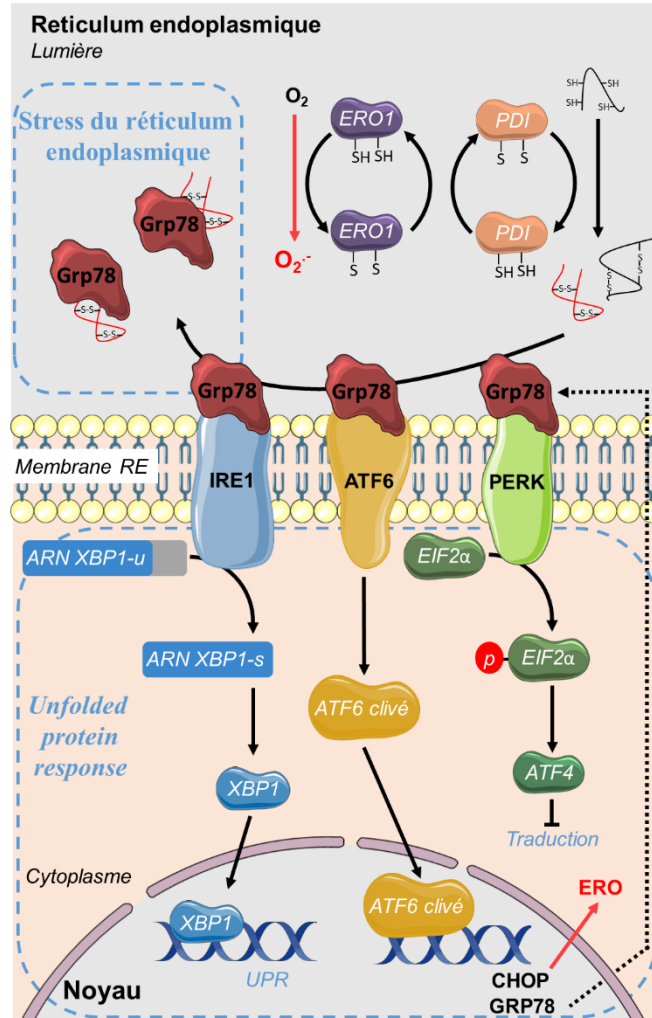


Figure 9 : Schéma simplifié du stress du réticulum endoplasmique et de la *Unfolded protein response*

La formation des ponts disulfures lors de la conformation des protéines nécessite des transferts d'électrons catalysés par la protéine disulfide isomerase (PDI) et l'endoplasmic reticulum oxidoreductin-1 (ERO1) qui utilisent l'oxygène (O_2) comme accepteur d'électrons. En condition physiologique, la protéine BiP ou Grp78 (Grp78) est liée aux senseurs Inositol-requiring protein 1 (IRE1), Activating Transcription Factor 6 (ATF6) et Protein Kinase-Like Endoplasmic Reticulum Kinase (PERK). Les protéines ne présentant pas une conformation correcte (unfolded proteins) peuvent se fixer à Grp78 ce qui libère les senseurs en cas de stress. IRE1 peut alors cliver l'ARN messager XBP1-u en ARN messager XBP1-s, la X-Box Binding Protein 1 (XBP1) alors synthétisée agit comme facteur de transcription pour les gènes de réponses à l'accumulation de protéines non repliées (Unfolded protein response ou UPR). La

II-TOXICITE

forme clivée du senseur ATF6, permet sa libération, favorisant la transcription de C/EBP homology protein (CHOP) et GRP78. Enfin, PERK, phosphoryle l'initiation factor 2 (EIF2 α) qui permet l'expression de ATF4 qui inhibe la traduction protéique. Le stress du RE est une source d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) puisque CHOP est impliqué dans la production d'ERO et la conformation des protéines génère des anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$).

Antioxydants

De même que les sources des ERO sont nombreuses, la cellule possède une importante machinerie antioxydante pour les neutraliser. Ajouté à ce système de défense endogène, il existe des antioxydants exogènes qui favorisent le maintien de l'équilibre ERO/antioxydants. Les antioxydants peuvent être classés en deux groupes en fonction de leur action qui peut être la prise en charge des ERO produits ou la réparation des dommages causés par ces derniers. Que les antioxydants soient exogènes ou endogènes, ils peuvent être classés en deux groupes : les antioxydants enzymatiques et les non-enzymatiques.

Enzymatiques

Les superoxyde dismutases (SOD), dont il existe trois isoformes, sont spécifiquement localisées (Figure 10). Quelle que soit l'isoforme, leur action est dépendante d'un ou plusieurs métaux, c'est d'ailleurs à ces métaux qu'elles doivent leur nom. Ainsi, la SOD1 ou Cu/Zn-SOD est dépendante du cuivre ou du zinc et elle est localisée dans le cytosol. La SOD2 ou Mn-SOD mitochondriale est dépendante du manganèse (Weisiger and Fridovich, 1973). Enfin, il existe également la SOD3 ou ecSOD dépendante du cuivre et du zinc qui est extracellulaire (Marklund, 1982). Ces trois isoformes, en présence des métaux, catalysent la dismutation de $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 . Par ailleurs, leur expression peut être modulée, c'est le cas de la Mn-SOD dont les

II-TOXICITE

transcrits sont induits suite à un stress oxydant dû à l'alcool (Koch et al., 1994). Les molécules H_2O_2 formées par les SOD peuvent alors être détoxifiées en H_2O et O_2 par les enzymes telles que les glutathion peroxydases (GPX), les catalases (CAT) ou encore la thiorédoxine peroxydase (TP) (Lu and Holmgren, 2014; Mills, 1960) (Figure 10).

Non enzymatiques

Divers composés possèdent des capacités antioxydantes, on peut citer en tant qu'antioxydants endogènes l'acide urique et la coenzyme Q de la chaîne respiratoire, le glutathion (GSH) ou encore la métallothionéine capables de neutraliser les ERO (Kumari et al., 1998). De même, la liste des composés exogènes comprend la N-acétylcystéine (NAC) dont l'action peut être indirecte par l'augmentation de la concentration en GSH ou sa capacité à piéger les ERO tout comme la vitamine C (Aldini et al., 2018; Kaźmierczak-Barańska et al., 2020) (Figure 10). Enfin, le zinc possède différents modes d'actions dont son rôle de cofacteur essentiel des SOD, décrit ci-dessus, l'inhibition de la NADPH oxydase et l'augmentation de la production de la métallothionéine. En outre, il est capable d'entrer en compétition avec divers métaux pour des sites de liaison des macromolécules ce qui diminue la liaison de ces métaux et inhibe leur action d'oxydation par effet antagoniste, c'est notamment le cas de l'oxydation des lipides par le fer (Zago and Oteiza, 2001). Le zinc possède également une fonction protectrice des groupes sulfhydriles des protéines et enzymes.

Par ailleurs, une étude a démontré qu'une faible concentration en zinc était couplée à un important niveau de stress oxydant (Oteiza et al., 2000). Le zinc joue donc un rôle important dans le maintien du statu redox.

II-TOXICITE

Stress oxydant

Le stress oxydant peut-être défini comme le déséquilibre entre la production des espèces réactives et la capacité de l’organisme à se protéger par la machinerie antioxydante (Sies, 1991) (Figure 10). Le stress oxydant peut donc être dû à l’augmentation de la production des ERO et/ou à une diminution des défenses antioxydantes (Poljsak et al., 2013). Ce déséquilibre, induit par la modulation d’une ou plusieurs sources d’ERO ou du système antioxydant précédemment présenté, endommage les constituants cellulaires tels que les acides nucléiques, les protéines ou encore les lipides. Ceci conduit à terme à différentes pathologies telles que les maladies neurodégénératives (Parkinson, Alzheimer), le cancer, ou encore la stéatose hépatique non alcoolique (Pisoschi and Pop, 2015; Rives et al., 2020).

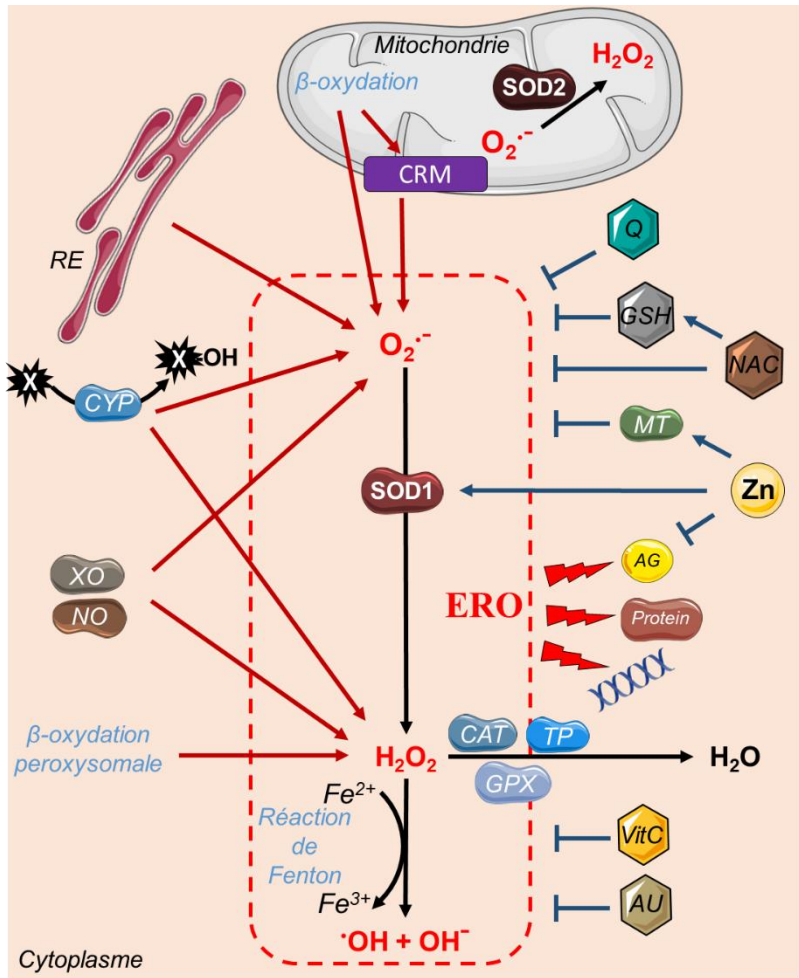


Figure 10 : Schéma simplifié de la production d'espèces réactives de l'oxygène et des systèmes antioxydants

II-TOXICITE

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) peuvent être converties, ainsi la dismutation des anions superoxydes (O_2^-) par les superoxydes dismutases (SOD) produit des peroxydes d'hydrogène (H_2O_2) qui peuvent être transformés en hydroxyles ($\cdot OH$, OH^\cdot) lors de la réaction de Fenton qui convertit un ion ferreux (Fe^{2+}) en ion ferrique (Fe^{3+}). Les H_2O_2 peuvent être détoxifiés en H_2O par certaines enzymes comme les catalases (CAT), les glutathion peroxydases (GPX) ou les thiorédoxine peroxydases (TP). Les ERO sont générés par la mitochondrie via la β -oxydation et la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM), le réticulum endoplasmique (RE), la détoxification des xénobiotiques (X) par les cytochromes P450 (CYP), la xanthine oxydase (XO), la NADPH oxydase (NO) et la β -oxydation peroxysomale. Les ERO et les dommages qu'ils causent à l'ADN, aux protéines et aux lipides (AG) sont pris en charge ou inhibés par les systèmes antioxydants. Le système enzymatique antioxydant est composé des SOD1 et 2, CAT, TP et GPX. Le système non enzymatique comprend, entre autres, l'ubiquinone (Q), le glutathion réduit (GSH), la N-acétylcystéine (NAC), la métallothionéine (MT), le zinc (Zn), la vitamine C (VitC) et l'acide urique (AU).

B-Apoptose

Si l'homéostasie de la synthèse protéique et/ou le statut redox de la cellule ne sont pas restaurés, les stress oxydant et du RE conduisent à une mort par apoptose (Verfaillie et al., 2012; von Harsdorf et al., 1999). De plus, les ERO perturbent la perméabilité de la membrane mitochondriale ce qui provoque le relargage du cytochrome c dans le cytoplasme. Or, cette libération est un événement initiateur de la voie intrinsèque de l'apoptose (Shimizu et al., 1999).

II-TOXICITE

L'apoptose est un mécanisme indispensable en condition physiologique. On parle de mort cellulaire programmée durant laquelle la cellule active des voies de signalisation conduisant à son élimination. Le terme programmé reste, cependant, un qualificatif « impropre » dans le contexte de la mort cellulaire induite par le stress oxydant. En effet, le terme « programmé » provient de l'existence de processus d'involution de tissus lors de l'embryogénèse, faisant effectivement appel à un programme lors du développement. Cependant, les voies de signalisation induites lors de l'apoptose programmée ou induite par des xénobiotiques mettent en jeu des acteurs communs. Afin de répondre aux stimuli exogène et endogène, il existe deux voies de signalisation qui permettent à la cellule de déclencher sa mort par apoptose (Igney and Krammer, 2002) (Figure 11).

Voie extrinsèque

La voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort correspond comme son nom l'indique à l'apoptose induite par les signaux exogènes tels que les cytokines comme le FAS ligand. Les cytokines se liant aux récepteurs de mort induisent l'activation de la pro-caspase 8 en caspase 8 (Kang et al., 2004).

Voie intrinsèque

A l'inverse, la voie intrinsèque ou voie mitochondriale apoptotique est déclenchée par les stimuli endogènes. Le relargage du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytoplasme par l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale conduit à la formation de

II-TOXICITE

l'apoptosome. Ce complexe formé, notamment par la pro-caspase 9, permet l'activation de la caspase 9 (Acehan et al., 2002).

Activation de l'apoptose

Que l'élément déclencheur soit exogène ou endogène l'apoptose fait intervenir une caspase effectrice. En effet, les caspases 8 et 9, aussi appelées caspases initiatrices, active la pro-caspase 3 par clivage et réassociation des produits clivés en une forme catalytiquement active. Cette dernière initie une cascade d'évènements qui conduisent à la fragmentation de l'ADN nucléaire, la dégradation de certaines protéines structurales du noyau et du cytosquelette et la formation de corps apoptotique (Slee et al., 2001).

Apoptose et xénobiotiques

L'apoptose fait partie des dommages hépatiques causés par les xénobiotiques. Il a en effet été démontré que des drogues tels que la cocaïne, des contaminants alimentaires comme le diméthylénitrosamine ou des métaux comme le fer et le cuivre, sont à l'origine d'hépatotoxicité induite par apoptose (Cascales et al., 1994; Oyaizu et al., 1997; Rauen et al., 2004; Strand et al., 1998). Par ailleurs, l'hépatotoxicité induite par apoptose des xénobiotiques peut être favorisée par les CYP, c'est notamment le cas des diterpènes, aujourd'hui interdits, dont la métabolisation par les cytochromes de la famille des CYP3A favorise l'apoptose (Fau et al., 1997).

Enfin, il est connu que certains lipides provoquent une apoptose lors des phénomènes de lipotoxicité, ce qui survient lors des maladies du foie associées à la surcharge en lipides (Chen et al., 2018; Ricchi et al., 2009). Ainsi, la perturbation de l'homéostasie lipidique décrite plus haut pourrait jouer un rôle dans l'hépatotoxicité induite par les xénobiotiques.

II-TOXICITE

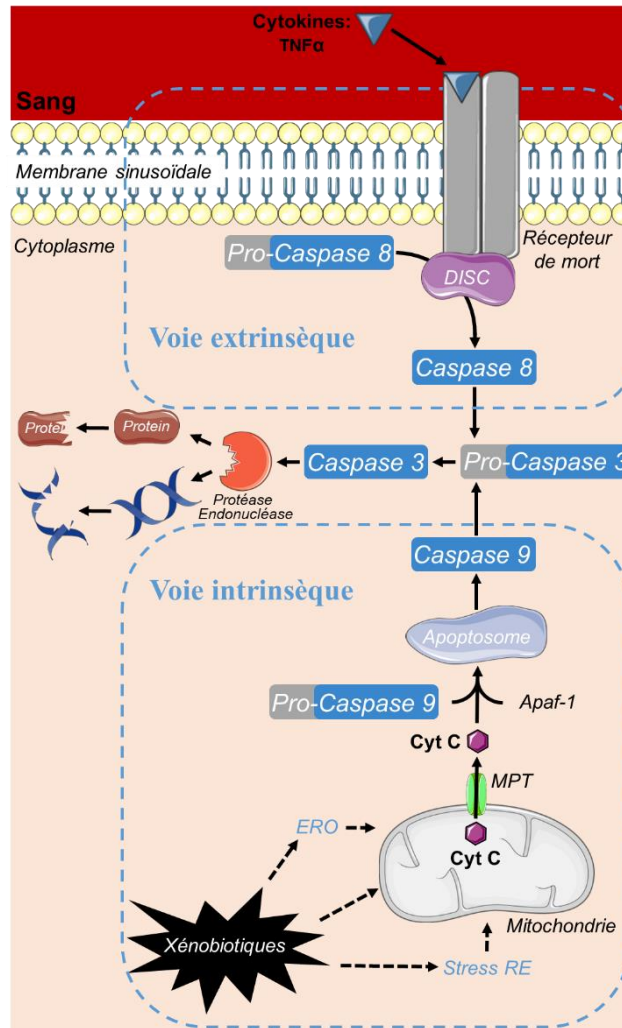


Figure 11 : Schéma simplifié de l'apoptose et ses différentes voies d'activation

Les signaux de mort extracellulaire comme les cytokines se lient au récepteur de mort favorisant le clivage de la pro-caspase 8 par le death-inducing signal complex (DISC) ce qui rend active la caspase 8. Les stimuli endogènes favorisent l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (MPT) ce qui conduit au relargage du cytochrome C (Cyt C) dans le cytoplasme. La présence du Cyt C conduit à la formation de l'apoptosome par l'apoptotic protease activating factor 1 (Apaf-1) et la pro-caspase 9. L'apoptosome favorise le clivage de la pro-caspase 9 en caspase 9. Les caspases 8 et 9 ainsi activées clivent la pro-caspase 3 qui à son tour active des protéases et endonucléases qui dégradent respectivement les protéines et l'ADN. Ces dommages conduisent à terme à la formation de corps apoptotiques.

II-TOXICITE

C- Stéatose hépatique associée aux xénobiotiques

Il a été rapporté que parmi 700 composés chimiques les plus utilisés en milieu professionnel, plus d'un tiers induisaient de l'hépatotoxicité (Tolman and Serrine, 1998). Il apparaît donc que les xénobiotiques peuvent conduire à des pathologies hépatiques telles que les hépatites, les fibroses, les cirrhoses ou encore les cancers. Cependant, il semblerait que les pathologies que sont la stéatose et la stéatohépatite soient les formes prédominantes de maladies hépatiques associées à l'exposition aux xénobiotiques (Al-Eryani et al., 2015). La stéatose hépatique ou *non alcoholic fatty liver disease* (NAFLD) correspond à une accumulation de triglycérides dans au moins 5% des hépatocytes, qui bien qu'elle soit réversible, reste néanmoins une lésion majeure (Aly and Kleiner, 2011). En effet, sa prévalence est estimée à environ 25% pour la population générale et passe à 60% chez les patients obèses (Wanless and Lentz, 1990; Younossi et al., 2016) (Figure 12).

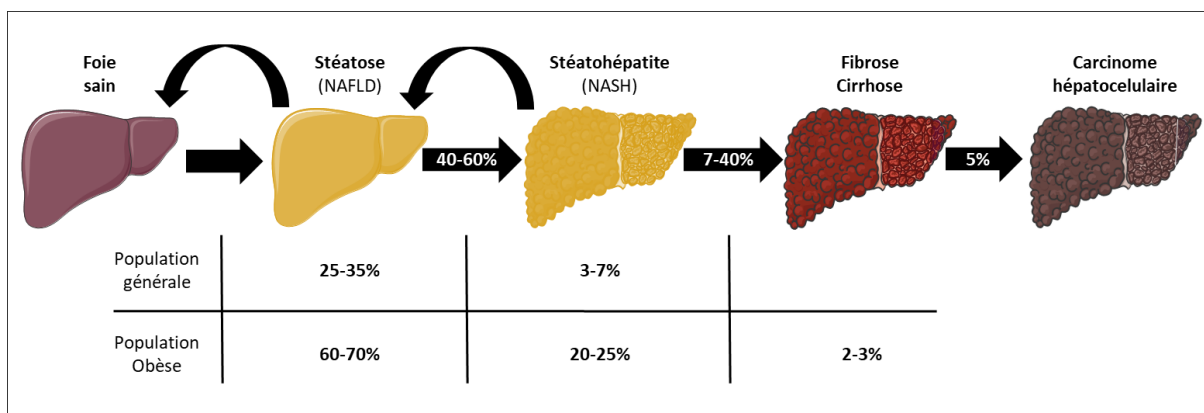


Figure 12 : Prévalence et progression des pathologies hépatiques

Les flèches indiquent la progression en pourcentage d'un stade vers un autre. La réversibilité des pathologies est indiquée par les flèches courbées. La prévalence en fonction de la population indiquée est exprimée en pourcentage. D'après (Mavilia, 2018; Neuschwander-Tetri and Caldwell, 2003; Wanless and Lentz, 1990; Younossi et al., 2016)

II-TOXICITE

Cette pathologie hépatique est due à une perturbation du métabolisme des lipides. En effet, l'*U.S Environmental Protection Agency* (EPA) a proposé des événements moléculaires initiateurs (*molecular initiating events*, MIE) impliquant les récepteurs nucléaires dans les mécanismes de mise en place de stéatose (*adverse outcome pathway*, AOP) (Figure 13). Dans ce modèle, les MIE (ici récepteurs nucléaires) modulent les mécanismes principaux de stéatose, décrits précédemment, tels que l'entrée, la synthèse, le catabolisme et l'excrétion des acides gras (Angrish et al., 2016).

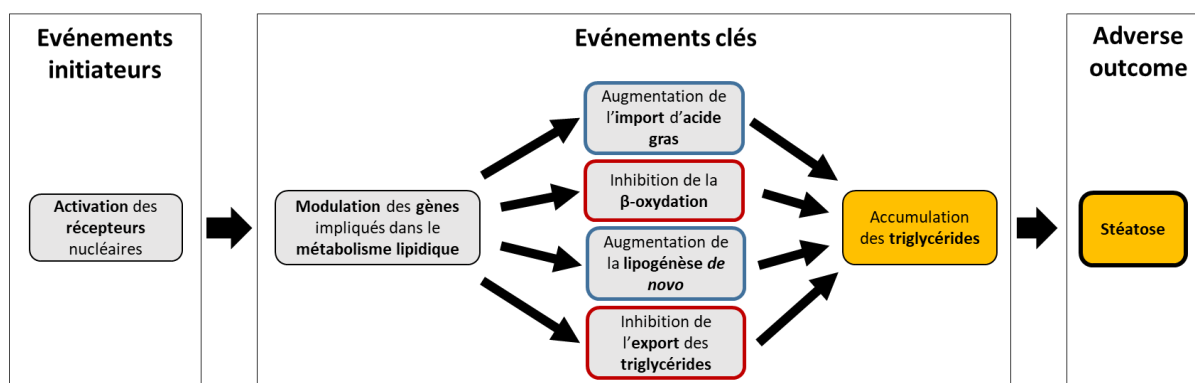


Figure 13 : Mise en place de la stéatose selon le modèle *adverse outcome pathway*

Adapté de (Luckert et al., 2018)

La stéatose hépatique peut évoluer en stéatohépatite, ou *non alcoholic steato-hepatitis* (NASH), caractérisée par et une inflammation et une accumulation lipidique plus importante, en fibrose puis en cirrhose et à terme en carcinome hépatocellulaire (Aly and Kleiner, 2011; Younossi et al., 2016) (Figure 12). Cette progression de simple stéatose hépatique vers une pathologie plus sévère peut être la conséquence d'un « *second hit* ». Dans ce concept, la stéatose induite par le « *first hit* », par exemple une dérégulation de l'homéostasie lipidique, subit un « *second hit* », par exemple un stress oxydant, qui conduit à des stéatohépatites, puis l'évolution vers la fibrose (Day and James, 1998). S'il est considéré, en règle générale, que les régimes hypercaloriques types « *Western Diet* » induisent une stéatose et que les xénobiotiques aggravent cette lésion,

II-TOXICITE

il a été démontré au contraire que les xénobiotiques et les régimes hypercaloriques pouvaient être respectivement le « first hit » et le « second hit » (Hardesty et al., 2019).

L'une des conséquences de la stéatose hépatique est la perturbation du métabolisme des xénobiotiques décrit ci-dessus. De fait, chez des souris subissant un régime hypercalorique, il a été mis en évidence une diminution de 30 à 60% des enzymes de phase I et II au niveau hépatique (Ghose et al., 2011) Ainsi, l'altération de la détoxification des xénobiotiques associée à une stéatose (*first hit*) pourrait conduire à une toxicité accrue des xénobiotiques (*second hit*), qui ne serait pas présente dans un foie sain, aggravant à terme la pathologie de surcharge en lipides.

Parmi les xénobiotiques, certains pesticides peuvent conduire à une stéatose et/ou une stéato-hépatite (Tableau 4). Selon une revue générale basée sur 474 études originales, plus de 10% des pesticides analysés sont associés à un développement de stéatose (Al-Eryani et al., 2015).

III-PESTICIDES

III- PESTICIDES

A- Définition et utilisation

Les produits phytosanitaires, souvent réduit au terme générique de pesticides, sont définis par la « *Food and Agriculture Organization* » (FAO) comme toute substance, ou association de substances chimiques ou organiques, qui est destinée à repousser, détruire ou combattre les organismes nuisibles ou à être utilisée comme régulateur de la croissance des plantes (WHO, 2014) Depuis la fin de la seconde guerre mondiale, l'utilisation des pesticides a explosé passant de 0,2 millions de tonnes par an dans les années 50 à plus de 4 millions en 2019 (Carvalho, 2017; FAO,2019) (Figure 14). Ceci s'explique par une augmentation de la population mondiale et par conséquent une intensification de l'agriculture. Les effets bénéfiques des pesticides que sont la limitation des pertes agricoles et l'augmentation des rendements, a permis de répondre en partie au besoin nutritionnel de la population mondiale. En effet, sans l'utilisation des pesticides les pertes de fruits, légumes et céréales s'élèveraient respectivement à 78, 54 et 32% (Sharma et al., 2019; Sitaramaraju, 2014). Aujourd'hui, il existe une très grande variété de composés chimiques utilisée pour lutter contre les nuisibles, ils sont d'ailleurs souvent divisés en fonction de leur organisme cible, on peut nommer : les herbicides, les insecticides ou encore les fongicides représentant 47,5, 29,5, et 17,5 % de la totalité des pesticides (Sarath Chandran et al., 2019).

III-PESTICIDES

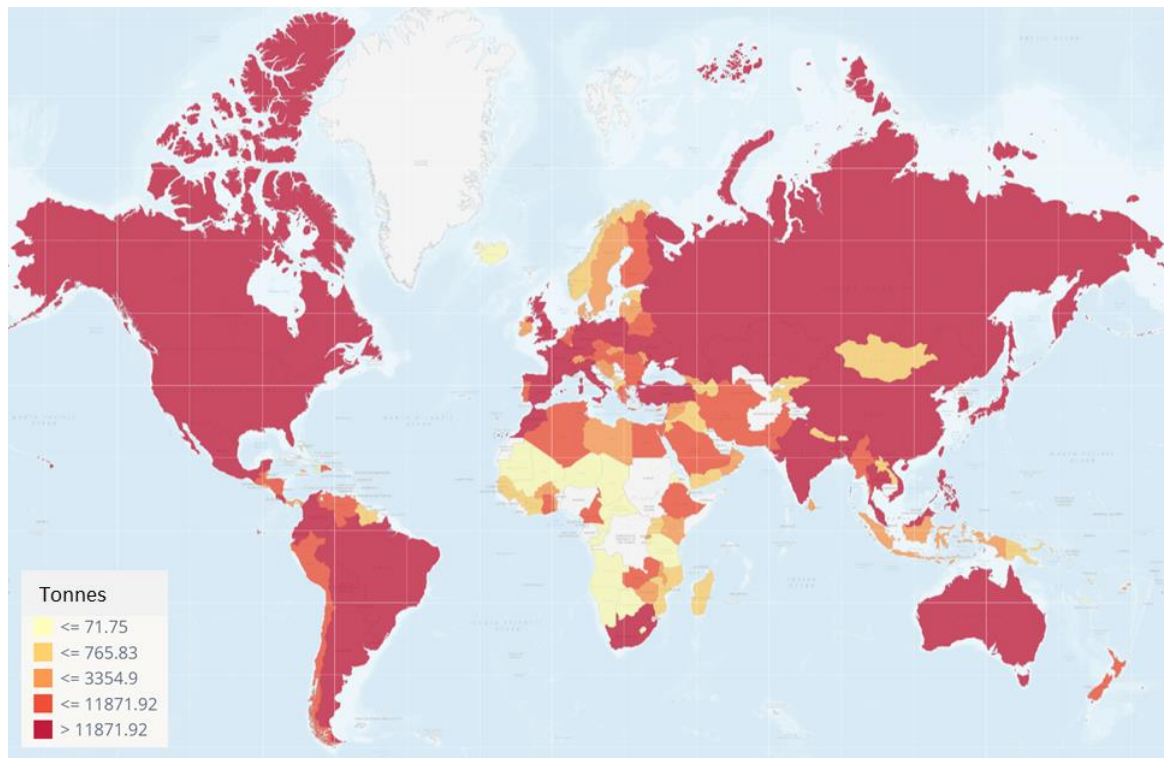


Figure 14 : Carte de la répartition de l'utilisation des pesticides en tonnes par pays pour l'année 2020

D'après la Food and Agriculture Organization des Nations Unis

B- Exposition, réglementation et limitations

Après traitement des cultures par les pesticides, souvent directement pulvérisés sur les surfaces agricoles, il est estimé que seulement 1% des substances actives agissent sur les plantes alors que les 99% restant contaminent l'environnement sans bénéfice pour la production agricole (Vera-Herrera et al., 2021). Ainsi, des résidus de pesticides sont retrouvés dans les sols, l'eau, l'air et les aliments. Par conséquent, il y a une exposition de la population générale principalement par l'alimentation puisque celle-ci représenterait 80% de l'exposition aux résidus de pesticides chez l'Homme (Bondareva and Fedorova, 2021). Etant donné que le but des pesticides est d'être toxique pour les organismes « nuisibles », se pose alors la question des effets néfastes que tous les résidus peuvent avoir sur la santé Humaine. De fait, l'exposition aux

III-PESTICIDES

pesticides est associée à différentes maladies telles que les cancers, le diabète ou les maladies neurodégénératives de types Alzheimer ou Parkinson (Mostafalou and Abdollahi, 2013).

C'est pourquoi, les pesticides sont considérés comme des substances dangereuses notamment en Europe par la directive 2006/11/EC (Commission Européenne, 2006). Ainsi, la mise sur le marché des pesticides est autorisée par le règlement 528/2012/EU (Parlement Européen, 2012).

De même, des niveaux maximaux de résidus autorisés (*maximum residue limit*, MRL) dans les aliments, exprimés en mg/kg, sont fixés par le règlement 396/2005/EC (Commission Européenne, 2005). Il est également établi une dose d'absorption acceptable journalière (*acceptable daily intake* ou ADI), elle est estimée à partir de l'ensemble des données disponibles sur les propriétés biochimiques, métaboliques, pharmacologiques et toxicologiques du pesticide. Les données peuvent provenir d'observations faites chez l'Homme mais, en général, elles sont issues de la dose sans effet toxique (*No Observed Adverse Effect Level* ou NOAEL) qui est établie après une exposition sur le long terme permettant de définir un point de référence sous lequel il n'y a pas d'effets néfastes pour le(s) modèle(s) animal(aux) généralement murin (WHO, 1997). L'ADI est alors placée 100 fois en dessous de la NOAEL afin de prendre en compte l'éventuelle variabilité entre l'Homme et le modèle animal. L'ADI correspond donc à la dose journalière d'un composé à laquelle l'Homme peut être exposé chaque jour durant toute sa vie sans qu'il n'y ait théoriquement d'effets néfastes sur sa santé. Elle est exprimée en mg/kg de poids corporel/jour (Damalas and Eleftherohorinos, 2011).

Néanmoins, les réglementations concernant ainsi l'ADI et la MRL sont modulables en fonctions des données disponibles. De même, certaines substances sont régulièrement retirées du marché en fonction des avancées dans les méthodes analytiques et les études de toxicité, c'est le cas de plus de 700 substances actives dont 26, 23 et 17% correspondant respectivement aux insecticides, herbicides et fongicides entre 1993 et 2008 (Karabelas et al., 2009).

III-PESTICIDES

Par ailleurs, bien que les résidus des pesticides sur les aliments soient peu concentrés, l'Homme y est exposé toute au long de sa vie. De plus, certains pesticides sont persistants dans l'organisme avec parfois des accumulations préférentielles pour certains organes. Il faut également prendre en compte le fait que, parfois, ce n'est pas le pesticide qui porte la toxicité mais ses métabolites ou comme le 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP), métabolite issu du chlorpyrifos, qui s'avère être plus toxique que la molécule mère (Zhao et al., 2017) (Tableau 2). De plus, l'exposition aux pesticides due à l'alimentation est une estimation et ne prend pas en compte le fait que certains individus ont une alimentation préférentielle, par exemple un régime centré sur les fruits et légumes, pouvant favoriser l'exposition à un pesticide ou une classe de produits en particulier.

Enfin, l'évaluation des risques pour la santé humaine liée à l'exposition aux pesticides est complexe de par les limitations de l'utilisation de l'ADI, mentionnées ci-dessous, mais également dû au fait que les pesticides puissent interagir entre eux et ainsi moduler leur métabolisation et leur toxicité, ce qui n'est pas pris en compte dans l'établissement de l'ADI (Food Administration, 2003). En effet, l'exposition à plusieurs pesticides en simultané présente différents types d'action ; additif, synergique ou antagoniste. La résultante d'un mode additif est équivalent à la somme des effets individuels des composés. Le synergisme se traduit par un effet du mélange plus important que la somme des effets individuels. A l'inverse, l'antagonisme correspond à un effet du mélange moins important que les effets individuels des composés. Par exemple, la compilation des données issues de publications de 2000 à 2014, concernant les mélanges de pesticides en modèle *in vitro* et *in vivo*, a permis aux auteurs d'établir que 48% des effets étaient additifs, 17% ne présentaient pas d'interactions et que parmi les 35% présentant des interactions plus des deux tiers sont des effets synergiques et un cinquième des effets antagonistes (Rizzati et al., 2016).

III-PESTICIDES

Par ailleurs, les concepts de toxico-cinétique et toxico-dynamique doivent être pris en compte dans l'évaluation des risques liés à l'exposition. Les interactions toxico-cinétiques et toxico-dynamiques correspondent à la modification par un ou plusieurs pesticides de la biodisponibilité par modulation de l'absorption, la distribution, la biotransformation ou l'excrétion et des effets néfastes d'un ou plusieurs autres pesticides (Reffstrup et al., 2010).

Dans le but d'évaluer les risques de l'exposition aux pesticides liés à l'alimentation, qui est par définition une exposition multiple et continue, plusieurs modèles basés sur les concepts décrits ci-dessus ont été mis en place. Les modèles considérés comme les plus pertinents sont basés sur les concepts de toxico-cinétique et toxico-dynamique (EFSA, 2008; Reffstrup et al., 2010). Cependant, tous ces modèles restent imparfaits et sont également limités (Food Administration, 2003). L'une des difficultés majeures correspond au fait que le nombre de pesticides est élevé et par conséquent les possibilités de mélanges quasiment infinies. Les modèles nécessitent pour la plupart des données de toxicité pour chaque pesticide de manière individuelle hors certains restent inconnus. En outre, les données de toxicité sont pour la plupart issues d'études utilisant des concentrations qui sont bien supérieures aux doses auxquelles l'Homme est exposé ce qui remet en cause leur pertinence. De plus, s'il existe plusieurs démonstrations d'interactions entre pesticides à fortes doses qui s'expliquent par la saturation des phénomènes de détoxification ou d'activation, ce n'est pas le cas lorsque les risques sont évalués à des doses plus proches de celle des résidus retrouvés dans l'alimentation. Egalement, il a été démontré que la nature des interactions entre les pesticides peut être différente selon les doses ce qui remet en cause l'extrapolation à des doses plus faibles (Borgert et al., 2004). C'est le cas de l'exposition combinée du chlorpyrifos et du parathion chez le rat qui révèle un mode d'action additif pour une dose donnée et, à l'inverse, qui présente un antagonisme à des doses plus élevées (El-Masri et al., 2004). Enfin, les évaluations des risques liés à l'exposition multiple de pesticides entre les années 1985 et 1998 ont mises en évidence que les interactions peuvent être de différentes

III-PESTICIDES

natures chez un même organisme en fonction de l'organe et de la cible étudiée (Carpy et al., 2000).

Ainsi, il apparaît critique de prendre en compte la pertinence de plusieurs facteurs dans la sélection des pesticides composant le mélange pour lequel les risques sont évalués, afin d'être le plus proche de l'exposition réelle, tels que : les pesticides choisis, les concentrations de chaque pesticide, l'organe ou les cibles étudiés et les modèles utilisés qu'ils soient *in vivo* ou *in vitro*.

Parmi les pesticides auxquels l'Homme peut être exposé par l'alimentation : le chlorpyrifos, le diméthoate, le diazinon, l'imazalil, l'iprodione et les dithiocarbamates, manèbe et mancozèbe sont fréquemment retrouvés sur les denrées alimentaires (EFSA, 2010) (Tableau 1)

III-PESTICIDES

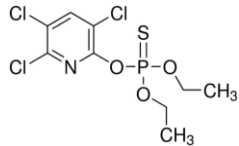
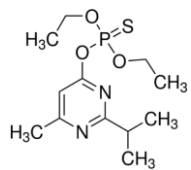
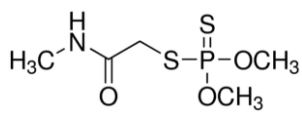
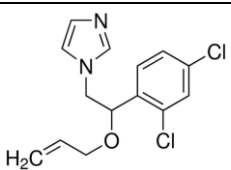
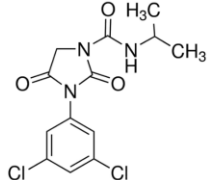
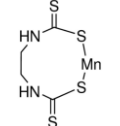
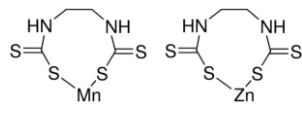
Pesticides	Famille	Type	ADI (mg/kg/jour)	Structure
Chlorpyrifos	Organophosphoré	Insecticide	0,01 (2005)	
Diazinon	Organophosphoré	Insecticide	0,0002 (2006)	
Dimethoate	Organophosphoré	Insecticide	0,001 (2007)	
Imazalil	Imidazole	Fungicide	0,025 (2011)	
Iprodione	Dicarboximide	Fungicide	0,06 (2002)	
Maneb	Dithiocarbamate	Fungicide	0,05 (2005)	
Mancozeb	Dithiocarbamate	Fungicide	0,05 (2005)	

Tableau 1 : Exemple de pesticides fréquemment retrouvés dans l'alimentation

III-PESTICIDES**C- Dithiocarbamates**

Les dithiocarbamates (DTC) font partie des fongicides, ils contiennent un groupement carbamate et deux atomes de soufres et sont capables de former des complexes avec différents éléments chimiques. Le manèbe et le mancozèbe font partie des éthylène-bis-dithiocarbamates (EBDC), une sous-catégorie des DTC, qui sont respectivement complexés à un atome de manganèse et à un atome de manganèse et de zinc (Cocco, 2022).

Mancozèbe

Le mancozèbe est aujourd'hui l'EBDC le plus vendu, il est d'ailleurs estimé que ses ventes s'élèveront à 18 milliards de dollars en 2025 (Fanjul-Bolado et al., 2020; ReportBuyer, 2015). Ses ventes sont réparties de la façon suivante : 29% utilisés dans les cultures de pommes de terre, 28% dans celles des légumes telles que les tomates et 18% en viticulture (Gullino et al., 2010). De plus, en 2022 la vente de mancozèbe est estimée à 250 000 tonnes (Industry Data Analytics 2020) Le succès du mancozèbe parmi les DTC est dû à son large champ d'action puisqu'il est efficace sur 70 types de cultures et 400 maladies différentes. Ceci s'explique par le fait qu'il interfère avec plusieurs processus biochimiques dans le cytoplasme et les mitochondries fongiques (Ludwig and Thorn, 1962). Par ailleurs, le mancozèbe est inefficace lorsque l'infection fongique se développe, son action est donc préventive et conduit à une utilisation systématique (Thind and Hollomon, 2018). Il est appliqué par pulvérisation sur les cultures ou les récoltes lors du transport et du stockage et est très peu soluble dans l'eau favorisant sa persistance et son accumulation. Ainsi, il y a une contamination du sol, de l'eau mais également des aliments qui peut mener à une exposition de la population générale.

III-PESTICIDES

Toxicité des EBDC, exemple du mancozèbe

Le mancozèbe présente une faible toxicité aiguë par voie orale ($LD_{50} > 5000\text{mg/kg}$ de poids corporel). Les études de toxicité à court et long termes ont permis de définir des NOAEL basées sur les modulations des hormones thyroïdiennes. Ainsi, les modèles animaux souris, rat et chien ont permis d'établir des NOAEL respectives à 18, 6,8 et 2,3mg/kg de poids corporel/jour. Il faut noter que la NOAEL pour une même espèce peut être différente en fonction de la toxicité étudiée (rat ; cancérogène : 4,8mg/kg/jour, impact sur le développement : 60mg/kg/jour, neurotoxicité : 8,2mg/kg/jour) (EFSA, 2020). De plus, l'EFSA révèle un manque de données qui ne permet pas d'évaluer certains aspects, c'est notamment le cas de la génotoxicité.

IL apparaît que la toxicité des EBDC et particulièrement du manèbe et du mancozèbe est principalement liée à l'éthylène thiourée (ETU). En effet, chez les mammifères le mancozèbe est décrit comme métabolisé de façon importante par deux voies majeures, l'hydrolyse et l'oxydation ce qui forme l'éthylène urée (EU), l'éthylène diamine (EDA) ou encore l'ETU, qui est le métabolite majoritaire des EBDC. C'est d'ailleurs ce métabolite qui est quantifié dans les urines pour évaluer l'exposition des populations aux EBDC (EFSA, 2020).

L'identification de la thyroïde comme organe cible de la toxicité du mancozèbe peut s'expliquer par le fait que l'ETU est un perturbateur endocrinien, il est ainsi capable d'inhiber la thyroïde peroxydase ce qui perturbe la synthèse des hormones thyroïdiennes T3 et T4 (Marinovich et al., 1997).

Les EBDC présentent également des effets neurotoxiques. En effet, la NOAEL du mancozèbe est fixée à 8,2mg/kg de poids corporel à partir des dommages causés à la myéline des cellules de Schwann chez le rat. De plus, l'exposition aux EBDC est associée au développement de la maladie de Parkinson (Bjørning-Poulsen et al., 2008; Runkle et al., 2017).

Enfin, chez la souris et le chien la NOAEL est également basée sur l'impact du mancozèbe sur le foie. Plusieurs études *in vivo* ont par ailleurs mis en évidence une hépato-toxicité des EBDC

III-PESTICIDES

lors d'exposition chronique (Tableau 3). Par exemple, l'administration par voie orale ou intrapéritonéale chez le rat et la souris provoque une augmentation de l'activité des aspartates et alanines aminotransférases, des modifications histologiques comme la dilatation de l'espace sinusoidal, de la nécrose, des infiltrations leucocytaires couplés à de l'inflammation par l'augmentation des niveaux d'IL-6, IL1- β ou TNF α , de la génotoxicité, des perturbations du métabolisme lipidique (augmentation des contenus en cholestérol et triglycéride) et un stress oxydant dû à la production d'ERO (H₂O₂) et une diminution du système antioxydant (GPX, SOD, GSH, CAT) conduisant à la peroxydation lipidique (Ahmad et al., 2013; Ben Amara et al., 2015; Gök and Deveci, 2022; Saber et al., 2019; Sefi et al., 2020; Yahia et al., 2019).

Bien que les effets toxiques des EBDC sont étroitement liés à leur métabolite ETU, certaines études montrent qu'ils pourraient également être dus aux métaux. En effet, il a été démontré que l'exposition à ces composés dérégule certaines enzymes, provoque un stress oxydant et cause des atteintes cérébrales associés aux métaux liés aux EBDC (Hoffman and Hardej, 2012; Kistingner and Hardej, 2022). Ainsi, la toxicité des EBDC est en partie due à l'ETU mais probablement aussi à l'élément chimique complexé au groupe carbamate (Anderson et al., 2018; Costa-Silva et al., 2018)

De fait, les risques liés à l'exposition des EBDC par l'alimentation sont très complexes. D'une part, l'exposition réelle aux EBDC est difficile à quantifier puisqu'elle est estimée indirectement par la détection de l'ETU, il y a donc une incertitude sur les quantités de résidus auxquels la population est exposées. D'autre part, les études démontrent des seuils et modes d'action parfois très différents en fonction de la toxicité étudiée et du modèle animal utilisé. C'est le cas du mancozèbe qui est considéré comme cancérigène chez le rat alors qu'il ne l'est pas chez la souris (EFSA, 2020). De plus, les études *in vivo* bien que mimant l'exposition sur le long terme utilisent parfois des voies d'administration différentes et des doses largement

III-PESTICIDES

supérieures à l'ADI, ce qui limite l'extrapolation des résultats pour une exposition réelle par l'alimentation.

Par ailleurs, l'ADI du mancozèbe (0,05mg/kg/jour) est largement supérieure à celle de l'ETU (0,002mg/kg/jour) or la toxicité des EBDC est considérée comme majoritairement due à ce métabolite (EFSA, 2020). De même, l'interdiction d'utiliser le manèbe a été édictée plusieurs années avant le bannissement par la Commission Européenne en Février 2021 du mancozèbe, or ce dernier est chimiquement très proche du manèbe (Commission Européenne, 2020). Ainsi, ces exemples remettent en question la pertinence des réglementations mises en place et la nécessité de réévaluer les doses références pour l'ensemble des pesticides autorisés.

Il apparaît que l'étude des risques liés à l'exposition des pesticides par l'alimentation est très complexe et nécessite une constante évaluation et réévaluation par des études dont les résultats doivent pouvoir être extrapolés qui par conséquent doivent mimer au mieux l'exposition réelle à plusieurs composés.

III-PESTICIDES

Pesticides	Métabolites	Enzymes / Réactions	Références
Chlorpyrifos	3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP)	CYP2B6 -> CPO (Désulfuration / bioactivation)	Tang et al 2001 Imaishi and Goto 2018
	Chlorpyrifos oxon (CPO)	CYP2C19 -> TCP (Déarylation / détoxification)	Tang et al 2001
		CYP3A4-> CPO / TCP (Désulfuration /déarylation)	
Diazinon	Diazoxon	CYP2C19, 1A2,2B6, 3A4 -> Diazoxon (bioactivation)	Mutch and Williams 2006 Sams et al 2004
	2-isopropyl-6-methyl-4-pyrimidinol (IMP)	CYP2C19, 1A2,2B6, 3A4 -> IMP (Déarylation / détoxification)	Kappers et al 2001
Diméthoate	Diméthoate-oxon ou ométhoate	CYP2C19 et 1A2 -> ométhoate (Désulfuration / bioactivation)	Buratti and Testai 2007
	Diméthoate carboxylique acide	Estérase -> Diméthoate carboxylique acide (détoxification)	
Imazalil	R61000	Epoxidation, O-dealkylation, oxydation	Spencer and Hamernick 1993
	R14821		
Iprodione	-	-	-
Maneb/ mancozeb	Ethylène thiourée		Seidler et al 1971
	Ethylène urée		Jordan and Neal 1979 Somerville 1986
	Ethylène diamine		Hurt et al 2001

Tableau 2 : Métabolisme des pesticides fréquemment retrouvés dans l'alimentation

III-PESTICIDES

Pesticides	Impact	Références
Chlorpyrifos	Inhibition de l'acétylcholinestérase	Nikbin et al 2020
	Inhibition des enzyme de biotransformation des xénobiotiques	Goel et al 2007
	Stress oxydant : Inhibition des enzymes antioxydantes + peroxydation lipidique	Goel et al 2005
Diazinon	Stress Oxydant : peroxydation lipidique	Girón-Pérez et al 2021
	Mort cellulaire	
	Augmentation des aspartates aminotransférases + alanine aminotransférases	Lari et al 2015
Dimethoate	Inhibition de l'acétylcholinestérase	Mehri et al 2022
	Stress oxydant : peroxydation lipidique	Astiz et al 2009a
	Génotoxicité : Fragmentation de l'ADN	
	Stress Oxydant : Inhibition des enzymes antioxydantes	Astiz et al 2009b , Ben Amara et al 2011
Imazalil	Inhibition de l'acétylcholinestérase	Barski and Zasadowski 2006
	Mort cellulaire : diminution ATP intracellulaire	Nakagawa and Tayama 1997
	Stress Oxydant : peroxydation lipidique	
Iprodione	Stress oxydant : production d'ERO + modulation enzymes antioxydantes	Washington and Tchounwou 2004
	Stress RE	
	Stress Oxydant	Radice et al 1998
Maneb	Génotoxicité : Fragmentation de l'ADN	Sefi et al 2019
	Stress Oxydant : Production d'ERO	Ahmad et al 2013
	Augmentation des aspartates aminotransférases + alanine aminotransférases	
	Modulation des enzymes de biotransformation des xénobiotiques	Ben Amara et al 2015
Mancozeb	Stress oxydant : inhibition des enzymes antioxydantes	Yahia et al 2019
	Génotoxicité	
	Augmentation des aspartates aminotransférases + alanine aminotransférases	Gök and Deveci 2022
	Mort cellulaire : Apoptose	Saber et al 2019
Stress oxydant : peroxydation lipidique		
	Génotoxicité	

Tableau 3 : Hépatotoxicité des pesticides fréquemment retrouvés dans l'alimentation

III-PESTICIDES

Pesticides	Impact	Référence
Chlorpyrifos	Accumulation lipides neutres + triglycérides Augmentation de la lipogénèse <i>de novo</i> Diminution de la sécrétion des triglycérides	Howell 3rd et al 2016
Diazinon	Augmentation triglycérides + cholestérol Accumulation lipides	Aramjoo et al 2021 Smith et al 2018
Dimethoate	-	-
Imazalil	Augmentation triglycérides + cholestérol Accumulation triglycérides	Nakagawa and Tayama 1997 Lichtenstein et al 2021
Iprodione	-	-
Maneb	Augmentation triglycérides + cholestérol	Ben Amara et al 2015
Mancozeb	Accumulation goutellettes lipidiques Augmentation triglycérides + cholestérol	Pirozzi et al 2016 , Yahia et al 2019

Tableau 4 : Impact des pesticides fréquemment retrouvés dans l'alimentation sur la stéatose

IV-CONTEXTE ET OBJECTIFS

IV-CONTEXTE ET OBJECTIFS

A-PeNiCa

Dans la perspective d'évaluer l'impact de l'exposition à plusieurs pesticides retrouvés dans l'alimentation sur des cellules tumorales ou saines du microenvironnement tumoral, un consortium a été créé au sein du Cancéropôle Grand-Ouest pour conduire un projet intitulé « Pesticides and Tumor Niches » (PeNiCa). En effet, l'EFSA rapporte en 2017 que des résidus de pesticides ont été détectés dans 44% des 84 341 échantillons d'aliments provenant de l'Union Européenne et des pays tiers. L'EFSA rapporte également que parmi les échantillons analysés environ 28% présentent de multiples résidus de pesticides dont plus d'un tiers en contiennent plus de 4 (EFSA, 2017). Le projet PeNiCa avait donc pour objectif d'évaluer l'impact au niveau cellulaire d'un mélange de sept pesticides à faibles doses. Pour correspondre au mieux à une exposition réelle aux pesticides par l'alimentation sept pesticides, parmi les plus fréquemment retrouvés dans l'alimentation, ont été sélectionnés et des doses extrapolées de l'ADI ont été utilisées (Tableau 1). Les équipes impliquées dans ce projet ont notamment démontré que l'exposition des cellules stromales mésenchymateuses de la moelle osseuse aux pesticides déclenchait leur senescence, leur différenciation en adipocyte, la dégradation de leur propriété immunosuppressive et altérait leur capacité à promouvoir l'hématopoïèse (Foucault et al., 2021a; Foucault et al., 2021b; Hochane et al., 2017; Leveque et al., 2019). Du fait que le foie soit un organe cible majeur dans la toxicité des xénobiotiques et de leur détoxification, notre équipe s'est intéressée aux effets de ce mélange de pesticide à faible dose au niveau hépatique. Ainsi, le but de ma thèse dans le cadre du projet PeNiCa a été d'évaluer l'effet des pesticides de manière individuelle et en mélange lors d'une exposition aiguë et chronique d'un modèle d'hépatocytes à des doses équivalentes à celles utilisées par les autres équipes. Pour ce faire, nous avons utilisé le modèle HepaRG qui est une lignée d'hépatome humain capable de se

IV-CONTEXTE ET OBJECTIFS

différencier en hépatocytes métaboliquement compétents (Figure 15). Cette lignée de cellules progénitrices bipotentes à l'avantage de se différencier ce qui permet d'avoir une co-culture de cellules dites cholangiocytaires et hépatocytaires (Gripon et al., 2002). La sous-population d'hépatocyte à la caractéristique d'être très proche des hépatocytes humains notamment sa morphologie et sa capacité métabolique importante due à l'expression d'un grand nombre d'enzymes du métabolisme (Aninat et al., 2006). Ces caractéristiques en font un modèle de choix très utilisé dans les études de toxicité des xénobiotiques et de leur métabolisme.

B-Pestifat

Les résultats obtenus lors du projet PeNiCa sur l'impact des pesticides au niveau hépatique ont permis d'obtenir le financement du projet Pestifat. Ce projet s'inscrit dans le programme ECOPHYTO (2019-2020) de l'Organisme Française pour la Biodiversité (OFB) qui vise à réduire l'utilisation des produits phytosanitaires afin de limiter leurs effets néfastes sur la santé Humaine. Dans ce projet, le but était de déterminer l'impact des pesticides utilisés dans le projet PeNiCa, de manière individuelle et en mélange sur la stéatose et l'expression des enzymes de biotransformation.

Dans le contexte d'augmentation des cas d'obésité et de surpoids, les maladies métaboliques associées représentent un problème de santé publique majeure. Par exemple, la stéatose hépatique est très fréquemment retrouvée chez des patients obèses. De plus, de précédentes études au laboratoire ont démontré que l'hépatotoxicité de certains xénobiotiques pouvaient être plus importante en cas de stéatose hépatique, mettant en avant le fait que la population obèse peut être plus susceptible à certains xénobiotiques (Allard et al., 2021; Massart et al., 2022). Egalement, la stéatose peut être induite mais également aggravée par les xénobiotiques comme décrit précédemment (Bucher et al., 2018b). Les pesticides pourraient alors favoriser l'apparition de la stéatose sur foie sain et/ou sa progression en stéatohépatite chez les patients obèses. Enfin, il a été rapporté que la stéatose liée à l'obésité chez les patients est associée à

IV-CONTEXTE ET OBJECTIFS

une altération de l'expression et de l'activité d'une partie des enzymes de biotransformation (Cobbina and Akhlaghi, 2017). Ces altérations peuvent potentialiser la toxicité des xénobiotiques, c'est notamment le cas de l'acétaminophène (Michaut et al., 2016). Ainsi, les pesticides et les altérations liées à la stéatose pourraient altérer la capacité de détoxification du foie sain et stéatosé altérant également la toxicocinétique des pesticides et des autres xénobiotiques (pharmacocinétiques).

Mes travaux de thèse avaient pour objectifs, dans le cadre du projet Pestifat, d'évaluer l'impact du mélange de pesticides à faible dose, d'une part sur l'apparition et l'aggravation de la stéatose et d'autre part, sur la capacité de détoxification de ces pesticides sur foie sain et stéatosé. Pour ce faire, le modèle de stéatose mis en place au laboratoire à partir de la lignée HepaRG a été utilisé (Le Guillou et al., 2018; Michaut et al., 2016). Ainsi, l'ajout d'acides stéarique et oléique permet d'obtenir un modèle de stéatose qui mime les caractéristiques présentes chez le patient telles que l'accumulation de triglycéride, la diminution de l'expression du CYP3A4 et l'augmentation de l'expression du CYP2E1 (Figure 15). Afin d'évaluer l'impact des pesticides sur l'apparition de la stéatose et sa progression, nous avons alors étudié les principaux mécanismes de mise en place en utilisant le modèle HepaRG stéatosé ou non. Enfin, l'impact des pesticides sur la détoxification en condition stéatosée ou non a été étudié par l'expression et l'activité des principales enzymes de phase I et II et par la capacité des cellules HepaRG stéatosées ou non à métaboliser les pesticides du mélange.

IV-CONTEXTE ET OBJECTIFS

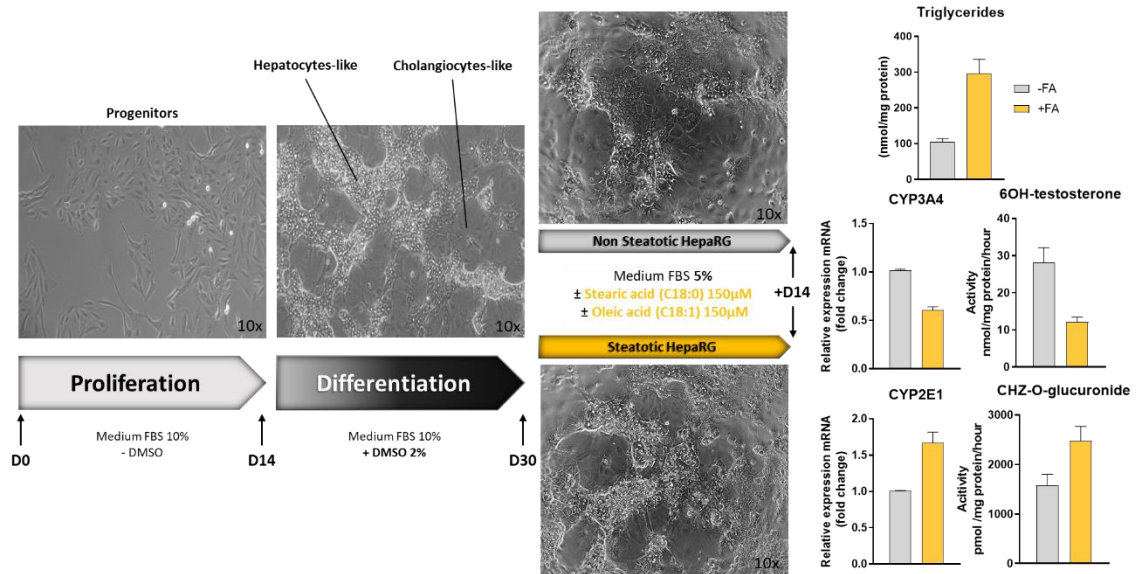


Figure 15 : Modèle cellulaire HepaRG stéatosé ou non et caractéristiques de la stéatose
Quantification de l'accumulation de triglycérides et de l'expression (RT-qPCR) et de l'activité (HPLC) des CYP2E1 et CYP3A4 après 14 jours de traitements avec 150µM d'acide stéarique et 150µM d'acide oléique (+FA) et sans (-FA).

RESULTATS

I-PeNiCa

I-PeNiCa

Résumé

L'utilisation des pesticides dans l'agriculture reste à l'heure actuelle le moyen le plus efficace pour bénéficier d'une bonne production. Cependant, un grand nombre d'études mettent en évidence que l'exposition professionnelle aux pesticides est associée à différents types de maladies. Le recours intensif et mondial des produits phytosanitaires conduit à une contamination de l'environnement et plus particulièrement des aliments. C'est pour l'EFSA établi pour chaque pesticide une Acceptable Daily Intake (ADI), qui correspond à un seuil théorique auquel l'Homme peut être exposé toute au long de sa vie sans qu'il n'y est d'effet néfaste pour sa santé. Malgré tout l'EFSA reconnaît que des résidus de pesticides sont retrouvés dans certains aliments avec parfois des contaminations multiples. Or, l'ADI ne prend pas en compte les potentiels effets cumulatifs que pourrait avoir les pesticides en mélange.

Le but de cette étude était donc d'évaluer l'impact de l'exposition par l'alimentation aux pesticides en mélange au niveau hépatique. Pour correspondre au mieux à une exposition par l'alimentation à différents pesticides simultanément, nous avons sélectionnés sept pesticides (chlorpyrifos, diazinon, diméthoate, imazalil, iprodione, manèbe et mancozèbe) fréquemment retrouvés dans l'alimentation à faibles concentrations extrapolées de l'ADI. Nous avons utilisé principalement la lignée HepaRG qui a permis d'étudier l'impact des pesticides à différents stades et sur différentes populations hépatiques (progéniteurs, hépatocytes, cholangiocytes) et valider nos résultats sur culture primaire d'hépatocytes humains.

Ainsi, nous avons mis en évidence une importante cytotoxicité du mélange de pesticides uniquement pour les hépatocytes HepaRG et dans les culture primaire d'hépatocytes humains après une exposition aiguë à faibles doses. Nous avons démontré que cette toxicité, spécifique des hépatocytes, était portée par les dithiocarbamates (manèbe et mancozèbe) et plus

I-PeNiCa

particulièrement par leur ion manganèse. Par ailleurs, notre étude démontre que la toxicité des dithiocarbamates est liée à la capacité des cellules à les métaboliser libérant des métabolites non toxique et l'ion manganèse. De plus, l'exposition au mélange, au manèbe, au mancozèbe ou au chlorure de manganèse provoque une surproduction des espèces réactives de l'oxygène qui est nécessaire au déclenchement de la mort des cellules par la voie intrinsèque de l'apoptose impliquant une activation des caspases 3 et 9. De manière intéressante, nous avons observé dans les hépatocytes HepaRG que la surcharge intracellulaire et mitochondriale en manganèse, provoquée par l'exposition au manèbe ou au chlorure de manganèse, est concomitante à une déplétion de la quantité de Zinc intracellulaire. Finalement, la restauration du pull en zinc par la co-exposition avec du chlorure de zinc diminue en partie la surcharge intracellulaire et mitochondriale de manganèse, ce qui est suffisant pour pallier à la toxicité induite par celle-ci.

Notre étude a ainsi révélé que l'exposition par l'alimentation aux dithiocarbamates contenant un ion manganèse à faible dose pouvait conduire à une hépatotoxicité. Cette toxicité souligne l'importance de l'homéostasie du manganèse et du zinc dans la régulation de la balance oxydant antioxydant.

I-PeNiCa

Low concentrations of ethylene bisdithiocarbamate pesticides maneb and mancozeb impair manganese and zinc homeostasis to induce oxidative stress and caspase-dependent apoptosis in human hepatocytes

Kilian PETITJEAN¹, Yann VERRES¹, Sébastien BRISTEAU³, Catherine RIBAUT¹, Caroline ANINAT¹, Christophe OLIVIER^{2,4,5}, Patricia LEROYER¹, Martine ROPERT^{1,6}, Olivier LOREAL¹, Olivier HERAULT^{2,7,8}, Laurence AMALRIC³, Nicole BARAN³, Bernard FROMENTY¹, Anne CORLU^{1,2*}, Pascal LOYER^{1,2*}

¹Inserm, INRAE, Univ Rennes, Institut NUMECAN (Nutrition Métabolismes et Cancer) UMR-A 1341, UMR-S 1241, F-35000 Rennes, France

²Cancéropole Grand Ouest (CGO), NET “Niches and Epigenetics of Tumors” Network, 44000 Nantes, France

³BRGM, Direction Eau, Environnement, Procédés et Analyses (DEPA), 3 avenue Claude-Guillemain - BP 36009, 45060 Orléans Cedex 2, France

⁴INSERM UMR 1232 CRCINA, 44000 Nantes-Angers, France

⁵Faculty of Pharmaceutical and Biological Sciences, Nantes University, 44000 Nantes, France

⁶AEM2 Platform, CHU Pontchaillou, University of Rennes, 2 Rue Henri le Guilloux, 35033 Rennes, France.

⁷Department of Biological Hematology, Tours University Hospital, 37000 Tours, France

⁸CNRS ERL 7001 LNOx, EA 7501, Tours University, 37000 Tours, France;

Keywords : dithiocarbamates, maneb, mancozeb, manganese, zinc, reactive oxygen species, hepatocytes.

I-PeNiCa

***Contact information:** LOYER Pascal, NuMeCan Inserm U1241, CHU Pontchaillou, 35033 Rennes, France. Phone: 0033 (0)223233873, email: pascal.loyer@univ-rennes1.fr ; CORLU Anne, NuMeCan Inserm U1241, CHU Pontchaillou, 35033 Rennes, France. Phone: 0033 (0)223233870, email: anne.corlu@univ-rennes1.fr

Abbreviations: DTCs: Dithiocarbamates, CYP450: cytochrome P450; DMSO: dimethyl sulfoxide ; XMEs: xenobiotic metabolizing enzymes ; HPLC-UV: High Pressure Liquid Chromatography-Ultra Violet ; LC-MS: Liquid-Chromatography-mass spectrometry ; ROS: Reactive Oxygen Species.

Financial support: This work was funded by the Cancéropole Grand-Ouest (CGO projet structurant PeNiCa), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm, France) and the “Organisme Française pour la Biodiversité (OFB), programme ECOPHYTO II”, project PESTIFAT AFB/2019/87 (PR-EST, 2019-2022). Kilian Petitjean received fellowships from the CGO (PeNiCa, 2018) and the OFB (PESTIFAT, 2019-2022).

ABSTRACT

Background: The worldwide and intensive use of phytosanitary compounds results in environmental and food contamination by chemical residues. Human exposure to multiple pesticide residues is a major health issue. Considering that the liver is not only the main organ for metabolizing pesticides but also a major target of toxicities induced by xenobiotics, we studied the effects of a mixture of 7 pesticides (chlorpyrifos-ethyl, dimethoate, diazinon, iprodione, imazalil, maneb, mancozeb) often detected in food samples.

Methods: Effects of the mixture was investigated using metabolically competent HepaRG cells and human hepatocytes in primary culture.

Results: We report the strong cytotoxicity of the pesticide mixture towards hepatocytes-like HepaRG cells and human hepatocytes upon acute and chronic exposures at low concentrations extrapolated from the Acceptable Daily Intake (ADI) of each compound. Unexpectedly, we demonstrated that the manganese (Mn)-containing dithiocarbamates (DTCs) maneb and mancozeb were solely responsible for the cytotoxicity induced by the mixture. The mechanism of cell death involved the production of reactive oxygen species (ROS), which led to cell death by intrinsic apoptosis involving caspases 3 and 9. Importantly, this cytotoxic effect was found only in cells metabolizing these pesticides. Herein, we unveil a novel mechanism of toxicity of the Mn-containing DTCs maneb and mancozeb through their metabolization in hepatocytes generating the main metabolite ethylene thiourea (ETU) and the release of Mn leading to intracellular Mn overload and depletion in zinc (Zn). Alteration of the Mn and Zn homeostasis provokes the oxidative stress and the induction of apoptosis, which can be prevented by Zn supplementation.

Discussion: Our data demonstrate the hepatotoxicity of Mn-containing fungicides at very low doses and unveil their adverse effect in disrupting Mn and Zn homeostasis and triggering ROS production in human hepatocytes.

1. Introduction

Pesticides remain extensively used in agricultural practices despite the well-documented risks for the human health (Alavanja, et al. 2009; Deziel et al. 2017). Occupational exposures to pesticides have been clearly correlated to higher risk of a wide range of pathologies including developmental abnormalities (Rauh et al. 2012), Parkinson disease (Brouwer et al. 2017; Pouchieu et al. 2018), hematological disorders (Merhi et al. 2007; Jin et al. 2014), solid tumors (Sabarwal et al. 2018; Lerro et al. 2021) and leukemia (Ferri et al. 2017; Foucault et al. 2021). Higher occurrences of pesticide-dependent diseases are not restricted to occupational exposure but are also documented in populations living in agricultural areas of intensive spreading via the drifting of pesticides in the air and house dust contamination (Deziel et al. 2017).

The intensive use of pesticides contributes to the so-called diffuse pollution (Mghirbi et al. 2018) with accumulation of chemicals in the upper layers of soil as a result of atmospheric deposition (Steines et al. 2011) and land application (Ritter et al. 2002) of these compounds. The soil contamination and the direct spreading of pesticides on crops result in the presence of chemical residues in agricultural products (Czaja et al. 2020). Regulatory authorities such as the Food and Drug Administration (FDA), the European Food Safety Authority (EFSA) and the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) defined residues as the mixture of active substances, metabolites and degradation products and implemented the Maximum Residue Levels (MRLs) corresponding to the highest levels of pesticide residues legally tolerated in agricultural commodities when pesticides are applied correctly.

These agencies also established dietary risk assessments of general population to pesticide exposures by monitoring the presence of residues in food samples (EFSA, 2017; OECD 2009; US FDA 2019) and considering the toxicity of each contaminant as well as the overall amounts used for each pesticide. In the past decade, the presence of at least one chemical contaminant

I-PeNiCa

in nearly 50% of food products and multiple residues in 25% of the samples were reported (EFSA, 2017; FDA 2019). In most cases, the amounts of residues in human foods were compliant with MRLs established standards, however, 10% of these commodities showed contamination levels that exceeded those maximum accepted levels. Considering the large diversity of active substances used in agricultural practice, it is practically impossible to monitor all active substances and their metabolites. For instance, the dithiocarbamates (DTCs) fungicides maneb and mancozeb used worldwide are poorly water soluble and bind tightly to soil. Because of their unstable polymeric structures in aqueous solution, maneb and mancozeb are difficult to identify by analytical procedures. Their hydrolysis generates fragmented complexes further metabolized by plants and animals in ethylene thiourea (ETU), their main metabolite. In absence of analytical protocols to analyze each DTC independently and all their residues, total DTC concentrations can be measured in water (Bristeau and Ghestem 2018; Bristeau and Amalric 2021). Nevertheless, the assessment of contamination levels in commodities remains poorly characterized and exposure to DTCs in humans relies only on the detection of ETU in urine (Stadler et al. 2022).

At the European level, the approval of pesticides is based on individual toxicology studies of the active substance (Regulation EC No 1107/2009). The EFSA established for each pesticide an Acceptable Daily Intake (ADI), which is a theoretical safety threshold for human health calculated from the No observable Adverse Effect Level (NoAEL) determined in animal models applying a corrective factor to account for intra-species and intra-individual variations (Dorne, 2010). Nevertheless, ADI does not consider potential cumulative effects of pesticide mixtures while regulatory agencies recognized that consumers are exposed to multiple residues present in food for long periods of times, which could lead to cumulative and delayed effects on human health. In this context, it is necessary to test low doses of mixtures of pesticides belonging to different families with similar or different mechanisms of action to better assess the possible

I-PeNiCa

existence of a risk to human health. This combined exposure could lead to insidious synergistic effects significantly different from those observed if summing the effect of each pesticide evaluated individually.

In order to extend knowledge on cellular alterations induced by pesticide mixtures, the consortium project entitled “Pesticides and Tumor Niches” (Cancéropole Grand-Ouest, France) studied the effects of a mixture of 7 pesticides from different classes of chemicals (chlorpyrifos-ethyl, dimethoate, diazinon, iprodione, imazalil, maneb, mancozeb) often detected in food samples (EFSA 2017). These compounds were used at concentrations extrapolated from the ADI dose for each pesticide in various *in vitro* cell models. In bone marrow mesenchymal stromal cells (BM-MSCs), it was shown that the pesticide mixture triggered the senescence of BM-MSCs, their differentiation in adipocytes (Hochane et al. 2017) and the deterioration of their immunosuppressive properties (Lévèque et al. 2019). These pesticides also altered the BM-MSC capacity to support primitive hematopoiesis by monitoring *in vitro* expansion of human normal BM CD34⁺ progenitors co-cultured with pesticides-modified BM-MSCs (Foucault et al. 2021). In this last study, the manganese (Mn)-containing DTCs, maneb and mancozeb significantly contributed to the decrease in the CD34⁺ cell expansion (Foucault et al., 2021). Interestingly, similar alterations have been described in BM-MSCs of patients suffering from myelodysplastic syndromes supporting the hypothesis that exposure to pesticides could favor the appearance of pre-leukemic states in the elderly (Foucault et al. 2021).

Most pesticides are metabolized in the liver by phase I and II enzymes to produce hydrophilic products more easily eliminated in urine and bile (Jandacek and Tso 2007; Klimowska et al. 2020; Kernalléguen et al. 2022). The liver is also a major target for toxicities triggered by xenobiotics themselves and/or their downstream reactive metabolites. In the present study, we evaluated the effects of the pesticide mixture and the 7 pesticides tested individually on

I-PeNiCa

metabolically competent hepatocytes *in vitro* at concentrations that previously showed effects of BM-MSCs. We report that the pesticide mixture induced a strong cytotoxicity in cultures of hepatocyte-like HepaRG cells and human hepatocytes following acute and chronic exposures at low concentrations extrapolated from the ADI. In addition, we demonstrated that the metal-containing DTCs maneb and mancozeb were solely responsible for the cytotoxicity induced by the mixture but only in cells metabolizing these fungicides through the intracellular accumulation of Mn and reduction in zinc (Zn) content, which triggered oxidative stress and apoptosis. Together, our data unveil a novel mechanism of hepatotoxicity of Mn-containing fungicides and emphasize the crucial role of the Mn and Zn homeostasis to regulate ROS production and cell fate in human hepatocytes.

2. Materials and methods

2.1. Pesticides, mixture, doses and treatments

Chlorpyrifos, dimethoate, diazinon, imazalil, iprodione, maneb, mancozeb, zineb PestanalTM analytical standards, ethylenethiourea (45531), ethyleneurea (31534) and ethylenediamine (41008) were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). CAS numbers and chemical structures are provided in **Supporting Information 1**.

The concentrations of pesticides used to treat the cells were extrapolated from two values (Hochane et al. 2017; Leveque et al. 2019): 1) the international ADI representing the threshold of safety in humans for lifetime exposure. Values of ADI (mg/kg.bw/day) for each pesticide was converted to g/L and then in mol/L for *in vitro* models, 2) the high nutritional daily intake (hNDI) or Theoretical Maximum Daily Intake (TMDI) corresponding to the lowest concentration of pesticides used in our study. Values of hNDI further referred as percentages of ADI (%ADI) correspond to the real exposure of the French population of all ages for each pesticide and calculated with the MRLs in food commodities established by EFSA. For the values of hNDI (%ADI), ADI, and 3ADI, a conversion has been made in order to extrapolate the aforementioned doses (estimated in mg/kg body weight/day) to an *in vitro* model. We considered a total absorption of this ingested amount and then its dilution in 5 L of blood in a subject of 60 kg, in order to obtain the blood concentration (mg/L and $\mu\text{mol/L}$) to which the various organs could be theoretically exposed.

Dimethyl-sulfoxide (DMSO) was the solvent used to prepare stock solution at 100mM except for the diazinon at 10mM. These stock solutions were diluted in culture medium to obtain the final concentrations of exposure. Control condition corresponded to cultures treated with the same concentration of DMSO without pesticides. For differentiated HepaRG cells and human hepatocytes, DMSO in the culture medium was adjusted at 2% (vol/vol), which corresponds to the culture medium used routinely for keeping these cells differentiated. DMSO concentration

I-PeNiCa

was 0.1% for progenitor HepaRG cells. For acute exposures cells were treated for 16 to 48 hours depending on the assays performed after exposure. For chronic exposures, cells were treated at each culture medium renewal, 3 times a week.

2.2. Cell cultures

The human hepatocellular HepaRG progenitor cells actively proliferate at low density and are capable to differentiate into biliary- and hepatocyte-like cells (Gripon et al. 2002) in appropriate culture conditions. Progenitor HepaRG cells were cultured as previously described (Cerec et al. 2007) in William's E Medium supplemented with Fetal Bovine Serum (FBS) 10% (Eurobio batch S52446-2170, reference CVFSVF00-01, HyClone Foetal II batch AAF204244 reference SH30066.03, ratio 1-1), 1% glutamine (200mM), 100U/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin, 5µg/ml insulin, and 50µM hydrocortisone hemisuccinate (Upjohn pharmacia). HepaRG cells were seeded at a density of 2.6×10^4 cells/cm². After 2 weeks, cells were cultured in the same medium supplemented with 2% DMSO to obtain differentiated HepaRG cells including hepatocyte- and cholangiocyte-like cells (Cerec et al. 2007). In some experiments, hepatocyte- and cholangiocytes-like HepaRG cells were selectively detached using mild trypsinization with Trypsin 0.05% diluted in PBS (vol/vol) as previously described (Cerec et al. 2007; Laurent et al. 2013) and plated separately at high density (2.5×10^5 cells/cm²) to obtain cultures enriched in hepatocytes or cholangiocytes. Both hepatocyte- and cholangiocyte-like cells were cultured in medium supplemented with 2% DMSO.

Human liver biopsies and primary hepatocytes were obtained from the processing of biological samples through the Centre de Ressources Biologiques (CRB) Santé of Rennes (Institutional review board approval BB-0033-00,056) under French legal guidelines and fulfilled the requirements of the institutional ethics committee. Primary human hepatocytes (PHH) were

I-PeNiCa

seeded at a density of 1.5×10^5 cells/cm² and cultured in same medium than differentiated HepaRG hepatocytes. Culture procedures of human macrophages and BM-MSC, as well as rat liver epithelia cells SDVI, Huh7 and HepG2 hepatoma cells are described in

Supporting Information 1.**2.3. Cell viability and apoptosis assessment**

Cell viability was assessed by measuring the relative intracellular ATP content using CellTiter-Glo Luminescent Cell viability assay (Promega). After treatment with pesticides, cells were incubated with the CellTiter-Glo reagent for 10 minutes (min). Lysates were transferred to an opaque multi-well plate and luminescent signals were quantified at 540nm using the Polarstar Omega microplate reader (BMG Labtech). Cell viabilities in treated cells were expressed as the percentage of the luminescent values obtained in untreated cells, which was arbitrary set as 100%. Loss of plasma membrane integrity and cytotoxicity during treatments were assessed by measuring the lactate dehydrogenase (LDH) release in the culture medium using Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit (Thermo Scientific) according to manufacturer's instructions.

Caspases activities were quantified after 24 or 48 hours of treatment for HepaRG cells and PHH, respectively. Cells were lysed with the "caspase-activity" buffer containing PIPES (20mM: pH 7.2), NaCl (100mM), EDTA (1mM), CHAPS (0.1%), sucrose (10%). Lysates were homogenized using sonication for 10 seconds twice. Then, 50µg proteins were added to the caspase-activity buffer supplemented with 10mM DTT and 80µM of substrates Ac-DEVD-AMC, Ac-IEPD-AMC and Ac-LEHD-AMD (Enzo Life Science) to measure caspase 3, 8 and 9 activities, respectively. The luminescence was measured using the Polarstar Omega microplate reader (BMG Labtech) with excitation wavelengths at 380 and emission at 440nm each 10 min during a 2h-time course.

I-PeNiCa

The γ -H2AX test was performed to assess genotoxicity. Briefly, cells were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS), fixed with 4% formaldehyde in PBS for 15 min at room temperature before permeabilization using 0.1% saponin in PBS. Nonspecific binding was blocked for 15 min by incubating the cells with 2 % FBS in PBS. Then, the cells were incubated with rabbit polyclonal anti-phospho-H2AX antibody (Abcam, ab88671) diluted 1/500 in 2 % FBS-PBS solution for 1h at room temperature. Following washes with PBS, Dylight 549-labeled secondary antibody in 2 % FBS-PBS solution containing Hoechst 33342 dye (1 μ g/mL) was incubated for 45 min. After washing, the γ -H2AX positive nuclei were observed and ten pictures per well were analyzed corresponding to at least 1000 cells scored.

2.4. Detection of reactive oxygen species (ROS)

Cell-permeant 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA, Thermo Fisher Scientific, D399) and MitoSOX (Thermo Fisher Scientific, M36008) molecular probes were used to assess ROS generation. Cells were washed with prewarmed (37°C) Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) and incubated with probes (2 μ M) diluted in HBSS for 30 min at 37°C, 5% CO₂ protected from light. Then, cells were rinsed with warm HBSS. N-acetylcysteine (NAC) at 20mM was used to neutralize ROS by treating cells for 2 hours prior to and during the treatment with pesticides. Treatments with excess of zinc chloride (ZnCl₂) at 70 μ M were also performed during pesticide and manganese chloride (MnCl₂) exposures. Fluorescence intensity was measured using the Polarstar Omega microplate reader with excitation/emission wavelengths at 485nm/520nm and 520/590nm for H₂DCFDA and MitoSOX probes, respectively. Fluorescence intensity values were normalized to amounts of total proteins. Data were expressed as the percentage of fluorescence signal measured in untreated control cells, which was arbitrarily set as 100%.

2.5. Measurement of mitochondrial respiration and complex (I-V) enzyme activities

Parameters of mitochondrial respiration were analyzed using XF Cell Mito Stress Test Kits and Agilent Seahorse XFe24 analyzer according to manufacturer's instructions. Briefly, after 16 hours of exposure to pesticides, HepaRG cells were incubated with Seahorse XF DMEM Medium (pH 7.4) at 37°C for 1 hour. Then, Seahorse XF DMEM Medium (pH 7.4) was replaced by the same medium containing L-glutamine (2mM), glucose (10mM) and pyruvate (1mM). HepaRG cells were transferred in Agilent Seahorse XFe24 analyzer for assessment of mitochondrial respiration. Oxygen consumption rates corresponding to basal respiration, maximal respiration, ATP production and proton leak were normalized by fluorescence intensity of Hoechst 33342 dye measured with the Polarstar Omega microplate reader (BMG Labtech) with excitation/emission wavelengths at 355nm/460nm.

In order to measure OXPHOS complex enzyme activities mitochondria were first isolated from a pellet of HepaRG cells treated for 16h with maneb at 6ADI, MnCl₂ at 14μM or control solvent vehicle. Briefly, cells were harvested and washed with cold PBS, then cells were centrifuged and pellets were frozen in liquid nitrogen. Cells were resuspended within isolation buffer pH 7.2 containing mannitol (220mM), sucrose (75mM), Trizma (10mM) and EDTA (1mM). After 3 min frozen in liquid nitrogen, cells were thawed at 37°C, centrifuged 1min at 20,000g and finally resuspended in the isolation buffer. For complexes I and V and citrate synthase cells were sonicated (6 times for 5 s).

The activities of the 5 mitochondrial OXPHOS complex enzymes were then measured at 37°C on a UVmc² spectrophotometer (SAFAS, Monaco) as previously described (James et al., 1996; Chretien et al., 2004; Medja et al., 2009) with specific buffer and reagents for each complex

I-PeNiCa

(**Supporting Information 1**). Absorbance changes due to the respective substrate conversions were analyzed at, 600nm for complex I and II, 550nm for complex III and IV, 340nm for complex V and 412nm for citrate synthase. Enzymes activities of all complexes were expressed as nmol substrate/min/10⁶cells using the Beer Lambert's law and were normalized to the citrate synthase activity.

2.6. High pressure liquid chromatography (HPLC)

The HPLC analysis was performed with the Agilent HPLC 1260 Infinity II with the column Accucore PFP (Thermo Scientific ref: 17426-153030) coupled with a UV detector. Cells were washed with PBS and incubated with phenol red-free William's E Medium containing 100µM, maneb or mancozeb. After incubations of cells for 3, 8 or 24 hours, the medium was collected and centrifuged 15 min at 20,000g at 4°C. 50µL of supernatant was injected in HPLC system. A gradient of acetonitrile and 0.1% acetic acid was used during the run at a flow rate of 0.500 mL/min. The run starts at 100% of acetic acid and decrease to 10% in 20 min. After 2 min at 10% acetic acid and 90% acetonitrile, the gradient returns to 100% acetic acid in 5 min. The wavelengths 247 and 285 nm were used to detect the metabolites of mancozeb, and the mancozeb, respectively. The peaks of mancozeb and ETU were identified by comparing the chromatograms of culture media containing or not these compounds and using analytical standards.

2.7. LC-MS/MS analyses.

The analysis was performed by LC-MS/MS detection with direct injection using Xevo-TQD ® triple quadrupole UPLC/MSMS (Waters) in MRM (Multiple Reaction Monitoring) mode. The

I-PeNiCa

mass spectrometer was operated in the positive and negative electron ionization modes for identification of the unknown compound resulting from mancozeb and MnCl_2 exposures while the mode of ionization positive electrospray was selected for quantification of mancozeb metabolites. The injection of analytical standards allowed to define the analytical parameters of the 8 metabolites and active substance (**Supporting Information 2**) and to estimate their quantification limits. To investigate the linearity of the method, 9 concentrations (0.01 to $10\mu\text{M}$ in a mixture water/William's E Medium 50/50 v/v) were used and a quadratic model was for all compounds except ETU for which a cubic model gave a better fit. The samples were analyzed directly or after dilution with a mixture water/William's E Medium (50/50 v/v) when appropriate. A control (calibration point at $5\mu\text{M}$) was injected every 15 samples to check the calibration accuracy. The samples to be analyzed were culture media containing or not mancozeb and incubated or not with HepaRG cells.

2.8. Quantification of Mn and Zn by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry.

HepaRG cells were treated during 16 hours with maneb at 3ADI concentration, MnCl_2 at $7\mu\text{M}$ or vehicle solvent (DMSO) as negative control. Then, cells were collected using trypsin (0.05%) before centrifugation. Cell pellets were washed twice in PBS then frozen at -80°C . Cells or purified mitochondria (see section 2.5) were desiccated overnight at 120°C . Dried tissues were weighed and mineralized by nitric acid solution in teflon PFA-lined digestion vessels. Acid digestion was carried out at 180°C using ultrapure concentrated HNO_3 (69%) (Fisher Chemical Optima Grade) in a microwave oven device (Mars 6, CEM). The elements studied were ^{55}Mn and ^{66}Zn . ICP-MS analyses were carried out using an X-Series II from Thermo Scientific equipped with collision cell technology (Platform AEM2, Biochemical Laboratory, Rennes Hospital). The source of plasma was argon (purity degree $> 99.99\%$). The collision/reaction

I-PeNiCa

cell used was pressurized with a mixture of helium (93%) and hydrogen (7%); argon and hydrogen were provided by Messer. Ultra-pure water was provided from Millipore Direct-Q 3 water station. Nitric acid solution was utilized at 69% (Fisher Chemical—Optima Grade). The rhodium was used as internal standard (Fisher Scientific). Calibration ranges were realized using a multi-element solution (SCP Science PlasmaCal). The performance was calibrated using multi-element solutions, tune F, and tune A (Thermo). The certified reference biological material was bovine liver ZC71001 obtained from NCS Testing Technology (Beijing, China).

2.9. RNA and protein expression studies

RNA purification and reverse transcription were performed using Nucleospin RNA (Fisher Scientific ref: 740955) and High capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems). Quantitative PCR was performed with Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) on ABI PRISM 7900HT instrument. The primer sequences are provided in **Supporting Information 1**.

For immunoblotting, culture medium was removed and cells were washed once with cold PBS and lysed in 50 mM HEPES pH 7.9, 150 mM, NaCl, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, 0.5% Tween 20 lysis buffer supplemented with protease inhibitors (EDTA-free, Roche). Cell lysates were briefly sonicated and total proteins of cell extracts were quantified using Biorad protein reagent assay. For detection of mitochondrial proteins, mitochondria were isolated from HepaRG cells after 16h of treatment with pesticides. Cells were lysed in H-medium (HEPES 5mM, D-mannitol 210mM, sucrose 70mM, pH 7.4). The lysate was centrifuged 5 minutes at 600g, 4°C. The supernatant (S1) was centrifuged 10 minutes at 4300g, 4°C. The supernatant (S2) was centrifuged 2h at 20,000g at 4°C. Resulting supernatant corresponded to cytosolic fraction. The pellet (C2) was then resuspended and centrifuged 5 minutes at 600g, 4°C. The supernatant

I-PeNiCa

collected (S3) was centrifuged 10 minutes at 4300g at 4°C. The pellet containing purified mitochondria was resuspended in a minimum volume of H-medium and frozen at -80°C.

Thirty µg of cytosolic or 10µg of mitochondrial proteins from each sample were separated on NuPAGE® Novex® Bis-Tris 4–12% gels kit (Invitrogen) and transferred to PVDF membranes (Trans-blot® Turbo™ Transfer System, Biorad) prior to immunoblotting using the following primary antibodies: COX4 (F-8, sc-376731, Santa Cruz), GSTA1 (R-14, sc-100546 Santa Cruz), Anti-Cytochrome C (556433, BD Pharmingen), IRE1a (14C10, 3294 Cell Signalling), anti phospho S724-IRE1a (ab124945, Abcam), eIF2a (FL-315, sc-11386 Santa Cruz), anti-phospho Ser52-eIF2a (sc-12412, Santa Cruz) and HSC70 (B-6, sc-526-G Santa Cruz). Primary antibodies were detected using secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase (Dako, Denmark), and detection of the immune complex was performed by chemiluminescent detection (Pierce™ ECL Substrate).

2.10. Data analysis

All data are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM) from at least three independent experiments. Comparisons between groups were performed using one-way ANOVA followed by a post hoc Dunnett's test or Bonferroni's test when the normality test was positive, and Kruskal-Wallis followed by a post hoc Dunn's test when data were not normally distributed. Graph Pad Prism 8 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used for all statistical analyses) and the threshold for statistical significance was set to $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Chronic and acute exposures to the pesticide mixture induce cytotoxicity in human hepatocytes.

In order to study the effects of the mixture of the 7 pesticides on human hepatic cell fate, we performed chronic exposures of human progenitor HepaRG cells at %ADI, ADI and 3ADI pesticide concentrations during 30 days (**Figure 1**) as previously done for BM-MSCs (Hochane et al. 2017; Foucault et al. 2021).

After plating at low density, progenitor hepatoblast-like HepaRG cells actively proliferate during 7 to 10 days prior differentiation into hepatocyte and cholangiocyte cell lineages (Cerec et al. 2007; Vlach et al. 2019). During the first two weeks, the pesticides at the ADI and 3ADI concentrations induced a slight but statistically significant increase in ATP contents (**Figure 1A**) without any visible effect on the cell morphology (**Figure 1B**) suggesting that the phytosanitary compounds could stimulate the proliferation of progenitor HepaRG cells. In contrast, when the chronic treatment was prolonged for 2 more weeks during differentiation, the pesticides triggered a strong decrease in the ATP content in a concentration dependent manner (**Figure 1A**). At 21 days of treatment, floating cells were visible in culture wells incubated to pesticides and very few cells remained adherent at 30 days (**Figure 1B**). These data demonstrated that the pesticide mixture triggered a dose- and time-dependent cytotoxicity in differentiated HepaRG cells.

In order to determine whether the cytotoxicity of the pesticides observed after 2 weeks resulted from the chronic exposure of HepaRG cells during proliferation or occurred only when cells underwent differentiation, we performed acute exposures of differentiated HepaRG cells (**Figure 2**). The cells were first differentiated during 30 days in absence of pesticides, then subjected to a single exposure to the pesticide mixture. After 2 days, we observed a strong

I-PeNiCa

decrease in the ATP content of differentiated HepaRG cells in a dose-dependent manner. Significant effects were found with concentrations as low as ½ ADI but the overall reduction in cell viability reached 50% of the control value for the ADI and higher concentrations. These data demonstrated that the pesticide mixture induced an acute toxicity in hepatocytes *in vitro* after a single exposure.

Differentiated HepaRG cultures contain both hepatocyte- and cholangiocyte-like cells producing a coculture *in vitro* model (Cerec et al. 2007). We next investigated whether the pesticides affected differently the viability of the 2 cell types by preparing enriched populations of both hepatocyte- and cholangiocyte-like HepaRG cells incubated in the same conditions (**Figure 2**). Interestingly, the pesticides triggered a stronger cytotoxicity in the hepatocyte-like cell population compared to that measured in the coculture while a mild decrease in ATP content was observed in the cholangiocyte cultures. The selective cytotoxicity towards hepatocytes was also visible with the morphological alterations in hepatocyte-like cell colonies while cholangiocytes remained unaffected (**Supporting Information 3A**).

To further confirm the toxicity of the pesticide cocktail, we used pure cultures of PHH incubated in the same conditions (**Figure 2**). The ATP content decreased in a dose-dependent manner with an extended loss in cell viability at 3 and 6ADI concentrations of pesticides. These data demonstrated the high cytotoxic effect of the pesticide cocktail towards differentiated hepatocytes. This conclusion was further supported by the absence of cytotoxicity in progenitor HepaRG cells, human HepG2 (**Figure 2**) and HuH7 hepatoma cells as well as primary rat liver epithelial SDVI cells, human macrophages and mesenchymal cells (**Supporting Information 3B-C**). In addition, we also used 2 transgenic HepaRG cell lines expressing the green fluorescent protein (GFP) under transcriptional control of hepatocyte-specific CYP2B6 and CYP3A4 gene promoters (Vlach et al 2019) leading to GFP expression at high levels in hepatocyte-like HepaRG cells (**Supporting Information 3D**). Upon exposure to the pesticide

I-PeNiCa

mixture, the GFP positive hepatocyte colonies were strongly reduced in size and fluorescence intensities. Moreover, in transgenic HepaRG cells exposed to pesticides, the mRNA levels of the endogenous CYP3A4 and CYP2E1 were dramatically decreased compared to those found in untreated cells while the expression of cytokeratin 19 (CK19), which is expressed in cholangiocytes remained stable (**Supporting Information 3E**). Together, our data demonstrated that the pesticide cocktail triggered cytotoxicity specifically in hepatocytes.

3.2. Maneb and mancozeb induce oxidative stress and apoptosis in human hepatocytes.

In order to determine whether one or several pesticides within the mixture were responsible for the toxicity, we exposed hepatocyte-like HepaRG cells to each pesticide individually in a wide range of concentrations (from ADI to 50xADI) for 48h and evaluated cell viability by measuring the ATP content (**Figure 3A**). Exposures to each pesticide have unveiled that only maneb and mancozeb were toxic. Moreover, the decreases in ATP content were similar with one or both DTCs and the mixture of all compounds (**Figure 2**) demonstrating the absence of additive effects of maneb and mancozeb and strongly suggesting that the toxicity observed with the mixture was triggered by these DTCs. To confirm this hypothesis, we exposed hepatocyte-like HepaRG cells to 7 different mixtures depleted in each pesticide individually and a mixture of 5 pesticides without maneb and mancozeb (**Figure 3B**). All mixtures depleted in one compound induced the same decrease in ATP contents while the cocktail of 5 pesticides without the two DTCs had no effect on cell viability confirming that maneb and mancozeb induced the toxicity of the mixture and evidencing for the first time that these DTCs trigger cell death in human hepatocytes at very low concentrations in the range of the ADI.

We next studied the mechanism of cytotoxicity induced by the pesticide mixture and DTCs (**Figure 4**) postulating that maneb and mancozeb may induce apoptosis in hepatocytes since

I-PeNiCa

previous publications reported that mancozeb at high concentrations (10 to 300 μM) triggered apoptosis in human gastric, colon and hepatoma cells (Kumar et al. 2018; Dhaneshwar et al. 2021; Lori et al. 2021). We measured caspase 3, 8 and 9 catalytic activities in total cell lysates of hepatocyte-like HepaRG cells exposed to the pesticide mixture or mancozeb alone (**Figure 4A**). The initiator caspase 9 and executioner caspase 3 activities were significantly increased in cells incubated with the mixture and mancozeb while the caspase 8 activity was unchanged suggesting the lack of cell death receptor activation. Importantly, when the antioxidant NAC was added prior to the pesticide mixture, the increase in caspase 3 and 9 activities was totally abrogated. Similarly, the pesticide mixture strongly induced the caspase 3 activities in human hepatocytes in primary culture (**Figure 4B**). The induction of apoptosis was further demonstrated by the cytochrome *c* release from mitochondria in both differentiated HepaRG cells and human hepatocytes (**Figure 4C**) and the increase in subG1 fraction of hepatocyte-like HepaRG cells (**Supporting Information 4A**). Together, these data demonstrated that the pesticide mixture and mancozeb induced caspase-dependent apoptosis in human hepatocytes through an intrinsic pathway and suggested the involvement of oxidative stress since NAC prevented the onset of cell death.

The effects of pesticides on mitochondrial function were next assessed in differentiated HepaRG cells. While basal respiration was not affected, maximal respiration and respiration linked to ATP production were significantly decreased upon exposure to the pesticide mixture at the 3ADI concentration (**Figure 4D**). In contrast, proton leak was increased by the same concentration. The activities of the five OXPHOS mitochondrial complexes were also studied in control culture and in cells exposed to maneb and no significant differences in enzymatic activities could be observed between untreated and pesticide-exposed cells (**Supporting information 4B**), thus suggesting an impairment of other metabolic pathways linked to OXPHOS.

I-PeNiCa

Relative levels in ROS measured by spectrofluorometry using H₂DCFDA and MitoSOX probes were strongly enhanced in cells exposed to the pesticide mixture or mancozeb alone at ADI and 3ADI concentrations (**Figure 4E**). Importantly, NAC totally prevented pesticide-induced ROS production and the cytotoxicity measured by the ATP content. In addition, no significant change in the relative ROS levels were observed in cholangiocyte-like HepaRG cells treated with the same concentrations of pesticides (**Supporting Information 4C**). Oxidative stress was further investigated in hepatocyte-like HepaRG cells (**Figure 4F**) and human hepatocytes (**Figure 4G**) by measuring the mRNA levels of genes known to be regulated by ROS and/or involved in antioxidant responses. Superoxide dismutase 1 (SOD1) mRNA levels were decreased while those of SOD2, glutathione peroxidase 3 (GPX3), BCL2-associated X apoptosis regulator (BAX) and DNA damage inducible transcript 3 (DDIT3, also known as CHOP) were up-regulated upon exposure to the pesticide mixture. The increase in DDIT3 transcripts suggested the induction of an endoplasmic reticulum (ER) stress, which was confirmed with the up-regulation of PERK and ERN1 mRNA levels and the increase in IRE1 α phosphorylation and eIF1 α protein expression (**Supporting Information 4D**). Considering the evidence of ROS overproduction and ER stress response in hepatocyte-like HepaRG cells incubated with the pesticides, a genotoxic effect was investigated using the γ -H2AX assay (**Supporting information 4E-F**). A strong induction in the percentage of γ -H2AX positive cells was detected and quantified in cells exposed to the pesticide mixture and aflatoxin B1 used as a positive control of genotoxicity. Altogether, these results indicated that the pesticide mixture and DTCs triggered a burst of ROS inducing ER stress, mitochondrial dysfunction, genotoxicity and apoptosis through an intrinsic caspase pathway.

3.3. Mancozeb is metabolized in hepatocytes to produce ethylene thiourea.

Since cell death induced by DTCs occurred only in differentiated hepatocyte-like HepaRG cells and human hepatocytes, we investigated the catabolism of the mancozeb in these metabolically competent cells expressing phase I and II xenobiotic-metabolizing enzymes (XME) (Aninat 2006, Kanerbratt 2008), and in cholangiocyte-like and progenitor HepaRG cells, which do not express these XME and do not undergo apoptosis upon exposure to DTCs.

Detection of mancozeb was assessed by HPLC coupled to UV detector (HPLC-UV) (**Figure 5**) and mancozeb's metabolites were identified by LC-MS/MS (**Table 1, Supporting Information 2**). Mancozeb added to culture media at the concentration of 100 μ M was detected by HPLC-UV at 285nm with a retention time of 10.75 min (**Figure 5**). This peak was confirmed to be mancozeb by LC-MS/MS (**Table 1, Supporting Information 2**). In addition, in media supplemented with mancozeb, a second peak was detected by HPLC at 247nm at a retention time of 2.7 min, very similar retention time to that of ethylene thiourea (ETU) analytical standard (**Figure 5**). Using LC-MS/MS (**Table 1**), we confirmed the presence of ~ 21 μ M of ETU in culture media without incubation with HepaRG cells strongly suggesting the presence of this degradation product in the mancozeb stock solution. In culture media of hepatocyte-like HepaRG cells, the amounts of mancozeb progressively decreased during a 24h incubation time while those of ETU concomitantly increased (**Figure 5, Table 1**). In contrast, the peaks of mancozeb and ETU detected by HPLC in culture media of cholangiocyte-like and progenitor HepaRG cells were not quantitatively modified during the 24h incubation with these cells (**Figure 5**). These data demonstrated that mancozeb is catabolized into its main ETU metabolite in hepatocyte-like HepaRG cells and that non-hepatocytic cells do not metabolize mancozeb.

In addition to the peaks of mancozeb and ETU, we also detected by HPLC-UV two other compounds eluting with retention times of 3.1 and 4.5 min only in culture media of hepatocyte-

I-PeNiCa

like HepaRG cells (**Figure 5A**). The peak at 3.1 min was not detected after 3 hours of incubation with mancozeb in hepatocyte-like HepaRG cells. However, the area of this peak increased with the incubation times and was similar in both untreated and treated cultures at 24h demonstrating that it corresponded to an endogenous hepatocyte-like HepaRG metabolite unrelated to mancozeb metabolism. This hypothesis was further confirmed by the absence of this peak in media of cholangiocyte-like HepaRG cells (**Figure 5B**) cultured in the same medium than hepatocyte-like HepaRG cells. Besides the formation of its well-documented ETU metabolite, the catabolism of mancozeb involves the production of at least 12 other metabolites (Engst and Schnaak 1970; World Health Organization 1988; INRS, report n°277, 2010), most of them known to be unstable compounds difficult to detect (**Supporting Information 2**). In a detailed LC-MS/MS analytical study, we investigated the presence of these metabolites in the culture media of hepatocyte-like HepaRG cells in order to identify the unknown compound eluting at 4.5 min in HPLC chromatograms (**Supporting Information 4**). We found that all known mancozeb metabolites were either undetectable or present at concentrations below the quantification limits (**Supporting Information 2**). By LC-MS/MS analysis, we found that the unknown compound eluting at 4.5 min in HPLC-UV had a molecular mass of 152 g/mol. Using the MASS BANK database, we identified two putative candidates, xanthine and oxipurinol, two compounds of the purine metabolic pathway. The LC-MS/MS analysis of commercial standards of these two compounds demonstrated that the unknown compound was xanthine (**Supporting Information 2, Table 1**). Although xanthine was detected in the culture media of control cells unexposed to mancozeb ($\sim 2.7 \mu\text{M}$ at 24h of culture), its levels were significantly increased up to $10.4 \mu\text{M}$ in media of hepatocyte-like HepaRG cells incubated with $100 \mu\text{M}$ mancozeb (**Table 1**). We next analyzed hypoxanthine and uric acid, two other main compounds of the purine metabolic pathway. We found that hypoxanthine was also produced by hepatocyte-like HepaRG cells incubated with mancozeb but not uric acid. Quantification of the

I-PeNiCa

lactate dehydrogenase (LDH) activities showed no significant differences between culture media of cells exposed or not to mancozeb (**Table 1**) indicating that the increase in hypoxanthine and xanthine levels upon mancozeb treatment was due to an active secretion rather than a passive leakage from cells resulting from loss of plasma membrane integrity in mancozeb-treated cells. Since hypoxanthine and xanthine have not been identified as metabolites of DTCs, we hypothesized that their efflux was a stress response resulting from mancozeb exposure.

3.4. Exposure to DTCs leads to Mn overload and Zn depletion and apoptosis in hepatocytes.

In order to determine if the production of DTC metabolites by hepatocyte-like HepaRG cells was responsible for DTC cytotoxicity, we exposed these cells to ETU as well as ethylene urea (EU) and ethylene diamine (EDA) and the combination of the three metabolites at concentrations ranging from 2 to 20 μM corresponding to mancozeb at ADI to 10xADI concentrations (**Figure 6A**). Exposure to these molecules had no significant effects on cell viability demonstrating that these metabolites were not involved in the cytotoxicity of DTCs towards hepatocytes.

DTCs represent a large group of synthetic compounds that share a similar chemical structure ($\text{R}_2\text{NCS}_2\text{R}$) (Ajiboye et al. 2022, **Supporting Information 2**). Several of these DTCs, including maneb, zineb and mancozeb, are salts containing Mn and Zn. While maneb and zineb contain only Mn and Zn, respectively, mancozeb is a combination of both maneb and zineb. We hypothesized that catabolism of DTCs in hepatocytes could lead to the release of Mn and/or Zn, present in their chemical structure. To address this hypothesis, hepatocyte-like HepaRG cells were exposed for 48h to maneb, mancozeb and zineb at the 3ADI concentration, as well

I-PeNiCa

as MnCl_2 and ZnCl_2 at $7\mu\text{M}$ corresponding to the concentration of Mn and Zn brought by exposure to DTCs at 3ADI (**Figure 6B**).

Quantification of the relative ATP contents in hepatocyte-like HepaRG cells demonstrated that exposure to maneb, mancozeb and MnCl_2 triggered similar toxicities while zineb and ZnCl_2 had no significant impact of cell viability (**Figure 6B**). The similar experiment performed using cholangiocyte-like cells showed no effect on cell viability with any of these treatments. These data strongly suggested that cell death of hepatocyte-like HepaRG cells exposed to maneb and mancozeb resulted from the release of Mn during their catabolism. We next studied the effects of exposures to maneb and MnCl_2 on the intracellular contents in Mn and Zn measured by ICP/MS in progenitor, cholangiocyte- and hepatocyte-like HepaRG cells (**Figure 6C-D, Supporting Information 5**). Hepatocytes exposed to maneb and MnCl_2 showed strong intracellular and mitochondrial accumulations of Mn with contents significantly higher than in untreated cells. Intracellular amounts of Mn were also increased in cholangiocytes and progenitor cells but in much lower extents compared those of hepatocyte-like cells. Importantly, significant decreases in intracellular Zn levels were also observed upon incubations with MnCl_2 and maneb only in hepatocyte-like cells. Together, these data supported the conclusion that Mn-containing DTCs induced cell death in metabolically competent hepatocytes capable of metabolizing these fungicides to produce innocuous metabolites, such as ETU, and to release Mn accumulating in cells and altering Zn content.

Since the treatment of hepatocyte-like HepaRG cells by MnCl_2 induced cytotoxicity, we used this experimental condition to determine whether the production of hypoxanthine and xanthine previously observed with mancozeb occurred in MnCl_2 -treated cells (**Figure 5, Table 1**). We found that exposure of differentiated HepaRG cells to MnCl_2 also enhanced the secretion of both xanthine and hypoxanthine (**Table 1**) demonstrating that these compounds are not

I-PeNiCa

metabolites resulting from DTC catabolism and suggesting that they may be produced in response to the alteration of the intracellular Mn/Zn content and/or oxidative stress.

To further study the role of the Zn depletion in DTC- and Mn-dependent toxicity, hepatocyte-like HepaRG cells were exposed to the pesticide mixture, maneb, mancozeb and MnCl₂ in absence or presence of a 10-fold excess of ZnCl₂ (70μM) and oxidative stress, relative ATP content, caspase 3 and 9 activities and cellular Mn and Zn amounts were measured (**Figure 7**). First, incubation of differentiated HepaRG cells with MnCl₂ led to ROS overproduction at similar levels to those observed in cultures exposed to maneb or mancozeb (**Figure 7A**). In addition, co-treatment with 70μM ZnCl₂ prevented the burst of ROS (**Figure 7A**), the decrease in ATP content (**Figure 7B**) and the onset of apoptosis (**Figure 7C**) in cultures exposed to DTCs and MnCl₂. Determination of cellular Mn and Zn contents in untreated control cells and cultures exposed to MnCl₂ and maneb in presence of 70μM of ZnCl₂ (**Figure 7D, Supporting Information 5**) demonstrated that the 10-fold excess in Zn partially but significantly reduced the intracellular and mitochondrial Mn overload and prevented Zn depletion induced by maneb and MnCl₂. Unexpectedly, while the excess in Zn increased the intracellular Zn content in absence of maneb and MnCl₂, it also reduced the mitochondrial contents in Zn in all culture conditions. These results demonstrated that partial restoration of Mn and Zn homeostasis disrupted by Mn-containing DTCs was sufficient to prevent oxidative stress and cytotoxicity in hepatocytes.

I-PeNiCa

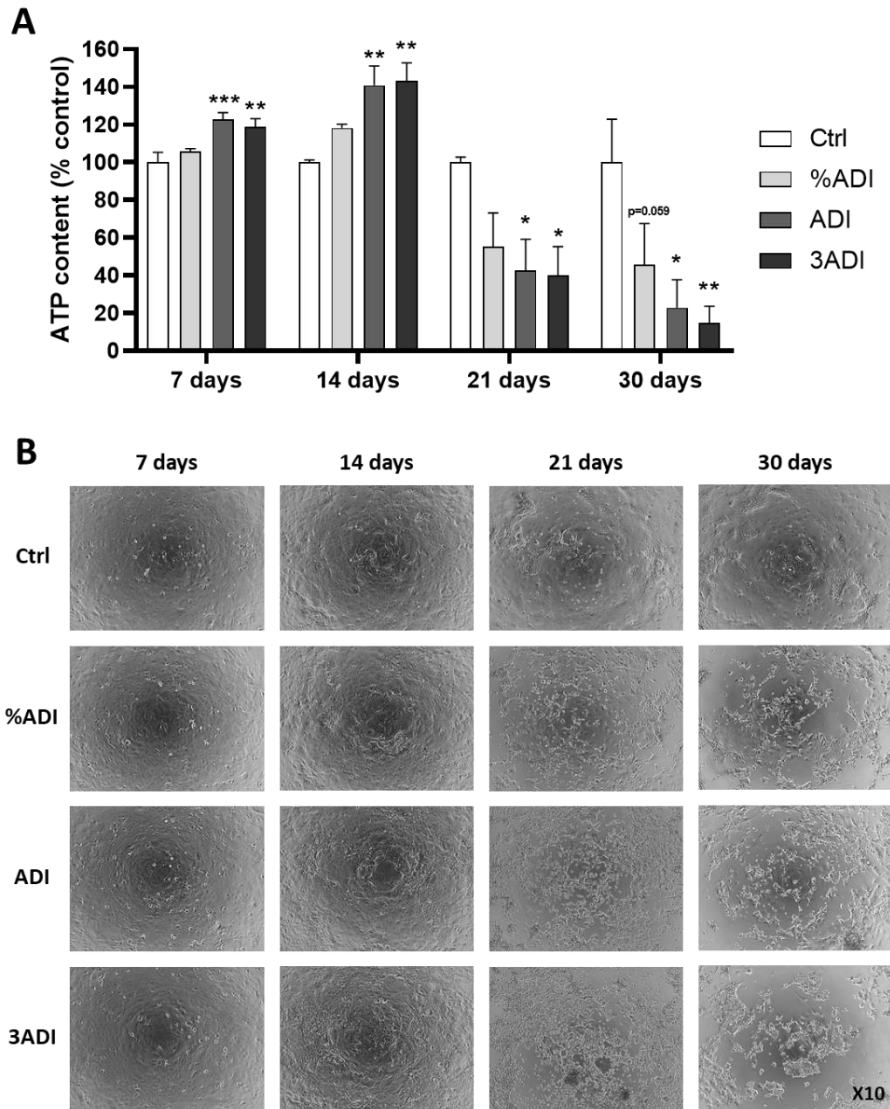


Figure 1

Chronic exposure of HepaRG cells to the pesticide mixture at low concentrations. A. Progenitor HepaRG cells were treated with the pesticide mixture during 4 weeks at different concentrations (%ADI, ADI or 3ADI). Cell viability was evaluated by measuring the intracellular ATP content after 7, 14, 21 and 30 days of exposure. Data were expressed as percentages of untreated control cells. Results are means \pm SEM ($N \geq 3$), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ significantly different from control (Ctrl) using One-way ANOVA and Dunnett’s multiple comparisons test. **B.** Cell morphologies in phase contrast of control and pesticide-treated cultures.

I-PeNiCa

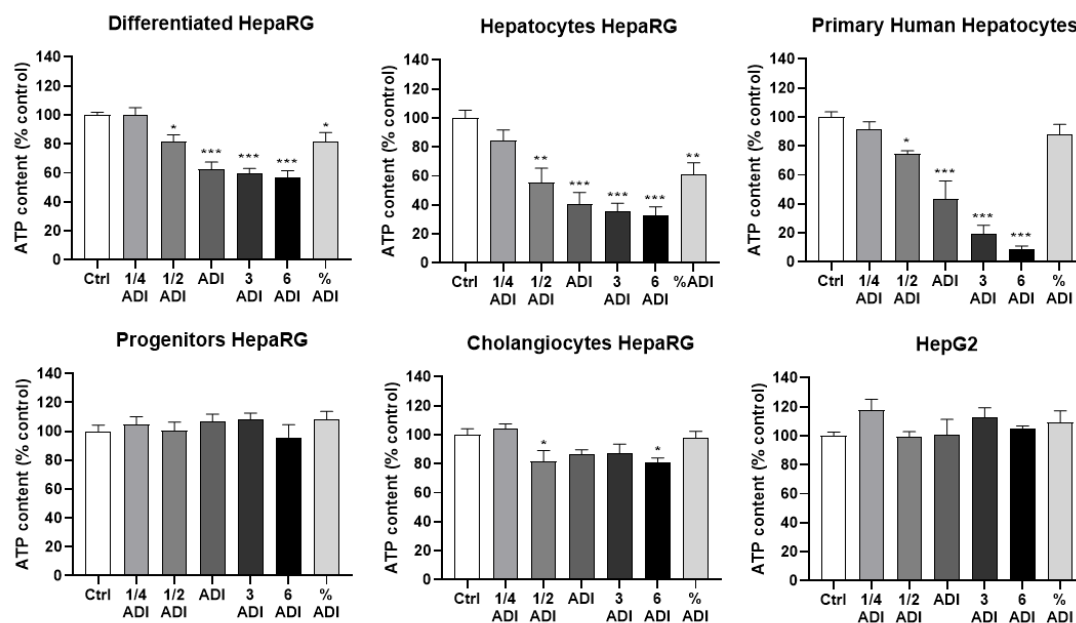


Figure 2

Acute exposure of hepatic cells to the pesticide mixture at low concentrations. Cell viabilities of differentiated HepaRG cells, human hepatocytes in primary culture and HepG2 hepatoma cells were measured by quantification of the intracellular ATP content after 48 h of exposure at different concentrations of the pesticide mixture (1/4ADI, 1/2ADI, ADI, 3ADI, 6ADI or %ADI). Data were expressed as % of untreated control cells. Results are means \pm SEM ($N \geq 3$), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ significantly different from control (Ctrl) using One-way ANOVA and Dunnett's multiple comparisons test.

I-PeNiCa

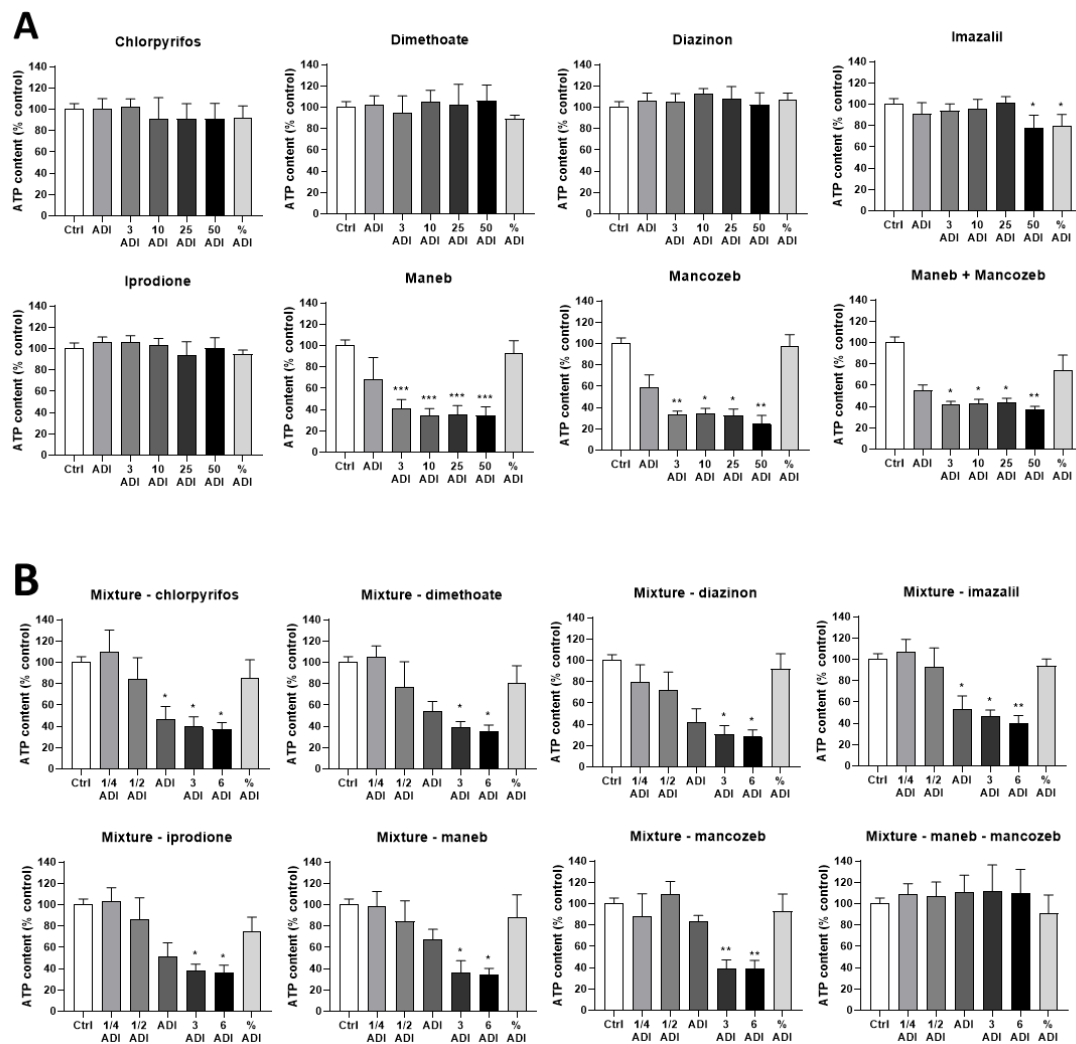


Figure 3

Hepatotoxicity of the pesticide mixture is triggered by maneb and mancozeb. **A.** Cell viability was evaluated by measuring intracellular ATP contents in hepatocyte-like HepaRG cells either in untreated control cultures (Ctrl) or exposed for 48h to each pesticide individually and the coinubcation with maneb and mancozeb at different concentrations (%ADI, ADI, 3ADI, 10ADI, 25ADI, 50ADI). **B.** Cell viability (ATP content) in hepatocyte-like HepaRG cells incubated for 48 h to 7 pesticide mixtures depleted in each pesticide (6 compounds per mixture) and a cocktail of 5 pesticides without maneb and mancozeb at different concentrations (%ADI, 1/4ADI, 1/2ADI, ADI, 3ADI, 6ADI). Data were expressed as % of control. Results are means \pm SEM (N \geq 3), *p< 0.05, **p< 0.01 significantly different from control (Ctrl) using One-way ANOVA + Dunnett's or Kruskal Wallis + Dunn's multiple comparisons tests.

I-PeNiCa

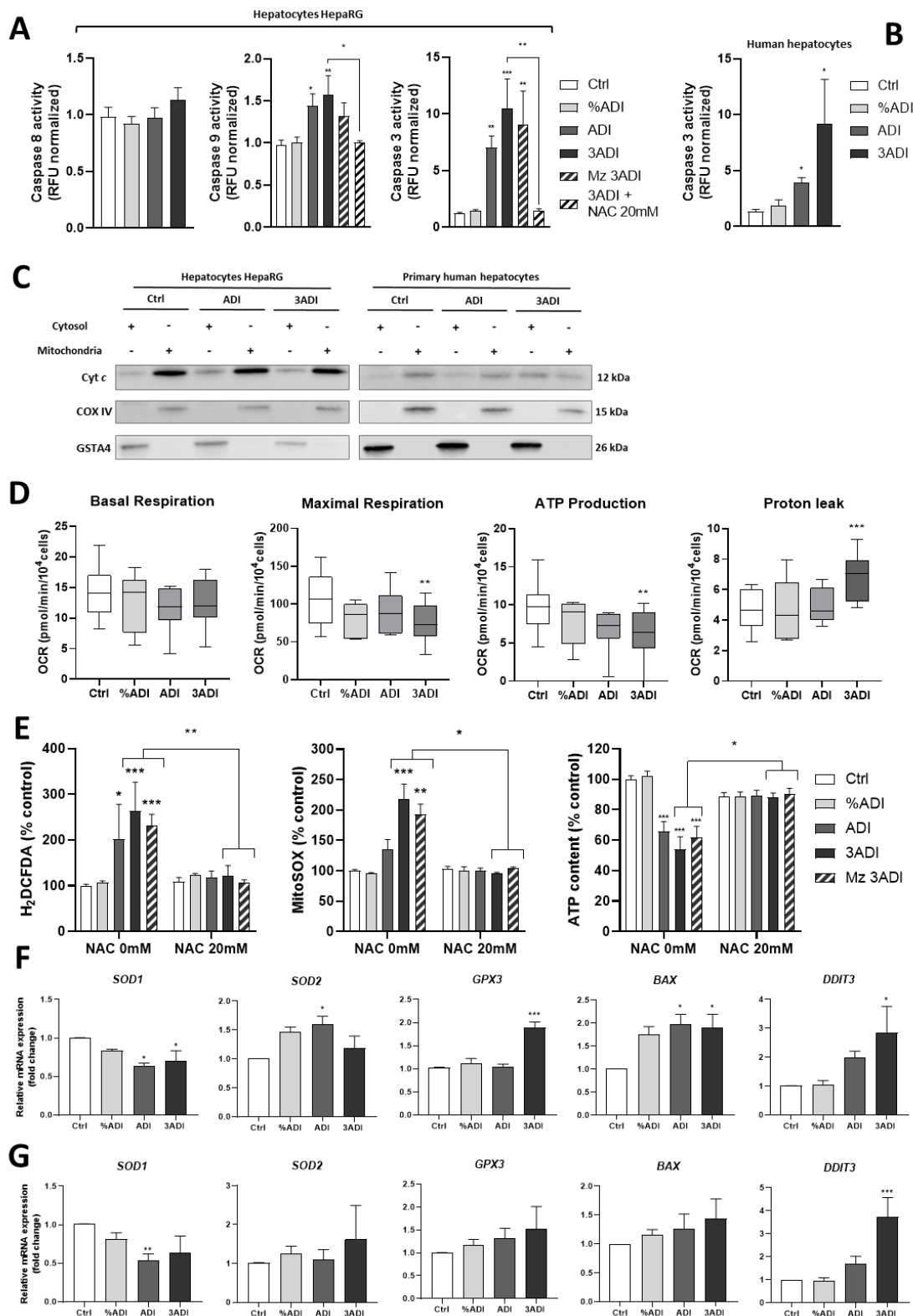


Figure 4.

Pesticide mixture and mancozeb induce oxidative stress and apoptosis in human hepatocytes. A. Caspase 8, 9 and 3 activities were quantified using Ac-IETD-AMC, Ac-LEHD-AMC and Ac-DEVD-AMC fluorogenic substrates, respectively, in hepatocyte-like

I-PeNiCa

HepaRG cells exposed for 24h to the pesticide mixture at different concentrations (%ADI, ADI and 3ADI), in absence or presence of N-acetylcysteine (NAC, 20 mM), and mancozeb (Mz) at the 3ADI concentration. **B.** Ac-DEVD-AMC substrate caspase 3 activity quantified in human hepatocytes in primary culture exposed to the pesticide mixture for 48h at different concentrations (%ADI, ADI and 3ADI). Relative data were normalized to the basal values measured in untreated control cells arbitrarily set as 1 (Ctrl). Results are means \pm SEM ($N \geq 3$), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ significantly different from control (Ctrl). **C.** Detection of cytochrome *c* by western blot in cytosol and mitochondrial subcellular fractions of differentiated HepaRG cells and human hepatocytes in untreated control (Ctrl) conditions and exposed to the pesticide mixture for 24 h at the ADI and 3ADI concentrations. **D.** Parameters of mitochondrial respiration (basal and maximal respiration, ATP production and proton leak) were analyzed in differentiated HepaRG cells exposed for 16 h to the pesticide mixture (%ADI, ADI and 3ADI concentrations) using XF Cell Seahorse Mito Stress Test [Results are means \pm SEM ($N \geq 3$), One-way ANOVA + Bonferroni's multiple comparisons test or Kruskal Wallis + Dunn's multiple comparisons test]. **E.** ROS production was evaluated in hepatocyte-like HepaRG cells using H₂DCFDA and MitoSOX probes after 24 h exposure to pesticide mixture (%ADI, ADI or 3ADI) or mancozeb alone (Mz 3ADI). N-acetyl cysteine (NAC 20mM) was used to neutralize ROS production (Kruskal Wallis + Dunn's multiple comparisons test). Cell viability of hepatocyte-like HepaRG cells was quantified by the relative intracellular ATP content after 24 h exposure to pesticide mixture (%ADI, ADI or 3ADI) or mancozeb alone (Mz 3ADI). **F-G.** Relative mRNA levels of *SOD1* and 2, *GPX3*, *BAX* and *DDIT3* genes in hepatocyte-like HepaRG cells (**F**) and human hepatocytes (**G**) exposed for 24 h to the pesticide mixture (%ADI, ADI or 3ADI). Data were expressed as % of the untreated control culture (Ctrl). Results are means \pm SEM ($N \geq 3$), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, significantly different from control (Ctrl).

I-PeNiCa

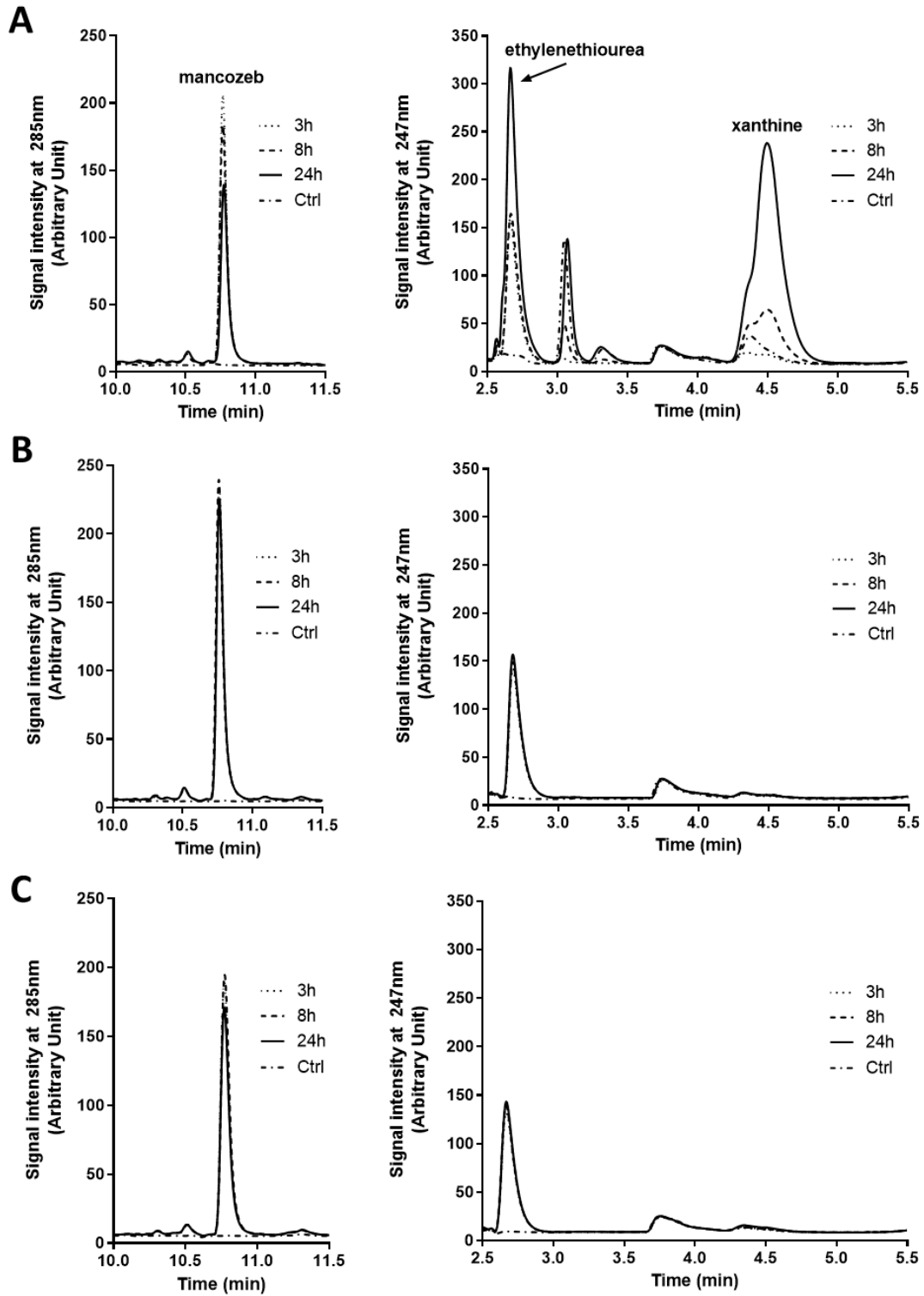


Figure 5

Hepatocyte-like HepaRG cells metabolize mancozeb. Representative UV-HPLC chromatograms of culture media without mancozeb (untreated control cells at 24 hours (h), Ctrl) or containing mancozeb (100 μ M) and incubated for 3, 8 and 24 h with **A**) hepatocyte like, **B**) cholangiocyte-like and **C**) progenitor HepaRG cells. Mancozeb, ethylenethiourea (ETU) and xanthine peaks are indicated in panel A.

I-PeNiCa

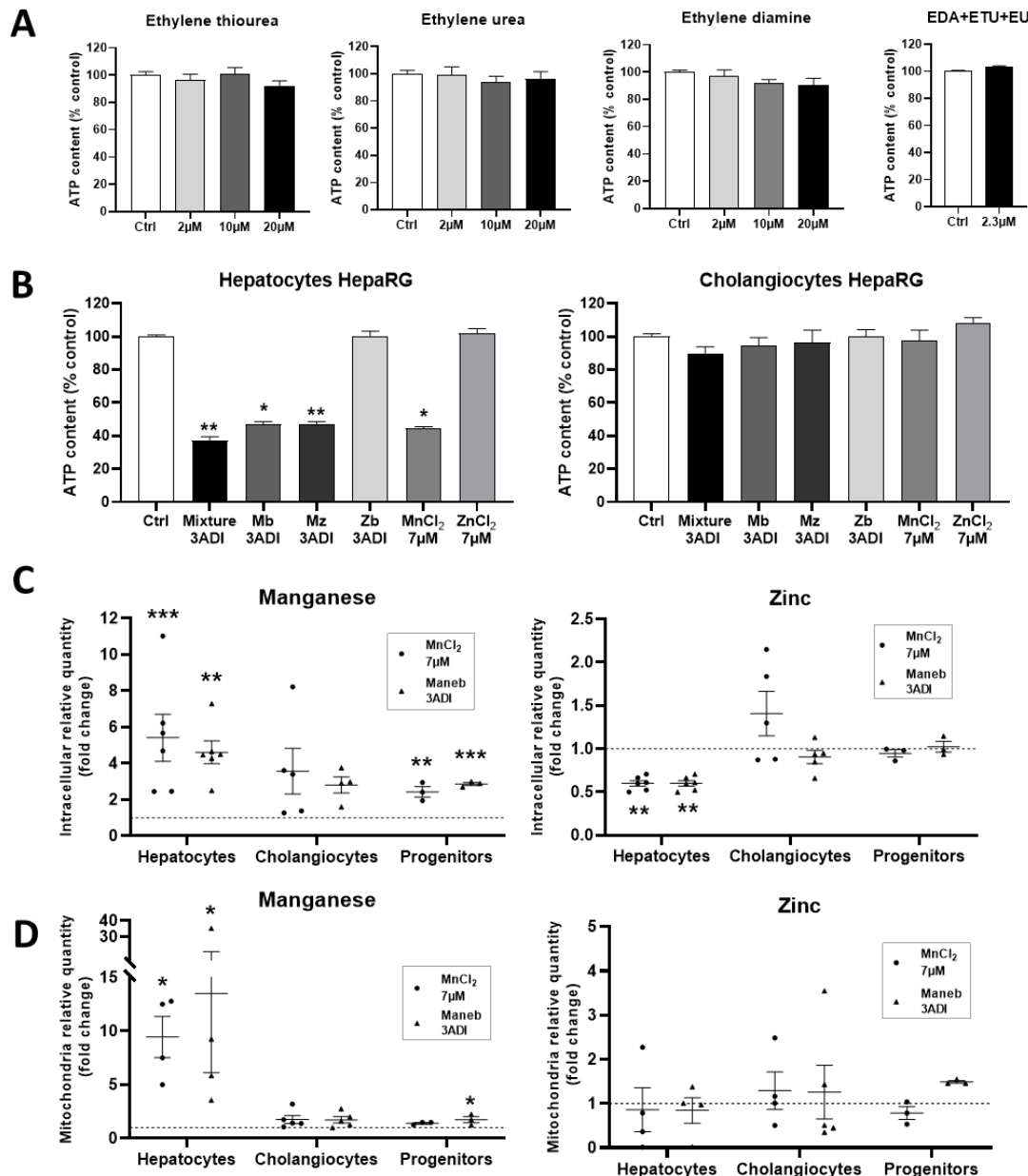


Figure 6

Exposure to maneb induces Mn overload and Zn depletion triggering cytotoxicity in hepatocytes. **A** Effects of DTCs metabolites ethylene thiourea (ETU), ethylene urea (EU) and ethylene diamine (EDA) metabolites and the combination of the three molecules (EDA+ETU+EU) at 2, 10 and 20 µM on cell viability (relative ATP contents) in hepatocyte-like HepaRG cell after 48h of exposure. **B.** Cell viability (relative ATP contents) in hepatocyte- and cholangiocyte-like HepaRG cell cultures after 48h treatments with the pesticide mixture (mixture), DTCs maneb (Mb), mancozeb (Mz), zineb (Zb) at 3ADI concentration, MnCl₂ and ZnCl₂ at 7µM. Relative ATP contents are expressed as % of untreated control cultures (Ctrl). Results are means ± SEM (N≥3), *p< 0.05, **p< 0.01 significantly different from control (Ctrl)

I-PeNiCa

with Kruskal Wallis + Dunn's multiple comparisons test. **C.** Relative intracellular (**C**) and mitochondrial (**D**) Mn and Zn contents in progenitor, hepatocyte- and cholangiocyte-like HepaRG cells measured by ICP/MS after 16h of exposures to maneb (3ADI) and MnCl₂ at 7μM. Data are expressed as fold change in metal contents between unexposed control cells arbitrary set as 1 (dotted line) and treated cells because of the large differences in metal contents between cell types and intracellular versus mitochondrial amounts. Absolute quantities of both Mn and Zn are presented in ng/well in the Supporting Information 5. Results are mean ± SEM (N≥3), *p< 0.05, **p< 0.01 significantly different from control (Ctrl) One-way ANOVA + Dunnett's multiple comparisons test or Kruskal-Wallis + Dunn's multiple test

I-PeNiCa

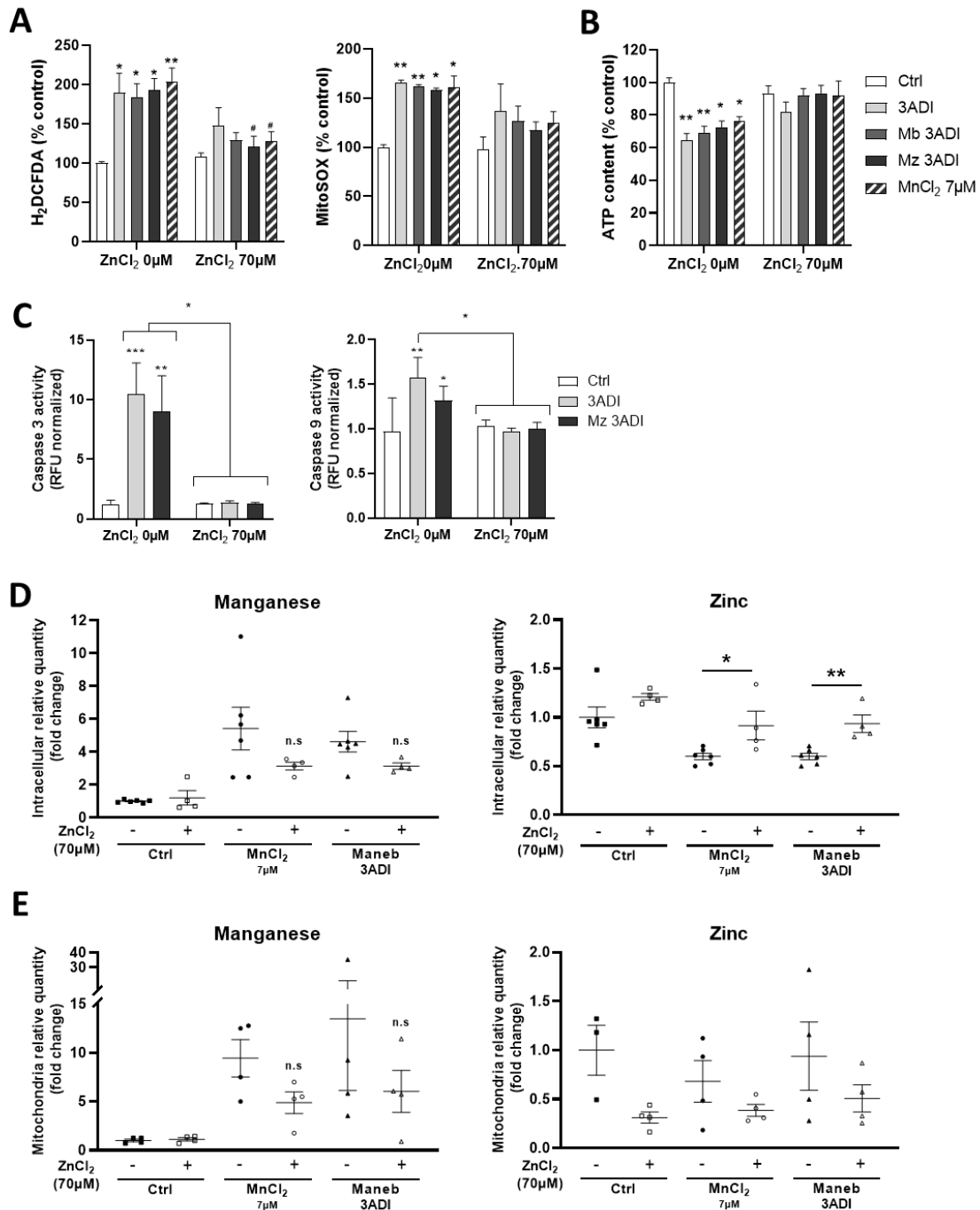


Figure 7

Excess of Zn prevents oxidative stress and cytotoxicity induced by DTCs in hepatocytes.

A. Relative ROS levels evaluated in hepatocyte-like HepaRG cells using H₂DCFDA and MitoSOX probes and, **B.** relative ATP contents in hepatocyte-like HepaRG cells after 24h of exposure to the pesticide mixture (3ADI), DTCs maneb (Mb 3ADI) and mancozeb (Mz 3ADI), and MnCl₂ at 7μM in absence or presence of a 10-fold-excess in ZnCl₂ at 70μM. For ROS production, statistics are: One-way ANOVA + Sidak's multiple comparisons test or Kruskal-Wallis + Dunn's multiple comparisons test, *p< 0.05, **p< 0.01, significantly

I-PeNiCa

different from untreated control cultures (Ctrl), # $p < 0.05$, significantly different from cultures exposed for 24h to the pesticide mixture, maneb, mancozeb and $MnCl_2$ in absence of a 10-fold-excess in $ZnCl_2$ at $70\mu M$. For ATP contents, results are means \pm SEM ($N \geq 3$), statistics are: Kruskal-Wallis + Dunn's multiple comparisons test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significantly different from untreated control (Ctrl). **C.** Relative caspase 3 and 9 activities quantified using Ac-DEVD-AMC and Ac-LEHD-AMC fluorogenic substrates, respectively, after exposure to the pesticide mixture (3ADI) and mancozeb (Mz 3ADI) in absence or presence of a 10-fold-excess in $ZnCl_2$ at $70\mu M$. Kruskal-Wallis + Dunn's multiple comparisons test. Results are means \pm SEM ($N \geq 3$), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, significantly different from untreated control cultures (Ctrl) and from cells co-exposed to excess of Zn. **D-E.** Relative intracellular (**D**) and mitochondria (**E**) Mn and Zn contents measured by ICP/MS after 16h exposures of hepatocytes HepaRG to maneb (3ADI) and $MnCl_2$ at $7\mu M$ in absence (-) and presence (+) of a 10-fold excess of $ZnCl_2$ ($70\mu M$). Data are expressed as fold change of untreated control cells (Ctrl). Results are means \pm SEM ($N \geq 3$).

4. Discussion

The initial goal of this work was to study the effects of a mixture of 7 pesticides (chlorpyrifos-ethyl, dimethoate, diazinon, iprodione, imazalil, maneb, mancozeb) often detected in food samples (EFSA 2017) at low concentrations in human hepatocytes *in vitro*. We evidenced that the pesticide mixture induced a strong cytotoxicity in hepatocytes-like HepaRG cells and human hepatocytes following chronic and acute exposures. The pesticides triggered the production of ROS, an ER stress response and DNA damages, which led to cell death by intrinsic apoptosis involving caspases 3 and 9. Unexpectedly, the individual evaluation of each pesticide demonstrated that the toxicity was carried by the Mn-containing DTCs maneb and mancozeb as the mixture of the five other pesticides without these compounds did not affect viability, and that the exposure to maneb or mancozeb alone recapitulated the effect of the mixture.

DTCs are broad-spectrum fungicides reacting with amino acids and enzymes. They are used on many fruits, vegetables, nuts, and field crops and spread on potatoes, corn, sorghum, tomatoes, apples, pears, grapes, onions and cereal grains to protect against fungal diseases. DTCs have been employed for decades with the examples of maneb and mancozeb registered on the market since 1948 and 1961, respectively. Nearly 200,000 tons of maneb are spread every year in the world and the overall amounts of mancozeb is estimated to several millions (Gullino et al. 2010; National Toxicology Program 2014). Maneb was banned in 2017 in E.U. and but it is still used worldwide in large amounts. In 2018, the Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES) recommended to the European Commission the non-renewal of the mancozeb approval given risks for human health and the high levels of exposure resulting of its intensive use (ANSES saisine 2018-SA-0163). EU has adopted the non-renewal of mancozeb (Official Journal on the European Union, L 423/50, 2020), which was withdrawn in 2021 with a grace period that expired in January 2022.

I-PeNiCa

Despite many information regarding DTC toxicity *in vivo* and *in vitro*, there are still ongoing investigations to decipher their mechanisms of action. Maneb and mancozeb show low acute toxicity *in vivo* (median lethal dose/LD₅₀ >1g/kg), but adverse effects have been described in rodents upon chronic exposure (5 to 10 mg/kg b.wt./d) with neurotoxicity and hyperthyroidism (World Health Organization 1988; INRS, report n°277, 2010). Chronic occupational or experimental exposures to maneb induce Parkinson-like syndromes in humans and animals (Ferraz et al. 1988; Thiruchelvam et al. 2002). Their main metabolite ETU also shows low toxicity (median lethal dose/LD₅₀ >1.5g/kg b.wt.) in rodents. However, ETU is a structural analog of thionamides, which inhibits the thyroid peroxidase, reduces the synthesis of triiodothyronine (T₃) and thyroxin (T₄) and induces thyroid hypertrophy (Panganiban et al. 2004; Goldner et al. 2010), defining an endocrine disrupting effect. ETU also alters the proliferation/survival of murine hematopoietic cell lineages with the development of pancytopenia after long-term exposure (Porreca et al. 2016). In addition, reports also suggest that occupational exposure to maneb and mancozeb induces alterations in lymphocyte and monocyte blood counts (Corsini et al. 2005, Colioso et al. 2007).

The *in vivo* hepatotoxicity of DTCs is less described with, however, studies demonstrating that mancozeb at high doses, 313.6 mg/kg b.wt./d, 3 times a week for 6 weeks (Sakr et al. 2007) and 750 mg/kg b.wt./d for 10 weeks (Hashem et al. 2018; Saber et al. 2019) induce liver damages with disruption of the normal histology, necrosis and mononuclear cell infiltration, depletion in glutathione, lipid peroxidation, genotoxicity and induction of inflammation in rats. Interestingly, antioxidant molecules such as *Nigella sativa* oil (Hashem et al. 2018) and curcumin (Saber et al. 2019) reduce the hepatotoxicity induced by mancozeb. Demonstration has also been brought that ETU (125mg/kg, single dose) induces hepatic morphological and histological abnormalities in newborns from female rats exposed during gestation, with strong remodeling of the hepatic trabeculae and severe hepatic megakaryocytosis (Lemos et al. 2012).

I-PeNiCa

In vitro studies have described mitochondrial-mediated cytotoxicity and apoptosis of maneb and/or mancozeb in various cell types including rat mesencephalic primary embryonic cells (Domico et al. 2007), SK-N-AS neuroblastoma cells (Anderson et al. 2018), AGS gastric carcinoma cells (Kumar et al. 2019), HepG2 hepatoma cells (Lori et al. 2021) and HT-29 and Caco2 colon cells (Hoffman and Hardej 2012; Hoffman and Hardej 2016; Dhaneshwar and Hardej 2021) through ROS production. In these reports, the cells were exposed to a wide range of concentrations of maneb and/or mancozeb from 1 to 500 μM , and the cytotoxic effects were observed at high concentrations from 10 to 100 μM , except for rat mesencephalic primary embryonic cells in which ROS production was detected at 3 μM (Domico et al. 2007).

To the best of our knowledge, our study is the first report describing induction of oxidative stress and apoptosis by maneb and mancozeb in differentiated hepatocyte-like HepaRG cells and primary human hepatocytes. In these cell models, the adverse effects occurred at concentrations as low as $\frac{1}{2}$ ADI (1.13 μM) in acute exposures and at hNDI (0.73 μM) in chronic treatments demonstrating that human hepatocytes are particularly sensitive to maneb- and mancozeb-induced toxicity. Interestingly, cytotoxic effects at such low concentrations were not found in other hepatoma cell lines and non-hepatic cells, which do not express phase I and II XMEs enabling pesticide metabolism. In this report, we showed that human hepatocytes metabolize mancozeb to produce ETU, which correlated with intracellular accumulation in Mn and depletion in Zn triggering ROS overproduction, xanthine/hypoxanthine release, ER stress and apoptosis.

It has been previously shown that maneb and mancozeb alter metal contents in HT-29 and Caco2 colon cells (Hoffman et al. 2012; Hoffman et al. 2016). In these studies, the authors demonstrated that maneb and mancozeb cause Mn overload but also strongly enhanced Zn and copper (Cu) cellular contents (Hoffman et al. 2012). Nevertheless, the same authors also reported that DTC namab, which contains sodium but not Mn, affected Cu and Zn contents in a much lower extent than maneb and mancozeb supporting the involvement of Mn in oxidative stress induced by maneb

I-PeNiCa

and mancozeb (Hoffman et al. 2016). In another recent study, authors reported that rats exposed to mancozeb (at 100 mg/kg b. wt. via oral gavage once daily for 28 days) showed no alteration of hepatic histology but a slight increase in Mn and glutathione contents and increases in glutathione peroxidase and reductase activities in the liver (Kistingner et al. 2022). However, in the same study, the use of namab (at 95mg/kg b. wt.) recapitulated the effects of mancozeb on the liver suggesting that the organic backbone of DTCs but not metals (Mn or Zn) was mainly responsible for the alteration of hepatic redox status (Kistingner et al. 2022).

In this context of contradictory data, our study further supports the mechanism of toxicity of the Mn-containing DTCs maneb and mancozeb through their metabolization in hepatocytes generating intracellular Mn accumulation and depletion in zinc (Zn), which are the key events in the observed cytotoxicity. The conclusion that alteration of the Mn/Zn homeostasis plays crucial role in hepatocyte death is based on the following observations 1) exposure to ETU did not induce hepatocyte cell death, 2) toxicity of maneb was prevented by a 10-fold excess in ZnCl₂, which partially restored the Mn/Zn contents indicating that Zn/Mn intracellular flux are predominant in the pesticide-mediated toxicity, 3) the DTC zineb, with chemical structure similar to maneb and mancozeb but containing only Zn, did not induce hepatocyte cytotoxicity, and 4) exposure of hepatocytes to MnCl₂ produced similar adverse effects than maneb and mancozeb.

While Mn is an essential metal because of its role as co-factor of multiple enzyme-mediated catalytic activities, high Mn overload resulting from occupational overexposure causes the well-described **manganism, a neurological syndrome similar to Parkinson's disease** (Kim et al. 2015). Even in non-occupationally exposure (i.e. lower doses of exposure), Mn remains one of the most toxic metals with endocrine disrupting effects especially during pregnancy with impacts on birth outcomes (Tsai et al. 2015; Signes-Pastor et al. 2019). Mn through its ability to cross the blood-brain barrier more efficiently in infants because of an incompletely developed blood–brain

I-PeNiCa

barrier and their inability to fully eliminate this metal, accumulates in the hypothalamus to affect the timing of puberty (Dees et al. 2017).

The characterization of Mn homeostasis was recently established with the identification of the membrane transporters DMT1 (*SLC11A2*), ZIP18 (*SLC39A8*), *SLC30A10* and ZIP14 (*SLC39A14*) regulating Mn uptake and efflux in enterocytes, cholangiocytes and hepatocytes (Katz and Rader 2019). Importantly, these transporters also regulate transport of other metals including Zn, which is consistent with our data showing that excess in ZnCl₂ abolished the deleterious effects of DTCs and MnCl₂ in hepatocytes. This observation may be of interest in order to prevent adverse effects of Mn-containing DTCs during occupational exposure through a specific diet containing Zn supplementation.

The principal risks of exposure to DTCs are expected to be inhalation resulting from spray drift from application sites (van Wendel de Joode et al. 2014) and residues present on agriculture products (EFSA 2017). Despite the fact that most DTCs will soon be banned in E.U., chronic exposure of worldwide populations to maneb and manozeb at low doses is likely to persist in the future and the impact of both ETU and Mn as endocrine disruptors needs to be considered especially for individuals with liver diseases. In healthy individuals, excess of Mn in blood or liver is released into the bile and eliminated with the stool (Katz and Rader 2019). Patients suffering from liver diseases could be more prone to Mn toxicity since their Mn removal system through the production and flow of bile may be impaired. Consistently, patients with liver cirrhosis have increased blood and brain Mn contents that may contribute to the occurrence of neurodegenerative disorders (Mehkari et al. 2020). In this context and in the light of our data, the impact of long-term exposures to low doses of Mn-containing DTCs especially in the liver remains to be investigated.

5. Materials and Methods – Supporting Information 1

Pesticides:

Table

Pesticides	CAS Number	%ADI			ADI		
		(µg/kg/days)	(µg/L)	(µM)	(mg/kg/days)	(mg/L)	(µM)
Chlorpyrifos	2921-88-2	0.292	3.51	0.01	0.01	0.12	0.3423
Diazinon	333-41-5	0.076	9.13	0.03	0.0002	0.0024	0.0078
Dimethoate	60-51-5	0.191	2.29	0.01	0.001	0.012	0.0523
Imazalil	35554-44-0	1.734	20.80	0.07	0.025	0.3	1.009
Iprodione	36734-19-7	0.275	3.30	0.01	0.06	0.72	2.181
Maneb	12427-38-2	16.14	193.67	0.73	0.05	0.6	2.262
Mancozeb	8018-01-7	15.99	191.88	0.72	0.05	0.6	2.251

References, chemical structures and values of ADI of each pesticide of the mixture and the highest Nutritional Daily Intake (hNDI) or Theoretical Maximum Daily Intake (TMDI) further referred as %ADI for French population as given by the 2014 annual report EFSA. All %ADI values for the seven compounds are < to ADI values.

Cell cultures:

Primary normal BM-MSCs were isolated from healthy donors (without any hematological disorder) undergoing orthopedic surgery (University Hospital, Tours, France) after informed consent and following a procedure approved by the local ethical committee. BM-MSCs were amplified as previously described (Delorme B Met Mol Biol 2007). MSCs (used between passages 4 and 7) were cultured at 2,000 cells per cm² in α -MEM modified with ribonucleosides and deoxyribonucleosides and supplemented with FCS (10%) and 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 0.2 ng/ml of FGF2.

Peripheral blood mononuclear cells were obtained from two human buffy coat (Etablissement Français du Sang, Rennes, France) by differential centrifugation on UNI-SEP maxi U10 (Novamed, Jerusalem, Israel). The experiments were performed in compliance with the French legislation on blood donation and blood products' use and safety. Monocytes from healthy donors were enriched using a human CD14 separation kit (Microbeads; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), plated at a density of 0.5 x 10⁶ cells per well in 24-well plates and cultured at 37 C with 5% humidified CO₂ in RPMI 1640 medium supplemented with 100 IU/ml penicillin–100 mg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine and 10% FCS BioWhittaker®.

I-PeNiCa

Macrophages were obtained after differentiation from monocytes by incubation with 50 ng/mL rhGM-CSF in RPMI 1640 medium during 7 days, as previously described (Vène et al., *Int J Pharm* 2016). All cells were cultured at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere.

HepG2 and Huh7 human hepatoma cell line were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% FBS, 1% glutamine (200mM), 100U/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin.

Rat liver epithelial cells (RLEC) were obtained as previously described from rat livers (Corlu et al., *J Cell Biol* 1991) and maintained in William's E medium supplemented with 10% Fetal calf serum, 100 units/mL penicillin, 100µg/mL streptomycin, 2mM L-glutamine.

List of forward and reverse primers used for RT-qPCR:

Supporting Information 2

	Primer sequence	
	Forward	Reverse
BAX	5'-GGA-GCT-GCA-GAG-GAT-GAT-TG-3'	5'-AGT-TGA-AGT-TGC-CGT-CAG-AA-3'
DDIT3	5'-GTC-TAA-GGC-ACT-GAG-CGT-ATC-3'	5'-CAC-TTC-CTT-CTT-GAA-CAC-TCT-CT-3'
GPX3	5'-CAA-CCC-TTT-CTC-TCC-AGT-TCT-C-3'	5'-CCC-AAG-GTT-GAG-GTA-TCA-GTT-AG-3'
SOD1	5'-GAA-AAC-ACG-GTG-GGC-CAA-AG-3'	5'-GCA-GTC-ACA-TTG-CCC-AAG-TC-3'
SOD2	5'-TTG-CTG-GAA-GCC-ATC-AAA-CG-3'	5'-GAA-ACC-AAG-CCA-ACC-CCA-AC-3'
TBP	5'-GAG-CTG-TGA-TGT-GAA-GTT-TCC-3'	5'-TCT-GGG-TTT-GAT-CAT-TCT-GTA-3'

Genotoxicity assay using γ -H2AX staining:

The γ -H2AX staining was used to monitor genotoxicity. After 24 hours of treatment, cells were washed with PBS and then fixed with 4% PAF for 15 minutes at RT. Cells were permeabilized with PBS containing 0.1% Triton X-100 for 5 minutes at RT, rinsed twice and then blocked with FBS 10% in 0.1% PBS-Tween 20 for 1h at RT. Cells were washed twice with PBS 0.1% Tween 20 and then incubated overnight at 4°C with Anti-gamma H2A.X (phospho S139) antibody [EP854(2)Y] (Alexa Fluor 488) ab195188 (abcam) at 1/50 dilution or with non-immune control antibodies labeled with Dylight 488 at 1/250 dilution. Antibodies were diluted

I-PeNiCa

in PBS 0.1% Tween 1% BSA. After two washes, nuclear DNA staining was performed using Hoechst 33342 at 10µg/mL in PBS 0.1% Tween 20. Then, cells were washed with PBS and γ-H2AX positive foci were observed by fluorescence microscopy using Zeiss Inverted Microscope and photographs were analyzed with the AxioVision Software.

Detection of cells with sub-G1 DNA content by flow cytometry:

Apoptotic cells with hypoploid DNA content were detected by flow cytometry using propidium iodide. Briefly, after 24 hours of treatment, cells were collected and DNA was labeled using the BD Cycletest Plus DNA Kit (BD Bioscience ref: 340242). The fluorescence intensity of 10,000 cells was analyzed with a Becton Dickinson le LSRFortessa™ X-20 (cytometry core facility of the Biology and Health Federative research structure Biosit, Rennes, France).

Buffers and substrates used for measurement of mitochondrial OXPHOS complex enzyme activities:

Complex	I	II	III	IV	V	CS
Potassium dihydrogen phosphate	80mM pH7.4	50mM pH7.5	10mM pH7.8	-	20mM pH8.1	-
Adjuvants	BSA 1mg/mL	BSA 1mg/mL EDTA 0.1mM	BSA 1mg/mL EDTA 2mM Lauryl malloside 0.6mM	BSA 1mg/mL Lauryl malloside 2.5mM	MgCl ₂ 1mM KCl 2mM Pyruvate kinase 1U/mL LDH11.7U/mL PEP 0.4mM FCCP 0.15mM	Oxaloacetate 0.5mM Triton X100 0.1%
Inhibitors	KCN 1mM Azide 2mM Rotenone 10 µM	KCN 2mM Rotenone 10µM Antimycin 2µM	KCN 0.24mM Antimycin 4µg/mL		Antimycin 0.1µg/mL adigomycine 0.01µg/mL	
Substrats	Decylubiquinone 0.1m DCPP 75µM NADH 30µM	Succinate 20mM DCPP 80µM Decylubiquinone 60µM	Cytochrome C 40µM Decylubiquinol 0.1mM	reduced Cytochrome C 50µM	NADH 0.15mM ATP 0.2mM	DTNB 0.15mM ACoA 0.3mM

BSA : bovine serum albumin ; DCPIP : 2,6-dichlorophenolindophenol ; KCl : potassium chloride ; KCN : potassium cyanide ; LDH : lactate dehydrogenase ; MgCl₂ : magnesium chloride ; PEP : phosphoenolpyruvate

Supporting Information 2

Metabolism of mancozeb in hepatocyte-like HepaRG cells.

Based on bibliographic data (references below), 12 metabolites that can be formed during the catabolism of mancozeb have been inventoried. Among these 12 compounds, eight have analytical standards that were purchased and analyzed in this study (Table 5). Ethylene thiourea (ETU) (99,6% purity), mancozeb (70.1%), EDA (100%), N-acetyl-EDA (100%), allantoin (100%), glycine (100%) and creatinine (99.1%) were purchased from Dr. Ehrenstorfer GmbH, EBIS (100%) from Toronto Research Chemicals. Formic acid, methanol and water were HPLC/MS-grade, and were purchased from J.T. Baker (Paris, France).

The analysis was performed by direct injection in UPLC/MSMS with a Xevo-TQD ® triple quadrupole (Waters) in MRM (Multiple Reaction Monitoring) mode. The mode of ionization retained is positive electrospray.

Chromatographic separation was done with a Waters Acquity UPLC HSS-T3 C18 column (2.1mm x 150 mm, particle size 1.8 µm, Waters®) maintained at 30 °C. The mobile phase was a gradient of water/0.01% formic acid (v/v) (A) and methanol /0.05% formic acid v/V (B) with a flow rate of 0.2 mL/min. The elution gradient started with 95% eluent A, maintaining isocratic conditions for 2 minutes. Then eluent B increased to 100% in 7 minutes and was maintained for 2.50 minutes. Finally, initial conditions were reached again in 0.10 minutes with a re-equilibrium time of 3.4 minutes to restore the column. The injection volume was 5 µL.

For the mass detector, the parameters were as following: Source temperature 150 °C, desolvation temperature 650 °C, cone gaz flow 50 L/h, desolvation gas flow 800 L/h, spray voltage 1kV.-

For each compound, distinctive ions and transitions were selected for identification (MRM2) and quantification (MRM1), as well as for confirmation purposes.

I-PeNiCa

Dimethyl-sulfoxide (DMSO) was the solvent for ETU, mancozeb, hypoxanthine to prepare stock solution at 1mM and a mixture of water and 0.1% NAH4OH for xanthine and uric acid.

The injection of analytical standards (at a concentration of 10 µM in water) allowed to define the analytical features of the 8 metabolites and active substance (table 1) and to estimate their limits of quantification. 9 concentrations (0.01 to 10 µM in a mixture water/ William's E Medium 50/50 v/v)) were injected to determine the calibration function. Data was best fitted with a quadratic calibration except for ETU (cubic function). A control (5 µM) was injected every 15 samples.

This method was applied to samples, in culture media containing or not mancozeb and incubated or not with HepaRG cells with direct injection (5µL).

Mancozeb / metabolites	CAS n°	Rt (min)	Cv (V)	Precursor ion	MRM1	MRM2	LoQ (µM)
Mancozeb	8018-01-7	8.7	40	213	213>86 (25)	213>169 (17)	0.01
Ethylenediamine (EDA)	107-15-3	1.5	20	61	61>44 (30)	-	11
Glycine	56-40-6	1.6	22	76	76>30 (8)	76>48 (8)	n.d.
N-acetyl-EDA (N-(2-aminoethyl)acetamide)	1001-53-2	1.6	20	103	103>44	103>43	11
Allantoin	95-59-6	1.8	25	157	157>97 (12)	157>114 (10)	3
Creatine	57-00-1	1.8	30	132	132>44 (16)	132>90 (12)	0.1
EU – ethylene urea	120-93-4	2.6	45	87	87>44 (12)	87>42 (15)	0.2
ETU – ethylene thiourea	96-45-7	3.0	30	103	103>44 (14)	103>60 (21)	0.1
EBIS (ethylene bisisothiocyanate sulfide)	33813-20-6	8.9	40	177	177>43 (22)	177>101 (20)	0.1

Table 5 : Detection parameters of mancozeb and its metabolites (Rt: retention time; Cv: cone voltage; MRM1 quantification (uma) (collision energy - eV); MRM2 confirmation (uma) (collision energy - eV); LoQ:Limit of Quantification; n.d.: not determined)

Analyses showed that EU, EDA, N-Acetyl-EDA, allantoin and EBIS were absent of all samples analysed. Glycine was found in all media at nearly identical amounts because this amino acid is a component of the Williams E medium used for the culture of HepaRG cells (concentration

I-PeNiCa

in the medium 0.66 mM). Creatine is also found in culture media incubated with cells regardless of the incubation with mancozeb indicating that creatine is most likely produced by cells. Ethylene thiourea (ETU) was found only in media containing mancozeb, and surprisingly, even in absence of cells. The amounts of ETU did not change in culture media of cells that do not metabolize the mancozeb demonstrating that the ETU found in these media was a degradation product present in the stock solution of mancozeb. In contrast, the amounts of ETU increased in the culture media of hepatocyte-like HepaRG cells exposed to mancozeb demonstrating the catabolism by these cells of this fungicide into its main metabolite.

For the 5 other metabolites of mancozeb (2-imidazoline, ethylene thiuram disulfide (ETD), ethylene thiuram monosulfide (ETM), ethylenethiourea-N-thiocarbamide (ETT) and Jaffe's base sulfoxide) for which it was not possible to obtain analytical standards, a full scan screening was realised and their mass were scrutinized. No peak with these exact masses were found in the samples, which confirmed their absence in the culture media of HepaRG cells incubated with mancozeb.

Identification of xanthine

Incubation of mancozeb with hepatocyte-like HepaRG cells led to the production of two compounds detected by HPLC/UV at 247 nm at retention times of 2.7 and 4.5 minutes. The peak detected at 2.7 minutes co-eluted with ETU standard (data not shown) and was confirmed as ETU by UPLC-MS/MS. To identify this compound, the first step was to determine its exact mass. To do this, the samples were injected onto an UPLC/MSMS with a Xevo-TQD® triple quadrupole (Waters) in MRM (Multiple Reaction Monitoring) mode under analytical conditions similar to those used in HPLC in order to maintain a similar elution order of compounds and retention time.

I-PeNiCa

The masses observed in positive electrospray ionization mode (153) and in negative ionization mode (151) led to the conclusion that the compound has a molecular mass of 152 g/mol. The use of the MASS BANK database (public mass spectrum library referencing about 10,000 compounds: <https://massbank.eu/MassBank/Search>) made it possible to identify two potential candidates: xanthine (CAS 69-89 -6) and oxypurinol (CAS 2465-59-0), two compounds of the purine family. We purchased the analytical standards (Tokyo Chemical Industry Co) of these two compounds (Oxypurinol - 95.1% / xanthine – 100 %) and their injection allowed the identification of the unknown compound: xanthine (Table 2).

The presence of xanthine was confirmed in the culture media of control cells unexposed to mancozeb at levels approximately 10 times lower than the amounts detected in media of cells incubated with 100 μ M mancozeb. Importantly, we found that exposure of HepaRG cells to 100 μ M MnCl₂ led to the production and release of xanthine in culture media in the same amounts as those found in cultures exposed to mancozeb demonstrating that xanthine was not a metabolite of mancozeb catabolism but a compound produced in response to both mancozeb and MnCl₂ treatment (**Figure 5, Table 1**).

Putative compounds based on molecular mass	CAS n°	Rt (min)	Cv (V)	Precursor ion	MRM1	MRM2	LOQ (μ M)
Xanthine	69-89-6	4.5	40	153	153>136 (24)	153>110 (16)	0.10
Oxypurinol	2465-59-0	5.0	40	153	153>80 (26)	153>136 (24)	0.50

Table 6 : Parameters for the identification of Xanthine and Oxypurinol in positive electrospray ionization mode (Rt: retention time; Cv: cone voltage; MRM1 quantification (uma) (collision energy - eV); MRM2 confirmation (uma) (collision energy - eV); LoQ: Limit of Quantification)

Considering the biosynthesis and catabolism of the xanthine, we decided to also analyze hypoxanthine and uric acid, two main compounds of this metabolic pathway. Analytical standard hypoxanthine (99.5%) were purchased from HPC standards and uric acid (100%) from

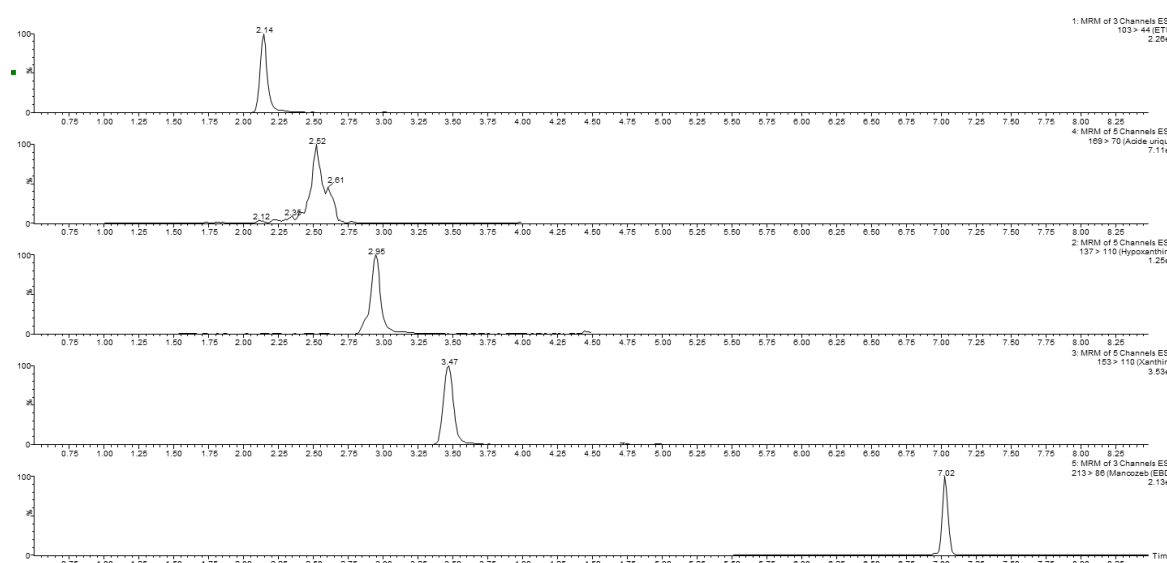
I-PeNiCa

Sigma-Aldrich and were injected to determine their retention time and their MS/MS parameters for identification and quantification. We also optimized the analytical method previously developed to quantify mancozeb, ETU, xanthine, hypoxanthine and uric acid (Table 3), by adjusting the elution parameters and cone voltage for the mass detector. An example of a chromatogram is shown in Figure 1. A mixture of water and 0.1% NAH_4OH was the solvent for prepare a stock solution of xanthine and Dimethyl-sulfoxide (DMSO) for hypoxanthine.

We found that both xanthine and hypoxanthine were produced by hepatocyte-like HepaRG cells incubated with mancozeb but not uric acid. In addition, we evidenced that both xanthine and hypoxanthine were also produced upon exposure to MnCl_2 demonstrating that these compounds are not metabolites of mancozeb.

Compound	CAS n°	Rt (min)	CV(V)	Precursor ion	MRM1	MRM2	LOQ (μM)
ETU	96-45-7	2.1	30	103	103>44 (14)	103>60 (21)	0.1
Uric acid	69-93-2	2.5	40	169	169>70 (21)	169>141 (15)	0.1
Hypoxanthine	68-94-0	2.9	25	137	137>110 (19)	137>55 (25)	0.2
Xanthine	69-89-6	3.4	35	153	153>136 (24)	153>110 (16)	0.02
Mancozeb	8018-01-7	7.0	40	213	213>86 (25)	213>169 (17)	0.05

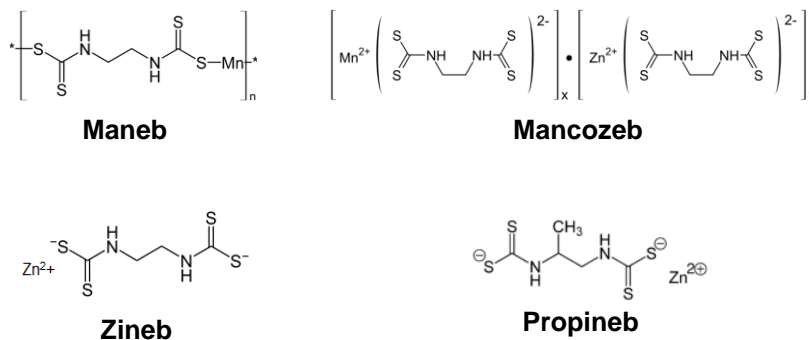
Table 7: Parameters for the identification of compounds, once xanthine has been identified, in positive electrospray ionization mode Rt: retention time; Cv: cone voltage; MRM1 quantification (uma) (collision energy - eV); MRM2 confirmation (uma) (collision energy - eV); LoQ: Limit of Quantification)



I-PeNiCa

Figure 1 : Chromatogram obtained for an experimental sample (mancozeb 7 μM 3h) (ETU 1.2 μM ; uric acid 0.6 μM ; hypoxanthine 1.35 μM ; xanthine 1.2 ; mancozeb 57 μM).

Chemical structures of some DTCs.



DTCs share a chemical backbone ($\text{R}_2\text{NCS}_2\text{R}$). Some of them such as maneb, mancozed, zineb and propineb are salts containing Mn^{2+} and/or Zn^{2+} . (Ajiboye et al., 2022).

References:

World Health Organization. Dithiocarbamate Pesticides, Ethylenethiourea and Propylenethiourea: A general introduction. International programme on chemical safety. Environmental Health Criteria 78. Published under the joint sponsorship of the United Nations Environment Programme, the International Labour Organisation and the World Health Organization. Geneva, 1988

AJIBOYE T.O., AJIBOYE TT, MAEZOUKI R., ONWUDIWE D.C. [The Versatility in the Applications of Dithiocarbamates](#). Int J Mol Sci. 2022, 23(3):1317.

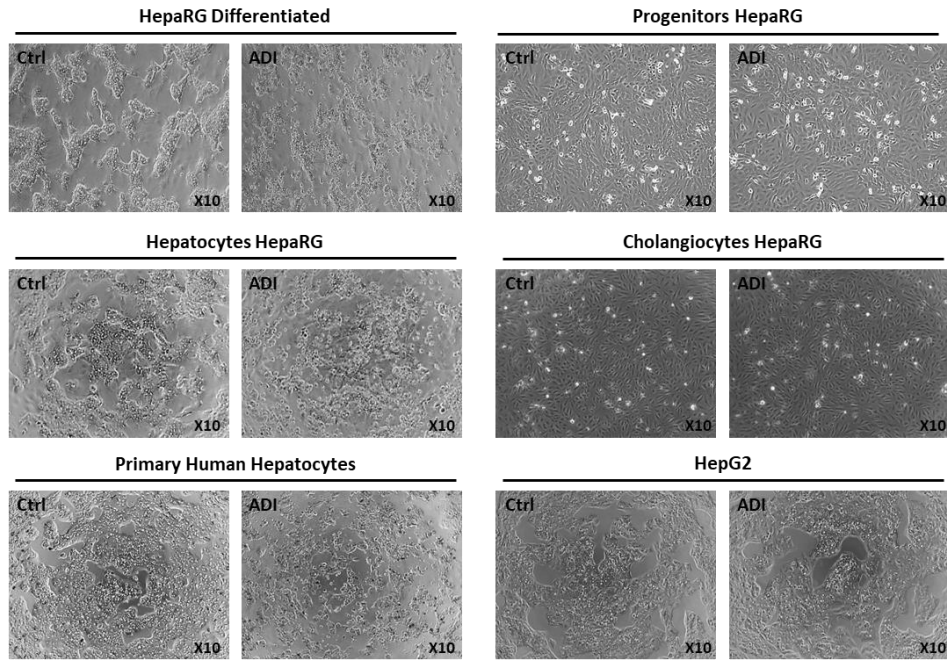
ALDRIDGE, W.N. & MAGOS, L. (1978) *Carbamates, thiocarbamates, Dithiocarbamates pesticides, ethylenethiourea, and propylenethiourea: a general introduction*. Luxembourg, Commission of the European Communities (Report No. V/F/1/78/75 EN).

ENGST, R. & SCHNAAK, W. (1967) [Studies on the metabolism of the ethylenebisdithiocarbamate fungicides maneb and zineb.] *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **134**(4): 216-221.

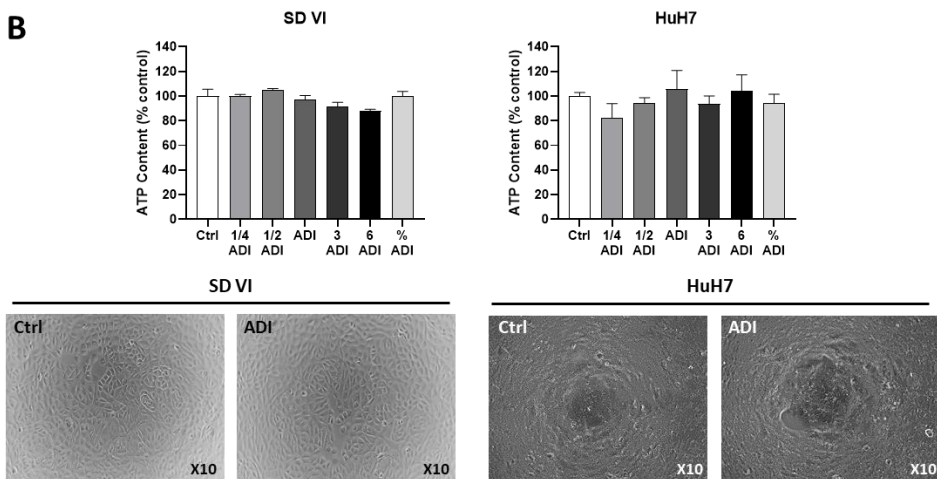
ENGST, R. & SCHNAAK, W. (1970a) [Studies on the metabolism of the ethylenebisdithiocarbamate fungicides maneb and zineb.] *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **143**: 99-103

FREUDENTHAL, R.I., KERCHNER, G.A., PERSING, R.L., BAUMEL, J., & BARON, R.L. (1977) Subacute toxicity of ethylene bisocyanate sulfide in the laboratory rat. *J. Toxicol. environ. Health*, **2**:1067-1077.

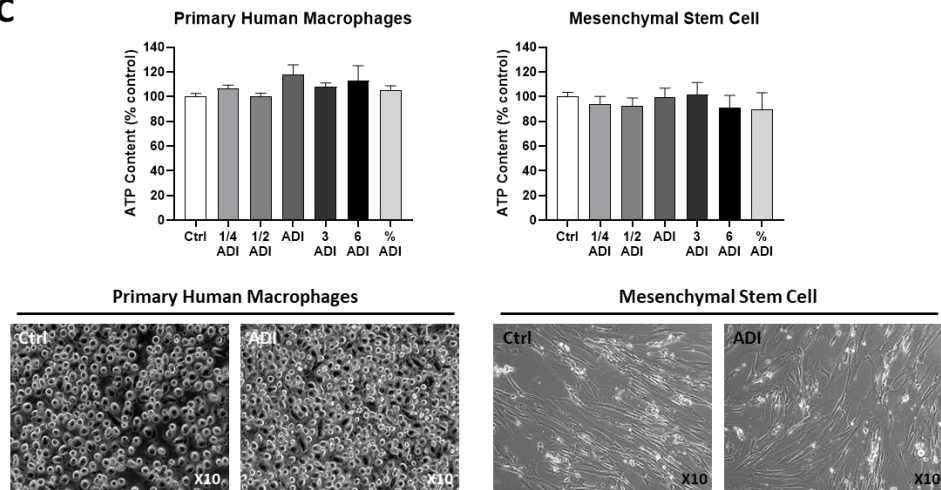
A

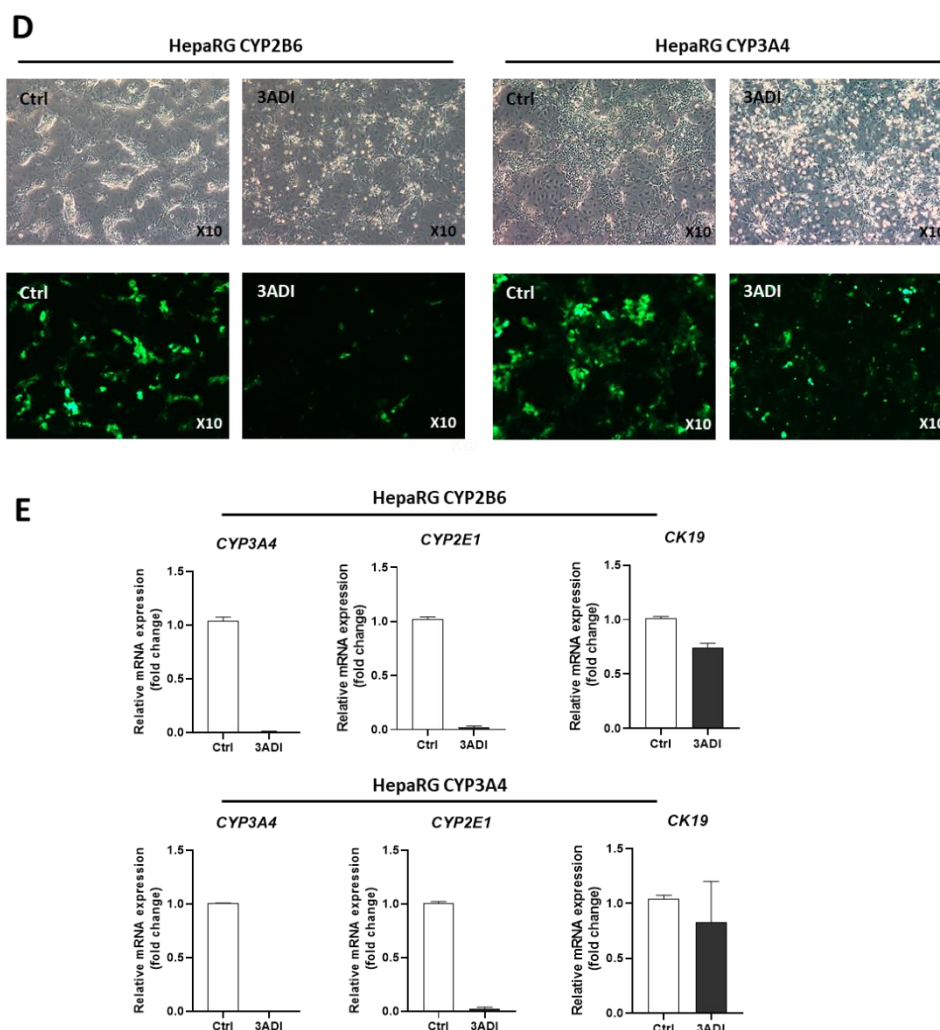


B



C



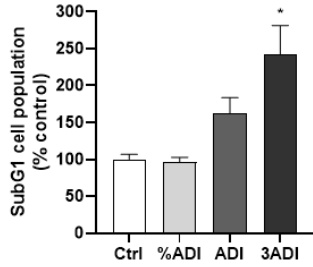


Supporting Information 3. Acute exposure of cell models to the pesticide mixture.

A. Cell morphology in phase contrast microscopy of progenitor and differentiated HepaRG cells (hepatocytes and cholangiocytes), human hepatocytes and HepG2 hepatoma cells in untreated condition (Ctrl) or after 48 hours of exposure with the pesticide mixture (ADI). Cell viability was quantified by measuring the ATP content and cell morphologies in phase contrasts microscopy in rat liver epithelial cells (RLEC) SDVI and HepG2 human hepatoma cells (**B**), human macrophages and mesenchymal stem cells (**C**) in untreated control cultures and after 48 hours of exposure to the pesticide mixture at different concentrations (1/4ADI, 1/2ADI, ADI, 3ADI, 6ADI or %ADI). Datas were expressed as % of control. Results are means \pm SEM of at least 2 independent experiments. **D.** Cell morphology in phase contrasts and GFP detection by fluorescence microscopy in HepaRG-CYP2B6 and HepaRG-CYP3A4 transgenic cells in untreated cultures (Ctrl) and after 48 hours of exposure to the pesticide mixture (3ADI). **E.** Relative expression of CYP3A4, CYP2E1 and cytokeratin 19 (CK19) mRNA levels in untreated control (Ctrl) and pesticide-treated HepaRG-CYP2B6 and HepaRG-CYP3A4 cells.

I-PeNiCa

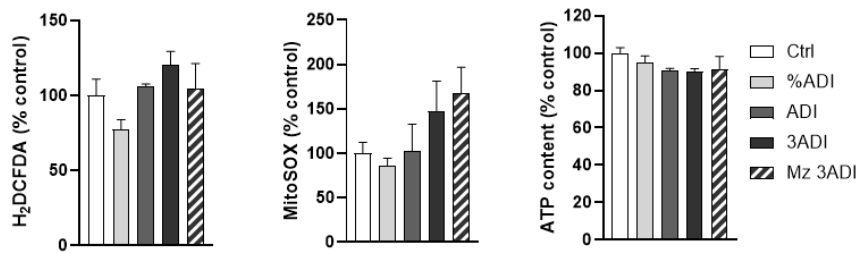
A



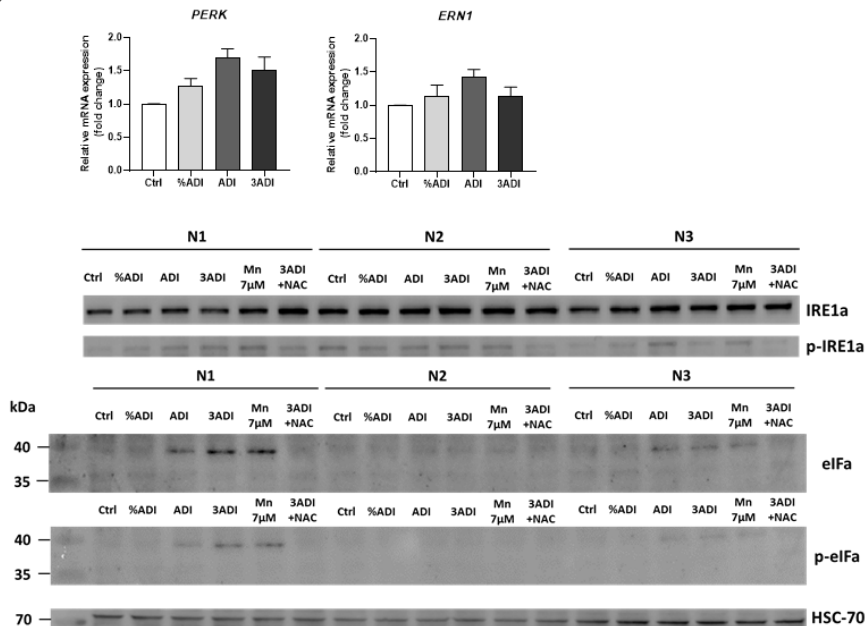
B

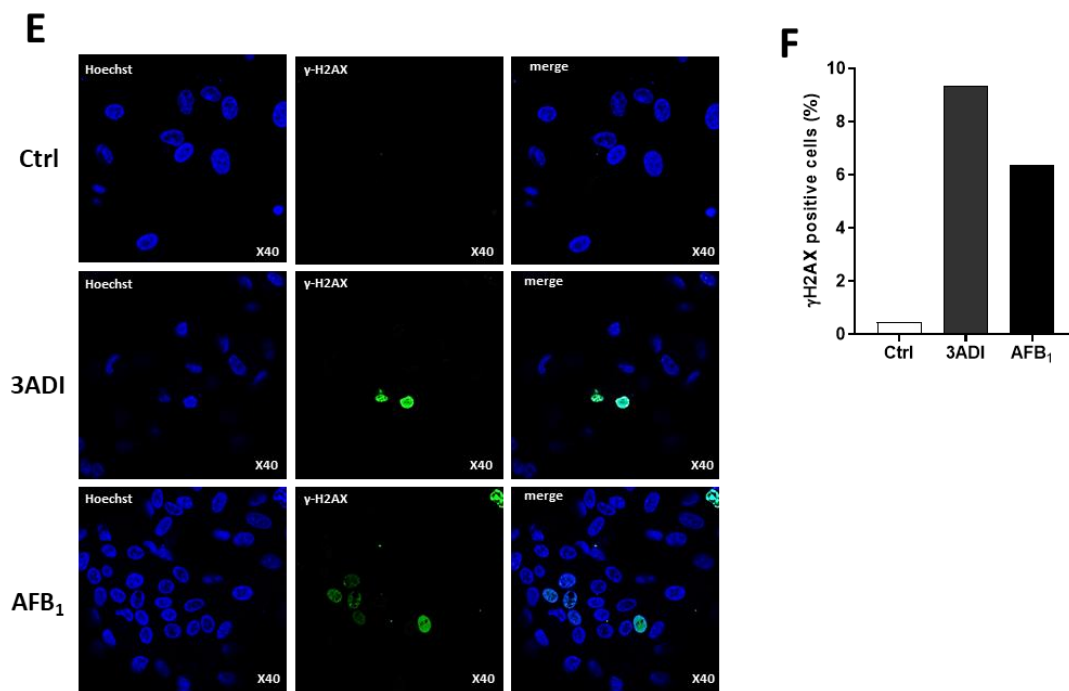
	I/CS	II/CS	III/CS	IV/CS	V/CS
Ctrl	0.33 ± 0.02	0.45 ± 0.05	0.44 ± 0.06	1.66 ± 0.35	0.95 ± 0.24
Maneb 6ADI	0.35 ± 0.07	0.45 ± 0.05	0.42 ± 0.12	1.70 ± 0.24	1.04 ± 0.09
MnCl ₂ 14μM	0.30 ± 0.08	0.41 ± 0.10	0.45 ± 0.07	1.73 ± 0.11	0.85 ± 0.14

C



D





Supporting Information 4. Apoptosis and genotoxicity in HepaRG cells and human hepatocytes exposed to the pesticide mixture

A. Percentages of apoptotic HepaRG cells estimated through the quantification of SubG1 population by flow cytometry after exposure to the pesticide mixture for 24h. DNA was stained using propidium iodide. **B.** Activity of the mitochondrial complexes I to V in control culture and in cells exposed to maneb and no significant differences in enzymatic activities could be observed between untreated and pesticide-exposed cells. Enzymes activities of all complex were expressed as nmol substrate/min/10⁶cells using the Beer Lambert's law and were normalized to the citrate synthase activity (N=3). **C.** ROS production was evaluated using H₂DCFDA and MitoSOX probes and cell viability was evaluated by quantification of the relative ATP contents in cholangiocyte-like HepaRG cells exposed for 24h to the pesticide mixture (%ADI, ADI or 3ADI) or mancozeb alone (Mz 3ADI). Data were normalized to the untreated control culture (Ctrl). Results are means ± SEM (N≥3), *p< 0.05 significantly different from control (Ctrl). **D.** Relative mRNA levels of *PERK* and *ERN1* (upper charts) and western blot analysis of IRE1a phosphorylation and eIF1a protein expression in hepatocyte-like HepaRG cells (N=3). **E.** Detection of γ-H2AX positive HepaRG cells by fluorescence microscopy in untreated cells (Ctrl) and exposure to the pesticide mixture for 16h (3ADI). Aflatoxin B₁ (24h, 0,25μM) was used as genotoxic positive control (AFB₁). **F.** Quantification of γ-H2AX positive cells versus total nuclei (Hoechst staining) using Image J. Results are means of at least 3 independent experiments (N≥3).

I-PeNiCa

Table Quantities (ng/well) ± SEM of manganese and zinc by ICP-MS

		Intracellular			Mitochondria		
		Hepatocytes	Cholangiocytes	Progenitors	Hepatocytes	Cholangiocytes	Progenitors
Manganese (ng/well)	Ctrl	12.14 ± 0.43	1.72 ± 0.41	1.23 ± 0.10	0.73 ± 0.10	0.46 ± 0.04	0.26 ± 0.00
	Ctrl + ZnCl ₂ 70µM	14.13 ± 4.34			0.85 ± 0.04		
	MnCl ₂ 7µM	65.20 ± 15.37	6.19 ± 1.98	3.06 ± 0.39	7.43 ± 2.39	0.77 ± 0.08	0.37 ± 0.02
	MnCl ₂ 7µM + ZnCl ₂ 70µM	39.78 ± 1.99			3.34 ± 0.78		
	Maneb 3ADI	55.47 ± 8.28	4.85 ± 0.69	3.51 ± 0.28	11.03 ± 7.06	0.81 ± 0.19	0.46 ± 0.07
	Maneb 3ADI + ZnCl ₂ 70µM	39.28 ± 1.85			3.94 ± 1.33		
Zinc (ng/well)	Ctrl	122.05 ± 12.78	26.76 ± 4.81	30.20 ± 1.44	13.02 ± 3.27	5.04 ± 1.83	2.86 ± 0.87
	Ctrl + ZnCl ₂ 70µM	140.21 ± 3.08			4.18 ± 0.79		
	MnCl ₂ 7µM	74.65 ± 11.70	43.11 ± 13.96	29.44 ± 0.89	8.70 ± 2.68	9.73 ± 4.08	2.03 ± 0.20
	MnCl ₂ 7µM + ZnCl ₂ 70µM	110.96 ± 18.75			5.17 ± 0.90		
	Maneb 3ADI	71.96 ± 6.66	23.19 ± 3.51	31.48 ± 2.37	12.10 ± 4.54	4.11 ± 1.06	4.33 ± 1.35
	Maneb 3ADI + ZnCl ₂ 70µM	111.45 ± 12.09			6.55 ± 1.72		

Supporting information 5

Results are expressed in ng of metals/culture wells are means of at least 3 independent experiments (N≥3).

Table Quantities (µM) ± SD

	Hours	Mancozeb	Ethylene thiourea	Hypoxanthine	Xanthine	Uric acid	LDH (m U/m L)
DMSO	3	<0.05	<0.1	1.70 ± 0.40	1.42 ± 0.30	0.64 ± 0.42	2.15 ± 1.68
	8	<0.05	<0.1	0.48 ± 0.10	2.08 ± 0.82	2.21 ± 2.35	3.92 ± 0.89
	24	<0.05	<0.1	0.75 ± 0.35	2.69 ± 3.36	10.34 ± 8.21	8.19 ± 3.66
Mancozeb (100µM)	3	118.28 ± 6.82	21.40 ± 0.65	0.62 ± 0.22	0.75 ± 0.16	0.32 ± 0.16	2.19 ± 0.86
	8	104.79 ± 4.52 ^a	20.73 ± 0.71	1.28 ± 0.93 ^a	2.29 ± 0.69 ^a	2.48 ± 1.98	4.10 ± 0.71
	24	35.44 ± 2.91 ^{a,b}	64.58 ± 2.58 ^{a,b}	5.15 ± 3.29 ^a	10.36 ± 3.63 ^a	9.47 ± 5.49	10.10 ± 1.96
MnCl ₂ (100µM)	3	<0.05	<0.1	0.99 ± 0.45	1.00 ± 0.18	0.27 ± 0.14	1.97 ± 0.61
	8	<0.05	<0.1	2.97 ± 2.78	3.92 ± 1.08	1.59 ± 1.18	4.46 ± 0.94
	24	<0.05	<0.1	6.96 ± 3.39 ^{a,*}	13.66 ± 0.11 ^{a,*}	9.22 ± 1.71	14.37 ± 1.96 [*]

a: significantly different from 3h

b: significantly different from 8h

*: significantly different from Ctrl

#: significantly different from Mz 100µM

Supporting Information Table 1

I-PeNiCa

Acknowledgements

This work was funded by the Cancéropole Grand-Ouest (projet structurant Pesticides and Tumor Niches-PeNiCa, 2016-2018, coordinator O. Herault, Tours, France), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm, France) and the project PESTIFAT (Agence Française pour la Biodiversité (AFB), plan ECOPHYTO II driven by the Ministères en charge de l'Environnement et de l'Agriculture, Appel à projet de Recherche en Environnement-Santé-Travail (PREST 2018, coordinator B. Fromenty, Rennes, France). Kilian Petitjean received a PhD fellowship from the Agence Française pour la Biodiversité (AFB). The authors would like to thank the Centre de Ressources Biologiques (CRB) Santé of Rennes for providing human hepatocytes. Information about protocols and Supporting Information repositories will be publicly available at Mendeley Data website if the manuscript is accepted.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest regarding this work.

Author Contributions: Conceptualization, P.L.O., A.C. and B.F.; methodology, K.P., S.B., C.R., M.R., O.L., L.A., N.B. and P.L.O.; validation, L.A., N.B. and P.L.; formal analysis, P.L.O., B.F. and A.C.; investigation, K.P., Y.V., S.B., C.R., C.A., P.LE.; resources, L.A., N.B. and M.R.; data curation, A.C. and P.L.O.; writing—original draft preparation, P.L.O.; writing—review and editing, K.P., A.C., B.F., N.B. ; supervision, P.L.O., A.C. and B.F.; project administration, P.L.O., A.C., B.F.; funding acquisition, P.L.O., C.O., O.H., A.C. and B.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript

I-PeNiCa

Data Sharing

Information about data sharing protocols, options for accessing data, and links to data repositories may be provided in the “Acknowledgments” section, as noted above. Authors may also provide links to data repositories in the “Methods” or “Results” sections of their manuscripts, as appropriate.

6. References

Anderson CC, Marentette JO, Rauniyar AK, Prutton KM, Khatri M, Matheson C, Reisz JA, Reigan P, D'Alessandro A, Roede JR. Maneb alters central carbon metabolism and thiol redox status in a toxicant model of Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med.* 2021, 162:65-76. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.11.028

Anderson CC, Aivazidis S, Kuzyk CL, Jain A, Roede JR. Acute Maneb Exposure Significantly Alters Both Glycolysis and Mitochondrial Function in Neuroblastoma Cells. *Toxicol Sci.* 2018, 165(1):61-73. doi: 10.1093/toxsci/kfy116.

Ajiboye TO, Ajiboye TT, Marzouki R, Onwudiwe DC. [The Versatility in the Applications of Dithiocarbamates.](#) *Int J Mol Sci.* 2022, 23(3):1317. doi: 10.3390/ijms23031317.

Alavanja, M.C.R. Pesticides Use and Exposure Extensive Worldwide. *Rev Environ Health* 2009, 24, 303–309.

Aninat C, Piton A, Glaise D, Le Charpentier T, Langouët S, Morel F, Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A. Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab Dispos.* 2006, 34(1):75-83. doi: 10.1124/dmd.105.006759.

ANSES (saisine 2018-SA-0163). Avis relatif aux substances phytopharmaceutiques préoccupantes.

I-PeNiCa

Ashraf MN, Asghar MW, Rong Y, Doschak MR, Kiang TKL. Advanced In Vitro HepaRG Culture Systems for Xenobiotic Metabolism and Toxicity Characterization. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2019, 44(4), 437-458.

Bristeau S., Ghestem J.-P. (2018) – Synthèse sur la problématique de la surveillance des dithiocarbamates dans les eaux environnementales. Rapport final. AQUAREF BRGM/RP-67894-FR, p.43, ill.20. <https://www.aquaref.fr/synthese-problematique-surveillance-dithiocarbamates-eaux-environnementales>.

Bristeau S. Amalric L. (2021). Dithiocarbamates. Méthode d'analyse dans les eaux souterraines. AQUAREF BRGM, MA-84. <https://www.aquaref.fr/dithiocarbamates-dibame-ferbame-mancopper-mancozebe-manebe-metam-sodium-metirame-nabame-propinebe-zi>

Brouwer, M., Huss, A., van der Mark, M., Nijssen, P.C.G., Mulleners, W.M., Sas, A.M.G., van Laar, T., de Snoo, G.R., Kromhout, H., and Vermeulen, R.C.H. Environmental exposure to pesticides and the risk of Parkinson's disease in the Netherlands. *Environ Int.* 2017, 107, 100–110.

Cerec V, Glaise D, Garnier D, Morosan S, Turlin B, Drenou B, Gripon P, Kremsdorf D, Guguen-Guillouzo C, Corlu A. Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor. *Hepatology.* 2007, 45(4):957-67. doi: 10.1002/hep.21536

Chretien, D., Slama, A., Brière, J.-J., Munnich, A., Rötig, A., and Rustin, P. Revisiting pitfalls, problems and tentative solutions for assaying mitochondrial respiratory chain complex III in human samples. *Curr Med Chem,* 2004, 11, 233–239. 10.2174/0929867043456151.

I-PeNiCa

Colosio C, Fustinoni S, Corsini E, Bosetti C, Birindelli S, Boers D, Campo L, La Vecchia C, Liesivuori J, Pennanen S, Vergieva T, Van Amelsvoort LG, Steerenberg P, Swaen GM, Zaikov C, Van Loveren H. Changes in serum markers indicative of health effects in vineyard workers following exposure to the fungicide mancozeb: an Italian study. *Biomarkers*. 2007, 12(6), 574-88. doi: 10.1080/13547500701441315.

Corsini E, Birindelli S, Fustinoni S, De Paschale G, Mammone T, Visentin S, Galli CL, Marinovich M, Colosio C. Immunomodulatory effects of the fungicide Mancozeb in agricultural workers. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005, 208(2), 178-85. doi: 10.1016/j.taap.2005.02.011.

Czaja K, Struciński P, Korcz W, Minorczyk M, Hernik A, Wiadrowska B. Alternative toxicological methods for establishing residue definitions applied for dietary risk assessment of pesticides in the European Union. *Food Chem Toxicol*. 2020, 137, 111120. doi: 10.1016/j.fct.2020.111120.

Dhaneshwar A, Hardej D. Disruption of mitochondrial complexes, cytotoxicity, and apoptosis results from Mancozeb exposure in transformed human colon cells. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2021, 84, 103614. doi: 10.1016/j.etap.2021.103614.

Dees WL, Hiney JK, Srivastava VK. Influences of manganese on pubertal development. *J Endocrinol*. 2017, 235(1):R33-R42. doi: 10.1530/JOE-17-0237.

I-PeNiCa

Deziel NC, Freeman LE, Graubard BI, Jones RR, Hoppin JA, Thomas K, Hines CJ, Blair A, Sandler DP, Chen H, Lubin JH, Andreotti G, Alavanja MC, Friesen MC. Relative Contributions of Agricultural Drift, Para-Occupational, and Residential Use Exposure Pathways to House Dust Pesticide Concentrations: Meta-Regression of Published Data. *Environ Health Perspect.* 2017, 125(3):296-305. doi: 10.1289/EHP426.

Domico LM, Cooper KR, Bernard LP, Zeevalk GD. Reactive oxygen species generation by the ethylene-bis-dithiocarbamate (EBDC) fungicide mancozeb and its contribution to neuronal toxicity in mesencephalic cells. *Neurotoxicology.* 2007, 28(6), 1079-91. doi: 10.1016/j.neuro.2007.04.008

Dorne JL. Metabolism, variability and risk assessment. *Toxicology* 2010, 268, 156-164. PMID: 19932147.

Engst R and Schnaak W. Studies on the metabolism of the ethylenebisdithiocarbamate fungicides maneb and zineb. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1970, 143, 99-103

European Food Safety Authority (EFSA), 2017. The 2015 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA Journal* 2017, 15(4):4791, 134 pp.

Ferraz HB, Bertolucci PH, Pereira JS, Lima JG, Andrade LA. Chronic exposure to the fungicide maneb may produce symptoms and signs of CNS manganese intoxication. *Neurology.* 1988, 38(4):550-3. doi: 10.1212/wnl.38.4.550.

I-PeNiCa

Ferri GM, Specchia G, Mazza P, Ingravallo G, Intranuovo G, Guastadisegno CM, Congedo ML, Lagioia G, Loparco MC, Giordano A, Perrone T, Gaudio F, Spinosa C, Minoia C, D'Onghia L, Strusi M, Corrado V, Cavone D, Vimercati L, Schiavulli N, Cocco P. Risk of lymphoma subtypes by occupational exposure in Southern Italy. *J Occup Med Toxicol*. 2017, 12, 31. doi: 10.1186/s12995-017-0177-2.

Foucault A, Vallet N, Ravalet N, et al. Occupational pesticide exposure increases risk of acute myeloid leukemia: a meta-analysis of case-control studies including 3,955 cases and 9,948 controls. *Sci Rep*. 2021, 11(1), 2007. doi: 10.1038/s41598-021-81604-x.

Foucault A, Ravalet N, Besombes J, Picou F, Gallay N, Babin L, Bourgeois J, Hamard S, Domenech J, Loyer P, Vallet N, Lejeune J, Gyan E, Béné MC, Vallette F, Olivier C, Hérault O. Low-Dose Pesticides Alter Primary Human Bone Marrow Mesenchymal Stem/Stromal Cells through ALDH2 Inhibition. *Cancers (Basel)*. 2021 Nov 14;13(22):5699

Goldner WS, Sandler DP, Yu F, Hoppin JA, Kamel F, Levan TD. Pesticide use and thyroid disease among women in the Agricultural Health Study. *Am J Epidemiol*. 2010, 171, 4, 455-64. doi: 10.1093/aje/kwp404.

Gripon P., Rumin S., Urban S., Le Seyec J., Glaise D., Cannie I., Guyomard C., Lucas J., Trepo C., Guguen-Guillouzo C. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99, 15655-15660.

Gullino ML, Tinivella F, Garibaldi A, Kemmitt GM, Bacci L, Sheppard B. Mancozeb: Past, Present, and Future. *Plant Dis*. 2010, 94(9):1076-1087. doi: 10.1094/PDIS-94-9-1076.

I-PeNiCa

Hashem MA, Mohamed WAM, Attia ESM. Assessment of protective potential of *Nigella sativa* oil against carbendazim- and/or mancozeb-induced hematotoxicity, hepatotoxicity, and genotoxicity. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2018, 25(2):1270-1282. doi: 10.1007/s11356-017-0542-9.

Hochane M, Trichet V, Pecqueur C, Avril P, Oliver L, Denis J, Brion R, Amiaud J, Pineau A, Naveilhan P, Heymann D, Vallette FM, Olivier C. Low-Dose Pesticide Mixture Induces Senescence in Normal Mesenchymal Stem Cells (MSC) and Promotes Tumorigenic Phenotype in Premalignant MSC. *Stem Cells*. 2017, 35(3):800-811. doi: 10.1002/stem.2539.

Hoffman L, Hardej D. Ethylene bisdithiocarbamate pesticides cause cytotoxicity in transformed and normal human colon cells. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2012, 34(2):556-573. doi: 10.1016/j.etap.2012.06.015.

Hoffman L, Trombetta L, Hardej D. Ethylene bisdithiocarbamate pesticides Maneb and Mancozeb cause metal overload in human colon cells. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2016, 41, 78-88. doi: 10.1016/j.etap.2015.11.002

IRNS (Institut national de recherche et de sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles). Mancozèbe, Fiche toxicologique 277, 2010. Auteurs : N. Bonnard, D. Jargot, M. Falcy, avec la participation de l'AFSSA (Agence française de sécurité sanitaire des aliments) : A. Fastier, S. Oudar, M.-O. Rambourg.

Jandacek RJ, Tso P. Enterohepatic circulation of organochlorine compounds: a site for nutritional intervention. *J Nutr Biochem*. 2007 18(3):163-7. doi:10.1016/j.jnutbio.2006.12.001

I-PeNiCa

James, A.M., Wei, Y.H., Pang, C.Y., and Murphy, M.P. Altered mitochondrial function in fibroblasts containing MELAS or MERRF mitochondrial DNA mutations. *Biochem J*, 1996, 318, 401–407. [10.1042/bj3180401](https://doi.org/10.1042/bj3180401).

Jin J, Yu M, Hu C, Ye L, Xie L, Jin J, Chen F, and Tong H. Pesticide exposure as a risk factor for myelodysplastic syndromes: a meta-analysis based on 1,942 cases and 5,359 controls. *PLoS One* 2014, 9:e110850.

Katz N, Rader DJ. Manganese homeostasis: from rare single-gene disorders to complex phenotypes and diseases. *J Clin Invest*. 2019, 129(12):5082-5085. doi: [10.1172/JCI133120](https://doi.org/10.1172/JCI133120).

Kanebratt KP, Andersson TB. Evaluation of HepaRG cells as an in vitro model for human drug metabolism studies. *Drug Metab. Dispos*. 2008, 36:1444-1452. doi: [10.1124/dmd.107.020016](https://doi.org/10.1124/dmd.107.020016).

Kernalléguen A, Le Daré B, Pelletier R, Ferron PJ, Maamar A, Bouvet R, Baert A, Morel I, Gicquel T. Carbofuran self-poisoning: forensic and analytic investigations in twins and literature review. *Int J Legal Med*. 2022, 136, 1585-1596. doi: [10.1007/s00414-022-02885-z](https://doi.org/10.1007/s00414-022-02885-z).

Kim G, Lee H-S, Bang JB, Kim B, Ko D, Yang M. A current review for biological monitoring of manganese with exposure, susceptibility & response biomarkers. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 2015, 33, 229-54. doi: [10.1080/10590501.2015.1030530](https://doi.org/10.1080/10590501.2015.1030530).

Kim, K.-H., Kabir, E., and Jahan, S.A. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Sci. Total Environ.*, 2017, 575, 525–535. doi: [10.1016/j.scitotenv.2016.09.009](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.009).

I-PeNiCa

Kistingner BR, Hardej D. The ethylene bisdithiocarbamate fungicides mancozeb and nabam alter essential metal levels in liver and kidney and glutathione enzyme activity in liver of Sprague-Dawley rats. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2022, 92, 103849. doi: 10.1016/j.etap.2022.103849.

Klimowska A, Amenda K, Rodzaj W, Wileńska M, Jurewicz J, Wielgomas B. Evaluation of 1-year urinary excretion of eight metabolites of synthetic pyrethroids, chlorpyrifos, and neonicotinoids. *Environ Int.* 2020 145:106119. doi: 10.1016/j.envint.2020.106119.

Kumar K, Sabarwal A, Singh RP. Mancozeb selectively induces mitochondrial-mediated apoptosis in human gastric carcinoma cells through ROS generation. *Mitochondrion.* 2019, 48, 1-10. doi: 10.1016/j.mito.2018.06.003.

Laurent V, Glaise D, Nübel T, Gilot D, Corlu A, Loyer P. Highly efficient SiRNA and gene transfer into hepatocyte-like HepaRG cells and primary human hepatocytes: new means for drug metabolism and toxicity studies. *Methods Mol Biol.* 2013, 987, 295-314. doi: 10.1007/978-1-62703-321-3_25.

Leiphon LJ, Picklo MJ Sr. Inhibition of aldehyde detoxification in CNS mitochondria by fungicides. *Neurotoxicology.* 2007, 28(1):143-9. doi: 10.1016/j.neuro.2006.08.008.

Lemos PV, Martins JL, Lemos SP, Santos FL, Silva SR. Hepatic damage in newborns from female rats exposed to the pesticide derivative ethylenethiourea. *Acta Cir Bras.* 2012, 27(12):897-904. doi: 10.1590/s0102-86502012001200012.

I-PeNiCa

Lerro CC, Beane Freeman LE, DellaValle CT, Andreotti G, Hofmann JN, Koutros S, Parks CG, Shrestha S, Alavanja MCR, Blair A, Lubin JH, Sandler DP, Ward MH. Pesticide exposure and incident thyroid cancer among male pesticide applicators in agricultural health study. *Environ Int.* 2021, 146, 106187. doi: 10.1016/j.envint.2020.106187.

Leveque X, Hochane M, Geraldo F, Dumont S, Gratas C, Oliver L, Gaignier C, Trichet V, Layrolle P, Heymann D, Herault O, Vallette FM, Olivier C. Low-Dose Pesticide Mixture Induces Accelerated Mesenchymal Stem Cell Aging In Vitro. *Stem Cells.* 2019, 37(8), 1083-1094. doi: 10.1002/stem.3014.

Lori G, Tassinari R, Narciso L, Udriou I, Sgura A, Maranghi F, Tait S. Toxicological Comparison of Mancozeb and Zoxamide Fungicides at Environmentally Relevant Concentrations by an In Vitro Approach. *Int J Environ Res Public Health.* 2021, 18(16), 8591. doi: 10.3390/ijerph18168591.

Medja, F., Allouche, S., Frachon, P., Jardel, C., Malgat, M., Mousson de Camaret, B., Slama, A., Lunardi, J., Mazat, J.P., and Lombès, A. (2009). Development and implementation of standardized respiratory chain spectrophotometric assays for clinical diagnosis. *Mitochondrion* 9, 331–339. doi: 10.1016/j.mito.2009.05.001.

Mehkari Z, Mohammed L, Javed M, Althwanay A, Ahsan F, Oliveri F, Goud HK, Rutkofsky IH. Manganese, a Likely Cause of 'Parkinson's in Cirrhosis', a Unique Clinical Entity of Acquired Hepatocerebral Degeneration. *Cureus.* 2020, 12(9), e10448. doi: 10.7759/cureus.10448

I-PeNiCa

Merhi M, Raynal H, Cahuzac E, Vinson F, Cravedi JP, Gamet-Payrastre L. Occupational exposure to pesticides and risk of hematopoietic cancers: meta-analysis of case-control studies. *Cancer Causes Control*. 2007, 18(10):1209-26. doi: 10.1007/s10552-007-9061-1.

Mghirbi O, Bord JP, Le Grusse P, Mandart E, Fabre J. Mapping for the management of diffuse pollution risks related to agricultural plant protection practices: case of the Etang de l'Or catchment area in France. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2018, 25(14), 14117-14137.

National Toxicology Program. 2014. 13th Report on Carcinogens. Available: <http://ntp.niehs.nih.gov/pubhealth/roc/roc13/index.html> [accessed 12 November 2014].

Official Journal on the European Union, L 423/50, 2020. Commission implementing regulation (EU) 2020/2087 of 14 December 2020 concerning the non-renewal of the approval of the active substance mancozeb.

Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), 2009. Guidance Document on the Definition of Residue. Series on Testing and Assessment Number 63, Series on Pesticides Number 31; Revision. ENV/JM/MONO (2009)30. Guidance Document on Residues in Livestock. Series on Pesticides No. 73, 2013.

Panganiban L, Cortes-Maramba N, Dioquino C, Suplido ML, Ho H, Francisco-Rivera A, Manglicmot-Yabes A. Correlation between blood ethylenethiourea and thyroid gland disorders among banana plantation workers in the Philippines. *Environ Health Perspect*. 2004, 112(1):42-5. doi: 10.1289/ehp.6499

I-PeNiCa

Porreca I, D'Angelo F, De Franceschi L, Mattè A, Ceccarelli M, Iolascon A, Zamò A, Russo F, Ravo M, Tarallo R, Scarfò M, Weisz A, De Felice M, Mallardo M, Ambrosino C. Pesticide toxicogenomics across scales: in vitro transcriptome predicts mechanisms and outcomes of exposure in vivo. *Sci Rep.* 2016, 6, 38131. doi: 10.1038/srep38131.

Pouchieu, C., Piel, C., Carles, C., Gruber, A., Helmer, C., Tual, S., Marcotullio, E., Lebailly, P., and Baldi, I. Pesticide use in agriculture and Parkinson's disease in the AGRICAN cohort study. *Int J Epidemiol.* 2018, 47, 299–310. doi: 10.1093/ije/dyx225.

Rauh, V.A., Perera, F.P., Horton, M.K., Whyatt, R.M., Bansal, R., Hao, X., Liu, J., Barr, D.B., Slotkin, T.A., and Peterson, B.S. Brain anomalies in children exposed prenatally to a common organophosphate pesticide. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012, 109, 7871–7876. doi: 10.1073/pnas.1203396109.

Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC. ELI: <http://data.europa.eu/eli/reg/2009/1107/oj>

Ritter L, Solomon K, Sibley P, Hall K, Keen P, Mattu G, Linton B. Sources, pathways, and relative risks of contaminants in surface water and groundwater: a perspective prepared for the Walkerton inquiry. *J Toxicol Environ Health A.* 2002, 65(1), 1-142. doi: 10.1080/152873902753338572.

I-PeNiCa

Sabarwal A, Kumar K, Singh RP. Hazardous effects of chemical pesticides on human health- Cancer and other associated disorders. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2018, 63, 103-114. doi: 10.1016/j.etap.2018.08.018.

Saber TM, Abo-Elmaaty AMA, Abdel-Ghany HM. Curcumin mitigates mancozeb-induced hepatotoxicity and genotoxicity in rats. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2019, 183, 109467. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.109467.

Sakr S. A. Ameliorative Effect of Ginger (*Zingiber officinale*) on Mancozeb Fungicide Induced Liver Injury in Albino Rats. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* 2007, 1, 650-656.

Signes-Pastor AJ, Doherty BT, Romano ME, Gleason KM, Gui J, Baker E, Karagas MR. Prenatal exposure to metal mixture and sex-specific birth outcomes in the New Hampshire Birth Cohort Study. *Environ Epidemiol.* 2019, 3(5):e068. doi: 10.1097/EE9.0000000000000068.

Stadler K, Li X, Liu B, Bao W, Wang K, Lehmler HJ. Systematic review of human biomonitoring studies of ethylenethiourea, a urinary biomarker for exposure to dithiocarbamate fungicides. *Environ Pollut.* 2022, 292, 118419. doi: 10.1016/j.envpol.2021.118419.

Thiruchelvam M, Richfield EK, Goodman BM, Baggs RB, Cory-Slechta DA. Developmental exposure to the pesticides paraquat and maneb and the Parkinson's disease phenotype. *Neurotoxicology.* 2002, 23(4-5):621-33. doi: 10.1016/s0161-813x(02)00092-x.

I-PeNiCa

Tsai MS, Liao KW, Chang CH, Chien LC, Mao IF, Tsai YA, Chen ML. The critical fetal stage for maternal manganese exposure. *Environ Res.* 2015, 137:215-21. doi: 10.1016/j.envres.2014.12.010.

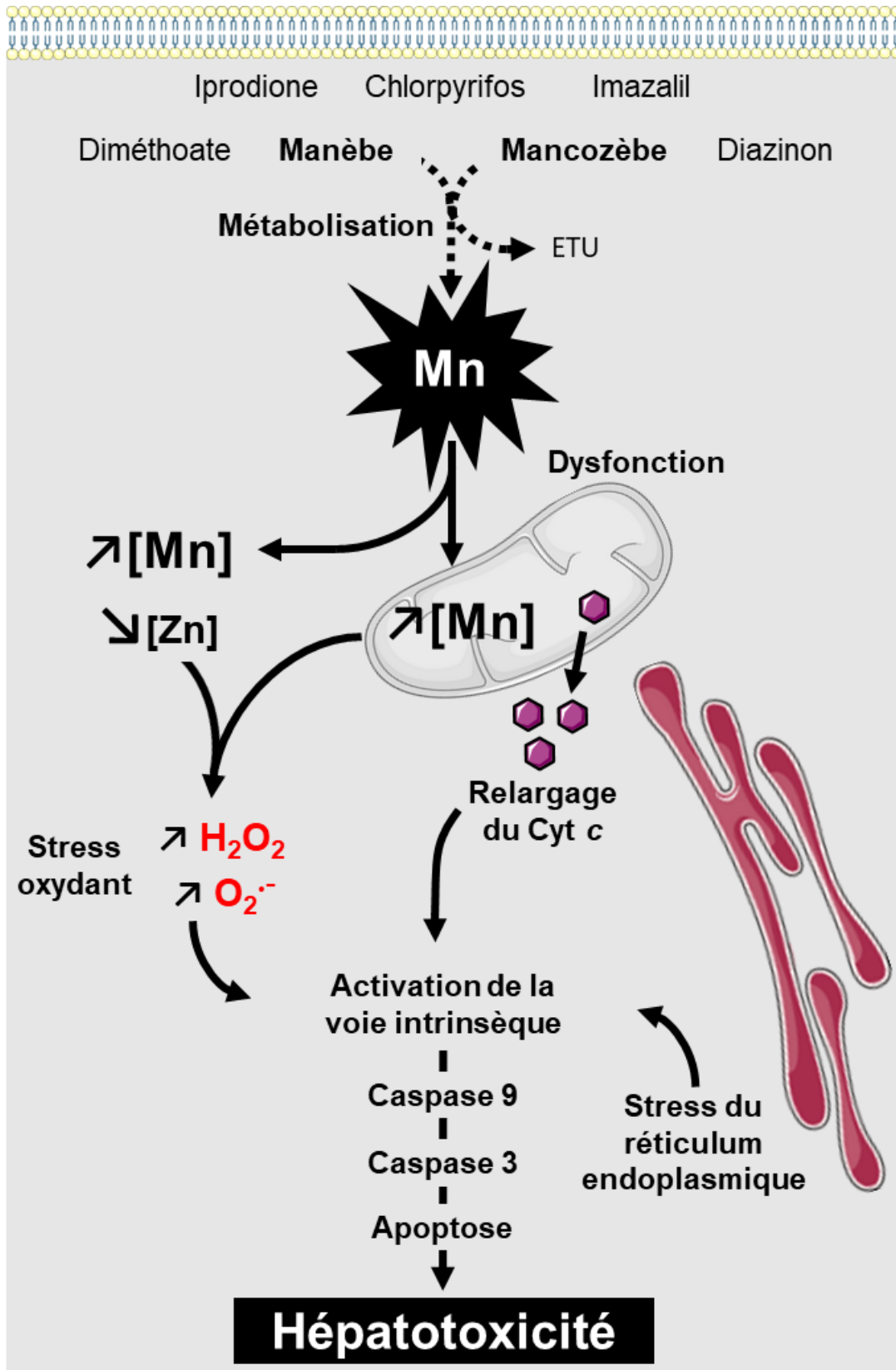
U.S. Food and Drug Administration (FDA) 2019, Pesticide Residue Monitoring Report and Data for FY 2019 <https://www.fda.gov/food/chemicals-metals-pesticides-food/pesticides>.

van Wendel de Joode B, Mora AM, Córdoba L, Cano JC, Quesada R, Faniband M, Wesseling C, Ruepert C, Oberg M, Eskenazi B, Mergler D, Lindh CH. Aerial application of mancozeb and urinary ethylene thiourea (ETU) concentrations among pregnant women in Costa Rica: The Infants' Environmental Health Study (ISA). *Environ Health Perspect.* 2014, 122(12):1321-8. doi: 10.1289/ehp.1307679.

Vlach M, Quesnot N, Dubois-Pot-Schneider H, Ribault C, Verres Y, Petitjean K, Rauch C, Morel F, Robin MA, Corlu A, Loyer P. Cytochrome P450 1A1/2, 2B6 and 3A4 HepaRG Cell-Based Biosensors to Monitor Hepatocyte Differentiation, Drug Metabolism and Toxicity. *Sensors (Basel).* 2019, 19(10). pii: E2245. doi: 10.3390/s19102245.

World Health Organization. Dithiocarbamate Pesticides, Ethylenethiourea and Propylenethiourea: A general introduction. International programme on chemical safety. Environmental Health Criteria 78. Published under the joint sponsorship of the United Nations Environment Programme, the International Labour Organisation and the World Health Organization. Geneva, 19888

Schéma bilan



II-PESTIFAT**II-PESTIFAT****A-Introduction**

L'utilisation intensive à travers le monde des pesticides conduit à l'exposition de la population générale qui est un problème de santé majeure. En effet, chez l'Homme l'exposition aux résidus de pesticides provient à 80% de l'alimentation (Bondareva and Fedorova, 2021). Or l'exposition aux pesticides est associée à différents effets délétères contribuant au développement de maladies telles que les maladies neurodégénératives de types Alzheimer ou Parkinson, le diabète ou encore un certain nombre de cancers (Mostafalou and Abdollahi, 2013). C'est pourquoi, l'utilisation des produits phytosanitaires est soumise aux réglementations qui fixent des doses de références. Parmi celles-ci, l'ADI correspond à la dose d'absorption acceptable journalière (Damalas and Eleftherohorinos, 2011; WHO, 1997). L'ADI est définie à partir de la No Observed Adverse Effect Level (NOAEL), elle est ainsi la dose d'un composé à laquelle l'Homme peut être exposé chaque jour durant toute sa vie sans qu'il n'y ait d'effets néfastes sur sa santé et est exprimée en mg/kg de poids corporel/jour (Damalas and Eleftherohorinos, 2011). Cependant, l'EFSA rapporte en 2017 que des résidus de pesticides ont été détectés dans 44% des 84 341 échantillons d'aliments provenant de l'Union Européenne et des pays tiers (EFSA, 2017).

Dans le contexte d'augmentation des cas d'obésité et de surpoids, les cas de maladies métaboliques associées, telle que la stéatose, sont de plus en plus importante (Younossi et al., 2016). La stéatose hépatique correspond à une accumulation de triglycérides dans au moins 5% des hépatocytes (Aly and Kleiner, 2011). Elle est associée à une altération des enzymes de biotransformation, notamment une inhibition et une augmentation de l'activité respective de CYP3A4 et CYP2E1 (Cobbina and Akhlaghi, 2017). Ces altérations perturbent le métabolisme

II-PESTIFAT

des xénobiotiques (Merrell and Cherrington, 2011; Naik et al., 2013). Ainsi, la stéatose hépatique peut modifier la toxicocinétique des xénobiotiques et accroître leur toxicité (Bucher et al., 2018b; Cichocki et al., 2017; Michaut et al., 2014). La stéatose hépatique peut être induite et aggravée par un certain nombre de facteurs dont les médicaments et les pesticides (Al-Eryani et al., 2015; Bucher et al., 2018b; Fromenty and Pessayre, 1997).

De ce fait, l'exposition de l'Homme aux pesticides par l'alimentation pourrait non seulement conduire au développement de la stéatose et l'aggravation de cette lésion chez les patients obèses mais également altérer la capacité de biotransformation des xénobiotiques. C'est pourquoi, nous avons choisi d'évaluer l'impact d'un mélange de sept pesticides fréquemment retrouvés dans l'alimentation afin de mimer au mieux l'exposition réelle de la population générale à travers la consommation alimentaire (Hochane et al., 2017). A cette fin, nous avons exposé de manière chronique, en présence du chlorpyrifos, du diméthoate, du diazinon, de l'iprodione, de l'imazalil, du manèbe et du mancozèbe à des concentrations extrapolées de l'ADI, le modèle de cellules HepaRG stéatosées ou non (Le Guillou et al., 2018; Michaut et al., 2016).

Premièrement, nous avons évalué l'accumulation lipidique, caractéristique de la surcharge en lipides de la stéatose, par l'exposition aux pesticides. Nous avons, par la suite, étudié les mécanismes conduisant à l'accumulation des triglycérides, tels que l'entrée des acides gras, la β -oxydation, la lipogenèse *de novo* et l'export par la voie des VLDL (Allard et al., 2021; Begriche et al., 2011; Fromenty and Pessayre, 1995; Massart et al., 2022).

Deuxièmement, nous avons étudié les modifications de la capacité de biotransformation des xénobiotiques. Pour cela, nous avons déterminé les activités des enzymes de phase I et II avec notamment les principaux cytochromes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques tels que les CYP2E1, CYP3A4, CYP3A5, CYP1A2, CYP2C19 et CYP2B6 (Rendic and

II-PESTIFAT

Guengerich, 2021). Enfin, nous avons évalué l'impact des modifications des enzymes de biotransformation sur la capacité de détoxification du chlorpyrifos et du diazinon.

B-Matériel & Méthode**Pesticides**

Les pesticides ont été obtenus auprès de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) : chlorpyrifos Pestanal™, diméthoate Pestanal™, diazinon Pestanal™, imazalil Pestanal™, iprodione Pestanal™, maneb Pestanal™, mancozeb Pestanal™. Les références et les structures des composés sont regroupées dans la Figure Supplémentaire 1 des Informations Supplémentaires.

Les concentrations utilisées sont extrapolées du seuil théorique de sureté pour l'exposition journalière de l'Homme durant toute sa vie, l'ADI (Hochane et al., 2017). Les valeurs de l'ADI (mg/kg de poids corporels / jour) pour chaque pesticide sont converties en g/L puis en mol/L pour les tests in vitro. Pour ces calculs, l'absorption lors de l'ingestion est considérée comme totale et les valeurs pour un individu sont de 5L de sang et 60kg (Information Supplémentaire Tableau 1).

Le diméthyle-sulfoxyde (DMSO) a été utilisé comme solvant pour les pesticides et tous ont été préparés en solution stock à 100mM sauf le diazinon à 10mM. A partir des solutions stocks à 100mM ou 10mM, les différentes concentrations utilisées en culture ont préalablement été préparées dans le DMSO afin d'obtenir des solutions à 1000X.

Culture cellulaire et traitements

La lignée cellulaire d'hépatome humain HepaRG a été cultivée comme décrit précédemment (Gripon et al., 2002). Les cellules ont étéensemencées à la densité de $2,6 \cdot 10^4$ cellules/cm² dans le milieu William's E Medium supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Biosera™

II-PESTIFAT

S006R20001, Hyclone™ SH30066.03, ratio 3-1), 1% glutamine (200mM), 100U/ml pénicilline, 100µg/ml streptomycine, 5µg/ml insuline, and 50µM hydrocortisone hémisuccinate (Upjohn pharmacia). Après deux semaines de prolifération, le milieu est supplémenté avec 2% de DMSO afin d'obtenir, après 2 semaines supplémentaires de culture, une différenciation en cellules hépatocytaires et cholangiocytaires. Deux jours avant exposition, les pourcentages de DMSO et de SVF des milieux de cultures des cellules HepaRG différenciées sont diminués respectivement à 1% et 5%, correspondant aux pourcentages utilisés lors des expositions. L'induction de la stéatose dans ces cellules est obtenue par l'ajout du mélange d'acide oléique (O1008, Sigma-Aldrich) et d'acide stéarique (S4751, Sigma-Aldrich) à 150µM chacun à partir d'une solution mère à 100X préparée dans le DMSO. L'exposition des cellules HepaRG aux différents pesticides est réalisée par la dilution des solutions stocks à 1000X dans le milieu de culture à 5% SVF contenant le mélange d'acide gras ou contenant 1% de DMSO. Les contrôles correspondent à l'exposition des cellules par le DMSO dilué à 1/1000^{ème} sans pesticides. Les cellules sont ainsi exposées à court terme (24 ou 48h) et de manière chronique pendant deux semaines. Pendant toute la culture et le traitement, le milieu est renouvelé tous les deux ou trois jours, et 24 heures avant chaque expérience.

Marquage au Nile Red et dosage des triglycérides

La sonde Nile Red marque les lipides neutres dans les cellules (Greenspan et al., 1985). Le marquage au Nile Red a été réalisée comme récemment décrit dans une publication du laboratoire avec une quantification adaptée (Allard et al., 2021). Les cellules sont lavées une fois au PBS puis fixées par une solution de formaldéhyde à 4% dans le PBS contenant 10µg/mL de sonde Hoechst 33342 pendant 30 minutes. Après trois lavages au PBS, les cellules sont incubées avec du PBS contenant la sonde Nile Red à 0.1µg/mL pendant 30 minutes. Après trois

II-PESTIFAT

lavages au PBS, l'intensité de fluorescence a été mesurée par spectrofluorométrie en utilisant le lecteur de plaque Polarstar Omega (BMG Labtech) avec les longueurs d'ondes d'excitation/émission de 355nm/460nm et 520nm/590-10nm respectivement pour les sondes Hoechst 33342 et Nile Red. L'intensité de fluorescence du Nile Red a été normalisée par celle du Hoechst 33342.

Le contenu en triglycérides intracellulaires a été quantifié par mesure de luminescence en utilisant le kit de dosage Triglyceride-Glo™ Assay (Promega). Les quantités de triglycérides ont été normalisées par les quantités totales de protéines déterminées par la méthode BCA en utilisant le kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific ref : 23227).

Evaluation de l'entrée des acides gras

Le réactif Fatty Acid Uptake Kit (Sigma Aldrich ref MAK156) a été utilisé pour évaluer l'entrée des acides gras. Brièvement, les cellules ont été lavées au PBS à 37°C puis incubées une heure à 37°C, 5% CO₂ avec le milieu William's E sans supplément. Comme préconisé, les cellules, une fois rincées au PBS à 37°C, sont incubées avec la sonde fluorescente dérivée de l'acide dodécanoïque, TF2-C12, pendant une heure et demie à 37°C. Après deux lavages au PBS, l'intensité de fluorescence a été mesurée par spectrofluorométrie en utilisant le lecteur de plaque Polarstar Omega (BMG Labtech) avec les longueurs d'ondes d'excitation/émission de 485-12nm/520nm. L'intensité de fluorescence de la sonde TF2-C12 a été normalisée par la quantité totale de protéines.

Evaluation de la lipogénèse *de novo*

La lipogénèse *de novo* a été mesurée en utilisant l'acide acétique marqué au carbone 14 sur le carbone n°2 ([2-¹⁴C] acide acétique) comme décrit dans une récente étude (Allard et al., 2021). Les cellules sont lavées au PBS à 37°C, puis incubées trois heures à 37°C, 5% CO₂, dans un milieu William's E sans rouge de phénol contenant de la BSA sans acides gras (1%), de l'acide

II-PESTIFAT

acétique (50 μ M) et le [2-¹⁴C] acide acétique (1850 Bq / 19,4 pM). Puis, les cellules sont rincées au PBS 37°C avant d'être incubées une heure dans un mélange d'hexane et d'isopropanol (ratio 3-2) à 37°C, 5% CO₂. Afin de limiter l'évaporation, les plaques de cultures sont scellées. Après transfert du mélange d'hexane et d'isopropanol contenant les lipides, le PBS et l'hexane sont ajoutés afin d'obtenir un ratio hexane/isopropanol/PBS de 6-2-3. Enfin, le mélange est centrifugé cinq minutes à 1000g et la phase supérieure est transférée dans le liquide à scintillation afin de mesurer les lipides radiomarqués par compteur de scintillation, Tri-Carb 4910TR (PerkinElmer). Les résultats ont été normalisés par la quantité de protéines totales.

Evaluation de la β -oxydation

L'oxydation mitochondriale des acides gras a été étudiée en utilisant de l'acide palmitique [U-¹⁴C] en partie comme décrit précédemment (Anthérieu et al., 2011). Les cellules sont lavées au PBS à 37°C, puis incubées trois heures à 37°C, 5% CO₂, dans un milieu William's E sans rouge de phénol contenant de la BSA sans acides gras (1%) et du DMSO (1%), la L-carnitine (1mM), l'acide palmitique (100 μ M) et l'acide palmitique [U-¹⁴C] (185 Bq / 0,5pM). Puis, l'acide perchlorique (6%) est directement ajouté au milieu, le mélange est ensuite incubé cinq minutes à 37°C, 5% CO₂. Le mélange milieu/acide perchlorique est alors centrifugé à 2000g pendant dix minutes. Le surnageant contenant les produits de la β -oxydation est transféré dans le liquide à scintillation, puis les produits radiomarqués au [¹⁴C] sont comptés en utilisant le compteur Tri-Carb 4910TR (PerkinElmer). Les résultats ont été normalisés par la quantité de protéines totales.

Dosage de l'apolipoprotéine B

La concentration en apolipoprotéine B a été dosée dans les surnageants des cellules exposées en suivant les instructions du kit Human Apolipoprotein B ELISA^{PTO} de Mabtech (ref 3715-1HP). Les surnageants de cultures ont été centrifugés 5 minutes à 1500g afin d'éliminer les

II-PESTIFAT

éventuels débris, puis, ils ont été dilués au ¼ dans le tampon Apo ELISA. Puis, les surnageants dilués sont déposés sur les bandes précoatées, préalablement lavées par le tampon de lavage. Après 2 heures d'incubation, les surnageants sont retirés et les bandes sont lavées. Les bandes sont alors incubées 1 heure en présence de l'anticorps anti-human apoB (LDL-11-biotin) couplé à la biotine. Les bandes sont ensuite lavées et incubées avec la peroxydase couplée à la streptaividine pendant 1 heure. Après lavage, les bandes sont incubées avec le 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, 15 minutes à l'abri de la lumière. Enfin, la réaction est arrêtée par ajout de la solution stop, puis l'absorbance est mesurée à 450nm en utilisant le lecteur de plaque Polarstar Omega (BMG Labtech).

Mesure de l'activité d'enzyme de phase I et II par HPLC, LC-MS/MS

Les activités du CYP2E1 et du CYP3A4 ont été mesurées par la production respective de chlorzoxazone O-glucuronide et 6 β -hydroxytestosterone par chromatographie liquide à haute performance (Agilent HPLC 1260 Infinity II) selon les publications suivantes (Michaut et al., 2016; Quesnot et al., 2018). Les cellules sont incubées à 37°C, 5% CO₂, 6 et 2 heures respectivement en présence de chlorzoxazone (300 μ M) et de testostérone (200 μ M) dans un milieu William's E sans rouge de phénol. Les surnageants sont ensuite centrifugés 20 minutes à 20.000g avant d'être injectés dans la colonne Accucore PFP (Thermo Scientific ref : 17426-153030). Pour la détection en UV de la chlorzoxazone O-glucuronide à 287nm un gradient d'acétonitrile et d'acide acétique (0,1%) contenant 0,25% de triéthylamine (TEA) est utilisé à un débit de 0,5mL/min. Le cycle commence à 2% d'acétonitrile et augmente jusqu'à 90% en 20 minutes. Après 7 minutes de stabilisation à 90% d'acétonitrile, il redescend à 2% en 3 minutes ce qui correspond à la fin du cycle. Pour la détection en UV de la 6 β -hydroxytestosterone à 245nm, un gradient d'acétonitrile et d'acide acétique (0,1%) est utilisé à un débit de 0,5mL/min. Le cycle commence à 20% d'acétonitrile et augmente jusqu'à 90% en

II-PESTIFAT

5 minutes. Après 4 minutes de stabilisation à 90% d'acétonitrile, il redescend à 20% en 6 minutes ce qui correspond à la fin du cycle.

Les activités des CYP3A4/5, CYP2B6, CYP1A2, CYP2C19 et des UGT et SULT ont été mesurées par la production respective de l'hydroxy-midazolam, l'hydroxy-bupropion, l'acétaminophène, la 4'-hydroxy-méphénytoïne, l'acétaminophène glucuronide et l'acétaminophène sulfate en utilisant la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS). Brièvement, les cellules sont incubées à 37°C, 5% CO₂, 1 heure en présence de midazolam (100µM), de bupropion (100µM), de phénacétine (200µM), de S-méphénytoïne (100µM), ou d'acétaminophène (1mM) dans un milieu William's E sans rouge de phénol. Les surnageants sont ensuite récupérés et dilués au demi dans l'acétonitrile et maintenus à -20°C. Après avoir été décongelés et vortexés, les surnageants sont injectés sur une colonne Xselect HSS T3 (2,1x75 mm, 2,5 µm, Waters, Milford, MA). Les composés ainsi séparés ont été détectés par spectrométrie de masse triple quadripôle, AB Sciex Triple Quad 5500+ (Applied Biosystems/Sciex, USA), sur un appareillage équipé d'une source d'ions électrospray en mode positif. Les équations des régressions linéaires des gammes obtenues par l'utilisation de standards analytiques permettent de quantifier les métabolites, les teneurs en métabolites sont normalisées par la quantité de protéines totales et rapportées au temps d'incubation.

Evaluation du métabolisme du chlorpyrifos et du diazinon par UPLC-MS/MS

Les molécules mères de chlorpyrifos et de diazinon ainsi que leurs métabolites ont été analysés par UPLC-MS/MS avec un triple quadripôle Xevo-(Waters) en mode Multiple Reaction Monitoring (MRM). De façon succincte, les cellules ont été incubées en présence de chlorpyrifos (50µM) ou de diazinon (50µM) dans le milieu William's E sans rouge de phénol pendant 8 et 24 heures. Les surnageants sont alors collectés et un lavage avec un volume

II-PESTIFAT

équivalent en eau ultra pure a été effectué afin de collecter un maximum de métabolites. Après centrifugation 20 minutes à 20.000g, les surnageants ont été congelés avant analyses. La séparation des composés a été effectuée sur colonne Acquity UPLC HSS-T3 (Waters) par un gradient d'un mélange d'eau à 0,01% d'acide formique et d'acétonitrile à 0,01% d'acide formique. La colonne est maintenue à 30°C et les échantillons à 10°C. La détection des composés est effectuée avec les paramètres suivants ; température de la source 150°C, température de désolvation 650°C, débit gaz du cône 50L/h, débit gaz de désolvation 800L/h, capillaire 2,5kV et le mode d'ionisation est l'électrospray en mode positif (Information Supplémentaire Tableau 2). Les teneurs quantifiées ont été normalisées par quantité de protéines totales. Information Supplémentaire Figure Supplémentaire 2.

Extraction des ARN et expression génique

Les ARN totaux ont été extraits en utilisant le kit Nucleospin RNA (Fisher Scientific ref : 740955) puis dosés par absorbance au Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). La synthèse et l'amplification des ADNc a été effectuée par transcription inverse en utilisant le High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). L'expression des gènes a été évaluée par PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) en utilisant le SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) et l'appareil 384-well QuantStudio™ 7 Flex Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). La TATA box binding protein (TBP) a été utilisée comme gène référence et son expression a été utilisée pour déterminer l'expression relative des gènes selon la méthode du $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Les séquences des amorces utilisées sont répertoriées dans le Tableau 3 des Informations Supplémentaires.

II-PESTIFAT

Analyses statistiques

Tous les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM d'aux moins trois expériences indépendantes. La comparaison parmi les groupes a été analysée par le test ANOVA à une voie suivi du test de comparaisons multiples de Dunnett, le test Kruskal-Wallis suivi du test de comparaisons multiples, de t-test ou de test de Mann-Whitney. Le logiciel Graph Pad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) a été utilisé pour les analyses statistiques et le seuil de significativité a été considéré pour une p-value $< 0,05$.

C-Résultats**Le mélange de pesticide aggrave l'accumulation des lipides neutres**

L'exposition du foie sain et stéatosé aux pesticides retrouvés dans l'alimentation a été mimée en utilisant la lignée HepaRG. Le modèle de stéatose *in vitro* mis au point au laboratoire, mimant les caractéristiques des patients atteints de cette pathologie, a été utilisé (Cobbina and Akhlaghi, 2017; Le Guillou et al., 2018). Nous avons exposé les cellules avec sept pesticides fréquemment retrouvés dans l'alimentation selon une procédure décrite précédemment (EFSA, 2017; Hochane et al., 2017). Les cellules HepaRG différenciées ont été exposées aux pesticides de manière isolée et en mélange à des concentrations extrapolées de l'ADI, en présence ou non d'acides stéarique et oléique à $150\mu\text{M}$ afin de mimer une condition stéatosée ou non. Après deux semaines d'exposition, l'accumulation des lipides neutres a été évaluée en utilisant la sonde fluorescente Nile Red dont l'intensité a été normalisée par la fluorescence mesurée après marquage des noyaux par le Hoechst (Figure 16). Comme attendu, l'intensité de fluorescence des cellules exposées au mélange d'acide gras (Ctrl +FA) est significativement supérieure à celle des cellules non exposés (Ctrl -FA) passant de 100 à 130%, démontrant une stéatose modérée. De façon intéressante, l'exposition au mélange, aux plus fortes concentrations

II-PESTIFAT

1/5ADI, ADI et 3ADI, en condition stéatosée (+FA), révèle une augmentation significative de l'accumulation de lipides neutres comparée aux cellules stéatosées non exposées aux pesticides. L'exposition aux pesticides isolés des cellules stéatosées suggèrent que les dithiocarbamates (manèbe et mancozèbe) sont responsables de l'augmentation de l'accumulation de lipides neutres. En effet, l'exposition au manèbe ou mancozèbe aux plus fortes concentrations, induit une accumulation de lipides neutres par rapport aux cellules stéatosées non exposées.

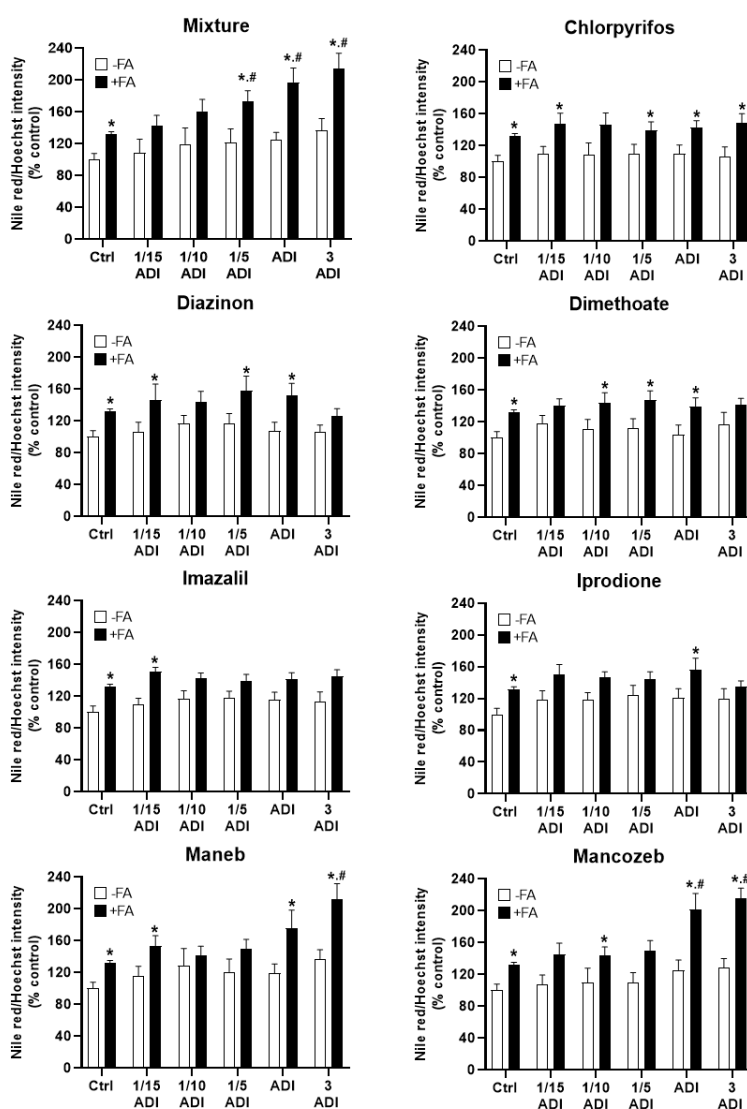


Figure 16 : Effets individuels et en mélange des pesticides sur l'accumulation des lipides

Evaluation de l'accumulation des lipides neutres par mesure de l'intensité de fluorescence de la sonde Nile Red rapportée à celle du Hoechst après deux semaines de co-exposition par les pesticides en présence (+FA) ou non d'acides gras (-FA). Les résultats correspondent à la moyenne \pm SEM de 6 expériences indépendantes* significativement différent des HepaRG non stéatosées (-FA). # significativement différent des HepaRG non traitées (Ctrl).

II-PESTIFAT

Les dithiocarbamates et l'ion manganèse aggravent l'accumulation des lipides neutres

Dans le but de vérifier l'implication des dithiocarbamates dans l'accumulation des lipides neutres, nous avons d'un côté co-exposées les cellules HepaRG avec le mélange de 5 pesticides sans les dithiocarbamates et de l'autre avec le manèbe et le mancozèbe. Ainsi, l'accumulation lipidique observée lors de la co-exposition au mélange des 7 pesticides est absente lorsque les cellules sont co-exposées au mélange déplété en dithiocarbamates (Figure 17A). De plus, l'induction de l'accumulation des lipides neutres est observée dans les cellules co-exposées aux manèbe et mancozèbe (Figure 17B). Notre étude précédente a mis en évidence que les molécules issues de la biotransformation du manèbe et mancozèbe étaient responsable de l'effet des dithiocarbamates avec production de l'éthylène thiourée et l'accumulation de manganèse (Petitjean et al., soumis). Nous avons alors co-exposé les cellules avec l'éthylène thiourée, le métabolite majeur, et avec le manganèse, ion contenu dans ces pesticides (Figure 17C). De façon intéressante, seul le manganèse reproduisait les effets des dithiocarbamates sur l'accumulation lipidique.

II-PESTIFAT

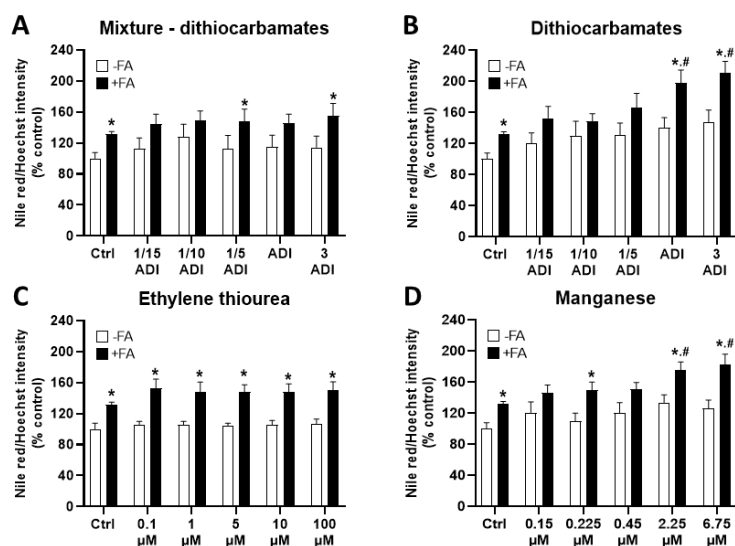


Figure 17 : Effets des dithiocarbamates, de l'éthylène thiourée et du manganèse sur l'accumulation des lipides

Evaluation de l'accumulation des lipides neutres par mesure de l'intensité de fluorescence de la sonde Nile red rapportée à celle du Hoechst après deux semaines de co-exposition par (A) le mélange de pesticides sans les dithiocarbamates (maneb et mancozeb), (B) les dithiocarbamates, (C) l'éthylène thiourée et (D) le chlorure de manganèse, en présence (+FA) ou non d'acides gras (-FA). Les résultats correspondent à la moyenne \pm SEM de 6 expériences indépendantes. * significativement différent des HepaRG non stéatosées (-FA). # significativement différent des HepaRG non traitées (Ctrl).

Les dithiocarbamates et l'ion manganèse provoquent une accumulation des lipides sous forme de triglycérides

Afin de confirmer les résultats obtenus par la sonde Nile Red qui marque les lipides neutres tels que les triglycérides et le cholestérol estérifié, nous avons quantifié les triglycérides par un dosage biochimique. En effet, la stéatose induite par un excès d'acides gras et par les xénobiotiques est principalement constituée de triglycérides (Begrache et al., 2011; Le Guillou et al., 2018). Comme attendu, les cellules exposées au mélange d'acide gras (Ctrl +FA) contiennent environ 3 fois plus de triglycérides que les cellules non exposées aux acides gras (Ctrl -FA) validant ainsi le modèle de cellules stéatosées (Figure 18). Bien que la différence entre les cellules stéatosées non exposées (Ctrl +FA) et les cellules stéatosées exposées au

II-PESTIFAT

manganèse ne soit pas significative (Figure 18C), les cellules exposées au mélange de pesticides et au manèbe ou mancozèbe présentent une accumulation lipidique observée sous forme de triglycérides. De ce fait, nos résultats démontrent clairement que le manèbe et le mancozèbe aggravent la stéatose liée à la surcharge d'acides gras et suggèrent fortement que celle-ci est due au manganèse contenu dans les dithiocarbamates.

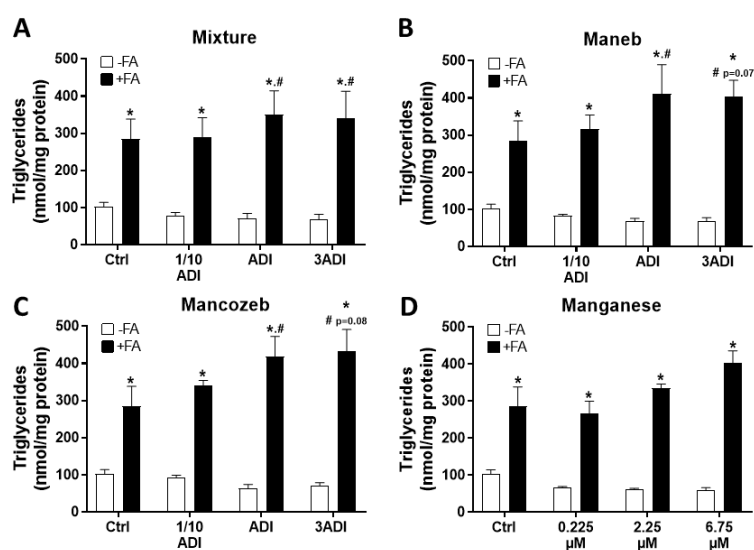


Figure 18 : Effets du mélange, des dithiocarbamates et du manganèse sur l'accumulation de triglycérides

Quantification des triglycérides par dosage après deux semaines de co-exposition par le mélange de pesticides (A), le manèbe (B), le mancozèbe (C), le manganèse (D), en présence (+FA) ou non d'acides gras (-FA). Les résultats correspondent à la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes. * significativement différent des HepaRG non stéatosées (-FA). # significativement différent des HepaRG non traitées (Ctrl).

Augmentation de l'import d'acides gras par les pesticides

Dans le but d'étudier par quels mécanismes les dithiocarbamates exacerbent la stéatose induite par les acides gras, nous avons étudié les principaux mécanismes de mise en place et d'aggravation de la stéatose. Dans un premier temps, nous avons évalué l'entrée des acides gras, pour ce faire nous avons utilisé une sonde fluorescente dérivée de l'acide dodécanoïque. Après 24 et 48 heures d'exposition au mélange, au manèbe et au manganèse en présence ou non du mélange d'acides gras, les cellules ont été incubées avec la sonde fluorescente. Après deux heures, l'intensité de fluorescence a été mesurée et rapportée à la quantité de protéines totales (Figure 19). Dès 24 heures, l'exposition au mélange, au manèbe ou au manganèse, pour les concentrations équivalentes à 3 fois l'ADI en présence ou non d'acides gras, induit une intensité de fluorescence nettement supérieure à celle des cellules non exposées aux xénobiotiques. Il semble que l'entrée des acides gras soit encore plus facilitée pour les concentrations équivalentes à 3 fois l'ADI étant donné que l'intensité de fluorescence à 48 heures est supérieure à celles observées à 24 heures. De plus, après 48 heures d'exposition, les concentrations les plus faibles (ADI) présentent une intensité de fluorescence significativement supérieure à leur contrôle respectif. Ces résultats reflètent une augmentation précoce de l'entrée des acides gras sous l'effet des dithiocarbamates et du manganèse.

II-PESTIFAT

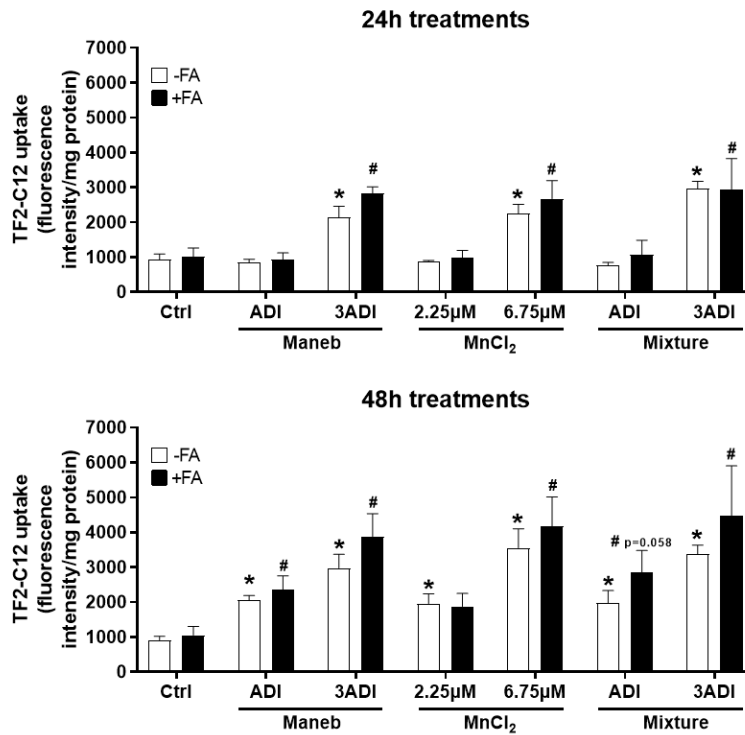


Figure 19 : Impact des dithiocarbamates et de l'ion manganèse sur l'import des acides gras

Mesure de fluorescence quantifiant l'entrée d'une sonde fluorescente dérivée de l'acide dodécanoïque après 2 heures d'incubation sur des cellules co-exposées 24 ou 48 heures au manèbe, manganèse et mélange des 7 pesticides, aux concentrations équivalentes à l'ADI et à 3 fois l'ADI (3ADI), en présence (+FA) ou non d'acides gras (-FA). Les résultats correspondent à la moyenne ± SEM de 3 expériences indépendantes. * significativement différent des HepaRG non stéatosées (-FA). # significativement différent des HepaRG non traitées (Ctrl).

II-PESTIFAT

Impact des pesticides sur la lipogénèse *de novo*

Le fait que le mélange, les dithiocarbamates et le manganèse n'entraînent pas d'accumulations lipidiques en absence du mélange d'acides gras suggère que l'augmentation de l'import des acides gras observée est compensée par d'autres voies métaboliques. Nous avons alors évalué la lipogénèse *de novo* en utilisant l'acide acétique marqué au carbone 14 sur le carbone n°2 ([2-¹⁴C] acide acétique) comme précurseur des carbones formant la chaîne aliphatique des acides gras, comme décrit dans une étude récente du laboratoire (Allard et al., 2021). Comme attendu après deux semaines de co-exposition, la lipogénèse *de novo* dans les cellules stéatosées non exposées (Ctrl+FA) est diminuée de 60% par rapport aux cellules non stéatosées non exposées (Ctrl-FA) (Figure 20). En présence d'acides gras, le mélange de pesticides, les dithiocarbamates et le manganèse ne modifient pas la lipogénèse *de novo* par rapport au contrôle. A l'inverse en absence d'acide gras, il semble que ces xénobiotiques diminuent la lipogénèse *de novo*, ce qui est confortée par la diminution significative observée dans les cellules exposées au mancozèbe à la concentration ADI (Figure 20A). Ceci pourrait expliquer pourquoi l'entrée des acides gras favorisée par les xénobiotiques en absence du mélange d'acides gras n'entraîne pas de stéatose significative.

II-PESTIFAT

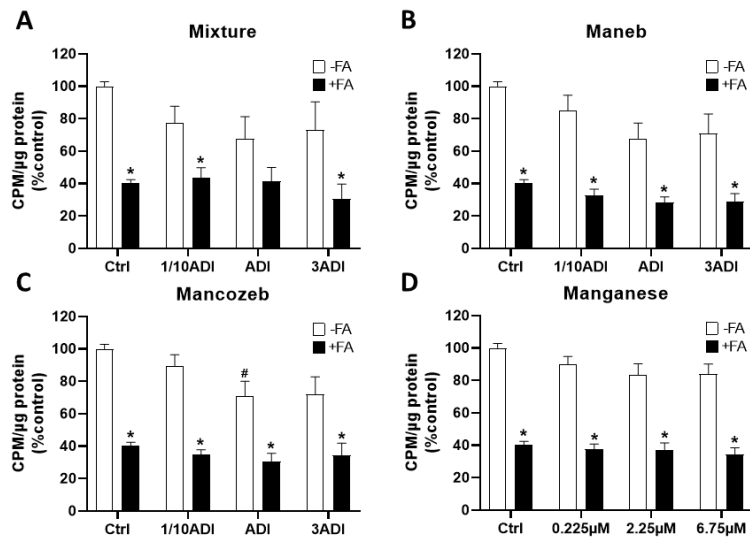


Figure 20 : Effets du mélange, des dithiocarbamates et du manganèse sur la lipogénèse *de novo*

Mesure par radioactivité des produits de synthèse de la lipogénèse *de novo* marqué au carbone 14 (C^{14}) après deux semaines de co-exposition par (A) le mélange de pesticides, (B-C) les dithiocarbamates, (D) le manganèse, en présence (+FA) ou non d'acides gras (-FA). Les résultats correspondent à la moyenne \pm SEM de 6 expériences indépendantes. * significativement différent des HepaRG non stéatosées (-FA). # significativement différent des HepaRG non traitées (Ctrl).

II-PESTIFAT

Impact des pesticides sur la β -oxydation

Le catabolisme des acides gras par la β -oxydation est une voie majeure dans le métabolisme lipidique dont l'altération peut contribuer à la mise en place d'une stéatose. Ainsi, l'oxydation mitochondriale des acides gras a été étudiée en utilisant de l'acide palmitique [U - ^{14}C] qui est marqué au carbone 14 sur tous les carbones de la chaîne aliphatique. L'oxydation mitochondriale de cet acide gras génère des corps cétoniques et des dérivés du cycle de Krebs marqués au carbone 14 et solubles dans l'acide perchlorique, contrairement à l'acide palmitique (Allard et al., 2021; Fromenty et al.). L'exposition chronique au mélange de pesticides, aux dithiocarbamates et au manganèse démontre qu'ils n'inhibent pas la β -oxydation dans les cellules stéatosées ou non (Figure 21). En revanche, il semblerait que ces molécules augmentent légèrement l'oxydation mitochondriale en absence d'acide gras, ce qui pourrait, comme pour la lipogenèse *de novo*, expliquer l'absence de stéatose malgré l'augmentation de l'import des acides gras.

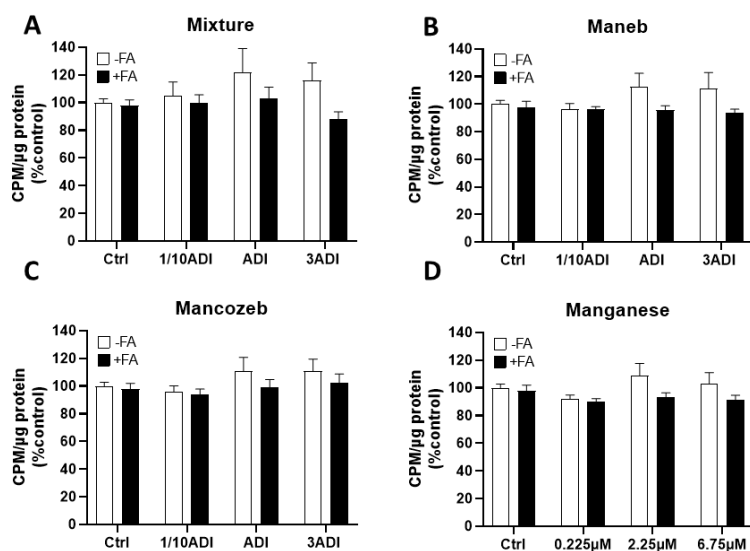


Figure 21 : Effets du mélange, des dithiocarbamates et du manganèse sur le catabolisme des acides gras par β -oxydation

Mesure par radioactivité de l'oxydation mitochondriale des acides gras par utilisation de l'acide palmitique marqué au carbone 14 (C^{14}) après deux semaines de co-exposition par (A) le mélange de pesticides, (B-C) les dithiocarbamates, (D) le manganèse, en présence (+FA) ou non d'acides gras (-FA). Les résultats correspondent à la moyenne \pm SEM de 6 expériences indépendantes.

II-PESTIFAT

Inhibition de l'export des triglycérides par la voie des VLDL

Enfin, nous avons évalué l'export des triglycérides par la voie des VLDL (very-low-density lipoproteins). Il est estimé que dans chaque « particule » VLDL, il y a une apolipoprotéine B (apoB). Nous avons, à partir de cette donnée, dosé ce constituant majeur et essentiel des VLDL comme « marqueur » d'export indirect des triglycérides dans le milieu de culture (Allard et al., 2021; Elovson et al., 1988). Le dosage a permis de mettre en évidence une diminution très importante de la concentration en apoB dans les surnageants des cellules exposées pendant deux semaines au mélange de pesticides, au manèbe et au manganèse, en présence ou non d'acides gras (Figure 22A). Ces résultats sont en partie retrouvés après 24 et 48 heures d'exposition mais de manière moins marquée. Ces résultats démontrent une inhibition par les dithiocarbamates et leur ion manganèse de la sécrétion des VLDL. Afin de déterminer les mécanismes impliqués dans l'inhibition de la sécrétion des VLDL, nous avons évalué l'expression génique des apolipoprotéines, apoB et apoC3 ainsi que la MTTP (*microsomal triglyceride transfer protein*). Les résultats démontrent que les expressions relatives des ARNm de ces trois protéines sont très fortement diminuées, voire totalement inhibées pour l'apoC3 et MTTP, après deux semaines d'exposition au mélange, au manèbe et au manganèse en présence ou non d'acides gras (Figure 22B). L'ensemble de ces résultats mettent en avant une inhibition drastique et précoce de la formation des VLDL et par conséquent de l'export des triglycérides par les dithiocarbamates et le manganèse.

II-PESTIFAT

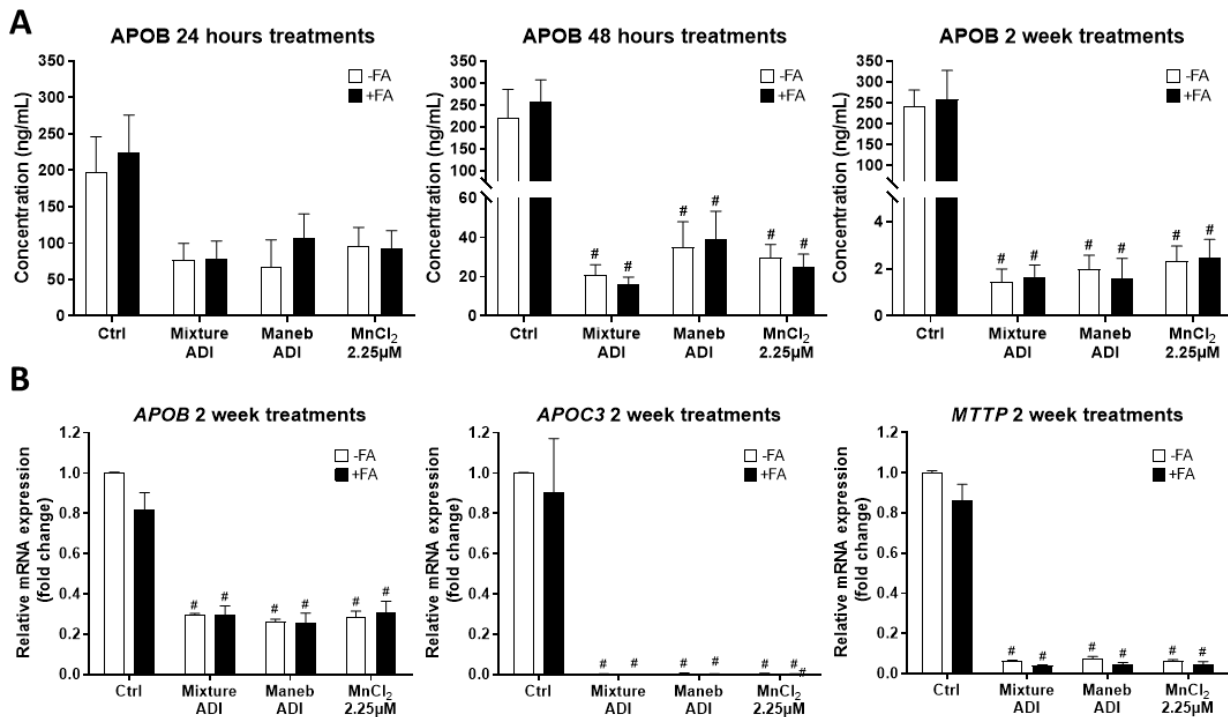


Figure 22 : Impact des dithiocarbamates et de l'ion manganèse sur la sécrétion des VLDL

(A) Quantification de l'apoB par dosage ELISA dans le surnageant de culture de cellules co-exposées pendant 24, 48 heures et 2 semaines au manèbe, manganèse et au mélange de pesticides, aux concentrations équivalentes à l'ADI, en présence (+FA) ou non d'acides gras (-FA). (B) Quantification relative par RT-qPCR de l'expression de gènes impliqués dans la formation des VLDL, dans les cellules co-exposées pendant 2 semaines au manèbe, manganèse et mélange de pesticides, aux concentrations équivalentes à l'ADI, en présence (+FA) ou non d'acides gras (-FA). Les résultats correspondent à la moyenne ± SEM de 3 expériences indépendantes. # significativement différent des HepaRG non traitées (Ctrl).

II-PESTIFAT

Impact des dithiocarbamates sur le stress du réticulum endoplasmique

Pour en savoir plus sur les mécanismes impliqués dans l'inhibition de la synthèse des VLDL par les dithiocarbamates, nous avons évalué le stress du réticulum endoplasmique. En effet, dans une étude récente menée au laboratoire, nous avons montré que la diminution de la synthèse des VLDL par certains médicaments stéatogènes pouvait impliquer, en partie, un stress du réticulum endoplasmique (Allard et al., 2021). De plus, nous avons démontré dans une précédente étude que les dithiocarbamates et le manganèse provoquaient un stress du réticulum endoplasmique (Petitjean et al., soumis). C'est pourquoi nous avons étudié l'expression des ARNm de DDIT3 (CHOP), ERN1 (IRE1 α) et EIF2AK3 (PERK). De façon intéressante, le mélange des pesticides, le manèbe et le manganèse augmentent l'expression de DDIT3 après deux semaines d'exposition en présence ou non d'acides gras (Figure 23).

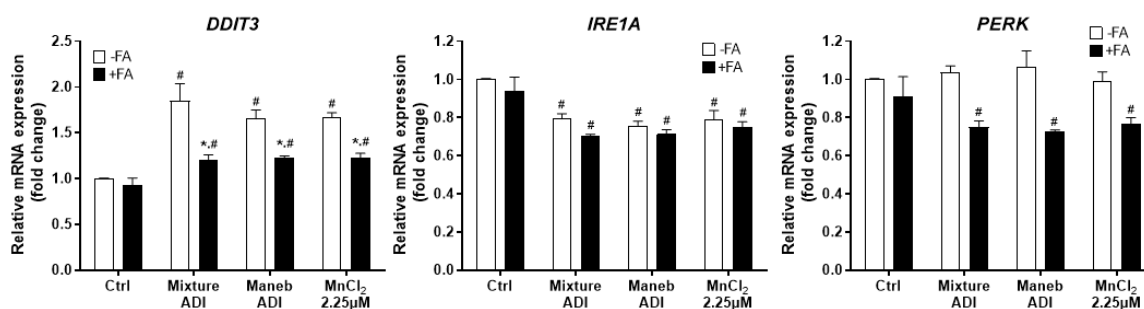


Figure 23 : Expression génique de marqueurs du stress du réticulum endoplasmique

Quantification relative par RT-qPCR de l'expression de gènes impliqués dans le stress du réticulum endoplasmique, des cellules co-exposées pendant 2 semaines au manèbe, manganèse et mélange de pesticides, aux concentrations équivalentes à l'ADI, en présence (+FA) ou non d'acides gras (-FA). Les résultats correspondent à la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes. *significativement différent des HepaRG non stéatosées (-FA). # significativement différent des HepaRG non traitées (Ctrl).

II-PESTIFAT

Inhibition de l'activité et de l'expression des cytochromes P450 2E1 et 3A4 par le mélange des pesticides

La stéatose hépatique, induite ou non par les xénobiotiques, étant corrélée à une modification des capacités de biotransformation des xénobiotiques, nous avons dans un premier temps évalué l'impact des pesticides sur l'expression des cytochromes P450 2E1 et 3A4. En effet, la stéatose hépatique chez le patient est généralement associée à une augmentation et une diminution de l'expression génique, et de l'activité, respectivement du CYP2E1 et CYP3A4 (Cobbina and Akhlaghi, 2017). Les activités des CYP2E1 et 3A4 ont été quantifiées par HPLC en utilisant leur substrat respectif, la chlorzoxazone et la testostérone. L'exposition au mélange des pesticides pendant deux semaines diminue la formation des métabolites du CYP2E1 et du CYP3A4 que les cellules soient co-exposées ou non aux acides gras (Figure 24A). L'analyse de l'expression génique de ces deux cytochromes révèle une forte diminution de leur expression dans les cellules exposées au mélange en présence ou non d'acide gras (Figure 24B). Ces résultats démontrent que le mélange de pesticides diminue la capacité de biotransformation des xénobiotiques en condition stéatosée ou non.

II-PESTIFAT

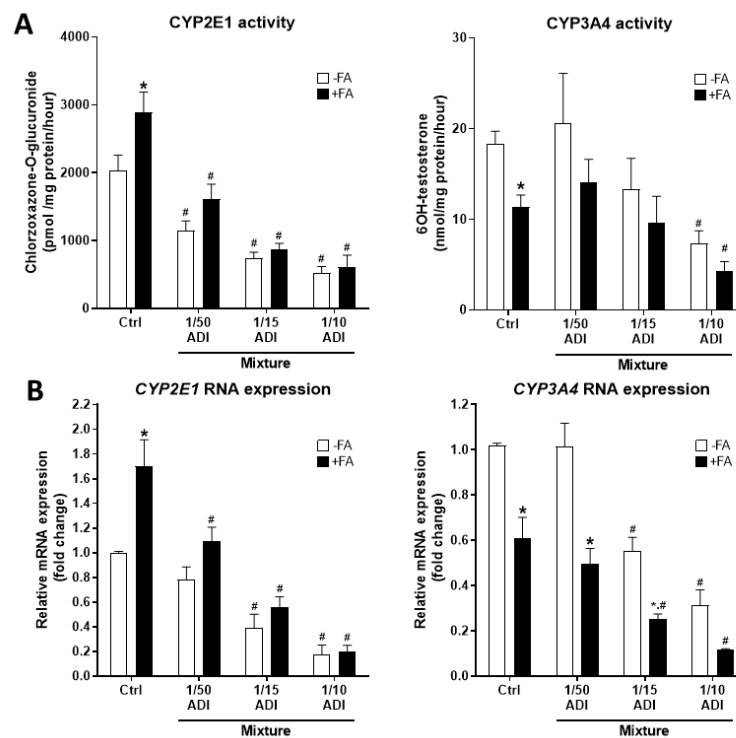


Figure 24 : Inhibition de l'activité et de l'expression génique des cytochromes P450 2E1 et 3A4 par le mélange de pesticides

(A) Mesure de l'activité du CYP2E1 et du CYP3A4 respectivement par dosage en HPLC des métabolites chlorzoxazone-O-glucuronide et de la 6-hydroxy-testosterone, (B) quantification relative par RT-qPCR de l'expression des gènes codant pour le CYP2E1 et CYP3A4, après deux semaines de co-exposition par le mélange de pesticides à des concentrations inférieures à l'ADI en présence (+FA) ou non d'acides gras (-FA). Les résultats correspondent à la moyenne \pm SEM d'au moins 3 expériences indépendantes. * significativement différent des HepaRG non stéatosées (-FA). # significativement différent des HepaRG non traitées (Ctrl).

II-PESTIFAT

Rôle des dithiocarbamates et du manganèse dans l'inhibition de l'activité et de l'expression des CYP2E1 et 3A4

Dans le but d'identifier les pesticides responsables de l'inhibition de l'activité et de l'expression du CYP2E1 et du CYP3A4 et au regard des résultats précédents, nous avons exposées les cellules, en présence ou non d'acide gras, au mélange de pesticides avec et sans dithiocarbamates, au manèbe et manganèse. Nos résultats démontrent que les inhibitions observées avec le mélange de pesticides sont dues en grande partie au manèbe et au manganèse (Figure 25A). Ces diminutions d'activité sont également associées à une réduction de l'expression des ARNm des CYP2E1 et CYP3A4 (Figure 25B). Fait intéressant, le mélange de pesticides sans dithiocarbamates diminue également l'expression du CYP3A4 dans les cellules non exposées aux acides gras, suggérant que d'autres pesticides, ou le mélange des cinq par un effet « cocktail », pourraient également altérer l'activité d'autres enzymes de biotransformation. L'expression et l'activité des CYP2E1 et CYP3A4 étant des marqueurs de différenciation hépatocytaire (Aninat et al., 2006; Gripon et al., 2002) nous avons voulu ainsi savoir si les effets des dithiocarbamates et du manganèse étaient liés à une perte de différenciation globale en mesurant l'expression de HNF4 α (*hepatocyte nuclear factor 4 α*), un facteur de transcription jouant un rôle majeur dans ce processus biologique (Watt et al., 2003). Nos résultats indiquent que l'expression d'HNF4 α n'était pas modifiée dans les différentes conditions d'exposition, suggérant que le manèbe et le manganèse n'entraîne pas d'altération du statut « global » de différenciation des hépatocytes (Figure 27).

II-PESTIFAT

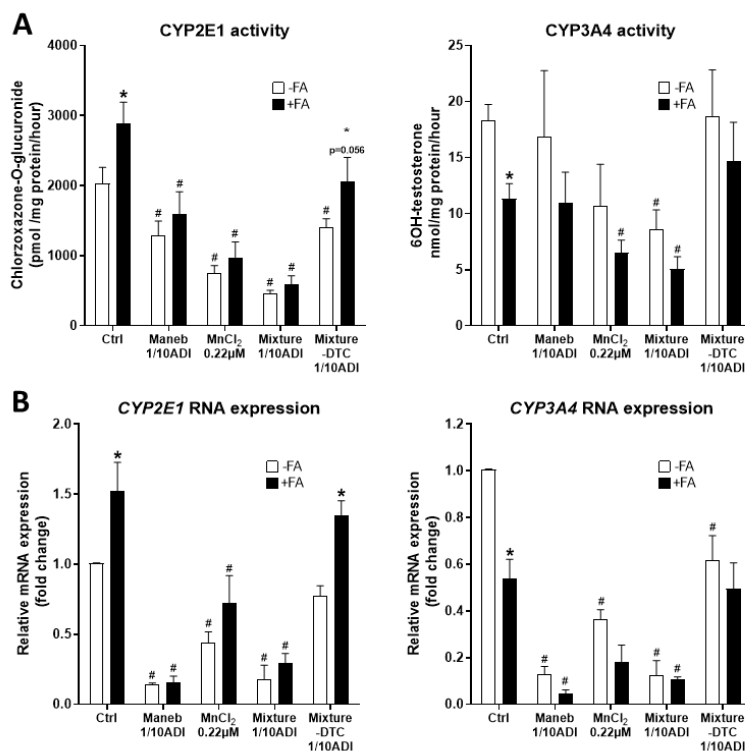


Figure 25 : Inhibition de l'activité et de l'expression génique des cytochromes P450 2E1 et 3A4 par les dithiocarbamates et l'ion manganèse

(A) Mesure de l'activité du CYP2E1 et du CYP3A4 respectivement par dosage en HPLC des métabolites chlorzoxazone-O-glucuronide et de la 6-hydroxy-testostérone, (B) quantification relative par RT-qPCR de l'expression des gènes codant pour le CYP2E1 et CYP3A4, après deux semaines de co-exposition au manèbe, manganèse (MnCl₂) et mélange de pesticides avec ou sans dithiocarbamates (Mixture -DTC) à des concentrations dix fois inférieures à l'ADI en présence (+FA) ou non d'acides gras (-FA). Les résultats correspondent à la moyenne ± SEM d'au moins 3 expériences indépendantes. * significativement différent des HepaRG non stéatosées (-FA). # significativement différent des HepaRG non traitées (Ctrl).

II-PESTIFAT

Impact des dithiocarbamates sur les enzymes de phase I et II de biotransformation

Pour aller plus loin dans la caractérisation de la capacité des dithiocarbamates à perturber la biotransformation, nous avons étudié l'expression génique et l'activité d'autres enzymes majeures de la phase I mais également de la phase II. Les cellules HepaRG différenciées ont été exposées pendant deux jours et deux semaines aux pesticides en présence ou non d'acides gras. L'exposition pendant deux jours n'a révélé aucune différence significative entre les cellules contrôles et les cellules exposées aux pesticides (Figure Supplémentaire 4A-C). En revanche, après deux semaines d'exposition, l'activité des enzymes de phase I, étudiée par la formation de leur métabolite respectif par LC-MS/MS, a mis en évidence une inhibition sélective de certaines enzymes (Figure 26A). En effet, le mélange des sept pesticides, le manèbe et le manganèse provoquent une diminution de l'activité du CYP2B6. A l'inverse ces molécules ne modifient pas l'activité du CYP1A2 et du CYP2C19. On peut cependant noter qu'il y a une diminution de l'activité du CYP2C19 dans les cellules stéatosées exposés au mélange des sept pesticides. Les résultats obtenus pour le CYP2E1 et 3A4 suggèrent une altération de l'activité due à la diminution de leur expression génique. Nous avons donc mesuré les ARNm des enzymes de phase I. Les modifications de l'expression génique du CYP2B6 et 2C19 sont en partie similaires aux variations de l'activité de ces enzymes (Figure 26B). De façon intéressante, l'expression de CYP1A2 dans les cellules stéatosées exposées au mélange avec et sans dithiocarbamates était augmentée. Ceci suggère un rôle des autres pesticides dans l'induction de l'expression de CYP1A2. Enfin, l'évaluation de l'activité et l'expression des enzymes de phase II, UGT et SULT n'a révélé aucune différence significative (Figure 26C-D). Cependant, l'expression génique de la GSTa2 dans les cellules exposées aux mélanges des sept pesticides, le manèbe et le manganèse était diminuée (Figure Supplémentaire 4D). Bien que l'expression des GSTa3 et GSTa4 ne soit pas modifiée, ceci pourrait impliquer une diminution de l'activité

II-PESTIFAT

des GST que nous n'avons pas analysé à ce stade. L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que les dithiocarbamates et le manganèse perturbent de façon sélective certaines enzymes de phase I et à l'inverse ne modifient pas l'activité des enzymes de phase II.

II-PESTIFAT

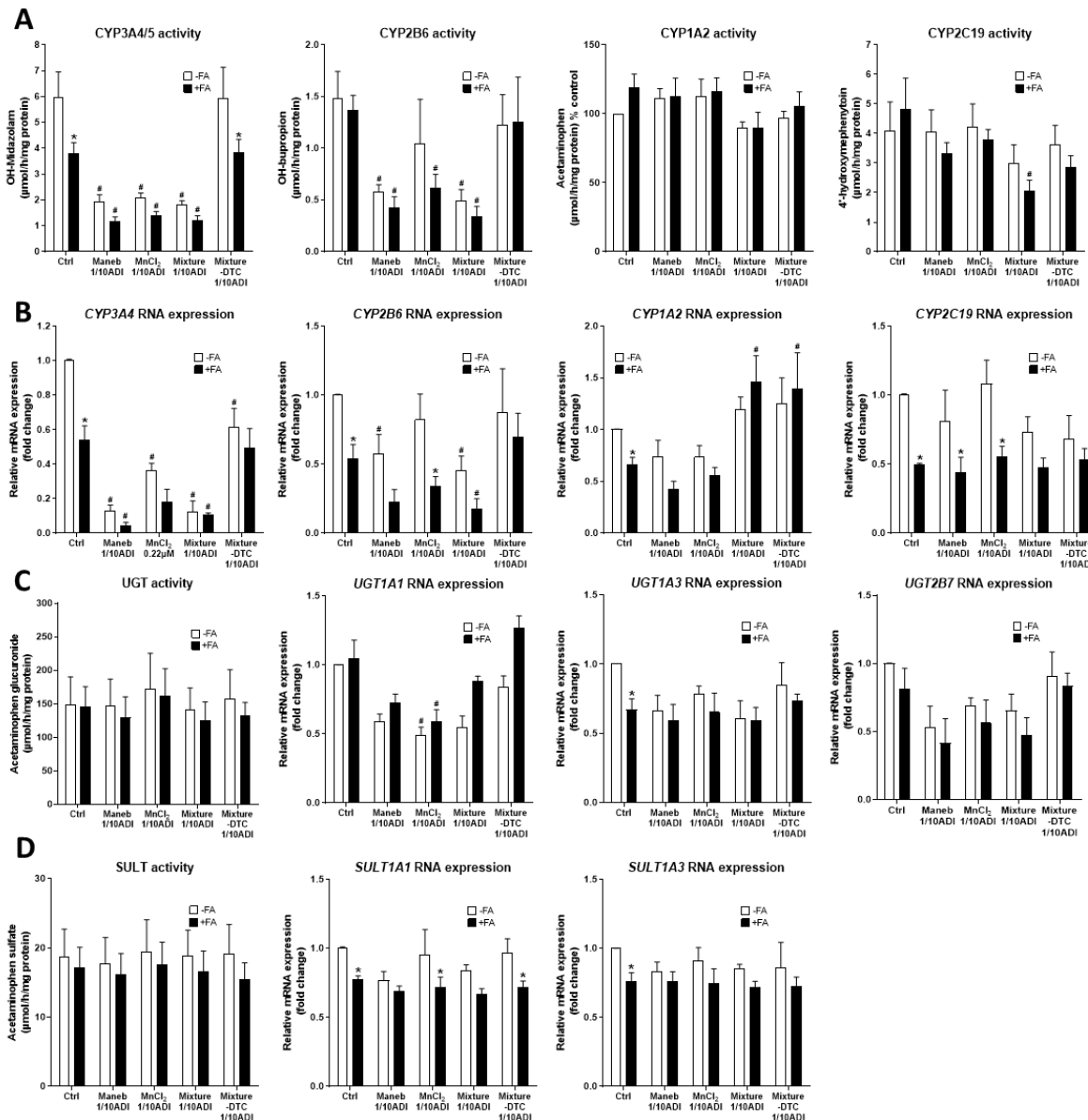


Figure 26 : Altération de l'activité et de l'expression génique d'enzymes de détoxification par les dithiocarbamates et l'ion manganèse

(A) Mesure de l'activité du CYP3A4/5, du CYP2B6, du CYP1A2 et du CYP2C19 respectivement par dosage en LC-MS/MS des métabolites hydroxy-midazolam, hydroxy-bupropion, acétaminophène et de la 4-hydroxy-méphénytoïne, (B) quantification relative par RT-qPCR de l'expression des gènes codants pour les enzymes de phase I du métabolisme, (C-D) mesure de l'activité des UGT et des SULT respectivement par dosage en LC-MS/MS de l'acétaminophène glucuronide et de l'acétaminophène sulfate et quantification par RT-qPCR de l'expression des gènes codants pour les enzymes de phase II, après deux semaines de co-exposition par le maneb, le manganèse (MnCl₂) et le mélange de pesticide avec ou sans dithiocarbamates (Mixture -DTC) à des concentrations dix fois inférieures à l'ADI en présence (+FA) ou non d'acides gras (-FA). Les résultats correspondent à la moyenne ± SEM d'au moins 3 expériences indépendantes. * significativement différent des HepaRG non stéatosées (-FA). # significativement différent des HepaRG non traitées (Ctrl).

II-PESTIFAT

Inhibition sélective de l'expression des récepteurs nucléaires par les dithiocarbamates et le manganèse

L'expression des CYP est régulée de manière importante par les récepteurs nucléaires, par exemple HNF4a joue un rôle majeur dans l'expression de CYP3A4 (Jover et al., 2001). C'est pourquoi, nous avons émis l'hypothèse d'une modulation de l'expression de récepteurs nucléaires par les dithiocarbamates qui impacterait l'expression des CYP. Nous avons donc analysé par RT-qPCR les transcrits des récepteurs nucléaires mettant ainsi en évidence une diminution de certains d'entre eux (Figure 27). En effet, l'exposition des cellules HepaRG, stéatosées ou non, au manèbe, au manganèse et au mélange de pesticides avec et sans dithiocarbamates ne modifie pas l'expression de HNF4a, AHR et LXR. A l'inverse, l'exposition au manèbe et au mélange de pesticides contenant les dithiocarbamates diminue de manière significative l'expression de CAR, PXR et FXR. Fait intéressant, l'exposition des cellules HepaRG aux acides gras semble diminuer l'expression de PXR et diminue de manière significative l'expression de FXR et CAR dans les cellules non exposées aux pesticides.

II-PESTIFAT

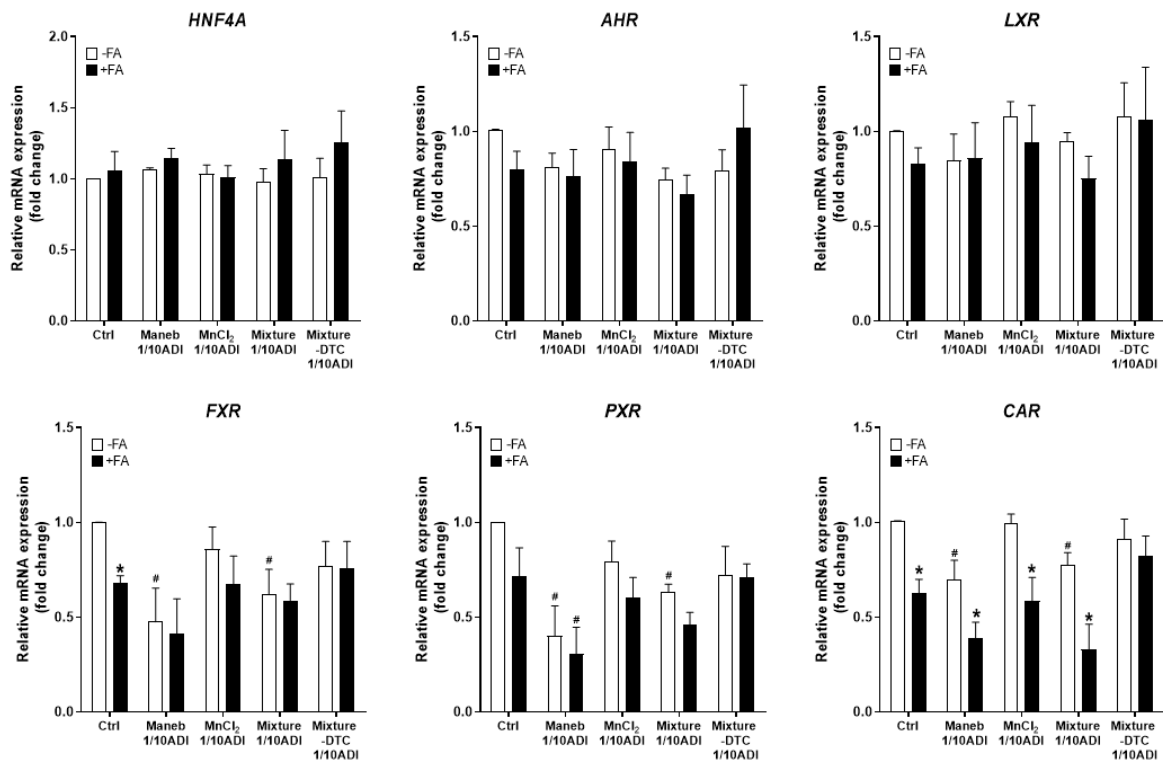


Figure 27 : Impact des dithiocarbamates sur l'expression des récepteurs nucléaires

Quantification relative par RT-qPCR de l'expression de gènes codant les récepteurs nucléaires, des cellules co-exposées pendant 2 semaines au manèbe, manganèse (MnCl₂) et mélange de pesticides avec ou sans dithiocarbamates (Mixture -DTC), à des concentrations inférieures à dix fois l'ADI, en présence (+FA) ou non d'acides gras (-FA). Les résultats correspondent à la moyenne ± SEM de 3 expériences indépendantes. * significativement différent des HepaRG non stéatosées (-FA). # significativement différent des HepaRG non traitées (Ctrl).

II-PESTIFAT

Impact de l'exposition du mélange de pesticides sur la biotransformation du chlorpyrifos et du diazinon

Etant donné que les dithiocarbamates altèrent l'activité de certaines enzymes, nous avons finalement voulu étudier leur impact sur la biotransformation des pesticides contenus dans le mélange. Pour ce faire, nous avons sélectionné 2 des 7 pesticides dont la biotransformation hépatique est dépendante d'une ou de plusieurs enzymes et dont les métabolites sont connus dans la littérature. Ainsi, nous avons choisi le chlorpyrifos, métabolisé notamment par les CYP3A4, CYP3A5 et 2B6 (Mutch and Williams, 2006; Rendic and Guengerich, 2021) et le diazinon, métabolisé par les 4 enzymes (i.e. CYP2E1, CYP3A4, CYP3A5 et CYP2B6) (Mutch and Williams, 2006; Rendic and Guengerich, 2021). Les cellules HepaRG différenciées ont été exposées ou non au mélange de pesticides, au manèbe et au manganèse en présence ou non d'acides gras pendant deux jours et deux semaines. Après exposition, les cellules ont été incubées 8 et 24 heures en présence de chlorpyrifos ou de diazinon à 50 μ M afin d'évaluer la métabolisation de ces composés par LC-MS/MS. Les résultats après deux jours d'exposition n'ont pas révélé de différence dans la métabolisation du chlorpyrifos et du diazinon (Figure Supplémentaire 5). En revanche, après deux semaines d'exposition au mélange, manèbe et manganèse, il y a une importante diminution de la concentration en IMP (2-isopropyl-6-méthyl-4-pyrimidinol), métabolite du diazinon, dans les milieux de cultures après 8 et 24 heures d'incubation par rapport aux milieux de cultures des cellules non exposées stéatosées (Ctrl+FA) ou contrôle sans traitement pas les acides gras (Ctrl-FA) (Figure 28B). On peut également noter pour des expositions équivalentes, que les concentrations en IMP dans certains milieux des cellules stéatosées sont significativement moins élevées que dans ceux des cellules non stéatosées correspondantes. Malgré l'inhibition de la formation de l'IMP dans les cellules exposées aux pesticides, il y a toujours une métabolisation de l'IMP dans les cellules non stéatosées. En effet, les concentrations en IMP sont plus importantes après 24 heures qu'après

II-PESTIFAT

8 heures d'incubation. La perturbation de la métabolisation du diazinon est confortée par le dosage de ce dernier dans les milieux de cultures (Figure 28A). En effet, la teneur en diazinon est significativement supérieure dans les milieux de cultures des cellules exposées au mélange de pesticides, au manèbe et au manganèse après 24 heures d'incubation comparée aux valeurs dans les cultures contrôles. Cependant, les concentrations en diazinon à 24 heures dans les milieux de culture sont toutes nettement moins importantes que dans les milieux à 8 heures, quel que soit l'exposition des cellules. L'ensemble de ces résultats suggère que les dithiocarbamates et le manganèse conduisent à une importante inhibition de la formation de l'IMP et également à un ralentissement de l'élimination du diazinon. Il apparaît donc que le diazinon est métabolisé par une autre voie que celle conduisant à la formation de l'IMP. L'absence de modification des concentrations en TCP (3,5,6-trichloro-2-pyridinol) semble indiquer que la métabolisation du chlorpyrifos n'est pas altérée par le mélange de pesticides, le manèbe et le manganèse (Figure 28C).

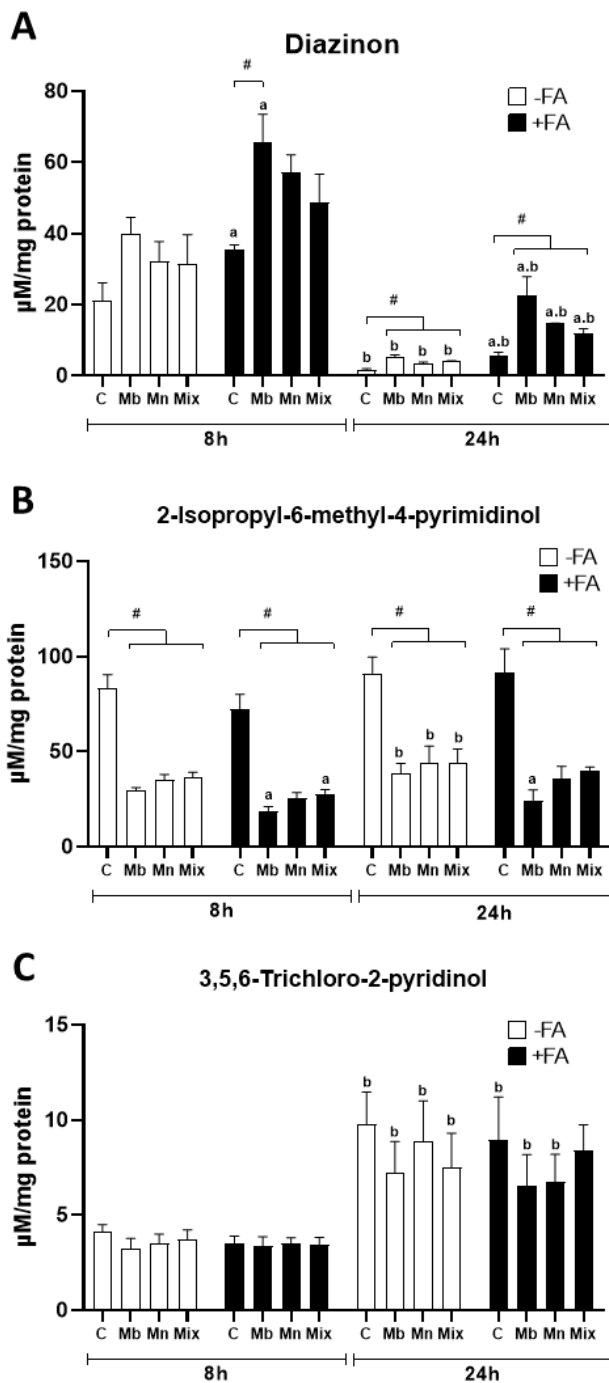


Figure 28 : Impact des dithiocarbamates et de l'ion manganèse sur la biotransformation du diazinon et du chlorpyrifos (A) Quantification par LC-MS/MS du diazinon, (B) de son métabolite le 2-Isopropyl-6-methyl-4-pyrimidinol et (C) du 3,5,6-Trichloro-2-pyridinol, métabolite du chlorpyrifos, après 8 et 24 heures d'incubation avec les molécules mères (50µM) sur des cellules co-exposées pendant 2 semaines au manèbe (Mb), manganèse (Mn) et mélange de pesticides (Mix), à des concentrations inférieures à dix fois l'ADI, en présence (+FA) ou non d'acides gras (-FA). Les résultats correspondent à la moyenne ± SEM de 4 expériences indépendantes. #, a, b valeurs significativement différentes respectivement, des cellules HepaRG non traitées, stéatosées ou non (C), de l'exposition équivalente non stéatosées (-FA) ou de l'équivalent à 8 heures d'incubation (8h).

II-PESTIFAT

D-Discussion

L'exposition de modèle *in vitro* et *in vivo* aux xénobiotiques, tels que les médicaments ou les contaminants de l'environnement, est capable d'induire une stéatose hépatique mais également de l'aggraver (Allard et al., 2021; Bucher et al., 2018b; Duval et al., 2017; Foulds et al., 2017). Plusieurs études suggèrent que l'exposition aux pesticides par l'alimentation pourrait conduire à une stéatose (Rives et al., 2020). De plus, la stéatose hépatique est connue pour altérer le métabolisme des xénobiotiques (Cobbina and Akhlaghi, 2017; Merrell and Cherrington, 2011; Naik et al., 2013). Cependant, les concentrations, les méthodes d'administration et de traitements ainsi que les modèles *in vivo* et *in vitro* ne reflètent pas toujours une exposition réelle aux pesticides par l'alimentation, et de ce fait permettent rarement une transposition des résultats à l'Homme. Dans ce contexte, nous avons sélectionné sept pesticides fréquemment retrouvés dans l'alimentation et évalué leur impact lors d'une exposition chronique sur l'apparition et l'exacerbation de la stéatose et les modulations du métabolisme des xénobiotiques.

Nos résultats montrent une exacerbation de la stéatose par les dithiocarbamates manèbe et mancozèbe et par le manganèse (Figure 16, 17 et 18). Ces résultats sont en accord avec une étude réalisée sur le modèle cellulaire HepG2 incubé avec un mélange d'acides oléique et linoléique (Pirozzi et al., 2016). En revanche, l'absence d'apparition d'une stéatose induite uniquement par l'exposition aux dithiocarbamates est en désaccord avec deux études observant une accumulation de triglycérides chez le rat exposé au manèbe et au mancozèbe (Ben Amara et al., 2015; Yahia et al., 2019). De même, nous n'avons pas mis en évidence d'impact des autres pesticides du mélange sur l'apparition ou l'aggravation de la stéatose, alors que le chlorpyrifos, le diazinon et l'imazalil sont également connus pour favoriser l'accumulation des triglycérides en modèles *in vitro* et/ou *in vivo* (Aramjoo et al., 2021; Howell et al., 2016; Lichtenstein et al., 2021). Les discordances de nos observations avec la littérature pourraient

II-PESTIFAT

s'expliquer par le fait que nous avons choisi des concentrations très faibles de pesticides afin de mimer au mieux l'exposition réelle par l'alimentation. Il est donc probable que les effets stéatogènes des pesticides soient soumis à des doses seuils. Ainsi, nous ne pouvons pas exclure qu'une exposition à plus forte concentration et/ou à plus long terme pourrait favoriser l'apparition d'une stéatose.

Pour la première fois à notre connaissance, notre étude démontre que les dithiocarbamates exacerbent la stéatose en augmentant l'entrée des acides gras dans les hépatocytes et en réduisant la sécrétion des VLDL, effets reproduits par le chlorure de manganèse (Figure 19 et 22). Cependant, le mécanisme d'induction de l'import des acides gras par les dithiocarbamates n'a pas pu être identifié dans cette étude. En effet, l'analyse de l'expression des gènes codant les transporteurs tels que FAT/CD36 ou FATP2, FATP4 et FATP5 (Gimeno, 2007; Li et al., 2022) n'a révélé aucune induction par les dithiocarbamates ou le manganèse (résultats non montrés). Or, il a été démontré que l'expression et l'activité de FAT/CD36 jouent un rôle dans l'augmentation de l'entrée des acides gras et les pathologies hépatiques associées aux lipides (He et al., 2011 ; Zhao et al., 2018). Des investigations supplémentaires seraient nécessaires afin de déterminer le(s) mécanisme(s) impliqué(s) dans l'augmentation de l'entrée des acides gras. Il serait important d'étudier notamment l'abondance protéique des transporteurs, cités ci-dessus, par Western blot et par immunofluorescence, étant donné que l'expression en ARNm n'est pas toujours le reflet de l'expression de la protéine qui peut subir de nombreuses régulations post-transcriptionnelles (Pradet-Balade et al., 2001). A expression protéique constante, nous pourrions conclure à une augmentation de l'activité de transport.

La diminution de la sécrétion de VLDL par les dithiocarbamates, que nous avons mis en évidence pourrait être due à une inhibition de la synthèse des VLDL. En effet, nos résultats démontrent une importante diminution de l'expression de l'apoB, l'apoC3 et de MTP qui sont essentielles à la formation des VLDL (Fisher et al., 2014; Yao and Wang, 2012). Ces résultats

II-PESTIFAT

sont concordants avec ceux d'une précédente étude dans laquelle les médicaments induisent une stéatose par diminution de la sécrétion/synthèse des VLDL. Par ailleurs, cette récente étude a mis en évidence que l'inhibition de la sécrétion des VLDL et de l'expression des gènes associés à leur synthèse étaient la conséquence d'un stress du réticulum endoplasmique par certains médicaments (Allard et al., 2021). De plus, notre étude précédente sur la toxicité de ce mélange de pesticides a révélé que les dithiocarbamates et le manganèse provoquaient un stress du réticulum endoplasmique (Petitjean et al., soumis). L'analyse de l'expression des gènes impliqués dans le stress du réticulum montre que DDIT3 (CHOP) est induit par les dithiocarbamates et le manganèse. Ainsi, l'inhibition de la synthèse des VLDL par les dithiocarbamates pourrait également être en partie due au stress du réticulum endoplasmique qu'ils provoquent. Il serait donc intéressant d'étudier l'expression protéique de ces marqueurs dans ces conditions expérimentales de co-traitement aux acides gras et dithiocarbamates ainsi que d'autres marqueurs du stress du réticulum endoplasmique par analyse transcriptionnelle et protéique.

Fait intéressant, nos résultats démontrent que l'augmentation de l'entrée des acides gras dans les hépatocytes et l'inhibition de la sécrétion des VLDL, induites par les dithiocarbamates et le manganèse, sont des mécanismes précoces. En outre, ces modulations sont observées en présence ou non d'acides gras. Or, il n'y a pas d'apparition de stéatose en absence d'apport en acides gras (Figure 16, 17 et 18). L'ensemble de nos résultats suggère que l'exposition aux dithiocarbamates et au manganèse favoriserait le développement d'une stéatose hépatique en cas d'excès d'apport d'acides gras survenant pendant ou immédiatement après l'exposition aux pesticides.

Nous avons démontré que l'effet délétère des dithiocarbamates sur les hépatocytes stéatosés est porté par le manganèse. Peu de données cliniques existent concernant la relation entre l'exposition au manganèse et la présence d'une stéatose. Cependant, des investigations

II-PESTIFAT

cliniques suggèrent qu'il existe une association positive entre les concentrations plasmatiques de manganèse et la présence d'une stéatose (Liu et al., 2022; Spaur et al., 2022), bien que ces données ne soient pas confirmées par d'autres études (Zhang et al., 2022). Malheureusement, ces recherches cliniques n'ont pas été conçues pour montrer que l'exposition au manganèse est capable d'aggraver une stéatose préexistante liée à l'obésité.

Notre travail met en évidence une inhibition par les dithiocarbamates et le manganèse de l'activité des CYP2E1, CYP3A4/5 et CYP2B6 (Figure 26 et 27). Toutefois, cette inhibition des enzymes de phase I est sélective puisqu'elle n'a pas été observée pour l'ensemble des CYP. On peut cependant noter que l'activité du CYP2C19 est significativement diminuée dans les hépatocytes stéatosés exposés au mélange de pesticides par rapport aux hépatocytes stéatosés non exposés. Ceci suggère une sensibilité et des mécanismes variables entre les différents cytochromes. De plus, nos investigations n'ont montré aucune différence d'activité des CYP après deux jours d'exposition (Figure Supplémentaire 4). Ceci concorde avec le fait que l'induction des CYP, notamment celle du CYP3A4 est dépendante du temps d'exposition et de la concentration des inducteurs canoniques tels que la rifampicine ou la dexaméthasone (Lehmann et al., 1998). Ainsi, il est possible que l'exposition aux dithiocarbamates inhibe l'activité d'autres CYP à des concentrations plus importantes ou à plus long terme. L'inhibition de l'activité des CYP est probablement liée à la diminution de leur expression en ARNm observée dans cette étude. L'analyse des transcrits des gènes codant les récepteurs nucléaires a mis en évidence des inhibitions d'expression spécifique (Figure 27). L'expression stable de AHR, quelle que soit l'exposition, et l'induction de l'expression de CYP1A2, uniquement par le mélange de pesticides, pourraient suggérer qu'un ou plusieurs pesticides, et dithiocarbamates, activent AHR. En effet, l'induction de CYP1A2 lors de l'exposition à certains xénobiotiques est due à l'activation de AHR par ces composés (Bucher et al., 2018a; Zhao et al., 2019).

II-PESTIFAT

Par ailleurs, nos résultats démontrent que l'exposition aux dithiocarbamates inhibe en partie l'expression de CAR, de PXR et de FXR, au même titre que celles des CYP, suggérant une corrélation. Cette hypothèse d'association entre l'inhibition de l'expression de ces récepteurs nucléaires et des CYP est en accord avec le rôle majeur de CAR et PXR dans l'induction de CYP2B6 et CYP3A4 (Sueyoshi et al., 1999; Xie et al., 2000). De même, FXR est connu pour réguler l'expression du CYP3A4 (Gnerre et al., 2004). De plus, certaines études ont démontré que l'inhibition de CAR et PXR conduit à une diminution de l'expression du CYP2B6 et du CYP3A4 (Beigneux et al., 2002; Forman et al., 1998). Notre hypothèse d'un lien entre la diminution de l'expression de récepteurs nucléaires et de CYPs est également confortée par plusieurs études qui démontrent que l'inhibition à la fois de l'expression de CAR et de PXR est responsable de la diminution d'expression de CYP2B6 et CYP3A4 (Bachmann et al., 2021; Xie et al., 2000). Par ailleurs, cette régulation de plusieurs récepteurs pourrait expliquer l'importante inhibition d'expression des CYP mise en évidence malgré une diminution partielle de l'expression de PXR et CAR (Wang et al., 2003). De même, on peut noter que CAR et PXR sont impliqués, dans une moindre mesure, dans la régulation des CYP2C, ceci pourrait expliquer pourquoi nous observons, uniquement en présence du mélange, une diminution de l'activité et de l'expression du CYP2C19 (Bachmann et al., 2021).

Néanmoins, bien que confortées par la littérature, ces hypothèses restent à confirmer par des expériences supplémentaires. Si ces hypothèses sont validées, elles pourraient permettre d'identifier CAR et PXR comme récepteurs nucléaires impliqués dans la régulation du CYP2E1 dont l'expression est similaire à celles de CYP2B6 et CYP3A4 après exposition aux dithiocarbamates ou au manganèse.

Enfin, l'activation de FXR par la liaison des acides biliaires est connue pour inhiber l'expression de CYP7A1 et CYP8B1. A l'inverse FXR induit l'expression des transporteurs des acides biliaires qui favorise leurs excrétions vers la bile (Keitel et al., 2019). Ainsi, FXR a un

II-PESTIFAT

rôle majeur dans la régulation du métabolisme des acides biliaires et son inhibition conduit à une dérégulation de l'expression des CYP7A1, CYP8B1 et des transporteurs (Sinal et al., 2000; Zollner et al., 2003). Il serait donc intéressant d'étudier plus en profondeur les impacts de la diminution l'expression de FXR par l'exposition des dithiocarbamates, notamment par l'étude de la synthèse des acides biliaires par quantification de la 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one (C4) et du CYP7A1 impliqués dans sa production.

Concernant les enzymes de phase II, notre étude n'a révélé aucune modification de leur activité (Figure 26). De plus, l'expression d'un certain nombre des membres de la famille des UGT et SULT a été mesurée et n'a mis en évidence aucune modification significative. Néanmoins, l'analyse des enzymes de la famille des GST a révélé que l'expression de la GSTa2 était diminuée. Aussi, l'exposition aux dithiocarbamates et au manganèse ne semble pas impacter globalement les enzymes de phase II. Le fait que l'expression d'AHR, qui est capable de réguler plusieurs enzymes de phase II tels que les UGT, ne soit pas modulée pourrait expliquer l'absence d'impact des dithiocarbamates sur les enzymes de phase II (Shelby and Klaassen, 2006). Toutefois, cette hypothèse reste à confirmer. De plus, il faut compléter notre étude par l'analyse de l'activité des GST.

Nous confirmons l'altération de l'activité du CYP3A4 et CYP2E1 dans un contexte de stéatose liée à une surcharge en acides gras qui est décrit chez les patients présentant une stéatose dysmétabolique liée à l'obésité (Bucher et al., 2018a; Cobbina and Akhlaghi, 2017). Ceci pourrait être due à la diminution d'expression de récepteurs nucléaires tels que CAR, PXR et FXR, que nous avons mis en évidence entre les cellules HepaRG stéatosées et non stéatosées. Ces altérations sont en effet connues pour perturber le métabolisme des xénobiotiques en modulant leur toxicocinétique (Cichocki et al., 2017; Merrell and Cherrington, 2011; Naik et al., 2013). Bien que l'on n'observe pas d'impact des dithiocarbamates et du manganèse sur la stéatose à ces concentrations, ils diminuent fortement l'activité de certains CYP (Figure 16, 17

II-PESTIFAT

et 18). Or, les CYP2E1, CYP3A4, CYP3A5 et CYP2B6 métabolisent non seulement beaucoup de médicaments mais également de nombreux autres xénobiotiques dont des pesticides (Rendic and Guengerich, 2021).

Pour évaluer l'impact de l'exposition des dithiocarbamates et du manganèse en condition stéatosée ou non sur la biotransformation des autres pesticides, nous avons étudié le métabolisme du chlorpyrifos et du diazinon (Figure 28). Ces deux pesticides partagent deux voies majeures de biotransformation, l'une étant considérée comme une détoxification et l'autre comme une bioactivation. La détoxification de ces molécules est due à une déarylation conduisant à la formation du TCP et de l'IMP respectivement pour le chlorpyrifos et le diazinon. A l'inverse, la désulfuration conduit à la bioactivation par la formation du chlorpyrifos-oxon et du diazoxon.

Nos résultats suggèrent d'une part qu'il n'y a pas de modification de la métabolisation du chlorpyrifos. En effet, la teneur en TCP n'est pas modifiée, ce qui pourrait s'expliquer par le fait que l'activité du CYP2C19 n'est pas affecté par les dithiocarbamates, or cette enzyme est considérée comme majeure dans la déarylation du chlorpyrifos (Tang et al., 2001). Par ailleurs, la désulfuration conduisant à la formation du chlorpyrifos-oxon serait majoritairement favorisée par le CYP2B6 dont l'activité est diminuée par les dithiocarbamates (Imaishi and Goto, 2018; Tang et al., 2001).

Notre étude démontre d'autre part que l'inhibition des CYP diminue la biotransformation du diazinon. En effet, les quantifications de l'IMP et du diazinon après deux jours d'exposition n'ont révélé aucune modification de la biotransformation du diazinon correspondant à une absence de modification des enzymes de phase I (Figure Supplémentaire 5). En revanche, l'exposition aux dithiocarbamates et au manganèse pendant 2 semaines induit une réduction significative de la dégradation du diazinon et une forte réduction de la formation de l'IMP.

II-PESTIFAT

Ainsi, la déarylation formant l'IMP est très nettement diminuée par l'exposition aux dithiocarbamates et au manganèse. Ceci est en accord avec l'inhibition de l'activité des CYP2B6 et CYP3A4, impliqués dans la production d'IMP (Mutch and Williams, 2006; Sams et al., 2004). Fait intéressant, la co-exposition par les acides gras réduit également, mais de manière plus modérée la biotransformation du diazinon. Ceci, pourrait s'expliquer par l'inhibition des différents CYP observée en condition stéatosée. Enfin, la réduction systématique de la concentration en IMP alors que la teneur en diazinon diminue au cours du temps, suggère que le diazinon est métabolisé par une voie non identifiée dans ce travail. Celle-ci pourrait correspondre à la désulfuration conduisant à la production du diazoxon. Cette hypothèse est confortée par le fait que l'activité du CYP2C19 n'est pas modifiée dans notre étude. En effet, bien que les CYP1A2, CYP2B6 ou CYP3A4 soient impliqués, le CYP2C19 est l'enzyme majeure dans la formation du diazoxon (Kappers et al., 2001; Sams et al., 2004). L'ensemble de ces résultats suggère que l'exposition aux dithiocarbamates et au manganèse provoque une altération importante dans la détoxification du diazinon. Malheureusement, nous n'avons pas pu quantifier la formation du diazoxon, des expériences supplémentaires seraient donc nécessaires pour confirmer l'hypothèse d'une toxicité accrue du diazinon.

Les conséquences de l'inhibition de certains CYP et de la perturbation de la toxicocinétique mises en évidence dans cette étude supposent que l'exposition aux dithiocarbamates et au manganèse pourrait augmenter non seulement la toxicité de certains pesticides mais également modifier leur pharmacocinétique et par conséquent la toxicité des médicaments. En effet, les CYP2E1, CYP3A4 et CYP2B6 sont responsables de la détoxification d'un grand nombre de xénobiotiques dont les médicaments et pesticides (Rendic and Guengerich, 2015).

II-PESTIFAT

En conclusion, nous avons pu mettre en évidence des effets délétères des dithiocarbamates liés au manganèse qu'ils contiennent malgré des concentrations bien inférieures à celles retrouvées dans la littérature. D'une part, nous avons démontré que les dithiocarbamates et le manganèse, augmentent l'import d'acides gras et l'inhibition de la sécrétion des VLDL aggravant la surcharge en lipides des hépatocytes lors d'un excès d'acides gras. L'exposition réelle aux dithiocarbamates et au manganèse par l'alimentation pourrait non seulement favoriser la progression d'une simple stéatose hépatique vers une stéatohépatite mais également « prédisposer » le foie au développement d'une stéatose en cas d'excès d'apport d'acides gras. D'autre part, notre étude met en évidence que les dithiocarbamates et le manganèse diminuent fortement l'activité d'enzymes majeures de la phase I de biotransformation des xénobiotiques, ce qui est corrélé à une modification de la toxicocinétique du diazinon. L'exposition aux dithiocarbamates à des concentrations dix fois inférieures à l'ADI pourrait ainsi favoriser la toxicité hépatique des xénobiotiques tels que les médicaments ou les contaminants de l'environnement.

E-Informations supplémentaires**Méthode Supplémentaire**

Evaluation de la viabilité cellulaire par contenu en ATP

La viabilité cellulaire a été évaluée en mesurant la luminescence relative au contenu intracellulaire en ATP en utilisant le CellTiter-Glo Luminescent Cell viability assay (Promega). Brièvement, après exposition, les cellules sont incubées 10 min avec le CellTiter-Glo reagent. Le lysat est transféré dans une plaque opaque et la luminescence est quantifiée à 540nm par le lecteur de plaque Polarstar Omega (BMG Labtech).

Informations supplémentaires

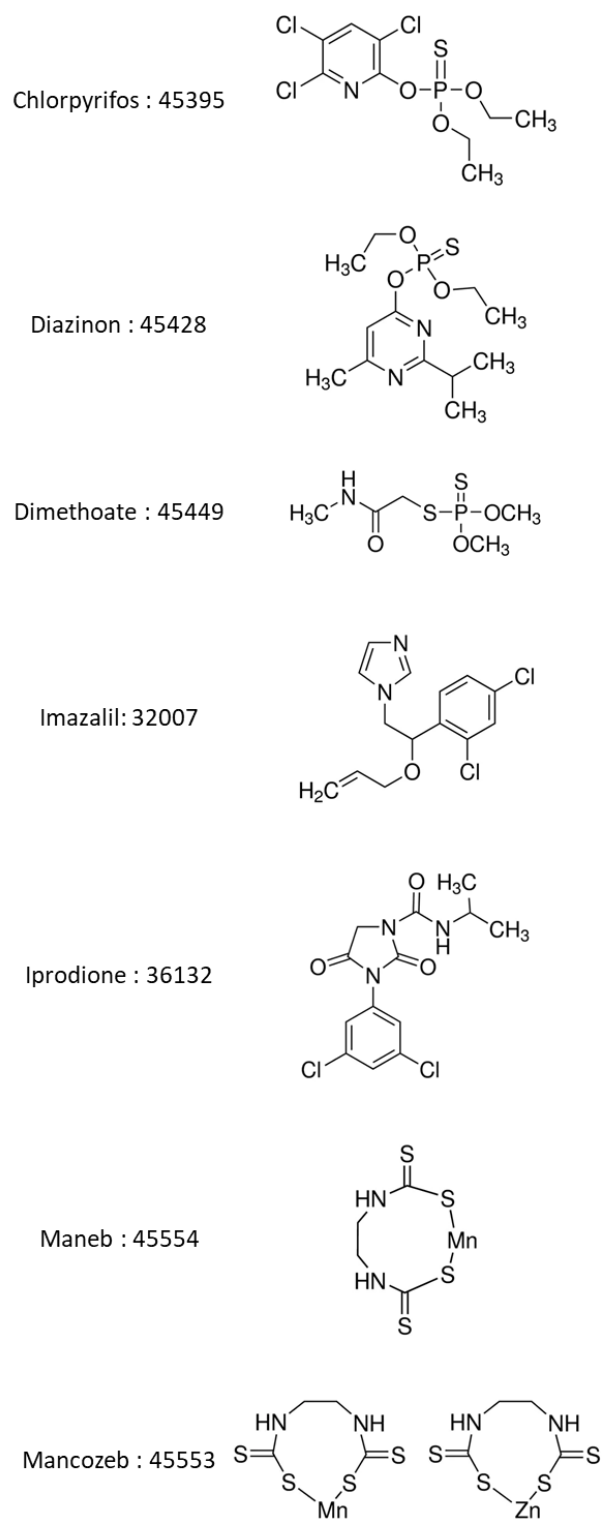


Figure supplémentaire 1 : Structures et références des pesticides

II-PESTIFAT

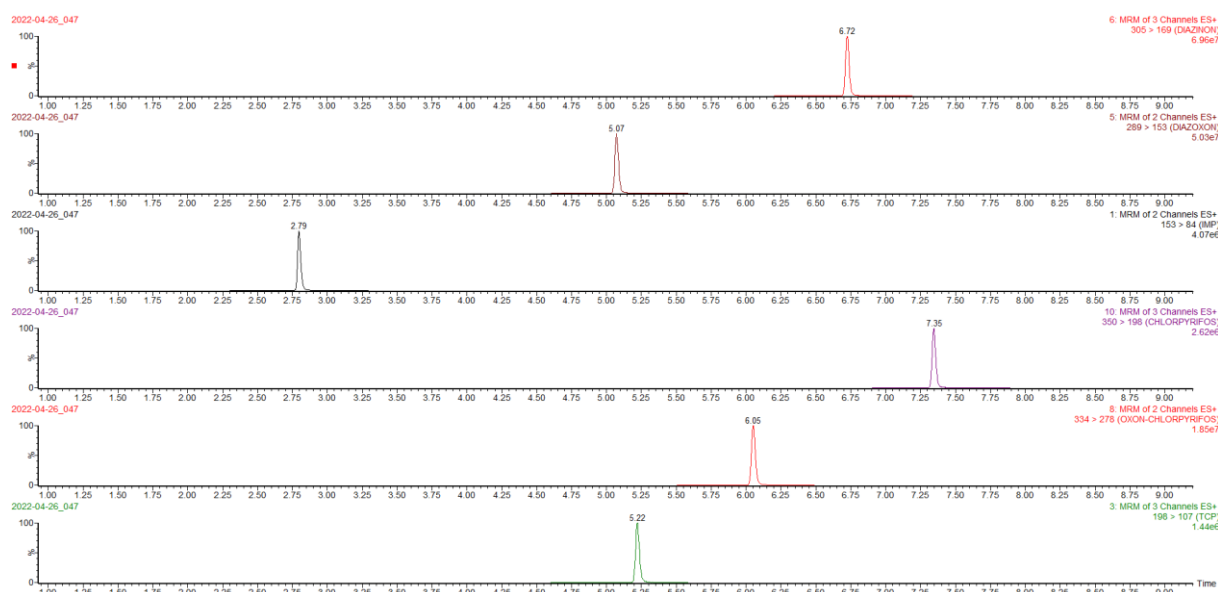


Figure supplémentaire 2

Chromatogrammes représentatifs d'un mélange (0,1µM pour diazinon, diazoxon et IMP et 1µM pour chlorpyrifos, chlorpyrifos-oxon et TCP) dans un mélange milieu William's sans rouge de phénol/eau HPLC 50/50 par UPLC/MSMS (diazinon à 6,7min, diazoxon à 5,1min, IMP à 2,8min, chlorpyrifos à 7,4min, chlorpyrifos-oxon à 6,1min et TCP à 5,2min)

Pesticides	CAS Number	ADI		
		(mg/kg/days)	(mg/L)	(µM)
Chlorpyrifos	2921-88-2	0.01	0.12	0.3423
Diazinon	333-41-5	0.0002	0.0024	0.0078
Dimethoate	60-51-5	0.001	0.012	0.0523
Imazalil	35554-44-0	0.025	0.3	1.009
Iprodione	36734-19-7	0.06	0.72	2.181
Maneb	12427-38-2	0.05	0.6	2.262
Mancozeb	8018-01-7	0.05	0.6	2.251

Tableau supplémentaire 1 : Acceptable Daily Intake (ADI) ou dose acceptable journalière

II-PESTIFAT

Composés / <i>étalons internes</i>	n° CAS	Tr (min)	Vc (V)	Transition de quantification (uma) et (énergie de collision - eV)	Transition de confirmation (uma) et (énergie de collision eV)	LQ (µM)
Diazinon	333-41-5	6.7	40	305>169 (29)	305>153(21)	0.03
Diazoxon	962-58-3	5.1	40	289>153 (21)	289>84 (40)	0.03
IMP	2814-20-2	2.8	40	153>84 (17)	153>70 (20)	0.03
chlorpyrifos	2921-88-2	7.4	25	350>198 (19)	350>125 (21)	0.03
Chlorpyrifos-oxon	5598-15-2	6.1	35	334>278 (20)	334>306 (12)	0.03
TCP	6515-38-4	5.2	40	198>107 (28)	198>134 (22)	0.03
<i>Diazinon-d₁₀</i>	<i>100155-47-3</i>	<i>6.6</i>	<i>40</i>	<i>315>170 (22)</i>	<i>315>154 (22)</i>	<i>0.03</i>
<i>IMP-¹³C₄</i>	-	<i>2.7</i>	<i>40</i>	<i>157>88 (18)</i>	<i>157>70 (20)</i>	<i>0.03</i>
<i>Chlorpyrifos-d₁₀</i>	<i>285138-81-0</i>	<i>7.3</i>	<i>35</i>	<i>362>131 (20)</i>	<i>362>99 (30)</i>	<i>0.03</i>
<i>Chlorpyrifos-oxon-d₁₀</i>	<i>1794779-85-3</i>	<i>6.0</i>	<i>40</i>	<i>344>280 (18)</i>	<i>344>312 (13)</i>	<i>0.03</i>
<i>TCP-¹³C₃</i>	-	<i>5.2</i>	<i>40</i>	<i>205>111 (31)</i>	<i>205>139 (22)</i>	<i>0.03</i>

Tableau supplémentaire 2

Paramètres d'identification UPLC-MS/MS du diazinon dy chlorpyrifos et leurs métabolites et étalons internes (Tr : temps de rétention ; Vc : tension de cône ; LQ : limite quantification

Primer sequence		
	Forward	Reverse
AHR	5'-GCC-GGT-GCA-GAA-AAC-AGT-AA-3'	5'-TAG-CCA-AAC-GGT-CCA-ACT-CT-3'
ApoC3	5'-TGC-TCC-AGG-AAC-AGA-GGT-3'	5'-CCC-TGC-ATG-AAG-CTG-AGA-A-3'
ApoB	5'-CCC-TCA-GTC-CTC-TCC-AGA-TAA-A-3'	5'-GCT-GCC-TCT-TCT-TCC-CAA-TTA-3'
CAR	5'-CCC-CGG-GAT-CGG-TTT-CT-3'	5'-GTA-GGC-CTC-ATT-AAT-GCT-CCG-3'
CYP1A2	5'-GGT-TCA-AGG-CCT-TCA-ACC-AG-3'	5'-ACA-TGA-GGC-TCC-AGG-AGA-TG-3'
CYP2B6	5'-CTT-CCG-GGG-ATA-TGG-TGT-GA-3'	5'-CAC-TGA-GCC-TCC-TCC-TGA-AT-3'
CYP2C19	5'-CCA-GGG-TTT-AAT-CTT-TTT-CAG-CTT-C-3'	5'-GCT-TTG-GAG-ATG-ACA-TGA-GGC-3'
CYP2E1	5'-TTG-AAG-CCT-CTC-GTT-GAC-CC-3'	5'-CGT-GGT-GGG-ATA-CAG-CCA-3'
CYP3A4	5'-CTT-CAT-CCA-ATG-GAC-TGC-ATA-AAT-3'	5'-TCC-CAA-GTA-TAA-CAC-TCT-ACA-CAG-ACA-A-3'
DDIT3	5'-GTC-TAA-GGC-ACT-GAG-CGT-ATC-3'	5'-CAC-TTC-CTT-CTT-GAA-CAC-TCT-CT-3'
FXR	5'-TAA-AAA-CGG-GGG-CAA-CTG-TG-3'	5'-GCC-TGT-ATA-CAT-ACA-TTC-AGC-CA-3'
GSTa2	5'-TGC-AAC-AAT-TAA-GTG-CTT-TAC-CTA-AGT-G-3'	5'-TTA-ACT-AAG-TGG-GTG-AAT-AGG-AGT-TGT-ATT-3'
GSTa3	5'-AAG-TCG-CTA-TTT-CCC-TGC-C-3'	5'-GAA-GTT-GGA-GAT-AAG-GCT-GGA-G-3'
GSTa4	5'-GAC-GGG-ATG-AAG-TTG-GTA-CAG-3'	5'-TCC-ACG-TAC-ATG-TCA-ATC-AGG-3'
HNF4a	5'-CAG-ATG-ATC-GAG-CAG-ATC-CA-3'	5'-CGT-TGG-TTC-CCA-TAT-GTT-CC-3'
IRE1α	5'-CCA-GAC-AGA-CCT-GCG-TAA-AT-3'	5'-CCG-GTA-GTG-GTG-CTT-CTT-ATT-3'
LXR	5'-TGA-TGT-TCC-CAC-GGA-TGC-TA-3'	5'-GGT-GGG-AGC-TTT-TTG-TCC-TG-3'
MTTP	5'-TAC-CAG-GCT-CAT-CAA-GAC-AAA-G-3'	5'-CTG-ACA-CCC-AAG-ACC-TGA-TTT-3'
PERK	5'-GAC-CTC-AAG-CCA-TCC-AAC-ATA-3'	5'-CTG-GTC-CAT-TGC-AGT-CAC-TAA-3'
PXR	5'-TCC-TTT-GCA-CCG-GAT-TGT-TC-3'	5'-TGG-ACT-GCT-TGG-TGG-TAA-GT-3'
SULT1A1	5'-GGA-TGT-GGC-AGT-TTC-CTA-CTA-C-3'	5'-TTT-CGG-GTT-CTC-CTT-CAT-GTC-3'
SULT1A3	5'-CCT-ACT-ACC-ATT-TCC-ACC-GTA-TG-3'	5'-GGA-CCC-GTA-GGA-CAC-TTC-T-3'
TBP	5'-GAG-CTG-TGA-TGT-GAA-GTT-TCC-3'	5'-TCT-GGG-TTT-GAT-CAT-TCT-GTA-3'
UGT1A1	5'-TGA-CGC-CTC-GTT-GTA-CAT-CAG-3'	5'-CCT-CCC-TTT-GGA-ATG-GCA-C-3'
UGT1A3	5'-ACA-TAA-TGA-GGC-CCT-GAT-CAG-3'	5'-AGG-AAT-CGA-CAG-GTA-CTT-AGC-3'
UGT2B7	5'-CAA-CGT-AAT-TGC-ATC-AGC-CC-3'	5'-AAG-CTC-TGG-TCT-TTG-GAT-GAC-3'

Tableau supplémentaire 3 : Séquences des amorces utilisées pour les quantifications d'expression de gènes par RT-qPCR

Figures supplémentaires

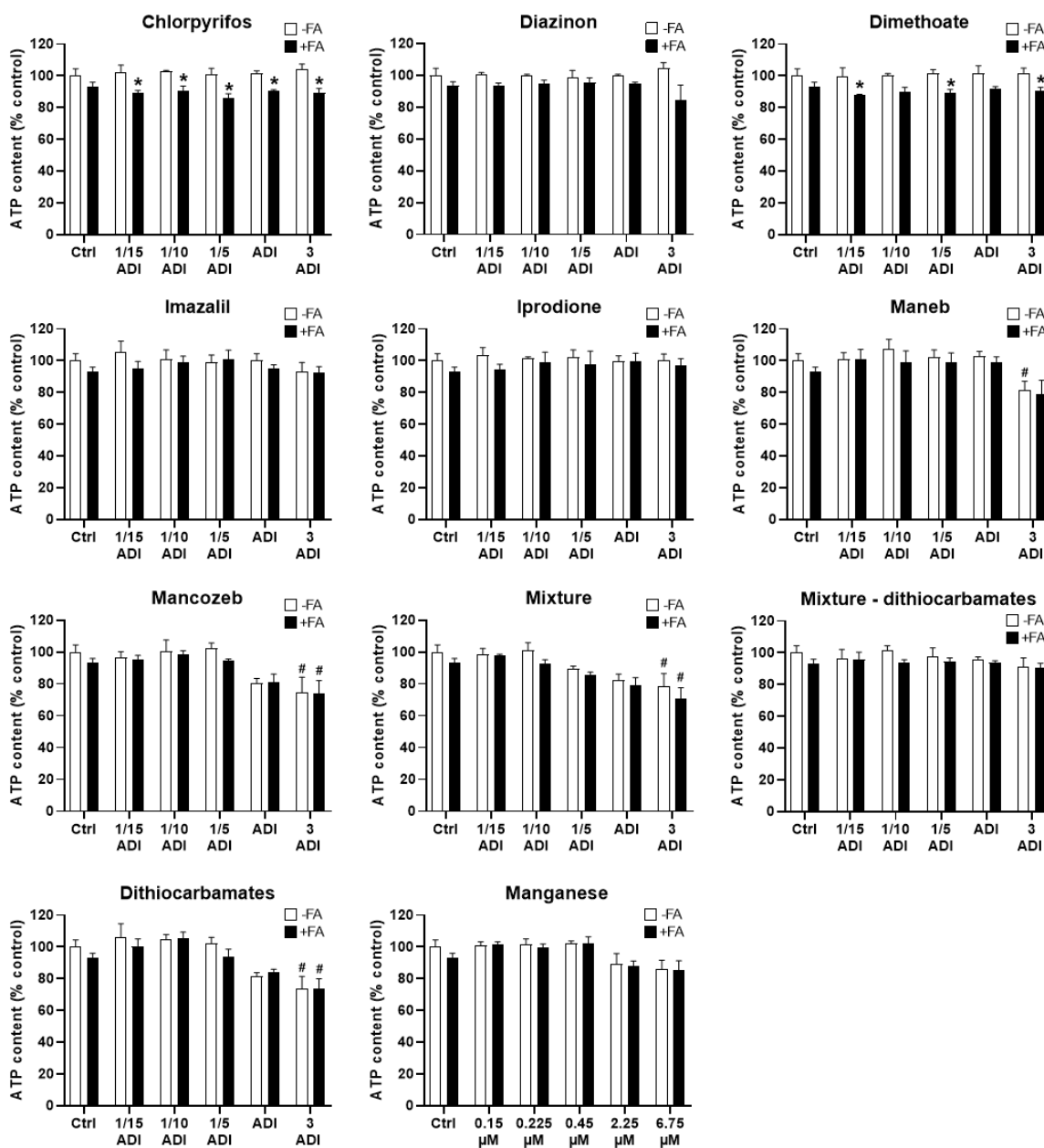


Figure supplémentaire 3 : Effets individuels ou en mélange des pesticides sur la viabilité cellulaire

Evaluation de la viabilité cellulaire par mesure du contenu intracellulaire en ATP après deux semaines de co-exposition aux pesticides en présence (+FA) ou non d'acides gras (-FA). Les résultats correspondent à la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes. * significativement différent des HepaRG non stéatosées (-FA). # significativement différent des HepaRG non traitées (Ctrl).

II-PESTIFAT

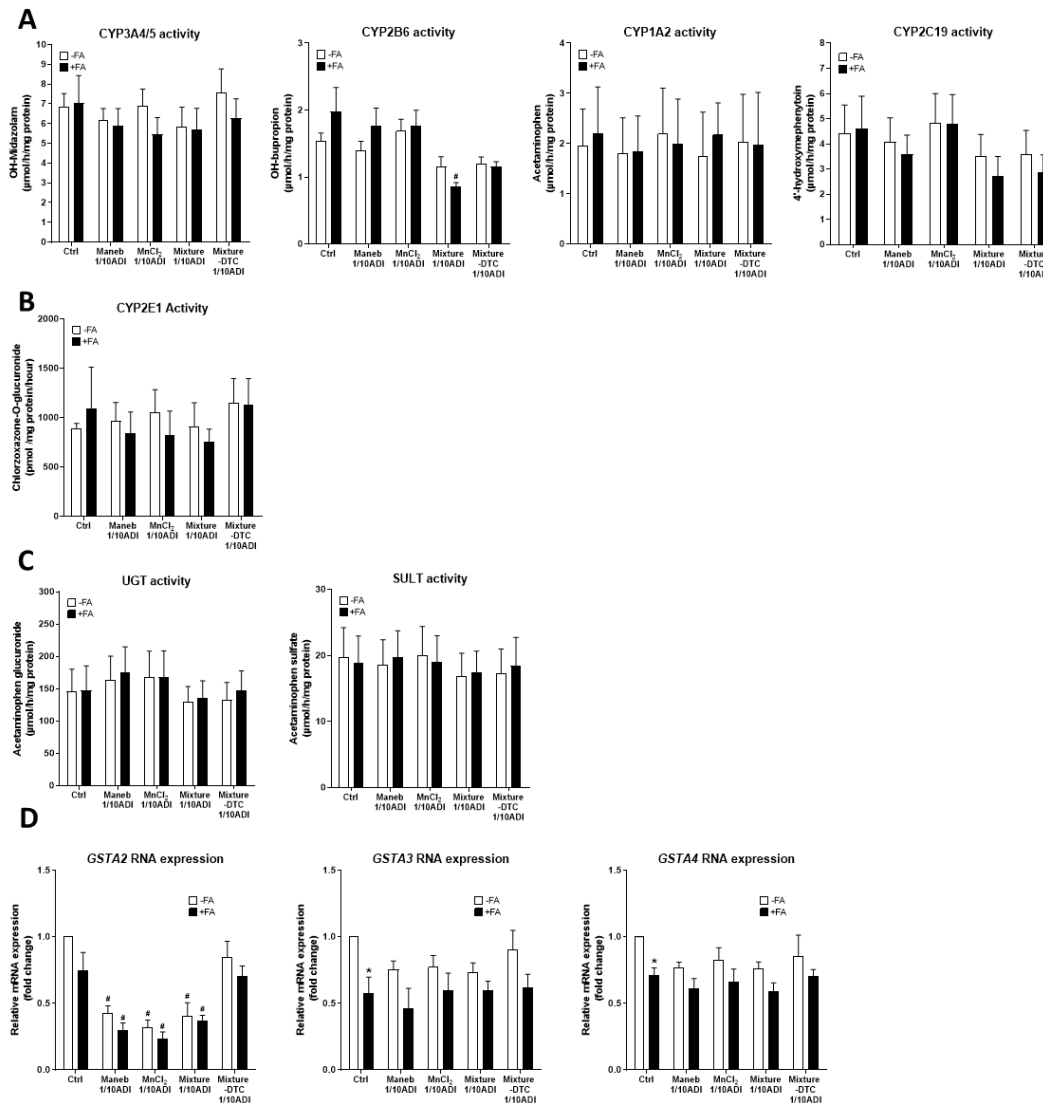


Figure supplémentaire 4 : Activité et expression génique d’enzymes majeures de détoxification après deux jours d’exposition aux dithiocarbamates et l’ion manganèse

(A) Mesure de l’activité du CYP3A4/5, du CYP2B6, du CYP1A2 et du CYP2C19 respectivement par dosage en LC-MS/MS des métabolites hydroxy-midazolam, hydroxy-bupropion, acétaminophène et de la 4-hydroxy-méphénytoïne, (B) mesure de l’activité du CYP2E1 par dosage en HPLC de la chlorzoxazone-O-glucuronide, (C) mesure de l’activité des UGT et des SULT respectivement par dosage en LC-MS/MS de l’acétaminophène glucuronide et de l’acétaminophène sulfate après deux jours de co-exposition au manèbe, manganèse (MnCl₂) et mélange de pesticides avec ou sans dithiocarbamates (Mixture –DTC) à des concentrations dix fois inférieures à l’ADI en présence (+FA) ou non d’acides gras (-FA). (D) quantification relative par RT-qPCR de l’expression des gènes codants les GSTa après deux semaines de co-exposition au manèbe, manganèse (MnCl₂) et mélange de pesticides avec ou sans dithiocarbamates (Mixture –DTC) à des concentrations dix fois inférieures à l’ADI en présence (+FA) ou non d’acides gras (-FA). Les résultats correspondent à la moyenne ± SEM d’au moins 3 expériences indépendantes. * significativement différent des HepaRG non stéatosées (-FA). # significativement différent des HepaRG non traitées (Ctrl).

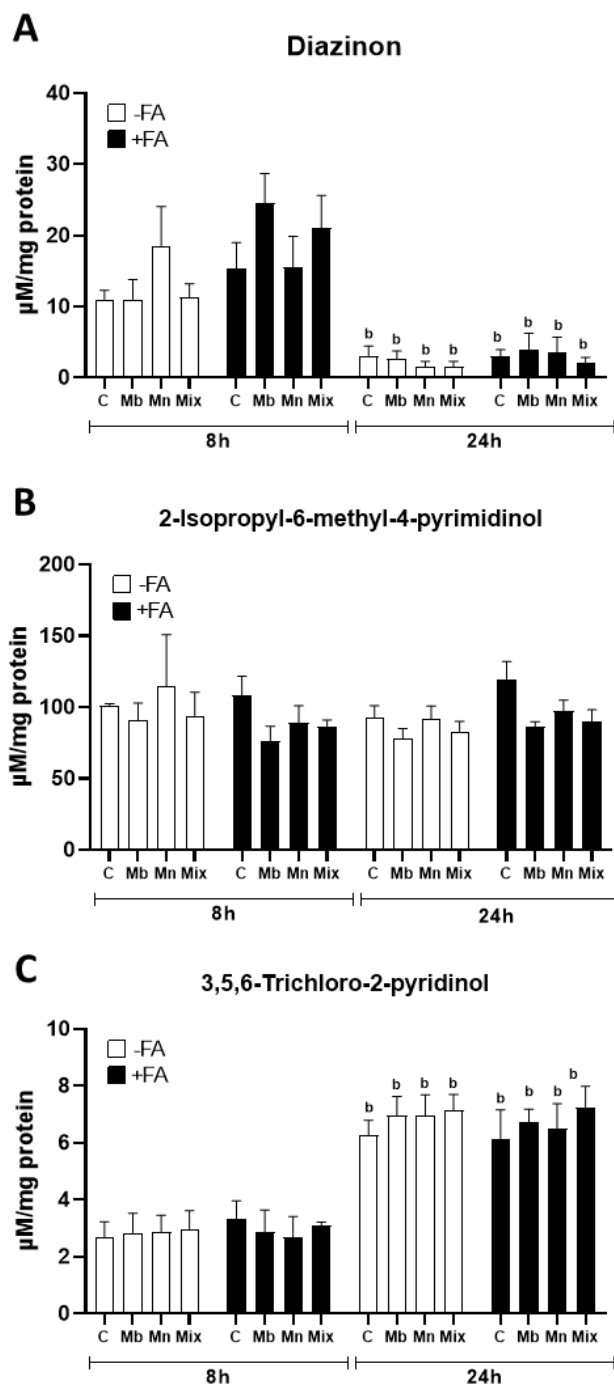
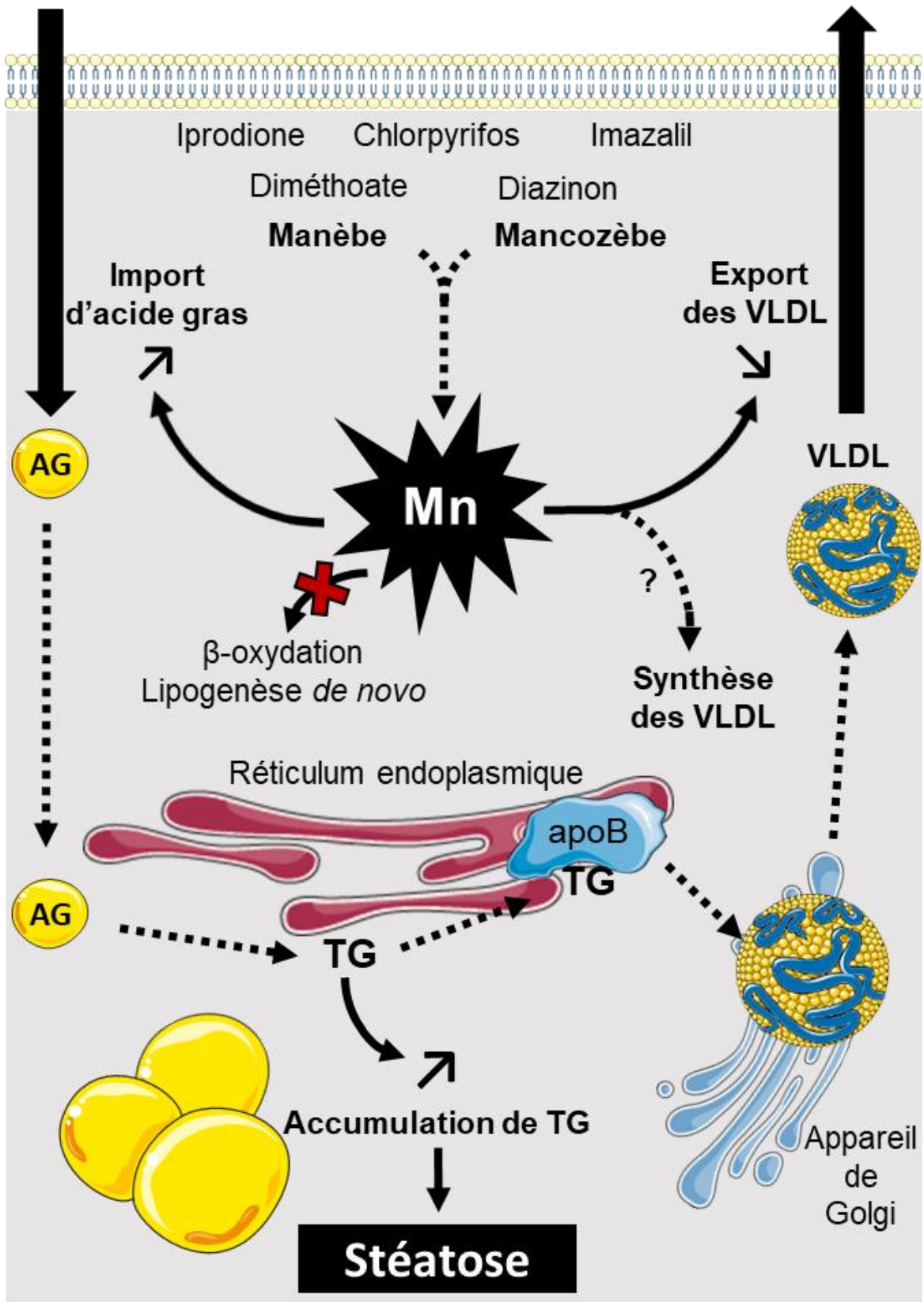
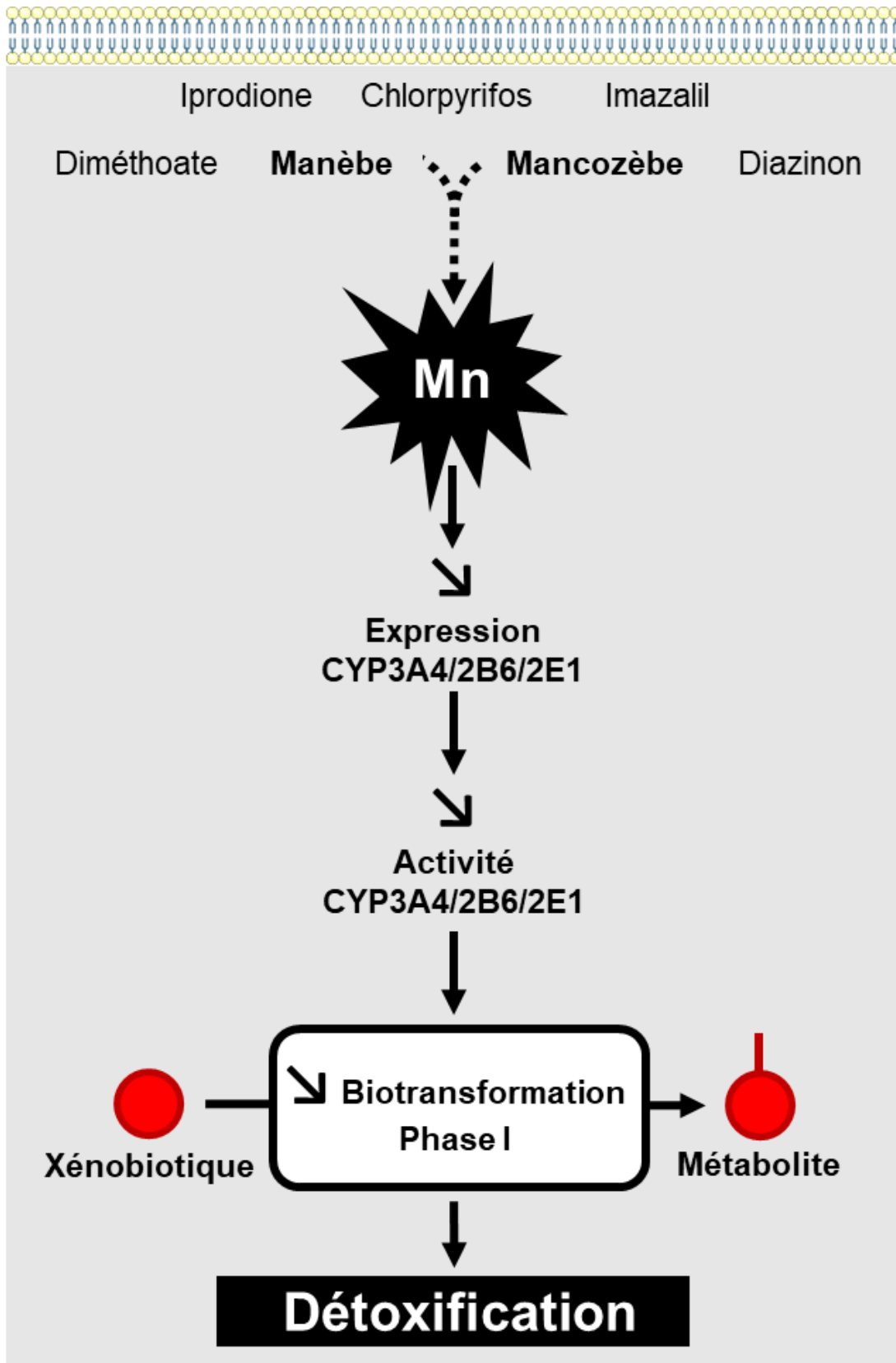


Figure supplémentaire 5: Impact de l'exposition pendant deux jours des dithiocarbamates et de l'ion manganèse sur la biotransformation du diazinon et du chlorpyrifos (A) Quantification par LC-MS/MS du diazinon, (B) de son métabolite le 2-isopropyl-6-méthyl-4-pyrimidinol et (C) du 3,5,6-trichloro-2-pyrimidinol, métabolite du chlorpyrifos après 8 et 24 heures d'incubation avec les molécules mères (50µM) sur des cellules co-exposées pendant 2 jours au manèbe (Mb), manganèse (Mn) et mélange de pesticides (Mix), à des concentrations inférieures à dix fois l'ADI, en présence (+FA) ou non d'acides gras (-FA). Les résultats correspondent à la moyenne ± SEM de 4 expériences indépendantes. #, a, b significativement différent respectivement des cellules HepaRG non traitées stéatosées ou non (C), de l'exposition équivalente non stéatosée (-FA), de l'équivalent à 8 heures d'incubation (8h).

Schéma bilan





DISCUSSION

I-DITHIOCARBAMATES DE MANGANESE ET HEPATOTOXICITE

I-DITHIOCARBAMATES DE MANGANESE ET HEPATOTOXICITE

Le rapport de l'EFSA en 2017, qui révèle une contamination par des résidus de pesticides dans 44% des aliments analysés parmi lesquels 28% présentent de multiples résidus, interroge quant aux effets de l'exposition de l'Homme aux pesticides par l'alimentation (EFSA, 2017). Dans le cadre du projet intitulé « Pesticides and Tumor Niches » (PeNiCa), s'inscrivant dans le consortium créé au sein du Cancéropôle Grand-Ouest visant à évaluer l'impact de l'exposition à plusieurs pesticides retrouvés dans l'alimentation, nous avons sélectionnés sept pesticides. Afin de correspondre au mieux à une exposition réelle aux pesticides par l'alimentation, le consortium a choisi d'étudier 1) le chlorpyrifos, le diazinon, le diméthoate, l'imazalil, l'iprodione, le manèbe et le mancozèbe qui sont fréquemment retrouvés dans l'alimentation (EFSA, 2017), 2) en mélange, 3) à des concentrations extrapolées de l'ADI. Dans l'article 1, nous nous sommes concentrés sur l'impact de ce mélange sur le foie étant donné que cet organe est une cible majeure dans la toxicité des xénobiotiques et qu'il assure leur biotransformation conduisant à leur élimination. L'utilisation de différents modèles hépatiques *in vitro* nous a permis de révéler une importante cytotoxicité du mélange des 7 pesticides vis-à-vis des hépatocytes lors d'une exposition aigue.

Nous avons identifié les dithiocarbamates, manèbe et mancozèbe, comme porteurs de l'hépatotoxicité. Nous avons également mis en évidence que l'exposition aux dithiocarbamates entraînait un stress du réticulum endoplasmique et oxydant qui entraîne l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose et la mort cellulaire. La majeure partie de ces résultats ont été confirmés dans les hépatocytes humains en culture primaire suggérant que l'extrapolation de nos résultats vers l'Homme est pertinente.

Ces résultats sont en accord avec plusieurs études *in vitro* et *in vivo* démontrant la toxicité de ces composés bien que les concentrations utilisées dans celles-ci soient très nettement

I-DITHOCARBAMATES DE MANGANESE ET HEPATOTOXICITE

supérieures à celles que nous avons utilisé (Ben Amara et al 2015, Sefi et al 2019, Yahia et al 2019, Saber et al 2019, Gök and Deveci 2022). De même, l'exposition aux dithiocarbamates est connue pour provoquer un stress oxydant associé à la mort cellulaire, notamment au niveau rénal, gastrique ou encore cérébral (Domico et al., 2007; Hoffman and Hardej, 2012; Kumar et al., 2019; Roede et al., 2011). En outre, l'exposition aux dithiocarbamates favorise le développement de pathologies neurodégénératives telle que la maladie de Parkinson (Ferraz et al., 1988; Meco et al., 1994). Il semblerait que les mécanismes impliqués dans l'apparition de la maladie de Parkinson induite par les dithiocarbamates soient en partie similaire aux mécanismes d'hépatotoxicité que nous avons mis en évidence. En effet, l'inhibition du stress oxydant et du stress du réticulum, induit par les dithiocarbamates diminuent leur toxicité (Colle et al., 2018; Dastidar et al., 2020). Dans une approche similaire à nos expériences de co-exposition avec la NAC, il serait intéressant de co-exposer les hépatocytes HepaRG avec l'acide phénylbutyrique ou l'acide tauroursodéoxycholique afin de déterminer si l'inhibition du stress du RE est suffisant pour pallier à la toxicité des dithiocarbamates (Ozcan et al., 2006). En revanche, Zhang et ses collaborateurs démontrent que le manèbe inhibe le complexe III de la chaîne respiratoire des mitochondries, isolées à partir du cerveau de rat (Zhang et al., 2003). Or le dosage de l'activité des complexes que nous avons effectués n'a révélé aucune altération de la chaîne respiratoire après exposition aiguë aux dithiocarbamates. Cependant, dans nos conditions expérimentales, la mesure de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire se fait sur mitochondries isolées perméabilisées sans qu'il y ait ajout de pesticide ou de $MnCl_2$. Il est possible que l'accumulation intra-mitochondriale liée à l'exposition au manèbe soit perdue dans ces conditions expliquant ainsi le fait que nous n'ayons pas observé d'altération de leur activité.

Par ailleurs, nous avons mis en évidence que l'hépatotoxicité est associée à une métabolisation des dithiocarbamates, qui conduit à la formation de l'ETU et la libération de l'ion manganèse.

I-DITHIOCARBAMATES DE MANGANESE ET HEPATOTOXICITE

Notre étude démontre que le métabolite principal des dithiocarbamates, l'ETU, n'est pas impliqué dans l'hépatotoxicité (Somerville, 1986). En revanche, l'ensemble des effets du manèbe et du mancozèbe était retrouvés lors de l'exposition des cellules HepaRG par le chlorure de manganèse. Dans ce sens, certaines études suggèrent que le manganèse pourrait jouer un rôle dans les effets délétères des dithiocarbamates contenant du manganèse (Anderson et al., 2018; Costa-Silva et al., 2018; Hoffman and Hardej, 2012). D'autres auteurs démontrent, comme dans notre étude, que les effets des dithiocarbamates sont retrouvés avec l'ion manganèse (Carmona et al., 2014; Domico et al., 2006; Domico et al., 2007). Par exemple, selon Domico et ses collaborateurs les peroxydes d'hydrogène sont générés à la fois par les dithiocarbamates et l'ion manganèse (Domico et al., 2007).

L'étude de la métabolisation des dithiocarbamates dans nos expériences a également révélé la présence de la xanthine et de l'hypoxanthine dans les milieux de culture des hépatocytes exposés aux dithiocarbamates. En se basant sur un document de la Commission Européenne sur le métiram, un analogue du mancozèbe, nous avons émis l'hypothèse que la xanthine et l'hypoxanthine pourraient être issus du métabolisme des dithiocarbamates en purines (European Commission, 2017). Notre deuxième hypothèse était basée sur la littérature qui décrit la xanthine comme un biomarqueur de stress cellulaire (Kathiwala et al., 2010; Turgan et al., 1999). L'exposition des hépatocytes HepaRG par le chlorure de manganèse a révélé que la xanthine et l'hypoxanthine était également présent dans le surnageant de culture. Ces résultats infirmaient la première hypothèse. De plus, l'absence de formation de ces molécules par les cellules exposées à des concentrations toxiques de paracétamol nous a permis de valider la deuxième hypothèse. Ainsi, le stress cellulaire dû aux dithiocarbamates induirait au sein des hépatocytes la formation et la sécrétion de la xanthine et de l'hypoxanthine. Par ailleurs, l'étude de Domico et al. démontre que le mancozèbe génère plus de ERO en présence de xanthine et xanthine oxydase et que l'ajout de l'allopurinol (inhibiteur de la xanthine oxydase) diminue

I-DITHOCARBAMATES DE MANGANESE ET HEPATOTOXICITE

fortement la formation des ERO (Domico et al., 2007). Il est donc possible que la formation de la xanthine et de l'hypoxanthine joue un rôle dans la production des ERO induit par les dithiocarbamates.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que la formation de la xanthine induite par les dithiocarbamates et le manganèse pourrait également favoriser la production des ERO responsable de la toxicité des dithiocarbamates.

Enfin, nous avons observé, uniquement dans les hépatocytes, que l'exposition au manèbe provoquait une surcharge intracellulaire et mitochondriale du contenu en manganèse au même titre qu'une exposition au chlorure de manganèse. La littérature conforte en partie ces résultats, puisque la surcharge en manganèse suite à une exposition au manèbe et/ou au mancozèbe est retrouvée dans les modèles *in vitro* du colon, du cerveau ou chez le poisson au niveau cérébral (Carmona et al., 2014; Costa-Silva et al., 2018; Hoffman and Hardej, 2012). En outre, cette surcharge en manganèse était concomitante à une diminution du contenu intracellulaire en Zinc. En restaurant le pool en zinc, par la co-exposition avec du chlorure de zinc, nous avons en partie diminué la surcharge en manganèse, ce qui était suffisant pour inhiber les mécanismes de toxicité induit par l'exposition aux dithiocarbamates. Ceci concorde avec une récente étude *in vivo* démontrant chez la souris que l'apport en zinc est capable de pallier à l'ensemble des dommages induit par le manèbe, tels que le stress oxydant ou la génotoxicité (Sefi et al., 2020). En revanche, à notre connaissance, la diminution du contenu intracellulaire en Zn concomitante à une surcharge de manganèse dans les hépatocytes n'avait pas encore été identifiée. Ainsi, nos investigations mettent en évidence un rôle majeur de l'homéostasie du zinc et du manganèse dans les phénomènes de stress oxydant induits par l'exposition aux dithiocarbamates.

Ces premiers travaux, ainsi que ceux présentés dans le chapitre 2, démontrent que les effets délétères de l'exposition aux dithiocarbamates semblent dus majoritairement au manganèse. Le

I-DITHOCARBAMATES DE MANGANESE ET HEPATOTOXICITE

manganèse étant un élément essentiel il n'existe pas d'ADI. Au contraire, il est établi une valeur d'apport recommandé appelé Adequate Intake (AI). Pour la population européenne l'AI a été fixée entre 2 et 3 mg par jour (EFSA, 2013). En revanche, l'absence d'effet délétère chez des personnes effectuant un régime végétarien a permis d'estimer que la NOAEL pour l'alimentation pouvait être fixé à 11mg par jour (Greger, 1999; Institute of Medicine (US), 2001). Si l'on rapporte l'AI au poids corporel moyen considéré dans notre étude c'est à dire 60kg, on obtient une ADI entre 0,33 et 0,5 mg/kg/jour. Fait intéressant, la valeur la plus haute, 0,5mg/kg/jour correspond à l'ADI du manèbe et du mancozèbe.

Cependant, moins de 5% du manganèse ingéré est absorbé au niveau intestinal, ce qui joue un rôle majeur dans l'homéostasie du manganèse (Katz and Rader, 2019). Ceci pourrait expliquer l'absence de toxicité du manganèse à des doses équivalentes à l'ADI du manèbe et du mancozèbe. Ainsi, les résultats que nous avons obtenu *in vitro* sont difficilement extrapolables à une exposition réelle par l'alimentation. Néanmoins, l'absorption du manèbe et du mancozèbe est probablement différente de celle du manganèse.

C'est pourquoi, nous avons utilisé le modèle *ex vivo* des chambres de Ussing (Ussing and Zerahn, 1951). Ce modèle permet, entre autres, d'étudier le passage des molécules à travers les tissus. Dans nos expériences, nous avons ajouté du mancozèbe du côté séreux et étudié son passage à travers le duodénum et le colon de porc. Malheureusement, les échantillons analysés en HPLC, qu'il soit prélevé du côté séreux ou luminal, n'ont pas permis de détecter le manèbe ou l'ETU en HPLC probablement parce que les concentrations étaient en dessous de la limite de quantification de la technique analytique. L'utilisation de la méthode d'analyse par LC-MS/MS, développée lors de ma thèse, devrait permettre de quantifier ces molécules. On pourrait également imaginer doser par ICP-MS le manganèse dans les tissus utilisés afin de démontrer si le métal est retenu au niveau intestinal. Si les dithiocarbamates se révèlent être en capacité de franchir la barrière intestinale, il pourrait être une forme de vecteur pour le manganèse. Alors,

I-DITHOCARBAMATES DE MANGANESE ET HEPATOTOXICITE

le foie serait directement exposé au manganèse, auquel cas nos résultats seraient transposables à une réelle exposition de l'Homme aux dithiocarbamates issus de l'alimentation.

Lors de mes travaux de thèse nous avons également mis en évidence que les pesticides à faibles doses impactaient négativement la différenciation des hépatocytes HepaRG (Figure 29A). Ainsi, l'exposition durant la phase de prolifération des progéniteurs de la lignée HepaRG conduit à une diminution de l'expression de marqueurs de différenciation hépatocytaire tels que le CYP3A4 et l'Aldolase B (Gripon et al., 2002; Watt et al., 2003). De plus, cette inhibition de différenciation était retrouvée malgré l'arrêt du traitement aux pesticides et l'ajout de DMSO pour potentialiser la différenciation hépatocytaire.

Par ailleurs, l'exposition aux pesticides des cellules progénitrices de la lignée HepaRG a révélé un effet pro-prolifératif (Figure 29B-C). En effet, le contenu intracellulaire en ATP et en ADN ainsi que la quantification des noyaux par marquage au Hoechst étaient augmentés dans les cellules HepaRG exposées au mélange de pesticides. Il sera important de poursuivre l'étude de cet effet sur la prolifération, d'en déterminer les mécanismes et de rechercher si les pesticides génèrent des mutations de gènes participant à la régulation du cycle cellulaire. La lignée HepaRG présente la particularité de ne pas avoir de mutations sur des gènes clefs du cycle cellulaire tels que P53, WNT, β -caténine ou encore Rb et de croître très lentement en milieu semi-solide. L'exposition chronique des cellules progénitrices pourrait potentiellement produire de nouveaux 'hits' oncogéniques qui modifieraient leur capacité proliférative et leur niveau de « transformation ». Ce résultat est à rapprocher d'un précédent article publié par le consortium PeNiCa qui avait démontré que des cellules mésenchymateuses rendues « pré-néoplasiques » par expression constitutive de hTERT et invalidation de P53 généraient plus de tumeurs en souris Nude après exposition aux pesticides (Hochane Stem Cells 2017).

I-DITHOCARBAMATES DE MANGANESE ET HEPATOTOXICITE

Des mutations des cellules progénitrices du foie peuvent conduire à différents types de cancer du foie (Cabillic and Corlu, 2016; Kim et al., 2004; Lazarevich et al., 2010). Il serait donc important de poursuivre ce versant de l'étude qui permettrait d'évaluer l'impact des pesticides sur la progression tumorale. La cancérogénicité des pesticides étant étudiée lors de la détermination des valeurs références, les résultats obtenus contribueraient à compléter notre évaluation de l'exposition aux pesticides par l'alimentation.

I-DITHOCARBAMATES DE MANGANESE ET HEPATOTOXICITE

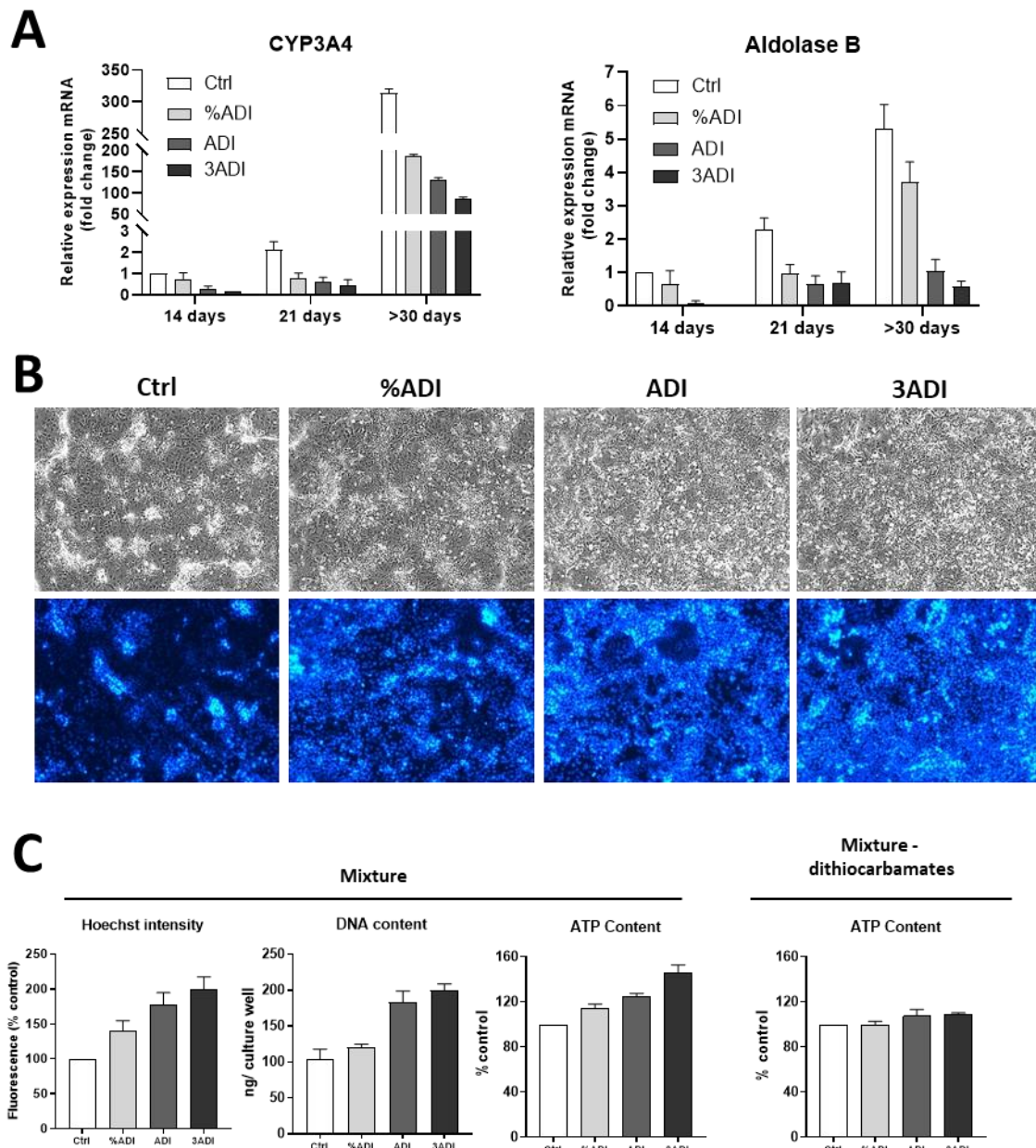


Figure 29 : Effets des pesticides sur la prolifération des progéniteurs HepaRG et sur leur différenciation en cellules hépatocytes-like

Pendant 21 jours les progéniteurs de la lignée HepaRG ont été exposés aux mélanges après quoi les cellules ont été cultivées sans pesticides et leur différenciation a été potentialisée par l'ajout de DMSO environ une semaine plus tard. (A) Analyse par RT-qPCR de l'expression des marqueurs de différenciation hépatocytaires au cours du temps en présence ou non de pesticides. (B) Images représentatives des cellules HepaRG en lumière blanche et marquages de leur noyau au Hoechst après exposition de 21 jours aux pesticides. (C) Mesure de la prolifération, par quantification de l'intensité de Hoechst, du contenu en ADN et en ATP, des cellules HepaRG après 21 jours d'exposition aux mélanges de pesticides avec et sans dithiocarbamates

II-DITHIOCARBAMATES DE MANGANESE ET STEATOSE

II- DITHIOCARBAMATES DE MANGANESE ET STEATOSE

La deuxième partie de mes travaux de thèse s'inscrivait dans le contexte d'augmentation des cas d'obésité et de surpoids. Plus particulièrement aux maladies métaboliques qui y sont associées telle que la stéatose hépatique. Ces travaux financés par l'ANSES, avaient pour but d'étudier l'impact de l'exposition aux pesticides par l'alimentation sur l'apparition et l'aggravation de la stéatose et sur la capacité de détoxification des xénobiotiques par le foie sain et stéatosé. Nous avons choisi de garder le mélange de pesticides utilisé dans la première étude ainsi que les concentrations extrapolées de l'ADI. En revanche, pour mimer au mieux l'exposition réelle aux pesticides par l'alimentation nous avons, cette fois-ci, exposées les cellules HepaRG différenciées pendant deux semaines. De plus, le modèle a été modifié afin de réduire la cytotoxicité des dithiocarbamates. Après différenciation selon le protocole classique des 30 jours, les cellules HepaRG sont maintenues dans un milieu réduit en sérum (5%) et en DMSO (1%). Dans ces conditions, l'exposition aux pesticides aux concentrations de l'ordre de l'ADI n'engendrent pas la toxicité décrite dans le 1^{er} chapitre. L'hypothèse est que l'expression de certaines enzymes de biotransformation, notamment des CYP450 très sensibles au DMSO, serait diminuée, réduisant ainsi la métabolisation des composés et la libération de manganèse.

L'utilisation du modèle de stéatose HepaRG a permis de mettre en évidence une exacerbation de la stéatose par l'exposition aux dithiocarbamates et au manganèse. Un certain nombre de mécanismes ont été identifiés dans l'accumulation lipidique mise en place lors de la stéatose tels que l'entrée des acides gras, la β -oxydation, la lipogénèse *de novo* et l'export par la voie des VLDL (Allard et al., 2021; Begriche et al., 2011; Fromenty and Pessayre, 1995; Massart et al., 2022). En étudiant ces différentes pistes, nous avons pu mettre en évidence que les dithiocarbamates et le manganèse augmentaient de manière précoce l'entrée des acides gras. De même, la sécrétion des VLDL était inhibée à la fois dans les cellules non stéatosées et stéatosées. Cette inhibition était également retrouvée lors de l'exposition de deux semaines et

II-DITHIOCARBAMATES DE MANGANESE ET STEATOSE

associée à une diminution de l'expression de facteurs essentiels dans la formation des VLDL que sont l'apoB, l'apoC3 et de MTTP (Fisher et al., 2014; Yao and Wang, 2012). Ces résultats, ainsi que l'absence d'accumulation des lipides due aux dithiocarbamates dans les cellules HepaRG non stéatosées, suggèrent que l'exposition aux dithiocarbamates et au manganèse prédispose le foie au développement d'une stéatose hépatique dans le cas d'un apport en excès d'acides gras. A l'instar de l'hypothèse « two hit » de la stéatohépatite, les dérégulations dues à l'exposition aux dithiocarbamates par l'alimentation pourrait correspondre au « first hit » et l'apport d'acides gras au « second hit » conduisant à l'apparition d'une stéatose (Day and James, 1998)

Par ailleurs, il a été démontré que l'inhibition de la sécrétion des VLDL et de l'expression des gènes associées à leurs synthèses était la conséquence d'un stress du réticulum endoplasmique pouvant être induit par des xénobiotiques (Allard et al., 2021; Liao and Chan, 2001; Rutkowski et al., 2008). Nos investigations suggèrent la mise en place d'un mécanisme similaire lors de l'exposition aux dithiocarbamates qui reste à confirmer. Par ailleurs, les résultats du chapitre 1 révèlent un stress du réticulum induit par l'exposition aigue aux dithiocarbamates (Petitjean et al., soumis). Il serait nécessaire d'étudier d'autres marqueurs du stress du réticulum endoplasmique par analyse génomique et transcriptionnelle. Egalement, la co-exposition de cellules en présence d'inhibiteur du stress du RE, tel que l'acide tauroursodéoxycholique, permettrait de confirmer le rôle du stress du RE dans l'exacerbation de la stéatose par les dithiocarbamates (Allard et al., 2021; Basseri and Austin, 2012; Ozcan et al., 2006).

Les maladies du foie telle que la stéatose ainsi que l'exposition aux xénobiotiques sont connues pour altérer la capacité métabolique du foie (Cichocki et al., 2017; Merrell and Cherrington, 2011; Michaut et al., 2016; Naik et al., 2013). Nous avons donc utilisé les cellules différenciées de la lignée HepaRG qui disposent d'une capacité de métabolisation proche des hépatocytes

II-DITHIOCARBAMATES DE MANGANESE ET STEATOSE

humains (Berger et al., 2016). Ainsi nos travaux ont mis en évidence une perturbation du métabolisme des xénobiotiques par l'exposition aux dithiocarbamates et au manganèse. En effet, la biotransformation du diazinon était altérée par les dithiocarbamates notamment par une formation de l'IMP fortement diminuée et une dégradation du diazinon réduite. Notre étude a également mis en évidence une inhibition de certains CYP dont CYP2B6 et CYP3A4 impliqués dans la production d'IMP (Mutch and Williams 2006 ; Sams et al 2004). L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que l'inhibition par les dithiocarbamates du CYP2B6 et CYP3A4 est responsable de la diminution de la biotransformation du diazinon, cependant des expériences supplémentaires restent nécessaires pour confirmer cette hypothèse. De même, notre étude démontre une inhibition de la déarylation du diazinon en IMP, or cette réaction est considérée comme une détoxification, c'est pourquoi l'exposition aux dithiocarbamates pourrait accroître la toxicité du diazinon (Mutch and Williams, 2006; Sams et al., 2004). Cependant, nous n'avons pas réussi à quantifier le diazoxon qui est le métabolite issu de la bioactivation du diazinon (Kappers et al., 2001; Sams et al., 2004). D'une part, il serait important de mettre au point une méthode permettant d'évaluer la formation de ce métabolite considéré comme plus toxique que le diazinon. D'autre part, il faudrait comparer l'EC₅₀ du diazinon vis à vis des cellules exposées aux dithiocarbamates par rapport aux cellules non exposées. Ainsi, la formation du diazoxon devrait être plus importante et la toxicité du diazinon plus élevée dans les cellules pré-exposées aux dithiocarbamates.

En outre, l'inhibition de l'activité des enzymes de biotransformation et l'altération du métabolisme du diazinon, suggère que l'exposition aux dithiocarbamates pourrait perturber la toxico-cinétique et toxico-dynamique d'un grand nombre de xénobiotiques. En effet, les CYP2E1, CYP3A4 et CYP2B6 sont fréquemment impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques tels que les pesticides et les médicaments (Rendic and Guengerich, 2015).

II-DITHIOCARBAMATES DE MANGANESE ET STEATOSE

Nos résultats mettent en évidence une association entre l'inhibition de CYP2B6 et CYP3A4 et l'inhibition des récepteurs nucléaires PXR, CAR et FXR par l'exposition aux dithiocarbamates. Certaines études démontrent que la diminution de l'expression des CYP2B6 et CYP3A4 est liée à une inhibition de CAR et PXR (Forman et al 1998 ; Beigneux et al 2002). Nous émettons l'hypothèse, qui restera à confirmer, que l'exposition aux dithiocarbamates diminue l'expression de CAR et PXR, par un mécanisme non identifié, ce qui conduit à une inhibition des CYP2B6 et CYP3A4. L'utilisation d'un gène rapporteur tel que la luciférase, largement utilisé pour l'étude du rôle des récepteurs nucléaires, permettrait de confirmer ou infirmer cette hypothèse (Cevenini et al., 2016; Lasch et al., 2021; Luckert et al., 2018; Miraglia et al., 2011; Schenborn and Groskreutz, 1999). Il faudrait pour cela que le gène codant pour la luciférase soit sous le contrôle d'un promoteur présentant des sites de liaisons aux récepteurs PXR et/ou CAR (Lasch et al., 2021; Luckert et al., 2018). On peut également imaginer un système similaire avec une expression basale de luciférase mais dépourvu des sites de liaison de PXR et/ou CAR, dans ce cas la luminescence ne serait pas atteinte par l'exposition aux dithiocarbamates.

Concernant le récepteur nucléaire FXR, il joue un rôle majeur dans le métabolisme des acides biliaires et son inhibition conduit à une perturbation des CYP7A1 et CYP8B1 (Keitel et al., 2019; Sinal et al., 2000; Zollner et al., 2003). Il est donc possible que l'exposition aux dithiocarbamates puisse modifier le métabolisme des acides biliaires. La quantification de la 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one (C4) et de l'activité et de l'expression du CYP7A1 dans les cellules exposées aux dithiocarbamates pourrait permettre de répondre à cette hypothèse.

Par ailleurs, l'inactivation du gène codant FXR chez la souris a mis en évidence que l'inhibition de FXR favorisait l'accumulation lipidique (Sinal et al., 2000). De plus, une étude révèle une action anti inflammatoire de FXR, à la fois dans un modèle in vitro et in vivo, lié à la voie NF- κ B (Wang et al., 2008). Les auteurs démontrent également que l'activation de la voie NF- κ B et donc l'inflammation réprime l'action de FXR. Il serait ainsi intéressant, dans les cellules

II-DITHOCARBAMATES DE MANGANESE ET STEATOSE

présentant une stéatose exacerbée, d'étudier l'expression de FXR qui pourrait jouer un rôle dans l'accumulation lipidique et la progression vers une stéatohépatite induite par les dithiocarbamates.

III-DISCUSSION GENERALE

III-DISCUSSION GENERALE

La simple stéatose hépatique peut évoluer en stéatohépatite caractérisée par une inflammation et une accumulation lipidique plus importante (Aly and Kleiner, 2011). Le concept « two hits » dans le cadre d'une stéatohépatite correspond à une accumulation lipidique caractéristique d'une stéatose « first hit » et le « second hit » qui peut être divers, stress oxydant, inflammation, conduit à la progression en stéatohépatite (Day and James, 1998). Parmi les facteurs favorisant la progression de la stéatose en stéatohépatite, on peut citer les xénobiotiques comme l'alcool, les médicaments ou les contaminants de l'environnement (Bucher et al., 2018b; Duval et al., 2017; Minato et al., 2014).

L'ensemble de nos études suggèrent que l'exposition aux dithiocarbamates et au manganèse serait un facteur de progression de la stéatose vers la stéatohépatite que l'on pourrait considérer comme « second hit ». En effet, nous avons démontré, d'une part que les dithiocarbamates et le manganèse provoquaient un stress du réticulum endoplasmique, un stress oxydant et une mort par apoptose et d'autre part, qu'ils favorisaient la progression de la stéatose par une plus forte accumulation lipidique et qu'ils perturbaient l'expression des enzymes de biotransformation.

La stéatose hépatique peut être induite par le stress du réticulum endoplasmique (RE) qui peut être provoqué par l'excès de lipides mais également par l'exposition aux xénobiotiques (Allard et al., 2021; Ota et al., 2008; Sharma et al., 2008). De plus, la dérégulation de l'une des voies de l'UPR est suffisante pour provoquer un changement dans l'accumulation des lipides au niveau hépatique (Kammoun et al., 2009; Rutkowski et al., 2008). La stéatose est associée à une forte diminution de l'apolipoprotéine B qui est indispensable à la formation des VLDL (Ota et al., 2008; Yamaguchi et al., 2007). Par ailleurs, l'inhibition de la sécrétion des VLDL, nécessaire à l'élimination des triglycérides, joue un rôle majeur dans la progression de la stéatose induite par le stress du RE (Allard et al., 2021; Liao and Chan, 2001; Ota et al., 2008).

III-DISCUSSION GENERALE

Il apparait que le stress du RE peut être à la fois une cause et une conséquence, ce qui en fait un mécanisme d'importance dans l'étude du développement et de la progression de la stéatose. Bien que nos travaux ne permettent pas de démontrer une telle hypothèse, l'ensemble des résultats suggèrent néanmoins que l'exposition aux dithiocarbamates induirait un stress du RE qui serait responsable en partie de la mise en place et de l'exacerbation de la stéatose.

Le stress du RE a également été identifié dans la progression vers une stéatohépatite (Ji and Kaplowitz, 2006; Kim et al., 2018; Nakagawa et al., 2014). Il serait impliqué dans l'inflammation caractéristique de la stéatohépatite et dans la mort des cellules par apoptose (Nakagawa et al., 2014; Zhang et al., 2014). Plusieurs rôles de la protéine CHOP, issue de la réponse UPR, ont été mis en évidence dans le cadre de la stéatohépatite. Par exemple, son activation est associée à l'apoptose induite par les lipides dans les hépatocytes (Cao et al., 2012). CHOP est également responsable en partie de l'activation de NF- κ B et de l'inflammasome NLRP3, ce qui pourrait expliquer la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires tels que l'IL-6, l'IL-1 β ou le TNF α (Lebeaupin et al., 2015; Willy et al., 2015). Ces études sont en cohérence avec l'expression de CHOP chez les patients atteints d'une stéatohépatite et dont les marqueurs de l'inflammation sont augmentés (González-Rodríguez et al., 2014; Ribeiro et al., 2004). Nos résultats démontrent que l'expression de CHOP (DDIT3) est augmentée dans les hépatocytes exposés de manière chronique aux dithiocarbamates et dans le cas d'une exposition aiguë nous avons confirmé l'induction du stress du RE. Ainsi, l'exposition aux dithiocarbamates, par le stress du RE, pourrait favoriser la progression de la stéatose vers une stéatohépatite en induisant l'expression de CHOP conduisant à la sécrétion des cytokines proinflammatoires. Cependant, le rôle de CHOP dans la stéatohépatite reste controversé. En effet, des études démontrent que l'expression de CHOP est associée à une diminution de l'expression des protéines chaperones de l'UPR qui favoriserait une activation de l'apoptose (Lee et al., 2017). Au contraire, d'autres études révèlent une augmentation de la réponse UPR, ce qui limiterait l'apoptose (Lake et al.,

III-DISCUSSION GENERALE

2014). Par ailleurs, Nakagawa et ses collaborateurs démontrent que l'utilisation d'inhibiteur du stress du RE tels que l'acide phénylbutyrique ou l'acide tauroursodeoxycholique est capable d'inhiber le développement de la stéatohépatite (Nakagawa et al., 2014; Ozcan et al., 2006). Dans l'hypothèse où le développement de la stéatohépatite soit confirmé, il serait intéressant de co-exposer les cellules à de tels inhibiteurs afin de mettre en évidence le rôle indispensable ou non du stress du RE induit par les dithiocarbamates.

Les ERO et la dysfonction mitochondriale ont également été montrés comme favorisant l'évolution vers la stéatohépatite (Begrache et al 2013). Ainsi, plusieurs études démontrent que l'apparition de la stéatohépatite due à l'exposition à des xénobiotiques est associée à un stress oxydant (Bucher et al., 2018a; Lin et al., 1996; Santra et al., 2000; Shi et al., 2012). Par ailleurs, la production des ERO est considérée comme plus élevée dans les cas de stéatohépatite que dans la simple stéatose (Begrache et al., 2013; Di Ciaula et al., 2021). De même, la dysfonction mitochondriale semble apparaître uniquement au stade de stéatohépatite (Pérez-Carreras et al., 2003). Enfin, certaines études suggèrent que dans les cas de stéatose, la production d'ERO provoque une inflammation caractéristique de la stéatohépatite (Pérez-Carreras et al., 2003; Satapati et al., 2015). De fait, le stress oxydant induit par les dithiocarbamates, que nous avons mis en évidence dans la première partie de ma thèse, pourrait contribuer à l'apparition d'une stéatohépatite. Il serait donc intéressant d'étudier la production des ERO et la dysfonction mitochondriale dans les cellules dont la stéatose est aggravée par les dithiocarbamates.

Enfin, l'activation de l'apoptose induite par les dithiocarbamates que nous avons révélée, conforte l'hypothèse d'une progression vers un stade de stéatohépatite. En effet, l'apoptose est un mécanisme crucial dans le développement de la stéatohépatite (Feldstein et al., 2003; Wieckowska et al., 2006). Il a en effet été démontré, que les fragments de la cytokératine 18,

III-DISCUSSION GENERALE

clivée par la caspase 3 activée, étaient produits chez les patients atteints de la stéatohépatite (Wieckowska et al., 2006). De plus, l'augmentation de l'activation de la caspase 3 et de l'apoptose sont corrélées à la progression de la stéatohépatite (Feldstein et al., 2003; Ferreira et al., 2011).

L'inhibition de l'activité des enzymes de biotransformation est une des caractéristiques de la stéatose mais également de la stéatohépatite (Cobbina and Akhlaghi, 2017). Ainsi, la diminution de l'activité du CYP3A4 est d'autant plus marquée que la stéatose s'aggrave (Kolwankar et al., 2007; Woolsey et al., 2015). De même, l'inhibition de l'activité du Cyp2b1 (orthologue chez le rat du CYP2B6 de l'Homme) est corrélée à l'apparition et au développement de la stéatose vers la stéatohépatite (Gao et al., 2016). Cependant, ces résultats ne sont pas retrouvés dans les tissus de patients atteints d'une stéatohépatite (Fisher et al., 2009). Des études ont démontré dans le modèle HepaRG que la sécrétion de l'IL-6 provoquait une diminution de l'expression des enzymes de biotransformation (Dubois-Pot-Schneider et al., 2014; Tanner et al., 2018). Notamment, l'action des récepteurs nucléaires PXR et CAR jouant un rôle majeur dans l'expression des CYP3A4 et CYP2B6 était diminué par l'IL-6 (Tanner et al., 2018). De plus, il a récemment été mis en évidence que les enzymes de biotransformation étaient inhibées dans le cas d'une stéatohépatite induite par des xénobiotiques (Bucher et al., 2018b).

Ainsi, bien que l'inhibition des enzymes de biotransformation par les dithiocarbamates ait été mise en évidence à des concentrations n'entraînant pas de stéatose, nos résultats concordent avec les caractéristiques retrouvées dans les stéatohépatites. Dans l'hypothèse où les dithiocarbamates favorisent une sécrétion des cytokines pro-inflammatoires, celles-ci pourraient être responsables de la diminution de l'activité et de l'expression des CYP via les

III-DISCUSSION GENERALE

récepteurs nucléaires. Ainsi, ces modulations, induite par les dithiocarbamates, pourraient favoriser la progression de la simple stéatose vers une stéatohépatite.

La stéatohépatite est caractérisée notamment par une inflammation engendrée par des cytokines telles que l'IL-6, l'IL1- β ou encore le TNF α (Crespo et al., 2001; Mridha et al., 2017; Wieckowska et al., 2008). Par ailleurs, le manganèse favorise la sécrétion de ces cytokines inflammatoires au niveau neuronal (Kirkley et al., 2017; Yin et al., 2018). C'est pourquoi, l'étude de l'expression de ces cytokines par analyse des transcrits et la quantification des protéines par Western Blot et/ou ELISA devra être réalisée. Dans ce but, nous avons, par RT-qPCR, analysé l'expression du gène codant pour l'IL-6 dont l'expression semble fortement augmentée lors d'expositions aiguës, puis maintenue de manière plus modérée après deux semaines, dans les cellules exposées aux dithiocarbamates (Figure 30). Ceci suggère une induction de l'inflammation par les dithiocarbamates.

Ainsi, ce résultat préliminaire encourageant et l'ensemble de nos résultats suggèrent fortement qu'il y aurait une exacerbation de la stéatose vers la stéatohépatite induite par l'exposition aux dithiocarbamates.

III-DISCUSSION GENERALE

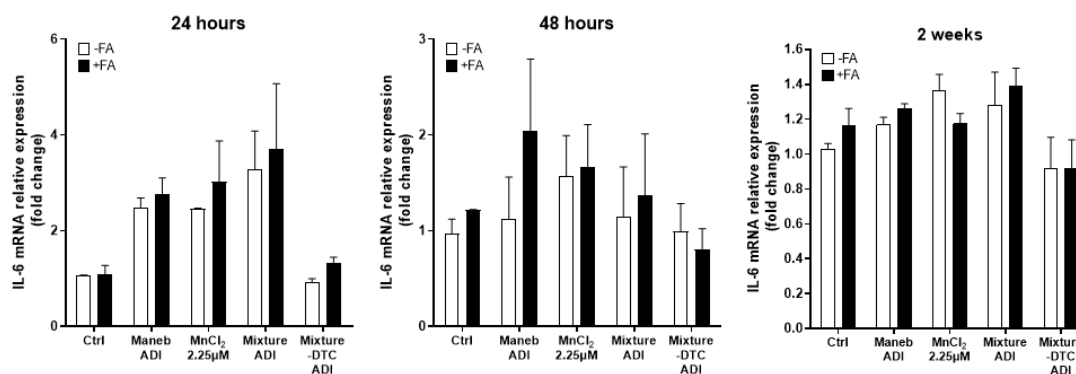


Figure 30 : Expression génique de la cytokine inflammatoire IL-6 dans les cellules exposées aux pesticides

Quantification relative par RT-qPCR de l'expression du gène codant pour l'IL-6 dans les cellules co-exposées pendant 24, 48 heures et 2 semaines par le manèbe, le manganèse (MnCl₂) et le mélange de pesticides avec (Mixture) ou sans dithiocarbamates (Mixture -DTC) aux concentrations équivalentes à l'ADI, en présence (+FA) ou non d'acides gras (-FA).

Mes travaux de thèse révèlent des discordances avec la littérature. En effet, nous n'avons identifié aucun rôle des pesticides, hormis les dithiocarbamates manèbe et mancozèbe, dans l'ensemble des mécanismes que nous avons étudié. Pourtant au niveau hépatique, le chlorpyrifos serait impliqué dans l'inhibition des enzymes de biotransformation des xénobiotiques, l'iprodione provoquerait un stress du RE et le diazinon ainsi que l'imazalil induirait l'apoptose (Girón-Pérez et al., 2021; Goel et al., 2007; Nakagawa and Tayama, 1997; Washington and Tchounwou, 2004). De plus, ces sept pesticides sont connus pour induire un stress oxydant (Astiz et al., 2009; Girón-Pérez et al., 2021; Goel et al., 2005; Jin et al., 2018; Radice et al., 1998). Egalement, le chlorpyrifos, le diazinon et l'imazalil favoriseraient l'accumulation des triglycérides (Aramjoo et al., 2021; Howell et al., 2016; Lichtenstein et al., 2021; Nakagawa and Tayama, 1997). Ceci peut s'expliquer par le fait que nous avons choisi des concentrations très faibles afin de mimer au mieux l'exposition réelle aux pesticides par l'alimentation, alors que la plupart des études utilisent des concentrations bien supérieures aux valeurs de références telles que l'ADI.

III-DISCUSSION GENERALE

A l'inverse, nos résultats sur les dithiocarbamates, malgré des concentrations inférieures, sont en accord avec certaines études. Ainsi, il a été démontré *in vitro* que le mancozèbe est capable en présence d'un mélange d'acides oléique et linoléique de provoquer une accumulation de triglycérides (Pirozzi et al., 2016). En revanche, deux études *in vivo* suggèrent que l'apport d'acide gras en excès n'est pas nécessaire à l'induction d'une stéatose par le manèbe et le mancozèbe (Ben Amara et al., 2015; Yahia et al., 2019). De plus, comme nous l'avons démontré, le manèbe et le mancozèbe ont été identifiés dans l'altération des enzymes de biotransformation, la génotoxicité, le stress oxydant et l'apoptose (Ahmad et al., 2013; Ben Amara et al., 2015; Saber et al., 2019; Sefi et al., 2019; Yahia et al., 2019).

Néanmoins, nos résultats concernant l'impact des dithiocarbamates peuvent être remis en question par un certain nombre de facteurs comme, le fait que nous ayons considéré une stabilité et une absorption totale des pesticides. En outre, ils ont été obtenus principalement dans le modèle de cellules d'hépatome HepaRG, bien qu'en partie reproduits avec des hépatocytes en culture primaire.

C'est pourquoi, l'extrapolation de nos résultats dans le cadre d'une exposition de l'Homme aux pesticides par l'alimentation reste limitée. En revanche, les études utilisant des concentrations très importantes de pesticides interrogent quant à la pertinence de l'évaluation des risques liés à l'exposition de l'Homme par l'alimentation. Mes travaux de thèse démontrent comme d'autres études, que l'utilisation de concentrations très faibles de pesticides permet d'observer des effets délétères qui correspondraient plus à une exposition réelle par l'alimentation (Carpy et al., 2000; Foucault et al., 2021a; Foucault et al., 2021b; Hochane et al., 2017; Leveque et al., 2019; Nimako et al., 2021; Rouimi et al., 2012). Ils démontrent également l'importance de l'utilisation des modèles *in vitro* dans la détermination des valeurs références tels que la NOAEL et l'ADI. Comme les modèles *in vitro* qui comportent un grand nombre de lacunes (système fermé, absence d'interactions avec d'autres types cellulaires etc), les modèles *in vivo*

III-DISCUSSION GENERALE

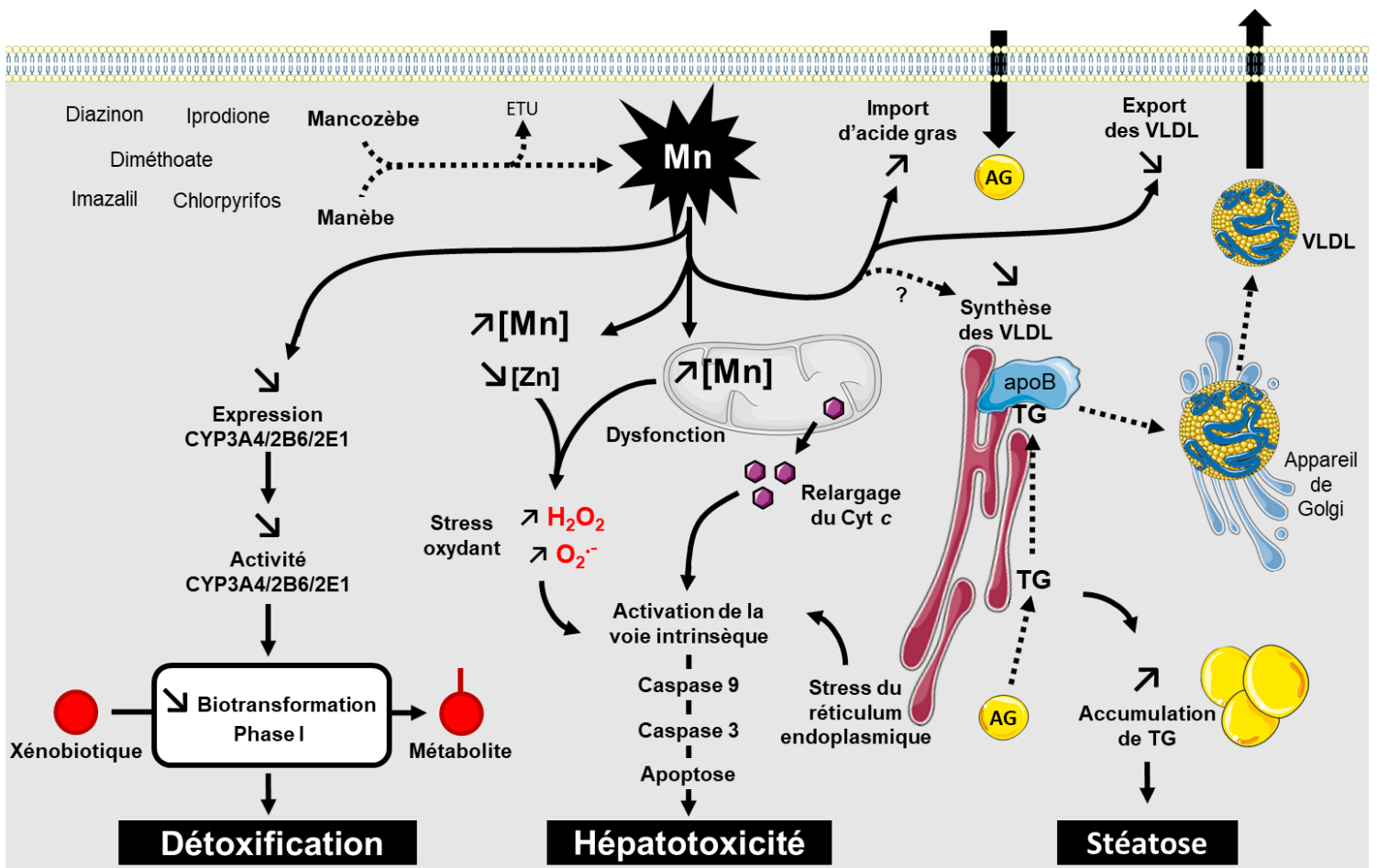
ont également des limites. Par exemple, le pourcentage de poids corporels que représente le foie ou encore la quantité de CYP par rapport au poids corporel sont plus élevés chez les petits animaux que chez l'Homme (Martignoni et al., 2006). Cette différence suggère une élimination plus rapide des xénobiotiques chez les espèces modèles, telles que le rat ou la souris, que chez l'Homme. De plus, les espèces modèles présentent des différences dans la localisation de leur expression des CYP. Par exemple, le CYP2B, qui est exprimé dans le foie chez toutes les espèces, est fortement présent dans l'intestin des rats et des souris, ce qui n'est pas le cas chez l'Homme (Lindell et al., 2003; Martignoni et al., 2005). Ainsi, l'évaluation des risques de xénobiotiques pourraient être sous-estimée par une importante détoxification au niveau intestinal dans les modèles murins, dont l'absence conduirait à une hépatotoxicité chez l'Homme. De même, les CYP2C dont l'expression et l'activité, chez le rat sont sexe dépendantes ou encore chez le chien dont l'activité est différente de celle retrouvée chez l'Homme, peuvent conduire à d'importants biais dans l'évaluation des risques des xénobiotiques (Agrawal and Shapiro, 1997; Graham et al., 2003; Morgan et al., 1985). Enfin, le rat ne serait pas un bon modèle puisque les CYP3A, qui ont un rôle majeur dans la détoxification des xénobiotiques, présentent d'importantes différences avec l'Homme telles que l'absence d'induction par la rifampicine ou l'absence de métabolisation de substrats des CYP3A humain (Guengerich, 1997; Lu and Li, 2001). Néanmoins, il existe de nombreuses similitudes entre les CYP des espèces modèles et l'Homme notamment avec le CYP2E1 dont les caractéristiques inter-espèces semblent indiquer une extrapolation des résultats fiables (Bogaards et al., 2000; Guengerich, 1997; Martignoni et al., 2006). Ainsi, l'utilisation de modèles *in vivo* dans la détermination des valeurs références de toxicité présente des limites, au même titre que les modèles *in vitro*. Il apparait alors clairement que l'utilisation systématique des deux types de modèles soit indispensable afin obtenir des résultats pertinents dont

III-DISCUSSION GENERALE

l'extrapolation reflète au mieux les risques liés à l'exposition de l'Homme aux pesticides par l'alimentation.

Le développement embryonnaire fait partie de l'évaluation des risques des pesticides (EFSA, 2020). Une partie de mes résultats de thèse ont permis d'obtenir le financement d'un projet, auprès de l'ANSES, intitulé « Perturbations endocriniennes et altérations métaboliques dans le foie et le tissu hématopoïétique induites par l'exposition chronique à de faibles doses de pesticide contenant du manganèse » (MANGA-21 EST-239). Le projet MANGA a pour but notamment d'étudier le développement des embryons de souris dont les mères ont été exposées au manèbe pendant la gestation. En plus, d'apporter le versant *in vivo* faisant défaut à mes travaux, ce projet devrait permettre de compléter les données de toxicologie de notre laboratoire sur l'impact des dithiocarbamates et le rôle du manganèse lors d'une exposition par l'alimentation.

III-DISCUSSION GENERALE



REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D. G., Heuser, J. E., Wang, X. and Akey, C. W.** (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol. Cell* **9**, 423–432.
- Adeva-Andany, M. M., Carneiro-Freire, N., Seco-Filgueira, M., Fernández-Fernández, C. and Mouriño-Bayolo, D.** (2019). Mitochondrial β -oxidation of saturated fatty acids in humans. *Mitochondrion* **46**, 73–90.
- Agrawal, A. K. and Shapiro, B. H.** (1997). Gender, age and dose effects of neonatally administered aspartate on the sexually dimorphic plasma growth hormone profiles regulating expression of the rat sex-dependent hepatic CYP isoforms. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **25**, 1249–1256.
- Ahmad, I., Shukla, S., Kumar, A., Singh, B. K., Kumar, V., Chauhan, A. K., Singh, D., Pandey, H. P. and Singh, C.** (2013). Biochemical and molecular mechanisms of N-acetyl cysteine and silymarin-mediated protection against maneb- and paraquat-induced hepatotoxicity in rats. *Chem. Biol. Interact.* **201**, 9–18.
- Aldini, G., Altomare, A., Baron, G., Vistoli, G., Carini, M., Borsani, L. and Sergio, F.** (2018). N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why. *Free Radic. Res.* **52**, 751–762.
- Al-Eryani, L., Wahlang, B., Falkner, K. C., Guardiola, J. J., Clair, H. B., Prough, R. A. and Cave, M.** (2015). Identification of Environmental Chemicals Associated with the Development of Toxicant-associated Fatty Liver Disease in Rodents. *Toxicol. Pathol.* **43**, 482–497.
- Ali, S. F., Duhart, H. M., Newport, G. D., Lipe, G. W. and Slikker, W.** (1995). Manganese-induced reactive oxygen species: comparison between Mn⁺² and Mn⁺³. *Neurodegener. J. Neurodegener. Disord. Neuroprotection Neuroregeneration* **4**, 329–334.
- Allard, J., Bucher, S., Massart, J., Ferron, P.-J., Le Guillou, D., Loyant, R., Daniel, Y., Launay, Y., Buron, N., Begriche, K., et al.** (2021). Drug-induced hepatic steatosis in absence of severe mitochondrial dysfunction in HepaRG cells: proof of multiple mechanism-based toxicity. *Cell Biol. Toxicol.* **37**, 151–175.
- Aly, F. Z. and Kleiner, D.** (2011). UPDATE ON FATTY LIVER DISEASE AND STEATOHEPATITIS. *Adv. Anat. Pathol.* **18**, 294–300.
- Ameer, F., Scanduzzi, L., Hasnain, S., Kalbacher, H. and Zaidi, N.** (2014). De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism.* **63**, 895–902.
- Anderson, C. C., Aivazidis, S., Kuzyk, C. L., Jain, A. and Roede, J. R.** (2018). Acute Maneb Exposure Significantly Alters Both Glycolysis and Mitochondrial Function in Neuroblastoma Cells. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **165**, 61–73.
- Angrish, M. M., Kaiser, J. P., McQueen, C. A. and Chorley, B. N.** (2016). Tipping the Balance: Hepatotoxicity and the 4 Apical Key Events of Hepatic Steatosis. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **150**, 261–268.

- Aninat, C., Piton, A., Glaise, D., Le Charpentier, T., Langouët, S., Morel, F., Guguen-Guillouzo, C. and Guillouzo, A.** (2006). Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **34**, 75–83.
- Anthérieu, S., Rogue, A., Fromenty, B., Guillouzo, A. and Robin, M.-A.** (2011). Induction of vesicular steatosis by amiodarone and tetracycline is associated with up-regulation of lipogenic genes in HepaRG cells. *Hepatol. Baltim. Md* **53**, 1895–1905.
- Aramjoo, H., Farkhondeh, T., Aschner, M., Naseri, K., Mehrpour, O., Sadighara, P., Roshanravan, B. and Samarghandian, S.** (2021). The association between diazinon exposure and dyslipidemia occurrence: a systematic and meta-analysis study. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **28**, 3994–4006.
- Astiz, M., de Alaniz, M. J. T. and Marra, C. A.** (2009). Antioxidant defense system in rats simultaneously intoxicated with agrochemicals. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **28**, 465–473.
- Bachmann, F., Duthaler, U., Meyer Zu Schwabedissen, H. E., Puchkov, M., Huwyler, J., Haschke, M. and Krähenbühl, S.** (2021). Metamizole is a Moderate Cytochrome P450 Inducer Via the Constitutive Androstane Receptor and a Weak Inhibitor of CYP1A2. *Clin. Pharmacol. Ther.* **109**, 1505–1516.
- Barnes, J. M.** (1960). Detoxication Mechanisms. The Metabolism and Detoxication of Drugs, Toxic Substances and Other Organic Compounds. *Br. J. Ind. Med.* **17**, 244.
- Barrows, B. R. and Parks, E. J.** (2006). Contributions of different fatty acid sources to very low-density lipoprotein-triacylglycerol in the fasted and fed states. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **91**, 1446–1452.
- Basseri, S. and Austin, R. C.** (2012). Endoplasmic reticulum stress and lipid metabolism: mechanisms and therapeutic potential. *Biochem. Res. Int.* **2012**, 841362.
- Begriche, K., Massart, J., Robin, M.-A., Borgne-Sanchez, A. and Fromenty, B.** (2011). Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver. *J. Hepatol.* **54**, 773–794.
- Begriche, K., Massart, J., Robin, M.-A., Bonnet, F. and Fromenty, B.** (2013). Mitochondrial adaptations and dysfunctions in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol. Baltim. Md* **58**, 1497–1507.
- Beigneux, A. P., Moser, A. H., Shigenaga, J. K., Grunfeld, C. and Feingold, K. R.** (2002). Reduction in cytochrome P-450 enzyme expression is associated with repression of CAR (constitutive androstane receptor) and PXR (pregnane X receptor) in mouse liver during the acute phase response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 145–149.
- Belyaeva, E. A., Dymkowska, D., Wieckowski, M. R. and Wojtczak, L.** (2006). Reactive oxygen species produced by the mitochondrial respiratory chain are involved in Cd²⁺-induced injury of rat ascites hepatoma AS-30D cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1757**, 1568–1574.

- Ben Amara, I., Ben Saad, H., Hamdaoui, L., Karray, A., Boudawara, T., Ben Ali, Y. and Zeghal, N.** (2015). Maneb disturbs expression of superoxide dismutase and glutathione peroxidase, increases reactive oxygen species production, and induces genotoxicity in liver of adult mice. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **22**, 12309–12322.
- Berger, B., Donzelli, M., Maseneni, S., Boess, F., Roth, A., Krähenbühl, S. and Haschke, M.** (2016). Comparison of Liver Cell Models Using the Basel Phenotyping Cocktail. *Front. Pharmacol.* **7**, 443.
- Bjørling-Poulsen, M., Andersen, H. R. and Grandjean, P.** (2008). Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. *Environ. Health* **7**, 50.
- Bogaards, J. J., Bertrand, M., Jackson, P., Oudshoorn, M. J., Weaver, R. J., van Bladeren, P. J. and Walther, B.** (2000). Determining the best animal model for human cytochrome P450 activities: a comparison of mouse, rat, rabbit, dog, micropig, monkey and man. *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.* **30**, 1131–1152.
- Bondareva, L. and Fedorova, N.** (2021). Pesticides: Behavior in Agricultural Soil and Plants. *Molecules* **26**, 5370.
- Borgert, C. J., Quill, T. F., McCarty, L. S. and Mason, A. M.** (2004). Can mode of action predict mixture toxicity for risk assessment? *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **201**, 85–96.
- Bortolotti, M., Polito, L., Battelli, M. G. and Bolognesi, A.** (2021). Xanthine oxidoreductase: One enzyme for multiple physiological tasks. *Redox Biol.* **41**, 101882.
- Boveris, A. and Chance, B.** (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* **134**, 707–716.
- Bucher, S., Le Guillou, D., Allard, J., Pinon, G., Begriche, K., Tête, A., Sergent, O., Lagadic-Gossmann, D. and Fromenty, B.** (2018a). Possible Involvement of Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in a Cellular Model of NAFLD Progression Induced by Benzo[a]pyrene/Ethanol CoExposure. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, 4396403.
- Bucher, S., Tête, A., Podechard, N., Liamin, M., Le Guillou, D., Chevanne, M., Coulouarn, C., Imran, M., Gallais, I., Fernier, M., et al.** (2018b). Co-exposure to benzo[a]pyrene and ethanol induces a pathological progression of liver steatosis in vitro and in vivo. *Sci. Rep.* **8**, 5963.
- Cabillic, F. and Corlu, A.** (2016). Regulation of Transdifferentiation and Retrodifferentiation by Inflammatory Cytokines in Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* **151**, 607–615.
- Cao, J., Dai, D.-L., Yao, L., Yu, H.-H., Ning, B., Zhang, Q., Chen, J., Cheng, W.-H., Shen, W. and Yang, Z.-X.** (2012). Saturated fatty acid induction of endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human liver cells via the PERK/ATF4/CHOP signaling pathway. *Mol. Cell. Biochem.* **364**, 115–129.
- Carmona, A., Roudeau, S., Perrin, L., Veronesi, G. and Ortega, R.** (2014). Environmental manganese compounds accumulate as Mn(II) within the Golgi apparatus of dopamine

- cells: relationship between speciation, subcellular distribution, and cytotoxicity. *Met. Integr. Biometal Sci.* **6**, 822–832.
- Carpenter, K., Pollitt, R. J. and Middleton, B.** (1992). Human liver long-chain 3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase is a multifunctional membrane-bound beta-oxidation enzyme of mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **183**, 443–448.
- Carpy, S. A., Kobel, W. and Doe, J.** (2000). Health risk of low-dose pesticides mixtures: a review of the 1985-1998 literature on combination toxicology and health risk assessment. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* **3**, 1–25.
- Carvalho, F. P.** (2017). Pesticides, environment, and food safety. *Food Energy Secur.* **6**, 48–60.
- Cascales, M., Alvarez, A., Gascó, P., Fernández-Simón, L., Sanz, N. and Boscá, L.** (1994). Cocaine-induced liver injury in mice elicits specific changes in DNA ploidy and induces programmed death of hepatocytes. *Hepatology. Baltim. Md* **20**, 992–1001.
- Cevenini, L., Calabretta, M. M., Calabria, D., Roda, A. and Michelini, E.** (2016). Luciferase Genes as Reporter Reactions: How to Use Them in Molecular Biology? *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **154**, 3–17.
- Chen, X., Li, L., Liu, X., Luo, R., Liao, G., Li, L., Liu, J., Cheng, J., Lu, Y. and Chen, Y.** (2018). Oleic acid protects saturated fatty acid mediated lipotoxicity in hepatocytes and rat of non-alcoholic steatohepatitis. *Life Sci.* **203**, 291–304.
- Cichocki, J. A., Furuya, S., Konganti, K., Luo, Y.-S., McDonald, T. J., Iwata, Y., Chiu, W. A., Threadgill, D. W., Pogribny, I. P. and Rusyn, I.** (2017). Impact of Nonalcoholic Fatty Liver Disease on Toxicokinetics of Tetrachloroethylene in Mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **361**, 17–28.
- Cobbina, E. and Akhlaghi, F.** (2017). Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) - pathogenesis, classification, and effect on drug metabolizing enzymes and transporters. *Drug Metab. Rev.* **49**, 197–211.
- Cocco, P.** (2022). Time for Re-Evaluating the Human Carcinogenicity of Ethylenedithiocarbamate Fungicides? A Systematic Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **19**, 2632.
- Cohen, D. E. and Fisher, E. A.** (2013). Lipoprotein metabolism, dyslipidemia, and nonalcoholic fatty liver disease. *Semin. Liver Dis.* **33**, 380–388.
- Coleman, R. A. and Mashek, D. G.** (2011). Mammalian triacylglycerol metabolism: synthesis, lipolysis, and signaling. *Chem. Rev.* **111**, 6359–6386.
- Colle, D., Farina, M., Ceccatelli, S. and Raciti, M.** (2018). Paraquat and Maneb Exposure Alters Rat Neural Stem Cell Proliferation by Inducing Oxidative Stress: New Insights on Pesticide-Induced Neurodevelopmental Toxicity. *Neurotox. Res.* **34**, 820–833.
- Food Administration** (2003). Combined actions and interactions of chemicals in mixtures: the toxicological effects of exposure to mixtures of industrial and environmental

chemicals 1st ed. Søborg: Miljøministeriet, Miljøstyrelsen : Ministeriet for fødevarer, landbrug og fiskeri, Fødevaredirektoratet.

Commission Européenne, (2005) Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC Text with EEA relevance. (2005).

Commission Européene. Directive 2006/11/EC

Commission Européen (2020) Commission Implementing Regulation (EU) 2020/2087 of 14 December 2020 concerning the non-renewal of the approval of the active substance mancozeb, in accordance with Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market, and amending the Annex to Commission Implementing Regulation (EU) No 540/2011 (Text with EEA relevance).

Costa-Silva, D. G., Lopes, A. R., Martins, I. K., Leandro, L. P., Nunes, M. E. M., de Carvalho, N. R., Rodrigues, N. R., Macedo, G. E., Saidelles, A. P., Aguiar, C., et al. (2018). Mancozeb exposure results in manganese accumulation and Nrf2-related antioxidant responses in the brain of common carp *Cyprinus carpio*. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **25**, 15529–15540.

Crespo, J., Cayón, A., Fernández-Gil, P., Hernández-Guerra, M., Mayorga, M., Domínguez-Díez, A., Fernández-Escalante, J. C. and Pons-Romero, F. (2001). Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology. Baltim. Md* **34**, 1158–1163.

Croom, E. (2012). Metabolism of xenobiotics of human environments. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **112**, 31–88.

Croom, E. L., Wallace, A. D. and Hodgson, E. (2010). Human variation in CYP-specific chlorpyrifos metabolism. *Toxicology* **276**, 184–191.

Damalas, C. A. and Eleftherohorinos, I. G. (2011). Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* **8**, 1402–1419.

Dastidar, S. G., Pham, M. T., Mitchell, M. B., Yeom, S. G., Jordan, S., Chang, A., Sopher, B. L. and La Spada, A. R. (2020). 4E-BP1 Protects Neurons from Misfolded Protein Stress and Parkinson's Disease Toxicity by Inducing the Mitochondrial Unfolded Protein Response. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **40**, 8734–8745.

Davydov, R., Makris, T. M., Kofman, V., Werst, D. E., Sligar, S. G. and Hoffman, B. M. (2001). Hydroxylation of Camphor by Reduced Oxy-Cytochrome P450cam: Mechanistic Implications of EPR and ENDOR Studies of Catalytic Intermediates in Native and Mutant Enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 1403–1415.

Day, C. P. and James, O. F. (1998). Steatohepatitis: a tale of two “hits”? *Gastroenterology* **114**, 842–845.

- Di Ciaula, A., Passarella, S., Shanmugam, H., Noviello, M., Bonfrate, L., Wang, D. Q.-H. and Portincasa, P.** (2021). Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). Mitochondria as Players and Targets of Therapies? *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 5375.
- Doerge, H., Baillie, R. A., Ortegon, A. M., Tsang, B., Wu, Q., Punreddy, S., Hirsch, D., Watson, N., Gimeno, R. E. and Stahl, A.** (2006). Targeted deletion of FATP5 reveals multiple functions in liver metabolism: alterations in hepatic lipid homeostasis. *Gastroenterology* **130**, 1245–1258.
- Domico, L. M., Zeevalk, G. D., Bernard, L. P. and Cooper, K. R.** (2006). Acute neurotoxic effects of mancozeb and maneb in mesencephalic neuronal cultures are associated with mitochondrial dysfunction. *Neurotoxicology* **27**, 816–825.
- Domico, L. M., Cooper, K. R., Bernard, L. P. and Zeevalk, G. D.** (2007). Reactive oxygen species generation by the ethylene-bis-dithiocarbamate (EBDC) fungicide mancozeb and its contribution to neuronal toxicity in mesencephalic cells. *Neurotoxicology* **28**, 1079–1091.
- Döring, B. and Petzinger, E.** (2014). Phase 0 and phase III transport in various organs: combined concept of phases in xenobiotic transport and metabolism. *Drug Metab. Rev.* **46**, 261–282.
- Dubois-Pot-Schneider, H., Fekir, K., Coulouarn, C., Glaise, D., Aninat, C., Jarnouen, K., Le Guével, R., Kubo, T., Ishida, S., Morel, F., et al.** (2014). Inflammatory cytokines promote the retrodifferentiation of tumor-derived hepatocyte-like cells to progenitor cells. *Hepatology* **60**, 2077–2090.
- Duval, C., Teixeira, -Clerc Fatima, Leblanc, A. F., Touch, S., Emond, C., Guerre, -Millo Michèle, Lotersztajn, S., Barouki, R., Aggerbeck, M. and Coumoul, X.** (2017). Chronic Exposure to Low Doses of Dioxin Promotes Liver Fibrosis Development in the C57BL/6J Diet-Induced Obesity Mouse Model. *Environ. Health Perspect.* **125**, 428–436.
- EFSA** (2008). Opinion of the Scientific Panel on Plant Protection products and their Residues to evaluate the suitability of existing methodologies and, if appropriate, the identification of new approaches to assess cumulative and synergistic risks from pesticides to human health with a view to set MRLs for those pesticides in the frame of Regulation (EC) 396/2005. *EFSA J.* **6**, 705.
- EFSA** (2010) Annual Report on Pesticide Residues *Eur. Food Saf. Auth.*
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA)** (2013). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for manganese. *EFSA J.* **11**, 3419.
- EFSA** (2017). The 2015 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA J.* **15**, e04791.
- EFSA** (2020). Abdourahime, H., Anastassiadou, M., Arena, M., Auteri, D., Barmaz, S., Brancato, A., Bura, L., Carrasco Cabrera, L., Chaideftou, E., et al. (2020). Peer

- review of the pesticide risk assessment of the active substance mancozeb. *EFSA J.* **18**, e05755.
- El-Masri, H. A., Mumtaz, M. M. and Yushak, M. L.** (2004). Application of physiologically-based pharmacokinetic modeling to investigate the toxicological interaction between chlorpyrifos and parathion in the rat. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **16**, 57–71.
- Elovson, J., Chatterton, J. E., Bell, G. T., Schumaker, V. N., Reuben, M. A., Puppione, D. L., Reeve, J. R. and Young, N. L.** (1988). Plasma very low density lipoproteins contain a single molecule of apolipoprotein B. *J. Lipid Res.* **29**, 1461–1473.
- European Commission** (2009). Draft Renewal Assessment Report prepared according to the Commission Regulation (EU) N° 1107/2009
- Fanjul-Bolado, P., Fogel, R., Limson, J., Purcarea, C. and Vasilescu, A.** (2020). Advances in the Detection of Dithiocarbamate Fungicides: Opportunities for Biosensors. *Biosensors* **11**, 12.
- FAO.** FAOSTAT. Available online: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP/visualize>
- Fau, D., Lekehal, M., Farrell, G., Moreau, A., Moulis, C., Feldmann, G., Haouzi, D. and Pessayre, D.** (1997). Diterpenoids from germander, an herbal medicine, induce apoptosis in isolated rat hepatocytes. *Gastroenterology* **113**, 1334–1346.
- Feldstein, A. E., Canbay, A., Angulo, P., Tanai, M., Burgart, L. J., Lindor, K. D. and Gores, G. J.** (2003). Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* **125**, 437–443.
- Ferraz, H. B., Bertolucci, P. H., Pereira, J. S., Lima, J. G. and Andrade, L. A.** (1988). Chronic exposure to the fungicide maneb may produce symptoms and signs of CNS manganese intoxication. *Neurology* **38**, 550–553.
- Ferreira, D. M. S., Castro, R. E., Machado, M. V., Evangelista, T., Silvestre, A., Costa, A., Coutinho, J., Carepa, F., Cortez-Pinto, H. and Rodrigues, C. M. P.** (2011). Apoptosis and insulin resistance in liver and peripheral tissues of morbidly obese patients is associated with different stages of non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetologia* **54**, 1788–1798.
- Filhoulaud, G., Guilmeau, S., Dentin, R., Girard, J. and Postic, C.** (2013). Novel insights into ChREBP regulation and function. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **24**, 257–268.
- Fisher, C. D., Lickteig, A. J., Augustine, L. M., Ranger-Moore, J., Jackson, J. P., Ferguson, S. S. and Cherrington, N. J.** (2009). Hepatic cytochrome P450 enzyme alterations in humans with progressive stages of nonalcoholic fatty liver disease. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **37**, 2087–2094.
- Fisher, E., Lake, E. and McLeod, R. S.** (2014). Apolipoprotein B100 quality control and the regulation of hepatic very low density lipoprotein secretion. *J. Biomed. Res.* **28**, 178–193.

- Forman, B. M., Tzamelis, I., Choi, H. S., Chen, J., Simha, D., Seol, W., Evans, R. M. and Moore, D. D.** (1998). Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR-beta. *Nature* **395**, 612–615.
- Foucault, A., Ravalet, N., Besombes, J., Picou, F., Gallay, N., Babin, L., Bourgeais, J., Hamard, S., Domenech, J., Loyer, P., et al.** (2021a). Low-Dose Pesticides Alter Primary Human Bone Marrow Mesenchymal Stem/Stromal Cells through ALDH2 Inhibition. *Cancers* **13**, 5699.
- Foucault, A., Vallet, N., Ravalet, N., Picou, F., Bene, M. C., Gyan, E. and Herault, O.** (2021b). Occupational pesticide exposure increases risk of acute myeloid leukemia: a meta-analysis of case-control studies including 3,955 cases and 9,948 controls. *Sci. Rep.* **11**, 2007.
- Foulds, C. E., Treviño, L. S., York, B. and Walker, C. L.** (2017). Endocrine-disrupting chemicals and fatty liver disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* **13**, 445–457.
- Fromenty, B. and Pessayre, D.** (1995). Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. *Pharmacol. Ther.* **67**, 101–154.
- Fromenty, B. and Pessayre, D.** (1997). Impaired mitochondrial function in microvesicular steatosis. Effects of drugs, ethanol, hormones and cytokines. *J. Hepatol.* **26 Suppl 2**, 43–53.
- Fromenty, B., Fisch, C., Labbe, G., Degott, C., Deschamps, D., Berson, A., Letteron, P. and Pessayre, D.** Amiodarone Inhibits the Mitochondrial α -Oxidation of Fatty Acids and Produces Microvesicular Steatosis of the Liver in Mice.
- Fujimoto, Y., Itabe, H., Sakai, J., Makita, M., Noda, J., Mori, M., Higashi, Y., Kojima, S. and Takano, T.** (2004). Identification of major proteins in the lipid droplet-enriched fraction isolated from the human hepatocyte cell line HuH7. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1644**, 47–59.
- Gamage, N., Barnett, A., Hempel, N., Duggleby, R. G., Windmill, K. F., Martin, J. L. and McManus, M. E.** (2006). Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **90**, 5–22.
- Gao, J., Zhou, J., He, X.-P., Zhang, Y.-F., Gao, N., Tian, X., Fang, Y., Wen, Q., Jia, L.-J., Jin, H., et al.** (2016). Changes in cytochrome P450s-mediated drug clearance in patients with hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo: a bottom-up approach. *Oncotarget* **7**, 28612–28623.
- Ghose, R., Omoluabi, O., Gandhi, A., Shah, P., Strohacker, K., Carpenter, K. C., McFarlin, B. and Guo, T.** (2011). Role of high-fat diet in regulation of gene expression of drug metabolizing enzymes and transporters. *Life Sci.* **89**, 57–64.
- Gimeno, R. E.** (2007). Fatty acid transport proteins. *Curr. Opin. Lipidol.* **18**, 271–276.
- Girón-Pérez, M. I., Mary, V. S., Rubinstein, H. R., Toledo-Ibarra, G. A. and Theumer, M. G.** (2021). Diazinon toxicity in hepatic and spleen mononuclear cells is associated to early induction of oxidative stress. *Int. J. Environ. Health Res.* 1–15.

- Gnerre, C., Blättler, S., Kaufmann, M. R., Looser, R. and Meyer, U. A.** (2004). Regulation of CYP3A4 by the bile acid receptor FXR: evidence for functional binding sites in the CYP3A4 gene. *Pharmacogenetics* **14**, 635–645.
- Goel, A., Dani, V. and Dhawan, D. K.** (2005). Protective effects of zinc on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and hepatic histoarchitecture in chlorpyrifos-induced toxicity. *Chem. Biol. Interact.* **156**, 131–140.
- Goel, A., Dani, V. and Dhawan, D. K.** (2007). Zinc mediates normalization of hepatic drug metabolizing enzymes in chlorpyrifos-induced toxicity. *Toxicol. Lett.* **169**, 26–33.
- Gök, E. and Deveci, E.** (2022). Histopathological, immunohistochemical and biochemical alterations in liver tissue after fungicide-mancozeb exposures in Wistar albino rats. *Acta Cir. Bras.* **37**, e370404.
- González-Rodríguez, A., Mayoral, R., Agra, N., Valdecantos, M. P., Pardo, V., Miquilena-Colina, M. E., Vargas-Castrillón, J., Lo Iacono, O., Corazzari, M., Fimia, G. M., et al.** (2014). Impaired autophagic flux is associated with increased endoplasmic reticulum stress during the development of NAFLD. *Cell Death Dis.* **5**, e1179.
- Graham, M. J., Bell, A. R., Crewe, H. K., Moorcraft, C. L., Walker, L., Whittaker, E. F. and Lennard, M. S.** (2003). mRNA and protein expression of dog liver cytochromes P450 in relation to the metabolism of human CYP2C substrates. *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.* **33**, 225–237.
- Greger, J. L.** (1999). Nutrition versus toxicology of manganese in humans: evaluation of potential biomarkers. *Neurotoxicology* **20**, 205–212.
- Gripon, P., Rumin, S., Urban, S., Le Seyec, J., Glaise, D., Cannie, I., Guyomard, C., Lucas, J., Trepo, C. and Guguen-Guillouzo, C.** (2002). Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 15655–15660.
- Guengerich, F. P.** (1997). Comparisons of catalytic selectivity of cytochrome P450 subfamily enzymes from different species. *Chem. Biol. Interact.* **106**, 161–182.
- Gullino, M. L., Tinivella, F., Garibaldi, A., Kemmitt, G. M., Bacci, L. and Sheppard, B.** (2010). Mancozeb: Past, Present, and Future. *Plant Dis.* **94**, 1076–1087.
- Gusarova, V., Seo, J., Sullivan, M. L., Watkins, S. C., Brodsky, J. L. and Fisher, E. A.** (2007). Golgi-associated maturation of very low density lipoproteins involves conformational changes in apolipoprotein B, but is not dependent on apolipoprotein E. *J. Biol. Chem.* **282**, 19453–19462.
- Hardesty, J. E., Wahlang, B., Falkner, K. C., Shi, H., Jin, J., Zhou, Y., Wilkey, D. W., Merchant, M. L., Watson, C. T., Feng, W., et al.** (2019). Proteomic analysis reveals novel mechanisms by which polychlorinated biphenyls compromise the liver promoting diet-induced steatohepatitis. *J. Proteome Res.* **18**, 1582–1594.

- Harding, H. P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H. and Ron, D.** (2000). Perk Is Essential for Translational Regulation and Cell Survival during the Unfolded Protein Response. *Mol. Cell* **5**, 897–904.
- Havel, R. J.** (1994). Postprandial hyperlipidemia and remnant lipoproteins. *Curr. Opin. Lipidol.* **5**, 102–109.
- He, J., Lee, J. H., Febbraio, M. and Xie, W.** (2011). The emerging roles of fatty acid translocase/CD36 and the aryl hydrocarbon receptor in fatty liver disease. *Exp. Biol. Med. Maywood NJ* **236**, 1116–1121.
- Hochane, M., Trichet, V., Pecqueur, C., Avril, P., Oliver, L., Denis, J., Brion, R., Amiaud, J., Pineau, A., Naveilhan, P., et al.** (2017). Low-Dose Pesticide Mixture Induces Senescence in Normal Mesenchymal Stem Cells (MSC) and Promotes Tumorigenic Phenotype in Premalignant MSC. *Stem Cells Dayt. Ohio* **35**, 800–811.
- Hoffman, L. and Hardej, D.** (2012). Ethylene bisdithiocarbamate pesticides cause cytotoxicity in transformed and normal human colon cells. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **34**, 556–573.
- Hollingworth, R. M., Kurihara, N., Miyamoto, J., Otto, S. and Paulson, G. D.** (1995). Pesticides report 32: Detection and significance of active metabolites of agrochemicals and related xenobiotics in animals (Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **67**, 1487–1532.
- Horton, J. D., Goldstein, J. L. and Brown, M. S.** (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* **109**, 1125–1131.
- Houten, S. M. and Wanders, R. J. A.** (2010). A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid β -oxidation. *J. Inherit. Metab. Dis.* **33**, 469–477.
- Houten, S. M., Violante, S., Ventura, F. V. and Wanders, R. J. A.** (2016). The Biochemistry and Physiology of Mitochondrial Fatty Acid β -Oxidation and Its Genetic Disorders. *Annu. Rev. Physiol.* **78**, 23–44.
- Howell, G. E., Mulligan, C., Young, D. and Kondakala, S.** (2016). Exposure to chlorpyrifos increases neutral lipid accumulation with accompanying increased de novo lipogenesis and decreased triglyceride secretion in McArdle-RH7777 hepatoma cells. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* **32**, 181–189.
- Hudgins, L. C., Hellerstein, M., Seidman, C., Neese, R., Diakun, J. and Hirsch, J.** (1996). Human fatty acid synthesis is stimulated by a eucaloric low fat, high carbohydrate diet. *J. Clin. Invest.* **97**, 2081–2091.
- Igney, F. H. and Krammer, P. H.** (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 277–288.
- Iizuka, K., Bruick, R. K., Liang, G., Horton, J. D. and Uyeda, K.** (2004). Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 7281–7286.

- Imaishi, H. and Goto, T.** (2018). Effect of genetic polymorphism of human CYP2B6 on the metabolic activation of chlorpyrifos. *Pestic. Biochem. Physiol.* **144**, 42–48.
- Industry Data Analytics** (2020) Mancozeb Market - Growth, Trends And Forecast (2021 - 2026) By Types, By Application, By Regions And By Key Players: UPL, Coromandel International, Indofil, DowDuPont | Industry Data Analytics.
- Institute of Medicine (US) Panel on Micronutrients** (2001). *Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc*. Washington (DC): National Academies Press (US).
- Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals, World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations eds.** (2014). *The international code of conduct on pesticide management*. Rome: Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals : World Health Organization : Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Iqbal, J. and Hussain, M. M.** (2009). Intestinal lipid absorption. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **296**, E1183-1194.
- Izukawa, T., Nakajima, M., Fujiwara, R., Yamanaka, H., Fukami, T., Takamiya, M., Aoki, Y., Ikushiro, S., Sakaki, T. and Yokoi, T.** (2009). Quantitative analysis of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A and UGT2B expression levels in human livers. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **37**, 1759–1768.
- Jancova, P., Anzenbacher, P. and Anzenbacherova, E.** (2010). Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czechoslov.* **154**, 103–116.
- Jensen, P. K.** (1966). Antimycin-insensitive oxidation of succinate and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide in electron-transport particles. I. pH dependency and hydrogen peroxide formation. *Biochim. Biophys. Acta* **122**, 157–166.
- Ji, C. and Kaplowitz, N.** (2006). ER stress: can the liver cope? *J. Hepatol.* **45**, 321–333.
- Jin, C., Luo, T., Fu, Z. and Jin, Y.** (2018). Chronic exposure of mice to low doses of imazalil induces hepatotoxicity at the physiological, biochemical, and transcriptomic levels. *Environ. Toxicol.* **33**, 650–658.
- Jover, R., Bort, R., Gómez-Lechón, M. J. and Castell, J. V.** (2001). Cytochrome P450 regulation by hepatocyte nuclear factor 4 in human hepatocytes: A study using adenovirus-mediated antisense targeting. *Hepatology* **33**, 668–675.
- Kammoun, H. L., Chabanon, H., Hainault, I., Luquet, S., Magnan, C., Koike, T., Ferré, P. and Fofelle, F.** (2009). GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. *J. Clin. Invest.* **119**, 1201–1215.
- Kang, T.-B., Ben-Moshe, T., Varfolomeev, E. E., Pewzner-Jung, Y., Yogev, N., Jurewicz, A., Waisman, A., Brenner, O., Haffner, R., Gustafsson, E., et al.** (2004). Caspase-8 serves both apoptotic and nonapoptotic roles. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **173**, 2976–2984.

- Kappers, W. A., Edwards, R. J., Murray, S. and Boobis, A. R.** (2001). Diazinon is activated by CYP2C19 in human liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **177**, 68–76.
- Karabelas, A. J., Plakas, K. V., Solomou, E. S., Drossou, V. and Sarigiannis, D. A.** (2009). Impact of European legislation on marketed pesticides--a view from the standpoint of health impact assessment studies. *Environ. Int.* **35**, 1096–1107.
- Kathiwala, M., Affum, A. O. and Brajter-Toth, A.** (2010). HPLC-UV measurements of metabolites in the supernatant of endothelial cells exposed to oxidative stress. *Anal. Bioanal. Chem.* **396**, 1763–1771.
- Katz, N. and Rader, D. J.** (2019). Manganese homeostasis: from rare single-gene disorders to complex phenotypes and diseases. *J. Clin. Invest.* **129**, 5082–5085.
- Kaźmierczak-Barańska, J., Boguszewska, K., Adamus-Grabicka, A. and Karwowski, B. T.** (2020). Two Faces of Vitamin C-Antioxidative and Pro-Oxidative Agent. *Nutrients* **12**, E1501.
- Keitel, V., Dröge, C. and Häussinger, D.** (2019). Targeting FXR in Cholestasis. In *Bile Acids and Their Receptors* (ed. Fiorucci, S.) and Distrutti, E.), pp. 299–324. Cham: Springer International Publishing.
- Kendall, F. E.** (1941). STUDIES ON HUMAN SERUM PROTEINS: II. CRYSTALLIZATION OF HUMAN SERUM ALBUMIN. *J. Biol. Chem.* **138**, 97–109.
- Khatun, I., Zeissig, S., Iqbal, J., Wang, M., Curiel, D., Shelness, G. S., Blumberg, R. S. and Hussain, M. M.** (2012). Phospholipid transfer activity of microsomal triglyceride transfer protein produces apolipoprotein B and reduces hepatosteatosis while maintaining low plasma lipids in mice. *Hepatology. Baltim. Md* **55**, 1356–1368.
- Kim, H., Park, C., Han, K.-H., Choi, J., Kim, Y. B., Kim, J. K. and Park, Y. N.** (2004). Primary liver carcinoma of intermediate (hepatocyte-cholangiocyte) phenotype. *J. Hepatology.* **40**, 298–304.
- Kim, J. Y., Garcia-Carbonell, R., Yamachika, S., Zhao, P., Dhar, D., Loomba, R., Kaufman, R. J., Saltiel, A. R. and Karin, M.** (2018). ER Stress Drives Lipogenesis and Steatohepatitis via Caspase-2 Activation of S1P. *Cell* **175**, 133-145.e15.
- Kirkley, K. S., Popichak, K. A., Afzali, M. F., Legare, M. E. and Tjalkens, R. B.** (2017). Microglia amplify inflammatory activation of astrocytes in manganese neurotoxicity. *J. Neuroinflammation* **14**, 99.
- Kistinger, B. R. and Hardej, D.** (2022). The ethylene bisdithiocarbamate fungicides mancozeb and nabam alter essential metal levels in liver and kidney and glutathione enzyme activity in liver of Sprague-Dawley rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **92**, 103849.
- Koch, O. R., Deleo, M. E., Borrello, S., Palombini, G. and Galeotti, T.** (1994). Ethanol Treatment Up Regulates the Expression of Mitochondrial Manganese Superoxide Dismutase in Rat Liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**, 1356–1365.

- Kolwankar, D., Vuppalanchi, R., Ethell, B., Jones, D. R., Wrighton, S. A., Hall, S. D. and Chalasani, N.** (2007). Association between nonalcoholic hepatic steatosis and hepatic cytochrome P-450 3A activity. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* **5**, 388–393.
- Koop, D. R.** (2006). Alcohol metabolism's damaging effects on the cell: a focus on reactive oxygen generation by the enzyme cytochrome P450 2E1. *Alcohol Res. Health J. Natl. Inst. Alcohol Abuse Alcohol.* **29**, 274–280.
- Koopman, W. J. H., Nijtmans, L. G. J., Dieteren, C. E. J., Roestenberg, P., Valsecchi, F., Smeitink, J. A. M. and Willems, P. H. G. M.** (2010). Mammalian mitochondrial complex I: biogenesis, regulation, and reactive oxygen species generation. *Antioxid. Redox Signal.* **12**, 1431–1470.
- Korshunov, S. S., Skulachev, V. P. and Starkov, A. A.** (1997). High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.* **416**, 15–18.
- Kumar, K., Sabarwal, A. and Singh, R. P.** (2019). Mancozeb selectively induces mitochondrial-mediated apoptosis in human gastric carcinoma cells through ROS generation. *Mitochondrion* **48**, 1–10.
- Kumari, M. V., Hiramatsu, M. and Ebadi, M.** (1998). Free radical scavenging actions of metallothionein isoforms I and II. *Free Radic. Res.* **29**, 93–101.
- Lake, A. D., Novak, P., Hardwick, R. N., Flores-Keown, B., Zhao, F., Klimecki, W. T. and Cherrington, N. J.** (2014). The adaptive endoplasmic reticulum stress response to lipotoxicity in progressive human nonalcoholic fatty liver disease. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **137**, 26–35.
- Lasch, A., Marx-Stoelting, P., Braeuning, A. and Lichtenstein, D.** (2021). More than additive effects on liver triglyceride accumulation by combinations of steatotic and non-steatotic pesticides in HepaRG cells. *Arch. Toxicol.* **95**, 1397–1411.
- Lautt, W. W. and Greenway, C. V.** (1987). Conceptual review of the hepatic vascular bed. *Hepatol. Baltim. Md* **7**, 952–963.
- Lazarevich, N. L., Shavochkina, D. A., Fleishman, D. I., Kustova, I. F., Morozova, O. V., Chuchuev, E. S. and Patyutko, Y. I.** (2010). Deregulation of hepatocyte nuclear factor 4 (HNF4) as a marker of epithelial tumors progression. *Exp. Oncol.* **32**, 167–171.
- Le Guillou, D., Bucher, S., Begriche, K., Hoët, D., Lombès, A., Labbe, G. and Fromenty, B.** (2018). Drug-Induced Alterations of Mitochondrial DNA Homeostasis in Steatotic and Nonsteatotic HepaRG Cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **365**, 711–726.
- Lebeaupin, C., Proics, E., de Bievilte, C. H. D., Rousseau, D., Bonnafous, S., Patouraux, S., Adam, G., Lavallard, V. J., Rovere, C., Le Thuc, O., et al.** (2015). ER stress induces NLRP3 inflammasome activation and hepatocyte death. *Cell Death Dis.* **6**, e1879.

- Lee, J. H., Wada, T., Febbraio, M., He, J., Matsubara, T., Lee, M. J., Gonzalez, F. J. and Xie, W. (2010). A novel role for the dioxin receptor in fatty acid metabolism and hepatic steatosis. *Gastroenterology* **139**, 653–663.
- Lee, S., Kim, S., Hwang, S., Cherrington, N. J. and Ryu, D.-Y. (2017). Dysregulated expression of proteins associated with ER stress, autophagy and apoptosis in tissues from nonalcoholic fatty liver disease. *Oncotarget* **8**, 63370–63381.
- Lehmann, J. M., McKee, D. D., Watson, M. A., Willson, T. M., Moore, J. T. and Kliewer, S. A. (1998). The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *J. Clin. Invest.* **102**, 1016–1023.
- Leveque, X., Hochane, M., Geraldo, F., Dumont, S., Gratas, C., Oliver, L., Gaignier, C., Trichet, V., Layrolle, P., Heymann, D., et al. (2019). Low-Dose Pesticide Mixture Induces Accelerated Mesenchymal Stem Cell Aging In Vitro. *Stem Cells* **37**, 1083–1094.
- Li, H., Herrmann, T., Seeßle, J., Liebisch, G., Merle, U., Stremmel, W. and Chamulitrat, W. (2022). Role of fatty acid transport protein 4 in metabolic tissues: insights into obesity and fatty liver disease. *Biosci. Rep.* **42**, BSR20211854.
- Liao, W. and Chan, L. (2001). Tunicamycin induces ubiquitination and degradation of apolipoprotein B in HepG2 cells. *Biochem. J.* **353**, 493–501.
- Lichtenstein, D., Lasch, A., Alarcan, J., Mentz, A., Kalinowski, J., Schmidt, F. F., Pötz, O., Marx-Stoelting, P. and Braeuning, A. (2021). An eight-compound mixture but not corresponding concentrations of individual chemicals induces triglyceride accumulation in human liver cells. *Toxicology* **459**, 152857.
- Lin, T. H., Huang, Y. L. and Huang, S. F. (1996). Lipid peroxidation in liver of rats administrated with methyl mercuric chloride. *Biol. Trace Elem. Res.* **54**, 33–41.
- Lindell, M., Lang, M. and Lennernäs, H. (2003). Expression of genes encoding for drug metabolising cytochrome P450 enzymes and P-glycoprotein in the rat small intestine; comparison to the liver. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **28**, 41–48.
- Liu, J., Lu, Y.-F., Corton, J. C. and Klaassen, C. D. (2021). Expression of cytochrome P450 isozyme transcripts and activities in human livers. *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.* **51**, 279–286.
- Liu, X., Shen, H., Chen, M. and Shao, J. (2022). Clinical relevance of environmental manganese exposure with liver stiffness and steatosis detected by transient elastography in adults. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **29**, 16624–16632.
- Lu, J. and Holmgren, A. (2014). The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic. Biol. Med.* **66**, 75–87.
- Lu, C. and Li, A. P. (2001). Species comparison in P450 induction: effects of dexamethasone, omeprazole, and rifampin on P450 isoforms 1A and 3A in primary cultured hepatocytes from man, Sprague-Dawley rat, minipig, and beagle dog. *Chem. Biol. Interact.* **134**, 271–281.

- Luckert, C., Braeuning, A., de Sousa, G., Durinck, S., Katsanou, E. S., Konstantinidou, P., Machera, K., Milani, E. S., Peijnenburg, A. A. C. M., Rahmani, R., et al.** (2018). Adverse Outcome Pathway-Driven Analysis of Liver Steatosis in Vitro: A Case Study with Cyproconazole. *Chem. Res. Toxicol.* **31**, 784–798.
- Ludwig, R.D. & Thorn, G.D.** (1960). Chemistry and mode of action of Dithiocarbamate fungicides. *Adv. Pest Control Res.* **30**, 219-252
- M, S., Ae, N., Tr, S., A, N.-A., M, L. and Hc, W.** (2022). Association of blood manganese, selenium with steatosis, fibrosis in the National Health and Nutrition Examination Survey, 2017-18. *Environ. Res.* **213**,.
- Malarkey, D. E., Johnson, K., Ryan, L., Boorman, G. and Maronpot, R. R.** (2005). New insights into functional aspects of liver morphology. *Toxicol. Pathol.* **33**, 27–34.
- Manikandan, P. and Nagini, S.** (2018). Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. *Curr. Drug Targets* **19**, 38–54.
- Marciniak, S. J., Yun, C. Y., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Jungreis, R., Nagata, K., Harding, H. P. and Ron, D.** (2004). CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* **18**, 3066–3077.
- Marinovich, M., Guizzetti, M., Ghilardi, F., Viviani, B., Corsini, E. and Galli, C. L.** (1997). Thyroid peroxidase as toxicity target for dithiocarbamates. *Arch. Toxicol.* **71**, 508–512.
- Marklund, S. L.** (1982). Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 7634–7638.
- Martignoni, M., de Kanter, R., Moscone, A., Grossi, P. and Monshouwer, M.** (2005). Lack of strain-related differences in drug metabolism and efflux transporter characteristics between CD-1 and athymic nude mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **55**, 129–135.
- Martignoni, M., Groothuis, G. M. M. and de Kanter, R.** (2006). Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2**, 875–894.
- Massart, J., Begriche, K., Corlu, A. and Fromenty, B.** (2022). Xenobiotic-Induced Aggravation of Metabolic-Associated Fatty Liver Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 1062.
- Mavilia, M.** (2018). Mechanisms of progression in Non-alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterol. Hepatol. Endosc.* **3**,.
- McGarry, J. D., Mannaerts, G. P. and Foster, D. W.** (1977). A possible role for malonyl-CoA in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis. *J. Clin. Invest.* **60**, 265–270.
- Meco, G., Bonifati, V., Vanacore, N. and Fabrizio, E.** (1994). Parkinsonism after chronic exposure to the fungicide maneb (manganese ethylene-bis-dithiocarbamate). *Scand. J. Work. Environ. Health* **20**, 301–305.

- Merrell, M. D. and Cherrington, N. J.** (2011). Drug metabolism alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Drug Metab. Rev.* **43**, 317–334.
- Michaut, A., Moreau, C., Robin, M.-A. and Fromenty, B.** (2014). Acetaminophen-induced liver injury in obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* **34**, e171-179.
- Michaut, A., Le Guillou, D., Moreau, C., Bucher, S., McGill, M. R., Martinais, S., Gicquel, T., Morel, I., Robin, M.-A., Jaeschke, H., et al.** (2016). A cellular model to study drug-induced liver injury in nonalcoholic fatty liver disease: Application to acetaminophen. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **292**, 40–55.
- Mills, G. C.** (1960). Glutathione peroxidase and the destruction of hydrogen peroxide in animal tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* **86**, 1–5.
- Minato, T., Tsutsumi, M., Tsuchishima, M., Hayashi, N., Saito, T., Matsue, Y., Toshikuni, N., Arisawa, T. and George, J.** (2014). Binge Alcohol Consumption Aggravates Oxidative Stress and Promotes Pathogenesis of NASH from Obesity-Induced Simple Steatosis. *Mol. Med.* **20**, 490–502.
- Miners, J. O., Mackenzie, P. I. and Knights, K. M.** (2010). The prediction of drug-glucuronidation parameters in humans: UDP-glucuronosyltransferase enzyme-selective substrate and inhibitor probes for reaction phenotyping and in vitro-in vivo extrapolation of drug clearance and drug-drug interaction potential. *Drug Metab. Rev.* **42**, 196–208.
- Miraglia, L. J., King, F. J. and Damoiseaux, R.** (2011). Seeing the light: luminescent reporter gene assays. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **14**, 648–657.
- Morgan, E. T., MacGeoch, C. and Gustafsson, J. A.** (1985). Hormonal and developmental regulation of expression of the hepatic microsomal steroid 16 alpha-hydroxylase cytochrome P-450 apoprotein in the rat. *J. Biol. Chem.* **260**, 11895–11898.
- Mostafalou, S. and Abdollahi, M.** (2013). Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **268**, 157–177.
- Mridha, A. R., Wree, A., Robertson, A. A. B., Yeh, M. M., Johnson, C. D., Van Rooyen, D. M., Haczeyni, F., Teoh, N. C.-H., Savard, C., Ioannou, G. N., et al.** (2017). NLRP3 inflammasome blockade reduces liver inflammation and fibrosis in experimental NASH in mice. *J. Hepatol.* **66**, 1037–1046.
- Mutch, E. and Williams, F. M.** (2006). Diazinon, chlorpyrifos and parathion are metabolised by multiple cytochromes P450 in human liver. *Toxicology* **224**, 22–32.
- Naik, A., Belič, A., Zanger, U. and Rozman, D.** (2013). Molecular Interactions between NAFLD and Xenobiotic Metabolism. *Front. Genet.* **4**,.
- Nakagawa, Y. and Tayama, K.** (1997). Acute hepatotoxic potential of imazalil fungicide in rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **58**, 402–407.
- Nakagawa, H., Umemura, A., Taniguchi, K., Font-Burgada, J., Dhar, D., Ogata, H., Zhong, Z., Valasek, M. A., Seki, E., Hidalgo, J., et al.** (2014). ER stress cooperates

- with hypernutrition to trigger TNF-dependent spontaneous HCC development. *Cancer Cell* **26**, 331–343.
- Nègre-Salvayre, A., Hirtz, C., Carrera, G., Cazenave, R., Troly, M., Salvayre, R., Pénicaud, L. and Casteilla, L.** (1997). A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **11**, 809–815.
- Neuschwander-Tetri, B. A. and Caldwell, S. H.** (2003). Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology. Baltim. Md* **37**, 1202–1219.
- Greenspan, P., Mayer, E.P., Fowler S.D.** (1985) Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets (1985). *J. Cell Biol.* **100**, 965–973.
- Nimako, C., Ikenaka, Y., Okamatsu-Ogura, Y., Bariuan, J. V., Kobayashi, A., Yamazaki, R., Taira, K., Hoshi, N., Hirano, T., Nakayama, S. M. M., et al.** (2021). Chronic low-dose exposure to imidacloprid potentiates high fat diet-mediated liver steatosis in C57BL/6J male mice. *J. Vet. Med. Sci.* **83**, 487–500.
- Ota, T., Gayet, C. and Ginsberg, H. N.** (2008). Inhibition of apolipoprotein B100 secretion by lipid-induced hepatic endoplasmic reticulum stress in rodents. *J. Clin. Invest.* **118**, 316–332.
- Oteiza, P. I., Clegg, M. S., Zago, M. P. and Keen, C. L.** (2000). Zinc deficiency induces oxidative stress and AP-1 activation in 3T3 cells. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 1091–1099.
- Oyaizu, T., Shikata, N., Senzaki, H., Matsuzawa, A. and Tsubura, A.** (1997). Studies on the mechanism of dimethylnitrosamine-induced acute liver injury in mice. *Exp. Toxicol. Pathol. Off. J. Ges. Toxikol. Pathol.* **49**, 375–380.
- Ozcan, U., Yilmaz, E., Ozcan, L., Furuhashi, M., Vaillancourt, E., Smith, R. O., Görgün, C. Z. and Hotamisligil, G. S.** (2006). Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* **313**, 1137–1140.
- Pan, M., Liang Js, J., Fisher, E. A. and Ginsberg, H. N.** (2002). The late addition of core lipids to nascent apolipoprotein B100, resulting in the assembly and secretion of triglyceride-rich lipoproteins, is independent of both microsomal triglyceride transfer protein activity and new triglyceride synthesis. *J. Biol. Chem.* **277**, 4413–4421.
- Parlement Européen Règlement (UE) no 528/2012 du Parlement européen et du Conseil du 22 mai 2012 concernant la mise à disposition sur le marché et l'utilisation des produits biocides** Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE 123
- Pérez-Carreras, M., Del Hoyo, P., Martín, M. A., Rubio, J. C., Martín, A., Castellano, G., Colina, F., Arenas, J. and Solis-Herruzo, J. A.** (2003). Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **38**, 999–1007.

- Pirozzi, A. V. A., Stellavato, A., La Gatta, A., Lamberti, M. and Schiraldi, C.** (2016). Mancozeb, a fungicide routinely used in agriculture, worsens nonalcoholic fatty liver disease in the human HepG2 cell model. *Toxicol. Lett.* **249**, 1–4.
- Pisoschi, A. M. and Pop, A.** (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur. J. Med. Chem.* **97**, 55–74.
- Pohl, J., Ring, A. and Stremmel, W.** (2002). Uptake of long-chain fatty acids in HepG2 cells involves caveolae: analysis of a novel pathway. *J. Lipid Res.* **43**, 1390–1399.
- Poljsak, B., Šuput, D. and Milisav, I.** (2013). Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, 956792.
- Pollard, M. G., Travers, K. J. and Weissman, J. S.** (1998). Ero1p: A Novel and Ubiquitous Protein with an Essential Role in Oxidative Protein Folding in the Endoplasmic Reticulum. *Mol. Cell* **1**, 171–182.
- Pradet-Balade, B., Boulmé, F., Beug, H., Müllner, E. W. and Garcia-Sanz, J. A.** (2001). Translation control: bridging the gap between genomics and proteomics? *Trends Biochem. Sci.* **26**, 225–229.
- Prousek, J.** (2007). Fenton chemistry in biology and medicine. *Pure Appl. Chem.* **79**, 2325–2338.
- Quesnot, N., Bucher, S., Gade, C., Vlach, M., Vene, E., Valença, S., Gicquel, T., Holst, H., Robin, M.-A. and Loyer, P.** (2018). Production of chlorzoxazone glucuronides via cytochrome P4502E1 dependent and independent pathways in human hepatocytes. *Arch. Toxicol.* **92**, 3077–3091.
- Radice, S., Marabini, L., Gervasoni, M., Ferraris, M. and Chiesara, E.** (1998). Adaptation to oxidative stress: effects of vinclozolin and iprodione on the HepG2 cell line. *Toxicology* **129**, 183–191.
- Radović, B., Hussong, R., Gerhäuser, C., Meinel, W., Frank, N., Becker, H. and Köhrle, J.** (2010). Xanthohumol, a prenylated chalcone from hops, modulates hepatic expression of genes involved in thyroid hormone distribution and metabolism. *Mol. Nutr. Food Res.* **54 Suppl 2**, S225–235.
- Ramsay, R. R. and Singer, T. P.** (1992). Relation of superoxide generation and lipid peroxidation to the inhibition of NADH-Q oxidoreductase by rotenone, piericidin A, and MPP+. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**, 47–52.
- Rauen, U., Petrat, F., Sustmann, R. and de Groot, H.** (2004). Iron-induced mitochondrial permeability transition in cultured hepatocytes. *J. Hepatol.* **40**, 607–615.
- Reffstrup, T. K., Larsen, J. C. and Meyer, O.** (2010). Risk assessment of mixtures of pesticides. Current approaches and future strategies. *Regul. Toxicol. Pharmacol. RTP* **56**, 174–192.

- Rendic, S. and Guengerich, F. P.** (2015). Survey of Human Oxidoreductases and Cytochrome P450 Enzymes Involved in the Metabolism of Xenobiotic and Natural Chemicals. *Chem. Res. Toxicol.* **28**, 38–42.
- Rendic, S. P. and Guengerich, F. P.** (2021). Human Family 1-4 cytochrome P450 enzymes involved in the metabolic activation of xenobiotic and physiological chemicals: an update. *Arch. Toxicol.* **95**, 395–472.
- ReportBuyer** (2015) Fungicides Market (Mancozeb, Chlorothalonil, Metalaxyl, Strobilurin, and Others) for Cereals & Grains, Oilseeds & Pulses, Fruits & Vegetables, and Other Crops - Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends and Forecast 2015 - 2023.
- Ribeiro, P. S., Cortez-Pinto, H., Solá, S., Castro, R. E., Ramalho, R. M., Baptista, A., Moura, M. C., Camilo, M. E. and Rodrigues, C. M. P.** (2004). Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors, and activation of NF-kappaB in the liver of nonalcoholic and alcoholic steatohepatitis patients. *Am. J. Gastroenterol.* **99**, 1708–1717.
- Ricchi, M., Odoardi, M. R., Carulli, L., Anzivino, C., Ballestri, S., Pinetti, A., Fantoni, L. I., Marra, F., Bertolotti, M., Banni, S., et al.** (2009). Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **24**, 830–840.
- Rives, C., Fougerat, A., Ellero-Simatos, S., Loiseau, N., Guillou, H., Gamet-Payraastre, L. and Wahli, W.** (2020). Oxidative Stress in NAFLD: Role of Nutrients and Food Contaminants. *Biomolecules* **10**, E1702.
- Rizzati, V., Briand, O., Guillou, H. and Gamet-Payraastre, L.** (2016). Effects of pesticide mixtures in human and animal models: an update of the recent literature. *Chem. Biol. Interact.* **254**, 231–246.
- Roede, J. R., Hansen, J. M., Go, Y.-M. and Jones, D. P.** (2011). Maneb and paraquat-mediated neurotoxicity: involvement of peroxiredoxin/thioredoxin system. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **121**, 368–375.
- Rouimi, P., Zucchini-Pascal, N., Dupont, G., Razpotnik, A., Fouché, E., De Sousa, G. and Rahmani, R.** (2012). Impacts of low doses of pesticide mixtures on liver cell defence systems. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* **26**, 718–726.
- Rowland, A., Miners, J. O. and Mackenzie, P. I.** (2013). The UDP-glucuronosyltransferases: their role in drug metabolism and detoxification. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **45**, 1121–1132.
- Runkle, J., Flocks, J., Economos, J. and Dunlop, A. L.** (2017). A systematic review of Mancozeb as a reproductive and developmental hazard. *Environ. Int.* **99**, 29–42.
- Rus, D. A., Sastre, J., Viña, J. and Pallardó, F. V.** (2007). Induction of mitochondrial xanthine oxidase activity during apoptosis in the rat mammary gland. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **12**, 1184–1189.

- Rushmore, T. H. and Pickett, C. B.** (1990). Transcriptional regulation of the rat glutathione S-transferase Ya subunit gene. Characterization of a xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by phenolic antioxidants. *J. Biol. Chem.* **265**, 14648–14653.
- Rutkowski, D. T., Wu, J., Back, S.-H., Callaghan, M. U., Ferris, S. P., Iqbal, J., Clark, R., Miao, H., Hassler, J. R., Fornek, J., et al.** (2008). UPR pathways combine to prevent hepatic steatosis caused by ER stress-mediated suppression of transcriptional master regulators. *Dev. Cell* **15**, 829–840.
- Saber, T. M., Abo-Elmaaty, A. M. A. and Abdel-Ghany, H. M.** (2019). Curcumin mitigates mancozeb-induced hepatotoxicity and genotoxicity in rats. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **183**, 109467.
- Sams, C., Cocker, J. and Lennard, M. S.** (2004). Biotransformation of chlorpyrifos and diazinon by human liver microsomes and recombinant human cytochrome P450s (CYP). *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.* **34**, 861–873.
- Santra, A., Maiti, A., Das, S., Lahiri, S., Charkaborty, S. K. and Mazumder, D. N.** (2000). Hepatic damage caused by chronic arsenic toxicity in experimental animals. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **38**, 395–405.
- Sarath Chandran, C., Thomas, S. and Unni, M. R.** (2019). Pesticides: Classification, Detection, and Degradation. In *Organic Farming: New Advances Towards Sustainable Agricultural Systems* (ed. Sarath Chandran, C., Thomas, S.), and Unni, M. R.), pp. 71–87. Cham: Springer International Publishing.
- Satapati, S., Kucejova, B., Duarte, J. A. G., Fletcher, J. A., Reynolds, L., Sunny, N. E., He, T., Nair, L. A., Livingston, K., Fu, X., et al.** (2015). Mitochondrial metabolism mediates oxidative stress and inflammation in fatty liver. *J. Clin. Invest.* **125**, 4447–4462.
- Schaefer, J., Jackson, S., Taroni, F., Swift, P. and Turnbull, D. M.** (1997). Characterisation of carnitine palmitoyltransferases in patients with a carnitine palmitoyltransferase deficiency: implications for diagnosis and therapy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **62**, 169–176.
- Schenborn, E. and Groskreutz, D.** (1999). Reporter gene vectors and assays. *Mol. Biotechnol.* **13**, 29–44.
- Sefi, M., Elwej, A., Chaâbane, M., Bejaoui, S., Marrekchi, R., Jamoussi, K., Gouiaa, N., Boudawara-Sellemi, T., El Cafsi, M., Zeghal, N., et al.** (2019). Beneficial role of vanillin, a polyphenolic flavoring agent, on maneb-induced oxidative stress, DNA damage, and liver histological changes in Swiss albino mice. *Hum. Exp. Toxicol.* **38**, 619–631.
- Sefi, M., Chaâbane, M., Elwej, A., Bejaoui, S., Marrekchi, R., Jamoussi, K., Gouiaa, N., Boudawara Sellami, T., El Cafsi, M., Zeghal, N., et al.** (2020). Zinc alleviates maneb-induced kidney injury in adult mice through modulation of oxidative stress, genotoxicity, and histopathological changes. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **27**, 8091–8102.

- Seifert, E. L., Estey, C., Xuan, J. Y. and Harper, M.-E.** (2010). Electron Transport Chain-dependent and -independent Mechanisms of Mitochondrial H₂O₂ Emission during Long-chain Fatty Acid Oxidation. *J. Biol. Chem.* **285**, 5748–5758.
- Sharma, N. K., Das, S. K., Mondal, A. K., Hackney, O. G., Chu, W. S., Kern, P. A., Rasouli, N., Spencer, H. J., Yao-Borengasser, A. and Elbein, S. C.** (2008). Endoplasmic reticulum stress markers are associated with obesity in nondiabetic subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**, 4532–4541.
- Sharma, A., Kumar, V., Shahzad, B., Tanveer, M., Sidhu, G. P. S., Handa, N., Kohli, S. K., Yadav, P., Bali, A. S., Parihar, R. D., et al.** (2019). Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Appl. Sci.* **1**, 1446.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M. and Dowd, C. A.** (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* **360**, 1–16.
- Shelby, M. K. and Klaassen, C. D.** (2006). Induction of rat UDP-glucuronosyltransferases in liver and duodenum by microsomal enzyme inducers that activate various transcriptional pathways. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **34**, 1772–1778.
- Shi, X., Wahlang, B., Wei, X., Yin, X., Falkner, K. C., Prough, R. A., Kim, S. H., Mueller, E. G., McClain, C. J., Cave, M., et al.** (2012). Metabolomic Analysis of the Effects of Polychlorinated Biphenyls in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *J. Proteome Res.* **11**, 3805–3815.
- Shimizu, S., Narita, M. and Tsujimoto, Y.** (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* **399**, 483–487.
- Sidrauski, C. and Walter, P.** (1997). The Transmembrane Kinase Ire1p Is a Site-Specific Endonuclease That Initiates mRNA Splicing in the Unfolded Protein Response. *Cell* **90**, 1031–1039.
- Sies, H.** (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am. J. Med.* **91**, 31S–38S.
- Sinal, C. J., Tohkin, M., Miyata, M., Ward, J. M., Lambert, G. and Gonzalez, F. J.** (2000). Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell* **102**, 731–744.
- Sitaramaraju, S.** (2014). IMPACT OF PESTICIDES USED FOR CROP PRODUCTION ON THE ENVIRONMENT. 5.
- Slee, E. A., Adrain, C. and Martin, S. J.** (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J. Biol. Chem.* **276**, 7320–7326.
- Somerville, L.** (1986). The metabolism of fungicides. *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.* **16**, 1017–1030.

- Song, B., Scheuner, D., Ron, D., Pennathur, S. and Kaufman, R. J.** (2008). *Chop* deletion reduces oxidative stress, improves β cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes. *J. Clin. Invest.* **118**, 3378–3389.
- Stanger, B. Z.** (2015). Cellular homeostasis and repair in the mammalian liver. *Annu. Rev. Physiol.* **77**, 179–200.
- Starkov, A. A. and Fiskum, G.** (2001). Myxothiazol Induces H₂O₂ Production from Mitochondrial Respiratory Chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **281**, 645–650.
- Strand, S., Hofmann, W. J., Grambihler, A., Hug, H., Volkmann, M., Otto, G., Wesch, H., Mariani, S. M., Hack, V., Stremmel, W., et al.** (1998). Hepatic failure and liver cell damage in acute Wilson's disease involve CD95 (APO-1/Fas) mediated apoptosis. *Nat. Med.* **4**, 588–593.
- Straub, B. K., Stoeffel, P., Heid, H., Zimbelmann, R. and Schirmacher, P.** (2008). Differential pattern of lipid droplet-associated proteins and de novo perilipin expression in hepatocyte steatogenesis. *Hepatol. Baltim. Md* **47**, 1936–1946.
- Sueyoshi, T., Kawamoto, T., Zelko, I., Honkakoski, P. and Negishi, M.** (1999). The repressed nuclear receptor CAR responds to phenobarbital in activating the human CYP2B6 gene. *J. Biol. Chem.* **274**, 6043–6046.
- Sugatani, J., Yamakawa, K., Tonda, E., Nishitani, S., Yoshinari, K., Degawa, M., Abe, I., Noguchi, H. and Miwa, M.** (2004). The induction of human UDP-glucuronosyltransferase 1A1 mediated through a distal enhancer module by flavonoids and xenobiotics. *Biochem. Pharmacol.* **67**, 989–1000.
- Tang, J., Cao, Y., Rose, R. L., Brimfield, A. A., Dai, D., Goldstein, J. A. and Hodgson, E.** (2001). Metabolism of chlorpyrifos by human cytochrome P450 isoforms and human, mouse, and rat liver microsomes. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **29**, 1201–1204.
- Tang, J., Hu, P., Li, Y., Win-Shwe, T.-T. and Li, C.** (2017). Ion Imbalance Is Involved in the Mechanisms of Liver Oxidative Damage in Rats Exposed to Glyphosate. *Front. Physiol.* **8**, 1083.
- Tanner, N., Kubik, L., Luckert, C., Thomas, M., Hofmann, U., Zanger, U. M., Böhmert, L., Lampen, A. and Braeuning, A.** (2018). Regulation of Drug Metabolism by the Interplay of Inflammatory Signaling, Steatosis, and Xeno-Sensing Receptors in HepaRG Cells. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **46**, 326–335.
- Tauchi-Sato, K., Ozeki, S., Houjou, T., Taguchi, R. and Fujimoto, T.** (2002). The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition. *J. Biol. Chem.* **277**, 44507–44512.
- Thind, T. S. and Hollomon, D. W.** (2018). Thiocarbamate fungicides: reliable tools in resistance management and future outlook. *Pest Manag. Sci.* **74**, 1547–1551.
- Tolman, K. G. and Sirrine, R. W.** (1998). OCCUPATIONAL HEPATOTOXICITY. *Clin. Liver Dis.* **2**, 563–589.

- Tompkins, L. M. and Wallace, A. D.** (2007). Mechanisms of cytochrome P450 induction. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **21**, 176–181.
- Tu, B. P. and Weissman, J. S.** (2004). Oxidative protein folding in eukaryotes. *J. Cell Biol.* **164**, 341–346.
- Turgan, N., Boydak, B., Habif, S., Gültür, C., Senol, B., Mutaf, I., Ozmen, D. and Bayindir, O.** (1999). Urinary hypoxanthine and xanthine levels in acute coronary syndromes. *Int. J. Clin. Lab. Res.* **29**, 162–165.
- Ussing, H. H. and Zerahn, K.** (1951). Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol. Scand.* **23**, 110–127.
- Valm, A. M., Cohen, S., Legant, W. R., Melunis, J., Hershberg, U., Wait, E., Cohen, A. R., Davidson, M. W., Betzig, E. and Lippincott-Schwartz, J.** (2017). Applying systems-level spectral imaging and analysis to reveal the organelle interactome. *Nature* **546**, 162–167.
- Van Nieuwenhoven, F. A., Verstijnen, C. P., Abumrad, N. A., Willemsen, P. H., Van Eys, G. J., Van der Vusse, G. J. and Glatz, J. F.** (1995). Putative membrane fatty acid translocase and cytoplasmic fatty acid-binding protein are co-expressed in rat heart and skeletal muscles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **207**, 747–752.
- Vera-Herrera, L., Sadutto, D. and Picó, Y.** (2021). Non-Occupational Exposure to Pesticides: Experimental Approaches and Analytical Techniques (from 2019). *Mol. Basel Switz.* **26**, 3688.
- Verfaillie, T., Rubio, N., Garg, A. D., Bultynck, G., Rizzuto, R., Decuypere, J.-P., Piette, J., Linehan, C., Gupta, S., Samali, A., et al.** (2012). PERK is required at the ER-mitochondrial contact sites to convey apoptosis after ROS-based ER stress. *Cell Death Differ.* **19**, 1880–1891.
- Violante, S., Ijlst, L., van Lenthe, H., de Almeida, I. T., Wanders, R. J. and Ventura, F. V.** (2010). Carnitine palmitoyltransferase 2: New insights on the substrate specificity and implications for acylcarnitine profiling. *Biochim. Biophys. Acta* **1802**, 728–732.
- von Harsdorf, R., Li, P. F. and Dietz, R.** (1999). Signaling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis. *Circulation* **99**, 2934–2941.
- Wada, F., Shibata, H., Goto, M. and Sakamoto, Y.** (1968). Participation of the microsomal electron transport system involving cytochrome P-450 in ω -oxidation of fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **162**, 518–524.
- Wanders, R. J. A., Vaz, F. M., Waterham, H. R. and Ferdinandusse, S.** (2020). Fatty Acid Oxidation in Peroxisomes: Enzymology, Metabolic Crosstalk with Other Organelles and Peroxisomal Disorders. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1299**, 55–70.
- Wang, H., Faucette, S., Sueyoshi, T., Moore, R., Ferguson, S., Negishi, M. and LeCluyse, E. L.** (2003). A novel distal enhancer module regulated by pregnane X receptor/constitutive androstane receptor is essential for the maximal induction of CYP2B6 gene expression. *J. Biol. Chem.* **278**, 14146–14152.

- Wang, Y.-D., Chen, W.-D., Wang, M., Yu, D., Forman, B. M. and Huang, W.** (2008). Farnesoid X receptor antagonizes NF- κ B in hepatic inflammatory response. *Hepatology*. *Baltim. Md* **48**, 1632–1643.
- Wanless, I. R. and Lentz, J. S.** (1990). Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. *Hepatology*. *Baltim. Md* **12**, 1106–1110.
- Washington, T. and Tchounwou, P. B.** (2004). Cytotoxicity and transcriptional activation of stress genes in human liver carcinoma (HepG2) cells exposed to iprodione. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* **1**, 12–20.
- Watt, A. J., Garrison, W. D. and Duncan, S. A.** (2003). HNF4: a central regulator of hepatocyte differentiation and function. *Hepatology*. *Baltim. Md* **37**, 1249–1253.
- Weisiger, R. A. and Fridovich, I.** (1973). Mitochondrial Superoxide Dismutase: SITE OF SYNTHESIS AND INTRAMITOCHONDRIAL LOCALIZATION. *J. Biol. Chem.* **248**, 4793–4796.
- Wells, P. G., Mackenzie, P. I., Chowdhury, J. R., Guillemette, C., Gregory, P. A., Ishii, Y., Hansen, A. J., Kessler, F. K., Kim, P. M., Chowdhury, N. R., et al.** (2004). Glucuronidation and the UDP-glucuronosyltransferases in health and disease. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **32**, 281–290.
- Wieckowska, A., Zein, N. N., Yerian, L. M., Lopez, A. R., McCullough, A. J. and Feldstein, A. E.** (2006). In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. *Baltim. Md* **44**, 27–33.
- Wieckowska, A., Papouchado, B. G., Li, Z., Lopez, R., Zein, N. N. and Feldstein, A. E.** (2008). Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis. *Am. J. Gastroenterol.* **103**, 1372–1379.
- Willy, J. A., Young, S. K., Stevens, J. L., Masuoka, H. C. and Wek, R. C.** (2015). CHOP links endoplasmic reticulum stress to NF- κ B activation in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Mol. Biol. Cell* **26**, 2190–2204.
- Woolsey, S. J., Mansell, S. E., Kim, R. B., Tirona, R. G. and Beaton, M. D.** (2015). CYP3A Activity and Expression in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **43**, 1484–1490.
- World Health Organization. Programme of Food Safety and Food Aid, Programme, G. E. M. S. F. C. M. and A. and Residues, J. F. C. A. C. C. on P.** (1997). *Guide pour le calcul prévisionnel des quantités de résidus de pesticides apportées par l'alimentation*. Organisation mondiale de la Santé.
- Wu, D. and Cederbaum, A. I.** (1999). Ethanol-induced apoptosis to stable HepG2 cell lines expressing human cytochrome P-450E1. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **23**, 67–76.
- Xie, W., Barwick, J. L., Simon, C. M., Pierce, A. M., Safe, S., Blumberg, B., Guzelian, P. S. and Evans, R. M.** (2000). Reciprocal activation of Xenobiotic response genes by nuclear receptors SXR/PXR and CAR. *Genes Dev.* **14**, 3014–3023.

- Yahia, D., El-Amir, Y. O. and Rushdi, M.** (2019). Mancozeb fungicide-induced genotoxic effects, metabolic alterations, and histological changes in the colon and liver of Sprague Dawley rats. *Toxicol. Ind. Health* **35**, 265–276.
- Yamaguchi, K., Yang, L., McCall, S., Huang, J., Yu, X. X., Pandey, S. K., Bhanot, S., Monia, B. P., Li, Y.-X. and Diehl, A. M.** (2007). Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **45**, 1366–1374.
- Yao, Z. and Wang, Y.** (2012). Apolipoprotein C-III and hepatic triglyceride-rich lipoprotein production. *Curr. Opin. Lipidol.* **23**, 206–212.
- Yin, L., Dai, Q., Jiang, P., Zhu, L., Dai, H., Yao, Z., Liu, H., Ma, X., Qu, L. and Jiang, J.** (2018). Manganese exposure facilitates microglial JAK2-STAT3 signaling and consequent secretion of TNF- α and IL-1 β to promote neuronal death. *Neurotoxicology* **64**, 195–203.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T. and Mori, K.** (2001). XBP1 mRNA Is Induced by ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor. *Cell* **107**, 881–891.
- Younossi, Z. M., Koenig, A. B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L. and Wymer, M.** (2016). Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* **64**, 73–84.
- Zago, M. P. and Oteiza, P. I.** (2001). The antioxidant properties of zinc: interactions with iron and antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 266–274.
- Zhang, J., Fitsanakis, V. A., Gu, G., Jing, D., Ao, M., Amarnath, V. and Montine, T. J.** (2003). Manganese ethylene-bis-dithiocarbamate and selective dopaminergic neurodegeneration in rat: a link through mitochondrial dysfunction. *J. Neurochem.* **84**, 336–346.
- Zhang, X.-Q., Xu, C.-F., Yu, C.-H., Chen, W.-X. and Li, Y.-M.** (2014). Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* **20**, 1768–1776.
- Zhang, D., Wu, S., Lan, Y., Chen, S., Wang, Y., Sun, Y., Liao, W. and Wang, L.** (2022). Blood manganese and nonalcoholic fatty liver disease: A cohort-based case-control study. *Chemosphere* **287**, 132316.
- Zhao, Y., Wendling, L. and Wang, C.** (2017). Behavior of chlorpyrifos and its major metabolite TCP (3,5,6-trichloro-2-pyridinol) in agricultural soils amended with drinking water treatment residuals. *J. Soils Sediments* **17**,.
- Zhao, L., Zhang, C., Luo, X., Wang, P., Zhou, W., Zhong, S., Xie, Y., Jiang, Y., Yang, P., Tang, R., et al.** (2018). CD36 palmitoylation disrupts free fatty acid metabolism and promotes tissue inflammation in non-alcoholic steatohepatitis. *J. Hepatology* **69**, 705–717.

- Zhao, H., Chen, L., Yang, T., Feng, Y.-L., Vaziri, N. D., Liu, B.-L., Liu, Q.-Q., Guo, Y. and Zhao, Y.-Y.** (2019). Aryl hydrocarbon receptor activation mediates kidney disease and renal cell carcinoma. *J. Transl. Med.* **17**, 302.
- Zhao, M., Ma, J., Li, M., Zhang, Y., Jiang, B., Zhao, X., Huai, C., Shen, L., Zhang, N., He, L., et al.** (2021). Cytochrome P450 Enzymes and Drug Metabolism in Humans. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 12808.
- Zhou, S. L., Gordon, R. E., Bradbury, M., Stump, D., Kiang, C. L. and Berk, P. D.** (1998a). Ethanol up-regulates fatty acid uptake and plasma membrane expression and export of mitochondrial aspartate aminotransferase in HepG2 cells. *Hepatology*. *Baltimore, Md* **27**, 1064–1074.
- Zhou, M., Fisher, E. A. and Ginsberg, H. N.** (1998b). Regulated Co-translational ubiquitination of apolipoprotein B100. A new paradigm for proteasomal degradation of a secretory protein. *J. Biol. Chem.* **273**, 24649–24653.
- Zhou, J., Zhai, Y., Mu, Y., Gong, H., Uppal, H., Toma, D., Ren, S., Evans, R. M. and Xie, W.** (2006). A novel pregnane X receptor-mediated and sterol regulatory element-binding protein-independent lipogenic pathway. *J. Biol. Chem.* **281**, 15013–15020.
- Zollner, G., Fickert, P., Silbert, D., Fuchsbichler, A., Marschall, H. U., Zatloukal, K., Denk, H. and Trauner, M.** (2003). Adaptive changes in hepatobiliary transporter expression in primary biliary cirrhosis. *J. Hepatology*. **38**, 717–727.
- Zorov, D. B., Juhaszova, M. and Sollott, S. J.** (2014). Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol. Rev.* **94**, 909–950.

Evaluations des effets cytotoxiques et métaboliques des dithiocarbamates manèbe et mancozèbe dans des modèles *in vitro* de cellules hépatiques.

L'utilisation intensive des pesticides génère une contamination des denrées alimentaires, une exposition de l'Homme à ces contaminants environnementaux et un problème de santé majeur. L'EFSA a établi pour chaque pesticide une dose journalière admissible (DJA), qui est un seuil de sécurité théorique pour la santé humaine. Néanmoins, la DJA ne tient pas compte des effets cumulatifs potentiels des mélanges de pesticides. Le premier objectif de cette étude était d'évaluer les effets d'un mélange de pesticides fréquemment retrouvé dans l'alimentation humaine (chlorpyrifos, diméthoate, iprodione, imazalil, diazinon, manèbe, mancozèbe) dans des modèles hépatocytaires. En utilisant des cellules HepaRG différenciées, nous avons mis en évidence un effet cytotoxique majeur du mélange suite à une exposition unique à de faibles concentrations extrapolées à partir de la DJA. De plus, nous avons démontré que la toxicité de ce mélange est portée par les dithiocarbamates (Mn-EBDC), le manèbe et le mancozèbe, qui contiennent du manganèse. Une exposition aiguë au mélange, Mn-EBDC ou chlorure de manganèse (MnCl₂) induit une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène, qui a conduit à la mort cellulaire par apoptose. Nous avons également montré une surcharge intracellulaire/mitochondriale de manganèse concomitante à une diminution intracellulaire des niveaux de zinc suite à une exposition au manèbe ou au MnCl₂. Enfin, une co-exposition avec du chlorure de zinc (ZnCl₂) a partiellement restauré les niveaux intracellulaires/mitochondriaux de manganèse et prévient la toxicité induite par les Mn-EBDC. Dans une seconde étude, nous avons utilisé un modèle de stéatose des cellules HepaRG induite par les acides oléique et stéarique et démontré que l'exposition chronique au mélange pesticide, Mn-EBDC ou MnCl₂ aggravait la stéatose induite par ces acides gras (AG) en l'absence de cytotoxicité. Le mécanisme impliquait une absorption accrue de AG et l'inhibition de la sécrétion de VLDL. De plus, nous avons constaté que l'exposition à des concentrations non cytotoxiques du mélange de pesticides ou de MnCl₂ (\leq ADI/10) réduisait fortement l'expression et les activités enzymatiques des CYP2E1, CYP3A4 ou CYP2B6. Fait intéressant, ces inhibitions étaient associées à une réduction de l'expression des régulateurs transcriptionnels PXR et CAR des CYP. Ces altérations des enzymes de phase I par le mélange de pesticides réduisaient le catabolisme du diazinon. L'ensemble de ces résultats a démontré que les expositions aux Mn-EBDC et au MnCl₂ produisent des effets cytotoxiques et altèrent les métabolismes des lipides et des xénobiotiques dans les hépatocytes humains *in vitro*.

Mots clés : dithiocarbamates, manèbe, mancozèbe, manganèse, apoptose, hépatocytes, stéatose

Evaluations of cytotoxic and metabolic effects of maneb and mancozeb dithiocarbamates in models of liver cells *in vitro*.

The worldwide and intensive use of pesticides results in their dissemination in food as residues. Therefore, human exposure to these environmental contaminants is a major health issue. EFSA established for each pesticide an Acceptable Daily Intake (ADI), which is a theoretical safety threshold for human health. Nevertheless, ADI does not consider potential cumulative effects of pesticide mixtures. The first aim of this study was to evaluate the effects of a low-dose pesticide mixture, frequently found in human food (chlorpyrifos, dimethoate, iprodione, imazalil, diazinon, maneb, mancozeb) in human hepatic cell models. Using differentiated HepaRG cells, we unveiled a major cytotoxic effect of the mixture following a single exposure at low concentrations extrapolated from the ADI. Moreover, we demonstrated that the toxicity of this mixture is carried by dithiocarbamates (Mn-EBDC) maneb and mancozeb, which contain manganese. Acute exposure to the mixture, Mn-EBDC or manganese chloride (MnCl₂) triggered the production of reactive oxygen species, which led to cell death by intrinsic apoptosis. We also showed an intracellular/mitochondrial overload of manganese concomitantly with an intracellular decrease in zinc levels following a single exposure to maneb or MnCl₂. Finally, a co-exposure with zinc chloride (ZnCl₂) partially restored manganese intracellular/ mitochondrial levels which was sufficient to alleviate manganese overload-induced toxicity. In a second study, we used a model of steatosis in HepaRG cells induced by oleic and stearic acids and demonstrated that chronic exposure to the pesticide mixture, Mn-EBDC or MnCl₂ aggravated steatosis induced by these fatty acids (FA) in absence of cytotoxicity. The mechanism involved an increased uptake of FA and the inhibition of VLDL secretion. In addition, we found that exposure to non-cytotoxic concentrations of pesticide mixture and MnCl₂ (\leq ADI/10) strongly reduced the expression and enzymatic activities of CYP2E1, CYP3A4 or CYP2B6. Interestingly, these inhibitions were associated with reduction in the expression of PXR and CAR transcriptional regulators of CYP. These alterations of phase I enzymes by the pesticide mixture reduced the catabolism of diazinon. Together, these results demonstrated that the expositions to Mn-EBDC and MnCl₂ triggered cytotoxic effects and alteration of the lipid and xenobiotic metabolisms in human hepatocytes *in vitro*.

Key words : dithiocarbamates, maneb, mancozeb, manganese, apoptosis, hepatocytes, steatosis