



**HAL**  
open science

# Effets des polluants organiques persistants sur le métabolisme de l'alcool et des glucides dans le foie

Éléonore Abla Attignon

► **To cite this version:**

Éléonore Abla Attignon. Effets des polluants organiques persistants sur le métabolisme de l'alcool et des glucides dans le foie. Toxicologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCB159 . tel-04476191

**HAL Id: tel-04476191**

**<https://theses.hal.science/tel-04476191>**

Submitted on 24 Feb 2024

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

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



UNIVERSITÉ  
**PARIS  
DESCARTES**

MEMBRE DE

**USPC**  
Université Sorbonne  
Paris Cité

**Université Paris Descartes**  
**Faculté des Sciences Fondamentales et Biomédicales**

*Ecole Doctorale « Médicament-Toxicologie-Chimie-Imageries »*  
*ED MTCI n°563*

*THESE*  
*Pour obtenir le grade de*  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES**  
Biologie - Toxicologie

Présentée et soutenue publiquement par

**Eléonore Abla ATTIGNON**

Le 25 novembre 2016

Effets des polluants organiques persistants sur le  
métabolisme de l'alcool et des glucides dans le foie

**JURY**

Docteur Anne-Marie CASSARD-DOULCIER  
Docteur Dominique LAGADIC-GOSSMANN  
Professeur Armelle BAEZA  
Docteur Christelle MONTEIL  
Docteur Martine AGGERBECK  
Docteur Etienne BLANC

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Directeur de thèse  
Co-Directeur de thèse





## Table des matières

<b>Préambule - contexte</b> .....	<b>4</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>8</b>
<b>I. Le foie et les pathologies associées</b> .....	<b>8</b>
I.1 Anatomie .....	8
I.2 Les cellules du foie .....	10
I.3 Fonctions du foie .....	11
I.4 Les pathologies hépatiques non alcooliques .....	15
<b>II. Les polluants organiques persistants</b> .....	<b>26</b>
II.1 Les actions gouvernementales pour lutter contre la pollution d'origine anthropiques .....	26
II.2 Les dioxines .....	28
II.3 Les polychlorobiphényles (PCB) .....	37
II.4 L'endosulfan .....	41
<b>III. Les récepteurs des polluants</b> .....	<b>45</b>
III.1 Récepteur AhR .....	45
III.1.1 Structure et ligands du récepteur .....	45
III.1.2 Mode d'action .....	46
III.1.3 Rôles du AhR .....	50
III.2 Récepteurs nucléaires .....	56
III.2.1 La voie de signalisation des œstrogènes .....	58
III.2.2 Interactions ER et AhR .....	62
<b>IV. L'éthanol</b> .....	<b>63</b>
IV.1 Généralités .....	63
IV.2 Métabolisme .....	64
IV.3 Les effets délétères de l'alcool .....	68
IV.3.1 Toxicité .....	70
IV.3.2 Pathologies hépatiques liées à l'alcool .....	70
IV.3.3 Les bases moléculaires impliquées dans la toxicité de l'alcool .....	72
<b>V. La cytokine Transforming Growth Factor Beta 1 (TGF-β1)</b> .....	<b>76</b>
V.1 Synthèse et sécrétion extracellulaire .....	76
V.2 Le rôle des Latent TGF-β binding proteins (LTBP) .....	79
V.3 Activation de la voie de signalisation du TGF-β .....	80
V.4 Les protéines SMAD .....	84
V.5 Régulation de l'expression de gènes par la voie de signalisation du TGF-β .....	86
V.6 Pathologies hépatiques liées au TGF-β .....	88
<b>Objectif de thèse</b> .....	<b>94</b>
<b>Modèle utilisé</b> .....	<b>95</b>
<b>Partie 1</b> .....	<b>98</b>
<b>Rôle du AhR dans la régulation de l'expression des enzymes du métabolisme de l'alcool et des rétinoïdes en présence de xénobiotiques</b> .....	<b>98</b>
<b>I. Introduction</b> .....	<b>99</b>
<b>II. Conclusion-Perspectives</b> .....	<b>104</b>
II.1 Les Rétinoïdes .....	105

II.2	Métabolisme .....	106
II.3	Fonction .....	107
II.4	Effet d'une dérégulation .....	109
II.5	Interaction entre la voie du AhR et le métabolisme des rétinoïdes .....	111
II.6	Résultats préliminaires sur ADH et métabolisme des rétinoïdes.....	111
<b>III.</b>	<b>Etude préliminaire des promoteurs des ADH.....</b>	<b>113</b>
III.1	Mesure de l'activité du promoteur du gène de l'ADH4 .....	113
III.2	Niveau d'expression des ADH et du CYP2E1 et pathologies .....	115
<b>Partie 2</b>	<b>.....</b>	<b>118</b>
	<b>Implication de la voie du TGF-<math>\beta</math>1 dans la diminution de l'expression des ADH en présence de TCDD .....</b>	<b>118</b>
<b>I.</b>	<b>Matériel et Méthodes .....</b>	<b>119</b>
<b>II.</b>	<b>Résultats .....</b>	<b>124</b>
<b>III.</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>134</b>
<b>Partie 3</b>	<b>.....</b>	<b>140</b>
	<b>Etude mécanistique des effets d'un mélange de POP sur le métabolisme du glucose dans la lignée hépatique humaine HepaRG .....</b>	<b>140</b>
<b>I.</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>141</b>
I.1	La problématique des mélanges de polluants .....	141
I.2	Métabolisme glucidique.....	142
I.2.1	Glycolyse .....	143
I.2.2	Néoglucogenèse.....	144
I.2.3	Glycogénogenèse et glycogénolyse .....	144
<b>II.</b>	<b>Résultats .....</b>	<b>146</b>
<b>III.</b>	<b>Conclusion et Perspectives .....</b>	<b>151</b>
<b>Conclusion Générale – Perspectives</b>	<b>.....</b>	<b>157</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>.....</b>	<b>167</b>

## Table des Figures

Figure 1 : Schéma représentatif d'un lobule hépatique.....	7
Figure 2 : Schéma histologique d'une coupe de foie.....	9
Figure 3 : Schéma représentant la structure d'une travée hépatocyttaire et des sinusoides.....	9
Figure 4 : Représentation schématique du métabolisme des xénobiotiques dans la cellule hépatique pour favoriser leur élimination. ....	13
Figure 5 : Métabolisme des triglycérides à l'origine de la stéatose hépatique.....	18
Figure 6 : Mécanismes moléculaires du développement des maladies non alcooliques du foie..	18
Figure 7 : Structures chimiques des polluants et familles de polluants organiques persistants bannis par la convention de Stockholm en 2001 .....	25
Figure 8 : Structure de bases des dioxines .....	28
Figure 9 : Exemple de synthèse accidentelle de la TCDD (Mandal 2005).....	29
Figure 10 : Structure chimique du PCB 126 (3,3',4,4',5-pentachlorobiphényle).....	40
Figure 11 : Structure chimique des stéroisomères alpha-endosulfan et beta-endosulfan .....	42
Figure 12 : Réactions chimiques de la formation des métabolites de l'endosulfan (Silva & Beauvais 2010) .....	42
Figure 13 : Structure du récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR).....	45
Figure 14 : Voies de signalisation du AhR.....	47
Figure 15 : Structure chimique de ligands endogènes du AhR.....	49
Figure 16 : Activation du AhR par les dérivés du tryptophane pour la protection de la barrière épithéliale.....	54
Figure 17 : Les différentes voies de signalisation ostrogéniques possibles.....	60
Figure 18 : Représentation des différentes interactions possibles entre le complexe AhR/ARNT activé par un ligand et l'activité des récepteurs aux estrogènes (ER).....	61
Figure 19 : Métabolisme oxydatif de l'éthanol et ses effets dans l'organisme .....	66
Figure 20 : Localisation des différents gènes pour chaque isoforme des ADH (ADH1 à ADH7)....	66
Figure 21 : A : Schéma simplifié de la progression des maladies du foie avec leur incidence. B : Mécanismes moléculaires et conséquences des maladies alcooliques du foie. ....	69
Figure 22 : Mécanisme de la voie de synthèse du TGF-β1 .....	78
Figure 23 : Structure du complexe « Large Latent Complex » (LLC) fixé à la MEC .....	80
Figure 24 : Voie de signalisation des ligands de la superfamille des TGF-β. ....	81

Figure 25 : Structure des SMAD et fonction des différents domaine.....	85
Figure 26 : Image au microscope optique de la lignée cellulaire HepaRG en culture pendant le processus de prolifération (image de gauche) puis de différenciation (image de droite). ...	97
Figure 27 : Expression de l'ARNm CYP2E1 régulée par la TCDD en fonction du temps. ....	104
Figure 28 : Expression de l'ARNm CYP2E1 régulée en fonction de la concentration de TCDD (nM). .....	104
Figure 29 : Voie du métabolisme des rétinoïdes.....	106
Figure 30 : Induction de l'expression des gènes par les rétinoïdes par l'intermédiaire des combinaisons possibles du RXR avec différents partenaires, inspiré par Parisotto,2006. ...	109
Figure 31 : Hypothèse de régulation du métabolisme des rétinoïdes après une diminution des ADH par la TCDD.....	112
Figure 32 : Effet du rétinol (ROH) et de l'acide rétinoïque (RA) sur la régulation de l'expression du cytochrome P450 26A1 par la TCDD dans les cellules HepaRG.....	112
Figure 33 : Construction du plasmide pGLuc contenant la séquence XRE et le promoteur minimal du gène ADH4.....	114
Figure 34 : Quantification de l'activité du promoteur pADH4 XRE. ....	114
Figure 35 : Effet de l'inhibiteur SB431542 (spécifique du récepteur de la voie de signalisation du TGF $\beta$ 1), sur la régulation des enzymes du métabolisme de l'alcool par la TCDD dans les cellules HepaRG.....	123
Figure 36: Effet de l'inhibiteur SB431542 (spécifique du récepteur de la voie de signalisation du TGF- $\beta$ 1), sur l'expression des protéines ADH1 modulée par la TCDD dans les cellules HepaRG.....	125
Figure 37 : Rôle des protéines SMAD2/3 dans la régulation de l'expression des enzymes du métabolisme de l'alcool en présence de TCDD. ....	127
Figure 38 : Effet de la protéine SMAD4 sur l'expression des enzymes du métabolisme de l'alcool modulée par la TCDD.....	128
Figure 39 : Effet de la protéine SMAD4 sur l'expression des protéines ADH1 et ADH4 modulée par la TCDD dans les cellules HepaRG. ....	129
Figure 40 : Cinétique de l'expression de l'ARNm TGF- $\beta$ 1 lors d'un traitement par la TCDD 3 nM. .....	129
Figure 41 : Quantification de la protéine TGF- $\beta$ 1 après un traitement des cellules différenciées HepaRG par 3 nM de TCDD. ....	130

Figure 42 : Rôle de la protéine LTBP1 sur l'expression des enzymes du métabolisme de l'alcool modulée par la TCDD.....	131
Figure 43 : Rôle des des protéines SMAD1/5/8 dans la régulation de l'expression des enzymes du métabolisme de l'alcool en présence de TCDD. ....	133
Figure 44 : Schéma récapitulatif de l'implication de la voie du TGF- $\beta$ en présence de TCDD .....	138
Figure 45 : Schéma du métabolisme glucidique (Schéma de la glycolyse et de la néoglucogénèse) .....	145

## Table des Tableaux

Tableau 1 : TEF des composés apparentés à la TCDD .....	31
Tableau 2 : Exemples de différentes études montrant des effets de la TCDD dans les animaux traités par gavage, ou par injection en intrapéritonéal (IP). .....	36
Tableau 3 : Concentration de quelques PCB dans l'air et le sol au large d'Istanbul.....	38
Tableau 4 : Effets toxiques de l'endosulfan sur quelques espèces .....	43
Tableau 5 : Activité EROD moyenne dans le foie des rats Spargue-Dawley après administration des ligands du AhR, TCDD et PCB 126 (National Toxicology Program 2006).....	48
Tableau 6 : Récapitulatif succinct du rôle du AhR dans l'organisme .....	55
Tableau 7 : Quelques caractéristiques des trois récepteurs nucléaires PXR, CAR et ER .....	57
Tableau 8 : Consommation d'alcool par quelques populations mondiales au cours du temps (Ansari et al. 2016) .....	63
Tableau 9 : Les différentes classes d'alcool déshydrogénases et leur localisation dans l'organisme humain.....	68
Tableau 10 : Les différentes voies de signalisation possibles de la famille du TGF- $\beta$ .....	83
Tableau 11 : Exemples de pathologies associées à une perturbation de différentes voies de signalisation du TGF- $\beta$ dans des souris par invalidation de l'expression du ligand ou des protéines impliquées.....	89
Tableau 12 : Effets d'une invalidation par KO de gènes impliqués dans le métabolisme des rétinoïdes et de l'alcool dans la souris (d'après (Kumar et al. 2012) sauf *(Molotkov et al. 2002b) .....	110
Tableau 13 : Listes des séquences XRE potentielles sur les gènes ADH1A, 1B, 6.....	115
Tableau 14 : Anticorps utilisés .....	121

## Abréviations

3MC. : 3-MéthylCholanthrène

### A

ABC. : ATP-Binding Cassette  
acétyl-CoA. : acétyl-CoA  
ADH. : alcool déshydrogénases  
ADN. : Acide Désoxyribonucléique  
AGR2. : anterior gradient 2  
AhR. : Aryl Hydrocarbon Receptor  
AhRR. : AhR Nuclear Translocator  
ALDH. : aldéhyde déshydrogénase  
ALK. : Activin receptor-Like Kinase  
AR. : Acide rétinoïque

### B

bHLH-PAS. : Basic Helix Loop Helix (bHLH) – Period (Per)-  
AhR Nuclear Translocator (ARNT)-Single minded (Sim)  
BMP. : Bone Morphogenetic Protein  
BRCA-1. : protéine supresseur de tumeur Breast cancer 1

### C

C. elegans. : Caenorhabditis elegans  
C57BL/6J. : souris C57BLACK/6J  
CAR. : constitutive androstane receptor  
CCL. : Chemokine Ligand  
CYP. : Cytochromes P450  
CIRC. : Centre International de Recherche contre le  
Cancer

### D

DRE. : Dioxin Responsive Element  
DL-PCB. : Dioxin-like-PCB  
DTT. : Dithiothréitol

### E

EGFR. : récepteur du facteur de croissance épidermique  
EMX. : Enzymes du Métabolisme des Xénobiotiques  
ERO. : Espèces Réactives de l'Oxygène  
EFSA. : Autorité Européenne de Sécurité des Aliments

### F

FAEE. : ester éthylique d'acide gras  
FGF. : facteur de croissance de fibroblastes  
FICZ. : 6-formylindolo[3,2-b]carbazole

### G

Gpx. : Glutathion peroxidase  
GST. : Glutathion-S-Transférase

### H

HAH. : hydrocarbure aromatique halogéné  
HAP. : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique  
HCC. : carcinome hépatocellulaire  
HDL. : High Density Lipoprotein  
HSC. : Cellules Souches Hématopoïétiques  
HSP. : Heat Shock Protein

### I

I3C. : indol-3-carbinol  
IARC. : International Agency for Research on Cancer  
IDO. : indoléamine-2,3-dioxygénase  
IFN. : Interféron  
IL. : interleukine  
iNOS. : Inducible nitric oxide synthase  
IP. : IntraPéritonéal  
ITE. : 1'H-indol-3'carboxyl-thiazol-4-carboxylic acid  
méthyl ester

### J

JNK. : c-Jun-N-terminal protein kinase

### K

Km. : Constante de Michaelis  
KO. : Kock out

### L

LAP. : Latent Associated Protein  
LDL. : Low Density Lipoprotein  
LLC. : Large Latent Complex  
LTBP. : Latent TGF- $\beta$  binding protein

### M

MEC. : matrice extracellulaire  
MEOS. : système microsomal d'oxydation de l'éthanol  
miARN. : microARN  
MMP. : métalloprotéases de la matrice  
MRP. : Multi drug Resistance related Protein  
MTTP. : Microsomal Triglyceride Transfer Protein  
MUP. : Major Urinary Protein

### N

NAFLD. : stéatose hépatique non alcoolique  
NASH. : stéato-hépatite non alcoolique  
NK. : natural killer  
NLS. : Nuclear Localisation Signal  
non DL-PCB. : non Dioxin-Like PCB  
NOAEL : No Observable Adverse Effect Level



NTP. : *National Toxicology Program*

## O

OMS. : *Organisation Mondiale de la Santé*

## P

PBPK : *Modèle Pharmacocinétique et Physiologique*

PCB. : *PolyChoroBiphényle*

PCDD. : *PolyChloroDibenzo-para-Dioxine*

PCDF. : *PolyChloroDibenzoFurane*

PON. : *Paraoxonase*

POP. : *polluant organique persistant*

PPAR. : *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*

P-pg. : *P-glycoprotéine*

PXR. : *Pregnane X Receptor*

## R

REACH. : *Registration, Evaluation, Authorization of Chemicals*

## S

SAhRM. : *modulateur du AhR spécifique*

serpine. : *plasminogen activator inhibitor type 2*

SLC. : *small latent complex*

Smurf. : *SMAD ubiquitination-regulatory factor*

SOD. : *superoxide dismutase*

SR1. : *StemRegenin 1*

Ss. : *Spineless*

STAT. : *signal transducer and activator of transcription*

SULT. : *SULfoTransférase*

## T

TCDD. : *2,3,7,8 TétrachloroDibenzo-p-Dioxine*

TEF. : *Toxic Equivalency Factor*

TEQ. : *Toxic Equivalent*

TG. : *triglycéride*

TGF- $\beta$ . : *Transforming Growth Factor Beta*

TGF $\beta$ RII. : *récepteur transmembranaire homodimère 2 du Transforming Growth Factor Beta*

Th. : *lymphocyte T helper*

## U

UGT. : *UDP-glucuronyl-transférase*

## V

VLDL. : *Very Low Density Lipoprotein*

Vm. : *Vitesse Maximale*

## W

WHO. *World Health Organization*

## X

XAP. : *X-Associated Protein*

XO. : *Xanthine Oxydase*





## Préambule - contexte

La présence de nombreux agents chimiques, biologiques ou physiques dans l'atmosphère, l'eau et les sols est une menace pour l'écosystème. Il est donc primordial, d'étudier les effets des polluants sur la santé afin de réglementer la production des molécules et leur dispersion éventuelle dans l'environnement. En effet, l'Homme est exposé à diverses pollutions, intérieures, professionnelles, environnementales ou alimentaires. Des études ont montré une association entre une exposition à des polluants de l'environnement et le développement de tous types de cancers (Pesatori *et al.* 2009, Consonni *et al.* 2008, Steenland *et al.* 2004, Sengupta *et al.* 2013). En France, l'incidence de tous types de cancers a progressé de 48 % chez l'homme et de 46 % chez la femme entre 1980 et 2005 (Belot *et al.* 2008). Il est donc important d'étudier les effets d'une exposition chronique ou aiguë des polluants de l'environnement sur la santé humaine.

L'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) a été classée comme cancérigène avéré pour le cancer du poumon et le cancer de la peau. Le benzo-a-pyrène est un polluant de la famille des HAP retrouvé dans l'environnement (eau, air, alimentation) et est classé comme cancérigène avéré (groupe 1 par l'agence internationale pour la recherche contre le cancer (IARC). Un problème majeur de santé publique se pose quant à l'utilisation de certaines molécules indispensables dans divers procédés industriels ayant un potentiel toxique mais qui, faute d'alternative, sont encore employées. Pour faire face à cette difficulté, et afin de limiter les expositions chroniques ou aiguës, les organisations gouvernementales se sont accordées sur l'interdiction ou la limitation de la production et de l'utilisation de nombreux agents chimiques au potentiel toxique, dont les polluants organiques persistants (POP) de l'environnement dans le cadre de la convention de Stockholm en 2001. Dans le même temps, le parlement européen a mis en place en 2007 le plan REACH (Registration, Evaluation, Authorization of Chemicals) permettant d'évaluer et de classer selon leurs propriétés toxiques, les substances produites ou utilisées par les industriels. Cette réglementation préconise également le développement de méthodes alternatives pour l'évaluation des dangers liés à ces substances afin de réduire l'expérimentation animale.

Les xénobiotiques présents dans l'environnement et dans l'alimentation représentent un risque pour la santé humaine. Une fois dans l'organisme, ils peuvent activer différentes

catégories de récepteurs : les récepteurs des xénobiotiques au sens strict et les récepteurs de composés endogènes, comme par exemple les récepteurs hormonaux. L'activation des récepteurs des xénobiotiques permettra à la cellule une réponse adaptative en induisant l'élimination des molécules exogènes. L'activation des récepteurs hormonaux par des polluants hormonaux-mimétiques, quant à elle, conduira potentiellement à des perturbations métabolique ou endocrinienne. Ces substances chimiques, étrangères à l'organisme, qui interfèrent avec le système endocrinien et peuvent induire des effets délétères sur cet organisme ou sur ses descendants, sont appelées perturbateurs endocriniens. Certains polluants organiques persistants sont aussi classés comme perturbateurs endocriniens (endosulfan, methoxychlore) (Tiemann 2008, Weber *et al.* 2010).

Le foie, de par son rôle de biotransformation des xénobiotiques, est l'organe cible privilégié des produits chimiques potentiellement cytotoxiques et/ou génotoxiques. Il a été montré que les polluants organiques persistants (POP) peuvent induire une stéatose hépatique dans les animaux (Mandal 2005). Des études épidémiologiques ont montré une association positive entre l'exposition aux POP et la présence de marqueurs de la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) dans le sérum. La prévalence de la NAFLD dans le monde a ainsi doublé en 20 ans tandis que la prévalence d'autres maladies hépatiques chroniques reste stable ou tend même à diminuer. Cette pathologie est aujourd'hui considérée comme la maladie chronique la plus commune du foie affectant 20 à 30 % de la population mondiale. Dans le foie, la NAFLD peut progresser en stéato-hépatite non alcoolique (NASH), en cirrhose du foie ou fibrose hépatique et dans certains cas en carcinome hépatocellulaire (HCC), avec ou sans la présence d'une cirrhose, à la fois dans les modèles animaux et chez l'Homme. Une étude publiée au sein du laboratoire, montre un lien entre une exposition à la TCDD et l'apparition de fibrose hépatique dans la souris (Pierre *et al.* 2014). Ces symptômes peuvent également être provoqués par l'alcool, cependant à l'heure actuelle, nous ne savons pas si les mécanismes impliqués dans l'apparition des maladies alcooliques et non-alcooliques sont identiques. L'origine des pathologies hépatiques est multifactorielle, ce qui rend difficile l'identification de tous les facteurs et voies de signalisation menant à l'apparition de ces pathologies.

Nous avons encore besoin d'approfondir la compréhension des voies de signalisation de l'organisme par des études mécanistiques montrant le rôle des polluants dans les pathologies hépatiques. Mon travail de thèse s'inscrit dans ce cadre général. Pour cela nous

avons choisi d'étudier les effets de POP sur l'expression de gènes impliqués dans différentes fonctions du foie, et certaines de leurs conséquences métaboliques.

Après l'introduction qui détaille les données bibliographiques nécessaires à la compréhension de mes travaux, la partie résultats sera organisée en trois chapitres, avec comme modèle principal la lignée hépatocytaire humaine HepaRG :

- 1) L'étude de la régulation de l'expression des alcool déshydrogénases (ADH) par la dioxine, *via* le récepteur des hydrocarbures aromatiques (AhR), travail publié en 2016 dans *Archives of Toxicology* (Attignon *et al*, 2016).
- 2) L'étude de l'implication du TGF- $\beta$ 1 dans la régulation de l'expression des ADH par la dioxine. Ce travail n'est pas encore abouti pour une publication dont je serai premier auteur.
- 3) L'étude des effets d'un mélange de deux polluants organiques persistants (dioxine et  $\alpha$ -endosulfan, pesticide organochloré) sur le métabolisme du glucose. Ce travail, dont je suis co-premier auteur, va être soumis prochainement dans *Archives of Toxicology*.



*Figure 1 : Schéma représentatif d'un lobule hépatique.*

*Chaque lobule hépatique est traversé par une veine centrolobulaire. Les hépatocytes forment des travées qui convergent vers la veine centrolobulaire. Parallèlement aux hépatocytes, les sinusoides sont également disposées de façon radiaire, et entre les deux se situe l'espace de Disse. Les canalicules biliaires n'ont pas leurs propres parois et sont constitués des cordons d'hépatocytes adjacents. Entre les lobules hépatiques se trouvent les branches de l'artère hépatique, de la veine porte hépatique et du canal biliaire (image Servier).*

# Introduction

## I. Le foie et les pathologies associées

### I.1 Anatomie

Le foie est un organe essentiel qui participe à de nombreuses fonctions métaboliques, endocrines et immunologiques. Son intégrité est donc primordiale au bon fonctionnement de l'organisme entier. C'est un organe rouge-brun de forme triangulaire situé dans la partie supérieure droite de la cavité abdominale. Il s'agit d'une glande volumineuse avec un poids d'environ 1,5 kg chez l'homme, représentant ainsi 2 % de la masse corporelle, qui assure de nombreuses fonctions essentielles de métabolisme, de digestion, d'immunité et de stockage des nutriments dans l'organisme. Cet organe est composé de deux lobes majeurs individualisés, droit et gauche et de deux autres lobes, le carré et le caudé, situés entre les deux lobes majeurs. Chaque lobe est divisé en huit segments délimités par des cloisons fibreuses. Chaque segment est constitué de millions de lobules hépatiques (Figure 1) de forme hexagonale entre lesquels circulent les vaisseaux sanguins qui alimentent et collectent les substances que produisent les segments hépatiques, notamment la bile qui sortira du foie par les canaux biliaires. Au centre de chaque lobule hépatique, se trouve la veine centrolobulaire qui collecte le sang du lobule. Les hépatocytes sont disposés autour de cette veine centrolobulaire de façon radiaire.

Le foie est fortement vascularisé. Parcouru par le système sanguin artériel et veineux, il est traversé en moyenne par 1,4 L de sang par minute pour un adulte. L'artère hépatique provenant du cœur apporte le sang oxygéné, et la veine porte venant des intestins contient le sang désoxygéné et transporte une grande partie des nutriments provenant de la digestion. Dans le foie, le sang circule à travers un réseau de sinusoides qui forment des microcapillaires venant de la veine porte ou des artérioles hépatiques issues de l'artère. Le sang des deux systèmes circule dans les sinusoides entre les travées hépatocytaires pour converger vers une veine centrolobulaire. Les veines centrolobulaires se rejoignent pour former la veine sus-hépatique qui se jette ensuite dans la veine cave.





*Figure 2 : Schéma histologique d'une coupe de foie.*

*Entre les hépatocytes contenant les organites (mitochondries, appareil de Golgi, réticulum endoplasmique) se trouvent les canalicules biliaires. Les cellules endothéliales sont séparées des hépatocytes par l'espace de Disse. Dans la lumière du capillaire se trouvent les cellules de Kupffer. Les cellules endothéliales sont en contact avec les cellules étoilées (Ito). REF figure*

*Figure 3 : Schéma représentant la structure d'une travée hépatocytaire et des sinusoides.  
La flèche rouge représente la circulation sanguine*

Parallèlement au réseau sanguin, le foie est également parcouru par les canalicules et canaux biliaires qui reçoivent la bile et la dirige vers la vésicule biliaire pour être stockée. La bile joue un rôle essentiel dans la digestion chimique et l'absorption des nutriments au niveau de l'intestin mais également dans l'élimination de métabolites endogènes ou exogènes potentiellement toxiques pour l'organisme.

## I.2 Les cellules du foie

*Les **hépatocytes** représentent 60 à 80 % de la population cellulaire du foie et permettent d'assurer la plupart des fonctions hépatiques. Ce sont des cellules polygonales d'environ 20 µm de diamètre, organisées en travées hépatocytaires (Figure 1 et*

*Figure 2). En moyenne, chaque travée le long des sinusoides, contient 20 à 30 hépatocytes. Le cytoplasme des hépatocytes contient de nombreuses mitochondries, un réticulum endoplasmique granuleux et lisse et un appareil de Golgi abondants, essentiels aux activités de synthèse et de sécrétion (*

Figure 2).

**Les cellules épithéliales biliaires ou cholangiocytes** sont un des constituants de l'épithélium qui tapissent les canaux biliaires. Les canalicules biliaires forment un réseau entre les hépatocytes. La bile qui est composée d'acides biliaires et d'autres solutés favorise la digestion en jouant le rôle de suc gastrique qui provoque l'émulsion des graisses et vitamines liposolubles.

Les sinusoides hépatiques sont bordées par des **cellules endothéliales sinusoidales** non jointives permettant l'ancrage des macrophages résidents du foie (Figure 3). Les cellules sanguines circulent dans les méandres sinusoidaux. La présence de fenestrations allant de 0,1 à 1 µm entre les cellules endothéliales sinusoidales permet les échanges de nutriments et de macromolécules entre le système sanguin et les hépatocytes.

**Les cellules de Kupffer** (20 à 30 % des cellules non parenchymateuses du foie) sont les macrophages résidents du foie et sont situés dans la lumière des capillaires sinusoides. Elles participent principalement à l'immunité innée en étant la première ligne de défense contre tous les éléments qui passent dans le sang portal, y compris les pathogènes qui traversent la barrière intestinale. Elles sont capables de sécréter, après activation, un grand nombre de cytokines (TGF-β, TNF-α et certaines interleukines (IL) et chimiokines (Kamimura & Tsukamoto 1995). Les cellules de Kupffer éliminent les hépatocytes apoptotiques et les hématies âgées (Terpstra & van Berkel 2000), et peuvent également phagocyter les particules étrangères provenant de l'intestin avant qu'elles ne gagnent la circulation générale.

**Les cellules stellaires ou cellules de Ito** représentent 5 % des cellules du foie. Elles sont localisées dans l'espace de Disse situé entre les cellules hépatiques et les cellules sinusoidales. Ces cellules stockent les graisses et certaines vitamines comme les vitamines A (rétinol) et B12 (cobalamine). Lors d'un processus inflammatoire, elles se différencient en myofibroblastes et fabriquent du tissu fibreux qui est un indicateur de lésion hépatique (Sato *et al.* 2003).

**Les cellules lymphoïdes** regroupent les lymphocytes B et T ainsi que les cellules « natural killer » (NK) ; ces dernières sont des cellules résidentes du foie. Les lymphocytes T, tous types confondus, représentent 60 % des cellules lymphoïdes du foie. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (auxiliaire) peuvent se différencier en divers lymphocytes T helper (Th1, Th2, Th17) et font le lien entre la cellule présentatrice d'antigène et les cytokines. Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> acquièrent une fonction cytotoxique pour éliminer le porteur de l'antigène. Les cellules NK (Natural Killer) sont capables de synthétiser et de sécréter des cytokines mais ont également une activité cytotoxique (Saito *et al.* 1993). Ces cellules sont ainsi capables de reconnaître les cellules infectées et les cellules tumorigéniques et, dans un contexte physiologique, de les éliminer (Biron *et al.* 1999).

### I.3 Fonctions du foie

Le foie est un organe vital car il exerce beaucoup de fonctions majeures indispensables à la vie d'un organisme. Il est au centre de la régulation des taux de nombreuses molécules et macromolécules : glucose et glycogène, acides gras, triglycérides et dérivés lipidiques, acides aminés et protéines spécifiques ainsi que certaines vitamines.

Il régule le taux de glucose dans le sang en contrôlant les processus de glycolyse, néoglycogénèse, glycogénolyse et glycogénogenèse afin de maintenir une glycémie constante entre 0,8 et 1,2 g.L<sup>-1</sup>. Si la glycémie est plus élevée, le pancréas sécrète l'insuline, une hormone hypoglycémisante. Cette hormone se fixe sur des récepteurs membranaires à la surface des hépatocytes activant ainsi le processus de glycolyse et de glycogénogenèse ce qui permet de diminuer le taux de glucose sanguin et de favoriser son stockage sous forme de glycogène dans les cellules hépatiques. En revanche, si la glycémie est basse, le pancréas sécrète une hormone hyperglycémisante, le glucagon. Les processus de glycogénolyse puis de néoglycogénèse en cas de jeûne prolongé sont enclenchés dans les hépatocytes permettant ainsi la dégradation du glycogène en glucose et sa libération dans le sang.

Les acides gras synthétisés dans les hépatocytes sont stockés sous forme de triglycérides, et lors d'un besoin énergétique, les triglycérides sont dégradés en acides gras libres pour produire de l'énergie *via* la  $\beta$ -oxydation, voire en corps cétoniques dans le cas d'un jeûne prolongé. En cas de carence en glycogène, le foie produit du glucose à partir de sources non glucidiques telles que des acides aminés, le lactate, le glycérol (Owen *et al.* 1967). Cet organe est également impliqué dans la lipogenèse et la dégradation des lipides et des lipoprotéines (LDL, VLDL, HDL). Le foie intervient également dans la synthèse des phospholipides et du cholestérol utilisés dans la formation des acides biliaires (Nguyen *et al.* 2008) et de différentes hormones stéroïdiennes (Faust *et al.* 1977).

Le foie synthétise certaines protéines plasmatiques telles que l'albumine, les apolipoprotéines et les facteurs de coagulation comme le fibrogène et le complexe prothrombique. A l'opposé, il est le lieu de transaminations qui régulent la quantité d'acides aminés et permettent l'élimination du surplus d'azote sous forme d'urée.

Il stocke diverses vitamines (vitamine A, vitamine B12), mais également le fer indispensable à la synthèse des différents types d'hèmes présents, entre autres, dans l'hémoglobine ou les cytochromes P450.

Le foie participe également à la digestion en produisant et excréant de la bile. Une partie est sécrétée vers le duodénum à travers les canalicules biliaires et l'autre partie, 5 à 10 fois plus concentrée, est stockée dans la vésicule biliaire. La bile est constituée d'acides biliaires, de phospholipides, de cholestérol, de bilirubine conjuguée, de glutathion, d'électrolytes et d'eau. Dans le duodénum, les lipases émulsifient les graisses avec la bile pour les transformer en particules absorbables par la muqueuse intestinale. La bile permet également d'éliminer par les selles l'excès de cholestérol, d'ions organiques et des produits issus de la détoxification des xénobiotiques.

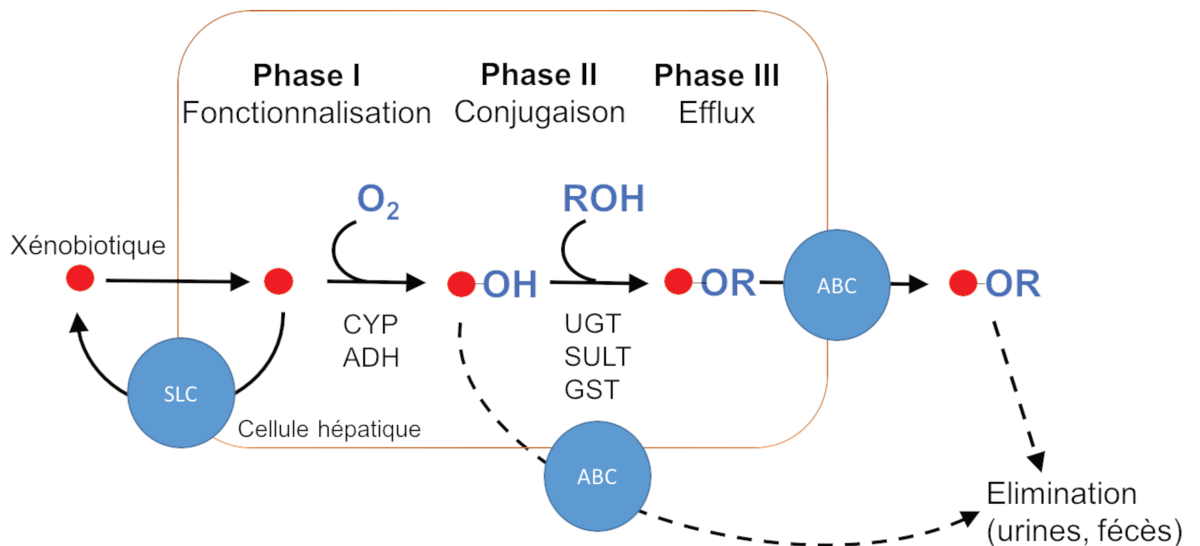


Figure 4 : Représentation schématique du métabolisme des xénobiotiques dans la cellule hépatique pour favoriser leur élimination.

Un xénobiotique, pour être éliminé de l'organisme, subit une première phase de fonctionnalisation par les enzymes de phase I (cytochromes P450, alcool déshydrogénase (ADH) ...) puis une deuxième phase de conjugaison par les enzymes de phase II (UDP-glucuronyl-transférases (UGT), sulfotransférases (SULT), glutathion-S-transférases (GST)...), avant d'être excrété par les transporteurs de la famille des ABC (ATP Binding Cassette) dans les urines ou les fèces. En fonction de leur structure, des métabolites intermédiaires peuvent également être pris en charge par des transporteurs membranaires.

SLC : Solute Carrier

Une autre grande fonction du foie est d'éliminer de l'organisme les xénobiotiques (molécules étrangères à l'organisme) ou des molécules endogènes devenues inutiles ou trop abondantes et dont l'excès serait toxique. En ce qui concerne les xénobiotiques, généralement lipophiles, leur biotransformation est réalisée principalement par les enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMX) dans les hépatocytes et se divise en trois phases (Figure 4). Ces composés entrent dans la cellule principalement par diffusion passive à travers la membrane plasmique et sont pris en charge par les enzymes de phase I. Cette première étape, dite de fonctionnalisation, catalyse une réaction de monooxygénation, d'hydrolyse ou de réduction du composé à éliminer. Les enzymes de phase I sont les cytochromes P450 (CYP), les alcools déshydrogénases (ADH), les aldéhydes déshydrogénases (ALDH) ou les mono-oxygénases à flavines. Parmi les 57 CYP humains, seulement 13 sont impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques. Ces derniers sont classés selon leur homologie de séquence, en trois familles CYP1, CYP2 et CYP3. Ensuite les xénobiotiques fonctionnalisés sont pris en charge par les enzymes de phase II qui les conjuguent en ajoutant un groupement (méthyle, acétyle, glutathionyle ou glucuronyle...) permettant soit de neutraliser un groupement réactif (aldéhyde, amine, thiol), soit de rendre le xénobiotique hydrophile, afin de faciliter son élimination. Les enzymes de la phase II sont les UDP-glucuronyl-transférases (UGT), les sulfotransférases (SULT), les glutathion-S-transférases (GST), les N-acétyl transférases, les époxyde hydrolases, les méthyltransférases et les acyl-CoA transférases spécifiques de la réaction de conjugaison sur les acides aminés. La réaction de phase II génère ainsi des métabolites polaires, parfois chargés, pris en charge par les protéines de phase III constituées de transporteurs membranaires actifs appartenant à la famille des ATP-binding cassette (ABC), (P-glycoprotéine (P-pg) et « multi drug resistance related proteins (MRP) (Nies *et al.* 2008, Vasiliou *et al.* 2009). Ces métabolites sont ensuite éliminés dans la bile, les urines et les fèces. Parfois, après leur transport dans le sang ou la bile, les métabolites peuvent être modifiés de nouveau par d'autres tissus possédant un spectre d'EMX différents (Beaune & Lorient 2000). En effet, l'expression des EMX dépend du tissu et peut aussi être régulée par des modifications épigénétiques (méthylation de l'ADN, modification d'histones) et par des microARN (miARN).

Lors de cette suite des transformations, le xénobiotique peut générer des métabolites intermédiaires plus ou moins toxiques que le composé parent. Le benzo-a-pyrène, par exemple, subit une biotransformation qui produit un métabolite, le diol époxyde, connu pour former des adduits à l'ADN, et donc induire des mutations.

#### I.4 Les pathologies hépatiques non alcooliques

Les pathologies hépatiques liées à l'alcool (stéatose, fibrose, cirrhose, cancer) seront décrites dans le paragraphe IV.3.2, tandis que les autres pathologies, en particulier celles liées à des virus ou héréditaires, ne seront pas abordées dans cette thèse.

##### I.4.1 La stéatose hépatique non-alcoolique (NAFLD)

La stéatose d'un organe est définie comme l'accumulation de lipides, principalement des triglycérides (TG), dans un tissu, résultant d'un déséquilibre entre la synthèse et la dégradation des lipides. Dans le cas du foie, on distingue deux étiologies : la stéatose non alcoolique ou NAFLD (« non-alcoholic fatty liver disease »), et la stéatose alcoolique (abordée dans le paragraphe IV.3.2).

La prévalence de la NAFLD est en augmentation constante et atteint 30 % dans les pays développés. Elle augmente dans le cas de diabète de type II (70%) ou d'obésité morbide (90%) (Ahmed 2015). Etant donné que dans les 27 pays de l'Union Européenne, 34,6 % de la population adulte est en surpoids et 15,5 % est obèse (OECD, 2014<sup>1</sup>), la NAFLD devient un véritable problème de santé publique.

La première hypothèse de progression de la NAFLD était que cette pathologie résultait d'une résistance à l'insuline. Les études des dix dernières années montrent que l'accumulation de lipides dans le foie est une cause et non une conséquence de la résistance à l'insuline (Vernon *et al.* 2011). Les effets de la résistance à l'insuline suggèrent que la diminution de la quantité des lipides dans le foie préviendrait la progression des pathologies associées au diabète de type II. Actuellement, la stéatose hépatique non-alcoolique est considérée comme la manifestation d'un syndrome métabolique associé à l'obésité, à l'hyper-insulinémie, au diabète de type II et à l'hypertension (Streba *et al.* 2008), variable en fonction des régions du monde (Loomba & Sanyal 2013). Une des causes majeures de l'apparition de ces symptômes est l'augmentation de la quantité de nourriture ingérée par repas et le changement de la composition nutritive : augmentation des graisses polyinsaturées ou des glucides comme le fructose.

---

<sup>1</sup> <http://www.oecd.org/els/health-systems/Obesity-Update-2014.pdf>

La NAFLD est caractérisée par une accumulation de lipides, sous forme de triglycérides dans les hépatocytes, supérieure à 5% du poids du foie (Hassan *et al.* 2014), sans consommation excessive d'alcool (30 g par jour pour les hommes et 20 g par jour pour les femmes avec un jour d'abstinence). L'augmentation des triglycérides peut avoir diverses origines (Figure 5): une augmentation des acides gras libres (lipogénèse *de novo*, lipolyse dans les adipocytes, diminution de la dégradation des lipides par la  $\beta$ -oxydation) conduisant à la synthèse des TG, une augmentation des triglycérides délivrés par les chylomicrons résultant de l'alimentation, et une diminution de l'excrétion dans des complexes lipidiques (VLDL, HDL ...). En cas d'obésité, le nombre et la taille des adipocytes augmentent (hypertrophie et hyperplasie), ce qui favorise la libération des acides gras (Laurencikiene *et al.* 2011).

La nature de l'alimentation peut également jouer un rôle dans l'apparition de la NAFLD. Une consommation excessive de boissons sucrées de régime contenant du fructose (initialement pour diabétiques) peut ainsi avoir des effets métaboliques délétères sur l'organisme. Le fructose est phosphorylé sur le carbone 1, contrairement au glucose qui est phosphorylé sur le carbone 6. Cette différence de site de phosphorylation rend le fructose inapte comme substrat pour la synthèse de glycogène et contourne la régulation métabolique très fine de la PFK1 (PhosphoFructokinase 1). Le fructose est alors transformé en glycéraldéhyde-3-phosphate et en acétyl-CoA qui sont des substrats de la lipogénèse *de novo* (Cohen *et al.* 2011). De plus, la transformation du fructose altère plus généralement le métabolisme des lipides *via* l'augmentation de l'activité des enzymes lipogéniques, comme l'acide gras synthase (Moore *et al.* 2014).

La stéatose hépatique non-alcoolique est considérée comme une pathologie non invasive et réversible qui n'altère pas la fonction hépatique (Karim *et al.* 2015). La guérison est caractérisée par une diminution des LDL circulants qui peut être bénéfique pour les organes extra-hépatiques comme la réduction des risques cardiovasculaires et du diabète de type II. A l'opposé, l'accumulation de lipides à long terme peut conduire à un stress oxydatif et provoquer des lésions cellulaires. Ceci rend le foie plus vulnérable aux agressions ultérieures favorisant l'apparition des stades plus avancés des maladies chroniques du foie (NASH, fibrose, cirrhose, hépatocarcinome (HCC). Ainsi, les NAFLD ont été récemment



corrélées au développement du HCC avec ou sans cirrhose chez l'homme (Mittal *et al.* 2015, 2016), ou sans fibrose (Paradis *et al.* 2009). Le cancer du foie a une incidence croissante ces dernières décennies en France. Les patients atteints de NAFLD ont une augmentation du risque de décès lorsque cette pathologie est associée au diabète de type II et aux pathologies cardiovasculaires (Vanni & Bugianesi 2014).

La stéatose liée aux mutations génétiques reste rare dans le monde, cependant quelques cas ont été décrits, de mutations altérant la structure de l'apo-lipoprotéine B ou de la protéine « microsomal triglyceride transfer protein » (MTTP) qui permet la formation du complexe triglycérides/apolipoprotéine B dans le réticulum endoplasmique (Mensenkamp *et al.* 2001). Il a également été montré que des mutations génétiques à l'origine d'un défaut des enzymes de la  $\beta$ -oxydation, peuvent également causer une stéatose hépatique.

Des travaux épidémiologiques, ont montré que certains polluants organiques persistants, tels que la dioxine, pourraient favoriser l'apparition de la NAFLD et d'autres altérations métaboliques comme le syndrome de cachexie dans les modèles animaux (Duval *et al.* 2016, Shan *et al.* 2014, Al-Eryani *et al.* 2015). Le lien direct chez l'Homme n'a pas été clairement établi.

*Figure 5 : Métabolisme des triglycérides à l'origine de la stéatose hépatique*

*Mécanisme de synthèse des triglycérides (TG). Après un repas, le glucose et l'insuline induisent les gènes et/ou activent les enzymes impliquées dans la lipogenèse. L'acide gras synthase transforme les acétyl-CoA issus de la dégradation du glucose en acides gras libres qui formeront les triglycérides. L'insuline diminue également la libération des acides gras libres et favorise la formation de complexes lipidiques (VLDL). Inspiré de (Cohen et al. 2011, Ducheix et al. 2016)*

*« ATGL : Adipose Triglyceride Lipase » ; « TCA : Tricarboxylic Acid »*

*Figure 6 : Mécanismes moléculaires du développement des maladies non alcooliques du foie.*

*La figure montre le développement des maladies non alcooliques du foie chez les individus. Les causes des maladies non alcooliques du foie sont multifactorielles. La résistance à l'insuline entraîne la libération des acides gras du tissu adipeux qui vont aller dans le foie. Leur accumulation favorise la synthèse des triglycérides (stéatose). Ensuite une série d'interactions entre les hépatocytes, les adipocytes, les cellules de Kupffer et les cellules stellaires provoque un stress oxydatif et une cascade inflammatoire. L'inflammation chronique (stéato-hépatite) conduit à long terme à une fibrose, une cirrhose et dans 2 % des cas à un hépatocarcinome (Weis et al. 2014)*

*FFA : Free Fatty Acid*

#### I.4.2 La stéato-hépatite non-alcoolique (NASH)

La progression de la stéatose hépatique non-alcoolique à la stéato-hépatite non-alcoolique arrive dans 40 % des cas chez des personnes ne buvant pas, ou peu, d'alcool. Le nombre de patients développant une NASH est en augmentation dans le monde depuis la dernière décennie. A l'heure actuelle, il n'est pas clairement établi si les pathologies retrouvées chez les patients alcooliques ou non alcooliques empruntent les mêmes mécanismes lors de leur développement. La NASH se définit comme une stéatose accompagnée d'une inflammation, d'une augmentation du volume cellulaire et de l'apparition à moyen terme d'une fibrose non réversible. L'accumulation du surplus de gouttelettes lipidiques dans le foie engendre, à long terme, un déséquilibre du système redox conduisant à une inflammation avec ou sans fibrose et donc à une NASH (Pettinelli *et al.* 2011, Brunt *et al.* 1999). La prévalence de la NASH semble être corrélée à l'obésité (Reid 2001). Elle a été également associée au diabète de type II et l'intolérance au glucose et s'accompagne d'un surplus d'adipocytes viscéraux (Pitt 2007). Elle a clairement le potentiel d'évoluer défavorablement puisque 10 à 20 % des individus atteints d'une NASH développent une cirrhose dans les 10 ans (Caldwell & Argo 2010) et jusqu'à 27 % de patients atteints de NASH et d'une cirrhose développent un hépatocarcinome (Starley *et al.* 2010).

A l'heure actuelle, il existe peu de traitements disponibles pour traiter la NAFLD et la NASH (Baran & Akyüz 2014). Les stratégies de traitements portent sur une modification du style de vie : un régime alimentaire plus équilibré et la pratique d'une activité sportive semblent diminuer l'incidence de la NAFLD et les symptômes associés comme l'hyperglycémie, la résistance à l'insuline et l'hyperlipidémie (Centis *et al.* 2013, Del Ben *et al.* 2014, Dyson *et al.* 2014, Pan & Fallon 2014). Les flavonoïdes et leurs dérivés sont suggérés comme des composés thérapeutiques potentiels pour un traitement ou en prévention contre la NAFLD (Ross & Kasum 2002, Park *et al.* 2015) du fait de leurs propriétés anti-oxydantes (Crespo *et al.* 2008).

#### I.4.3 La fibrose hépatique

La fibrose hépatique se traduit par une modification du parenchyme hépatique normal en un tissu fibreux (Figure 6). Elle se caractérise par une accumulation excessive de matrice extracellulaire (MEC). Cet état est la résultante d'un déséquilibre entre l'augmentation de la

synthèse des composants de la matrice et la diminution de leur dégradation, modifiant la composition quantitative et qualitative des composants de cette dernière (Mehal & Schuppan 2015). La matrice extracellulaire joue un rôle important dans l'adhésion, la migration et la différenciation cellulaire. Présente sous forme d'une lame basale discontinue dans l'espace de Disse, elle permet les échanges entre les hépatocytes et les vaisseaux sanguins. Le maillage de fibres de collagène joue un rôle important dans l'organisation et la structure extracellulaire. Dans un processus physiologique normal, l'équilibre entre fibrogenèse et fibrinolyse permet le maintien de la structure hépatique dans un maillage composé de collagène, de laminines et de protéoglycanes. Les métalloprotéases de la matrice (MMP) permettent de lyser le maillage et les débris sont pris en charge par les cellules immunitaires. En cas de lésions hépatiques et de l'altération de la MEC, les cellules stellaires sont activées, se différencient en myofibroblastes et déclenchent la formation du maillage par les protéines de la MEC et la production d'un tissu fibreux permettant la réparation des zones endommagées. Il existe des variations de la réponse inflammatoire qui peuvent être dues aux variabilités génétiques et aux différences d'expositions à des contaminants environnementaux (Vasto et al. 2007). L'activation des macrophages (cellules de Kupffer) et des monocytes libèrent des cytokines (TNF $\alpha$ , IL-1, TGF- $\beta$ 1) et des chimiokines (CCL2, 3, 5, 7, 8)<sup>2</sup> qui permettent la formation de myofibroblastes et le déclenchement de la fibrogenèse. Les macrophages peuvent également activer les MMP afin de dégrader l'excès de MEC, et induire l'apoptose des cellules stellaires et des myofibroblastes (Ramachandran & Iredale 2012). Enfin, les cellules NK peuvent induire l'apoptose des cellules stellaires hépatiques en induisant l'arrêt du cycle cellulaire et l'inhibition de la régénération des hépatocytes lésés (Mehal & To 2016). La fibrose est la conséquence d'une prolifération et d'une accumulation intense de myofibroblastes hépatiques pour tenter de soigner les blessures du foie. Lorsque ces attaques sont récurrentes, la réaction inflammatoire devient chronique et la composition de la MEC est modifiée, laissant place à un foie fibreux. Une surproduction des composants de la MEC peut conduire également à une résistance à la fibrinolyse. La localisation initiale de la fibrose dépend du type d'agression du foie : elle peut être portale dans le cas d'agents viraux et péricentrale si les lésions sont, par exemple, dues à l'alcool (Ramadori & Saile 2004). A long terme, ces altérations hépatiques peuvent favoriser l'apparition d'autres stades plus sévères

---

<sup>2</sup> CCL : Chemokine Ligand

de la pathologie comme la cirrhose, associée ou non à des complications comme l'hypertension portale, une ascite ou une insuffisance rénale (Bataller & Brenner 2005).

Les cellules sinusoidales sont à proximité des cellules stellaires hépatiques et sont sensibles à la libération des mêmes cytokines qui peuvent diminuer l'expression de gènes impliqués dans la dilatation des vaisseaux et induire alors leur vasoconstriction (Shah 1997). Ce changement de conformation des vaisseaux contribue au dépôt de la fibronectine et du collagène dans la MEC. Les plaquettes jouent également un rôle dans la fibrogenèse en libérant le TGF- $\beta$ 1 connu pour ses effets fibrogéniques.

#### 1.4.4 Cirrhose et Hépatocarcinome

La cirrhose est définie comme le stade F4 de la fibrose avec, dans tout le foie, une quantité exagérée de tissu cicatriciel. Elle se développe chez 10 à 20 % des individus ayant une NASH. La cirrhose est une maladie chronique inflammatoire qui se définit par une nécrose hépatocytaire, la présence d'une fibrose hépatique et la régénération anarchique du foie sous forme de nodules. A terme, ces symptômes conduisent à la perte des fonctions hépatiques.

Les hépatocytes sont remplacés par du tissu cicatriciel, résultant des différentes agressions que le foie a pu subir. Le tissu fibreux est essentiellement composé de collagène de type I produit par les cellules stellaires activées après la lésion hépatique (Cohen *et al.* 2011). L'hépatocarcinome se développe dans 2 % des cas des patients atteints d'une cirrhose hépatique.

#### 1.4.5 Le microbiote intestinal

##### ❖ Microbiote et maladies chroniques du foie

Le microbiote constitue la microflore intestinale et est composé de 400 à 600 espèces bactériennes différentes, essentiellement anaérobies. Cinq phyla représentent 95 % du microbiote humain, avec en particulier les *Firmicutes*, les *Bactéroidetes*<sup>3</sup> (Qin *et al.* 2010). Le microbiote intestinal commence à se développer dès la naissance et dépend du mode d'accouchement. De multiples facteurs peuvent modifier l'équilibre de la composition du microbiote intestinal (régime alimentaire, tabac, alcool, consommation d'antibiotique, âge, ...). Des études récentes montrent que le microbiote intestinal contribue à la susceptibilité aux

---

<sup>3</sup> Autres familles importantes : Actinobacteria, les Proteobacteria, les Verrucomicrobia, les Fusobacteria, les Cyanobacteria, les Spirochaetes.

maladies alcooliques et non-alcooliques du foie (Tilg *et al.* 2016, Llopis *et al.* 2016). Le foie, par la circulation de la veine porte, est un organe exposé au microbiote et aux produits des microbiotes intestinaux qui peuvent traverser la barrière intestinale. Chez les patients atteints d'une stéatose, d'une NASH ou d'une maladie alcoolique du foie, on observe une perméabilité des parois intestinales (Scarpellini *et al.* 2016). Cette altération semble corrélée à la gravité de la pathologie. L'aggravation de la stéatose alcoolique à la stéato-hépatite semble être reliée à la présence de lipopolysaccharides (LPS) retrouvés sur la membrane externe des bactéries à Gram négative. Les LPS sont capables d'activer les cellules de Kupffer qui produiront des cytokines et des espèces réactives de l'oxygène capables d'augmenter la transition de la stéatose à la stéato-hépatite (Netgen 2016, Romani *et al.* 2014).

#### ❖ Microbiote et métabolisme des xénobiotiques

Bien que l'interaction entre les xénobiotiques et le microbiote ait été décrite depuis longtemps, la majorité des études date des dix dernières années. D'une part les xénobiotiques sont capables de modifier la composition ou les fonctions du microbiote intestinal. D'autre part le microbiote peut métaboliser les xénobiotiques et en modifier leur activité voire leur toxicité (Lu *et al.* 2015).

Certains xénobiotiques altèrent la composition du microbiote intestinal. Par exemple, l'arsenic diminue de manière significative l'abondance de la bactérie *Firmicutes* dont son rôle est de produire le butyrate (Lu *et al.*, 2014). Les antibiotiques peuvent également modifier la physiologie, la structure et l'activité du microbiome intestinal (Maurice *et al.* 2013). Le chloripyrifos, un pesticide organochloré, peut également altérer la composition du microbiote intestinal, en diminuant les *Lactobacillus* et les *Bifidobacterium*, dans un modèle de rat et dans un bioréacteur simulant le microbiote humain (Joly *et al.* 2013). Par exemple, l'exposition aux particules atmosphériques PM 10 dans des souris présentant une inflammation du côlon a été associée à une altération du microbiote intestinal et une diminution du butyrate (Kish *et al.* 2013).

De nombreux xénobiotiques peuvent être métabolisés par le microbiote intestinal. Certains métabolismes sont bénéfiques pour l'hôte (fermentation des résidus alimentaires non digestibles, régulation de l'absorption du calcium, magnésium et des acides gras), d'autres sont néfastes, en modifiant la réponse d'un médicament, ou la composition de la flore microbienne.

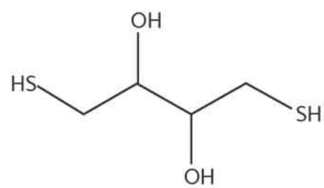
Les bactéries du microbiote sont capables de métaboliser les composés phytochimiques des plantes alimentaires, comme par exemple les polyphénols, les flavonoïdes ou les pro-vitamines, en molécules bioactives. Ces découvertes s'accompagnent d'un intérêt grandissant pour la médecine traditionnelle et les compléments alimentaires à base de plantes. Le curcumin est un polyphénol très étudié pour ses effets anti-oxydants et anti-inflammatoires. Ce composé est ainsi métabolisé principalement par la bactérie *Escherichia coli* présente dans la flore intestinale pour produire, entre autres, un dérivé plus actif le tétrahydrocurcumin (Hassaninasab *et al.* 2011). Les flavonoïdes sont des molécules absorbées par l'intestin grêle et le côlon, puis converties en d'autres constituants par des enzymes de phase I du métabolisme des xénobiotiques. Le microbiote intestinal du rat est ainsi capable de métaboliser le calycosine-7-O- $\beta$ -D-glucoside (flavonoïde abondant d'une herbe traditionnelle chinoise (*Astragali radix*), connue pour son effet anti-inflammatoire) en calycosine-3-O- glucuronide qui possède des propriétés pro-angiogéniques. Le flavonoïde permet le développement de microorganismes bénéfiques comme *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* (Ruan *et al.* 2015).

Les métabolites du tryptophane issus de l'activité du microbiote peuvent réguler l'activité du récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR) (Cheng *et al.* 2015). Une étude utilisant un simulateur *in vitro* de l'écosystème du microbiote intestinal humain a montré que ce dernier est capable de métaboliser des molécules de la famille des HAP (benzo(a)pyrène, naphthalène, pyrène) conduisant en partie à leur bioactivation ou à la production de composés oestrogéno-mimétiques (Van de Wiele *et al.* 2005).

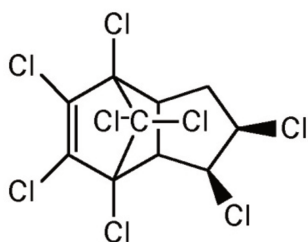
Les hydrazines sont des xénobiotiques utilisés dans les processus industriels et dans la synthèse de produits chimiques agricoles (Choudhary & Hansen 1998). Ces molécules sont connues pour ses effets toxiques sur le foie, la reproduction et le système nerveux et sont associées à une augmentation de certains cancers. L'hydrazine est métabolisée par les CYP1A1, 1A2, 2B1 et 2E2 (Nelson *et al.* 1976). Une étude métabolomique dans des rats axéniques (sans germes bactériens) par rapport aux rats contrôles a montré une augmentation des acides aminés dans leur urine et leur plasma, possiblement liée à une modification du métabolisme de la vitamine B6 et donc de l'activité des aminotransférases ainsi qu'une réponse cytotoxique plus élevée après l'administration orale d'une unique dose de 60 mg.kg<sup>-1</sup> d'hydrazine, probablement liée à des effets neurologiques (Swann *et al.* 2009).



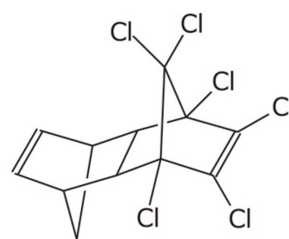




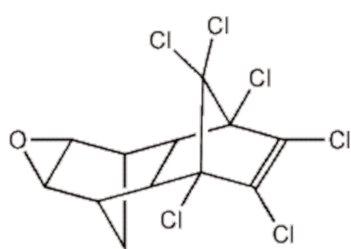
DTT



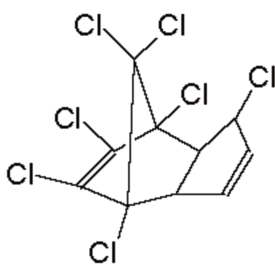
Chlordane



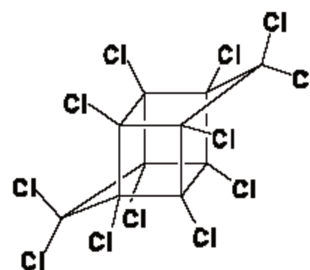
Aldrine



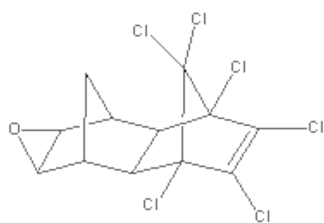
Dieldrine



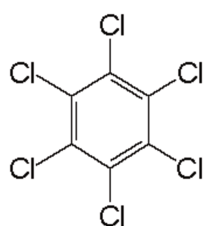
Heptachlore



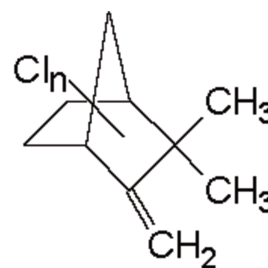
Mirex



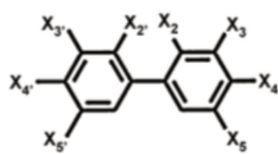
Endrine



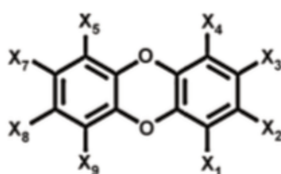
Hexachlorobenzène



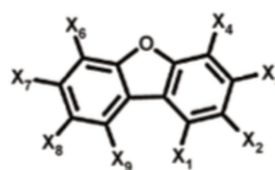
Toxaphène



Polychlorobiphényles  
(PCB)



Polychlorodibenzo-pa-  
dioxines (PCDD)



Polychlorodibenzofuranes  
(PCDF)

Figure 7 : Structures chimiques des polluants et familles de polluants organiques persistants bannis par la convention de Stockholm en 2001

## II. Les polluants organiques persistants

Les polluants organiques persistants (POP) sont des substances chimiques organiques, lipophiles, résultant essentiellement de l'activité humaine. Une molécule classée comme POP reste intacte pendant une longue période (des années), et est largement distribuée dans l'environnement (sol, air, eau). Elle s'accumule également dans le tissu adipeux tout le long de la chaîne alimentaire (EPA,2009<sup>4</sup>) et est toxique pour l'Homme et la faune. Les POP sont définis et classés selon leurs propriétés toxiques et non selon leur formule chimique. La mobilité des POP peut être accentuée par le vent ou l'eau, et entraîne alors une pollution dépassant les frontières et affectant ainsi des populations très éloignées de la source de contamination. Il était devenu nécessaire de réduire au niveau mondial cette pollution néfaste pour la santé humaine et les écosystèmes.

### II.1 Les actions gouvernementales pour lutter contre la pollution d'origine anthropiques

Le traité de la convention de Stockholm, signé en mai 2001 par 152 pays, visait à éliminer ou réduire la production de 12 POP hautement toxiques. Parmi ces 12 POP (Figure 7), 9 composés interdits ou sévèrement restreints étaient utilisés comme pesticides, fongicides ou insecticides :

- Le DDT pour lutter contre les vecteurs de certaines maladies (les moustiques dans le cas de la malaria).
- Le chlordane, l'aldrine, le dieldrine, l'heptachlore étaient employés en agriculture pour détruire principalement les termites, mais aussi les moustiques.
- Le mirex pouvait être soit utilisé comme composant incombustible dans les plastiques, le caoutchouc et les câbles électriques, soit employé contre les cochenilles, les fourmis et les termites.
- L'endrine était un insecticide foliaire pour le coton et les céréales.
- L'hexachlorobenzène était employé comme fongicide pour les semences.

---

<sup>4</sup> <https://www.epa.gov/international-cooperation/persistent-organic-pollutants-global-issue-global-response>  
« EPA : US Environmental Protection Agency »

- Le toxaphène était un insecticide utilisé dans les champs de coton, de céréales, pour protéger les fruits et légumes ou lutter contre les acariens et les tiques.

Le traité de Stockholm restreint également toute une famille de POP issue de produits chimiques industriels : les polychlorobiphényles (PCB) (Cf paragraphe II.3). La moitié des PCB sont des produits commerciaux (Inui *et al.* 2014) et peuvent être utilisés dans les transformateurs, comme liquide échangeur de chaleur, en tant qu'additif dans les peintures, dans les papiers autocopiants, dans les diluants de pesticides ou comme produits incombustibles dans le plastique (Kim *et al.* 2004, Sakurai *et al.* 2006, Shin *et al.* 2006, Dyke *et al.* 2003, Šyc *et al.* 2011).

Les deux dernières familles interdites par la convention de Stockholm sont les polychlorodibenzo-para-dioxines (PCDD) et les polychlorodibenzofuranes (PCDF). Ces composés constituent deux familles de sous-produits non désirés lors de combustions incomplètes.

A l'échelle européenne, le protocole d'Aarhus mis en vigueur depuis le 23 octobre 2004 a repris les objectifs de la convention de Stockholm en ajoutant d'autres pesticides : la chlordécone, le lindane et l'hexachlorocyclohexane par exemple, et plus récemment, en 2012, l'endosulfan, ainsi que les composés de type hexabromobiphényle et Hydrocarbure Aromatique Polycyclique (HAP). A l'heure actuelle, 26 molécules ou familles de molécules sont inscrites sur la liste des POP interdits.

Grâce aux différentes réglementations internationales, les POP listés dans le traité ne sont plus produits dans un grand nombre de pays (USA, Europe). En revanche, certains d'entre eux sont toujours retrouvés dans l'environnement. Outre le fait qu'ils soient parfois encore utilisés dans divers pays, ce sont ceux qui sont très persistants avec un métabolisme lent, ou provenant de composés fabriqués non intentionnellement et libérés dans l'atmosphère par l'intermédiaire, par exemple des fumées des incinérateurs de déchets sans filtre (Fiedler 2007, Hung *et al.* 2016) ou lors de la synthèse de produits chimiques (Lysychenko *et al.* 2015, Weber *et al.* 2010). Une étude, réalisée en Arctique, a ainsi détecté la présence de POP inscrits sur la liste de la convention de Stockholm, ainsi les PCB, le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) et le chlordane (Hung *et al.* 2016). Les mesures récentes montrent que la quantité de ces POP diminue lentement dans l'air arctique, ce qui reflète la réduction des émissions primaires au cours des deux dernières décennies. Cette diminution étant plus lente que théoriquement

attendue, elle montre également l'importance des émissions secondaires (volatilisation à partir des sols et des océans) (Hung *et al.* 2016).

Dans ce travail de thèse, nous avons décidé d'étudier les effets de POP, qui activent des voies de signalisation différentes, seuls ou en mélange sur différents métabolismes hépatiques (alcool, rétinoïdes, glucose) puisque certaines études suggèrent le rôle de certains contaminants dans des pathologies humaines. Je vais décrire dans le paragraphe suivant, certains POP ligands de la voie de signalisation du « Aryl Hydrocarbon receptor » (AhR).

## II.2 Les dioxines

La 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) est un polluant organique persistant appartenant à la grande famille des dioxines. L'ensemble des dioxines constitue deux familles, les PCDD et les PCDF, qui regroupent 210 congénères connus. Ces deux groupes rassemblent des composés tricycliques aromatiques plans, formés de deux cycles de benzène reliés par deux atomes d'oxygène pour les PCDD et un seul pour les PCDF (Figure 8). Les atomes d'hydrogène des cycles aromatiques peuvent être remplacés par au maximum huit atomes de chlore donnant 75 PCDD et 135 PCDF. Ces sous-familles ont des propriétés chimiques similaires. Ce sont des molécules très lipophiles et très stables ce qui leur permettent d'être résistantes à la dégradation (chimique, physique ou biologique) et de s'accumuler tout au long de la chaîne alimentaire.

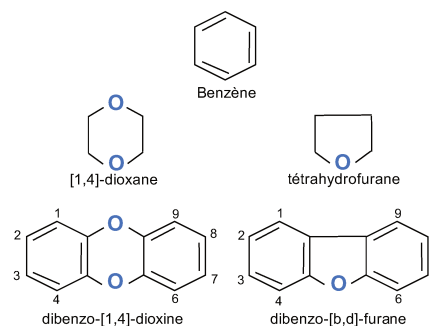


Figure 8 : Structure de bases des dioxines

Des composés chimiques similaires, tels que les dérivés bromés (2,3,7,8-TBDD et 2,3,7,8-TBDF), sont retrouvés dans l'environnement en faible quantité, par exemple dans les fumées d'incinération (Heinbuch & Stieglitz 1993). Ils se forment suite à la combustion de dérivés bromés comme les produits ignifugés (Greim 1997) et sont possiblement dotés d'un potentiel toxique et cumulatif similaire à celui de leurs homologues chlorés. Nous pouvons retrouver également des traces de dérivés polyfluorés et polychlorofluorés dans les fumées de la métallurgie de l'aluminium (Greim 1997).

Des dibenzothiophènes, composés de type PCDF dans lesquels l'atome d'oxygène est remplacé par un atome de soufre, sont également retrouvés dans des processus de combustion (Buser *et al.* 1991).

### II.2.1 La 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD)

La 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine, dite « dioxine de Seveso » depuis l'accident de l'usine ICMESA en 1976 en Italie, est la plus toxique de la famille des dioxines (Figure 9). C'est un composé organochloré qui apparaît lors de phénomènes naturels (feux de forêts, éruptions volcaniques), mais c'est avant tout un sous-produit indésirable obtenu lors de l'incinérateur des déchets, du blanchiment au chlore des pâtes à papier, ou lors de la production d'herbicides et de pesticides organochlorés. La Figure 9 montre comment la TCDD peut être obtenue accidentellement pendant la synthèse d'un herbicide lorsque la température n'est pas contrôlée. La mise en place de filtres installés en sortie des incinérateurs de déchets empêchent le rejet de la TCDD, et des dioxines, en général, dans l'atmosphère. De ce fait la concentration de dioxine a diminué depuis 1995 en France (divisée par 100 entre 1995 et 2006) (ADEME, 2010). Même si, la persistance dans l'environnement de cette molécule contribue à sa toxicité.

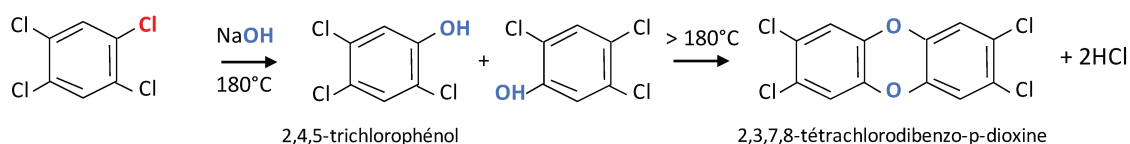


Figure 9 : Exemple de synthèse accidentelle de la TCDD (Mandal 2005).

Le tétrachlorobenzène produit en condition alcaline du 2,4,5-trichlorophénol, un herbicide, qui peut se transformer en dioxine si la réaction a lieu à plus de 180°C.

### II.2.2 Facteur d'équivalence toxique de la TCDD

Au cours de leur formation, les dioxines sont toujours formées avec d'autres congénères de la même famille, ou avec des furanes ou avec des PCB apparentés aux dioxines. Chacun de ces composés pris isolément est potentiellement toxique, mais il est nécessaire de déterminer la toxicité du mélange. Pour cela, un indicateur a été développé : le facteur d'équivalence toxique ou TEF ("Toxic Equivalency Factor"). Il est mesuré en comparant le potentiel toxique de chaque composé chimique par rapport au composé de référence, la TCDD, qui est le plus toxique de la famille des dioxines (TEF = 1). En appliquant ce facteur TEF à chacune des concentrations des composants de l'échantillon, on détermine une valeur toxicologique du mélange de composés chimiques. Ce facteur permet d'établir un seuil d'exposition à ne pas franchir pour éviter une toxicité (Van den Berg *et al.* 2006). Sur les 75 congénères de la famille des PCDD, seuls les sept molécules comportant au minimum quatre atomes de chlore en position 2,3,7,8 sont toxiques. L'utilisation du TEF sous-entend cependant que les différents composés du mélange n'aient pas d'interaction entre eux et qu'ils partagent le même mécanisme de toxicité.

En utilisant les TEF visibles dans le Tableau 1, on peut résumer la dose toxique d'un mélange complexe par l'équivalent toxique (TEQ : « toxic equivalent ») exprimé en gramme. Il est obtenu en faisant la somme des teneurs en gramme des substituants du mélange pondéré par leur TEF respectif (Toyoshiba *et al.* 2004). En 2005, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a fixé la dose journalière de TCDD tolérée à 1 pg par kilogramme de poids corporel et par jour, soit 1pg TEQ (Van den Berg *et al.* 2006).

Tableau 1 : TEF des composés apparentés à la TCDD

Le tableau présente les TEF de chaque molécule, la famille, le nom chimique et la nomenclature de la molécule enregistrée dans la banque de donnée CAS (Sorg 2014).

Famille	Nom	Nomenclature	TEF
PCDD	2,3,7,8-TCDD	D 48	1
	1,2,3,7,8-PeCDD	D 54	1
	1,2,3,4,7,8-HxCDD	D 66	0.1
	1,2,3,6,7,8-HxCDD	D 67	0.1
	1,2,3,7,8,9-HxCDD	D 70	0.1
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	D 73	0.01
	OCDD	D 75	0.0003
	2,3,4,7,8-PeCDF	F 114	0.3
PCDF	2,3,7,8-TCDF	F 83	0.1
	1,2,3,4,7,8-HxCDF	F 118	0.1
	1,2,3,6,7,8-HxCDF	F 121	0.1
	1,2,3,7,8,9-HxCDF	F 124	0.1
	2,3,4,6,7,8-HxCDF	F 130	0.1
	1,2,3,7,8-PeCDF	F 94	0.03
	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	F 131	0.01
	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	F 134	0.01
	OCDF	F 135	0.0003
	PCB	3,3',4,4',5-PeCB	PCB 126
3,3',4,4',5,5'-HxCBP		PCB 169	0.03
3,4,4',5-TCBP		PCB 81	0.0003
3,3',4,4'-TCBP		PCB 77	0.0001

### II.2.3 Voies d'exposition

La stabilité des dioxines, liée à leur caractère aromatique et pondérée par le nombre d'atomes de chlore, et leur lipophilie permettent leur bioconcentration dans la chaîne trophique. Les voies de contamination humaine sont : cutanée, aérienne et alimentaire. Cette dernière est la voie majoritaire due à l'ingestion de produits gras contaminés tels que la viande, le poisson et les produits laitiers (Huwe 2002). Le lait maternel peut également être contaminé par les dioxines (Ulaszewska *et al.* 2011). Une fois absorbée, la TCDD est stockée principalement dans les graisses et est très peu métabolisée. La TCDD a une demi-vie d'élimination de 7 ans environ dans le corps humain (Aylward *et al.* 2013). Lors du métabolisme de la 2,3,7,8 TCDD, les atomes de chlore sont remplacés par des groupements OH, conduisant à la formation de dichlorocatéchol. Les métabolites sont ensuite éliminés par la bile. Le corps élimine également ces molécules par le phénomène de chloracné, caractérisée par la formation sous la peau de petites boules de graisse qui concentrent le toxique avant de l'expulser. Chez la femme, la lactation constitue une des voies majeures d'élimination de la 2,3,7,8-TCDD augmentant en revanche la concentration de ce toxique chez l'enfant.

Une étude réalisée en 2014 a mesuré le taux des dioxines et des furanes dans la nourriture et dans le corps humain de 606 individus issus de familles de pêcheurs français. En moyenne, les individus entre 30 et 44 ans avaient 3,5 ng TEQ.kg<sup>-1</sup> de poids corporel de dioxine dans le sang, contre 2,8 ng TEQ.kg<sup>-1</sup> de poids corporel chez les 18-29 ans et environ 4,1 ng TEQ.kg<sup>-1</sup> de poids corporel chez les 45-79 ans. Les individus étaient exposés à environ 0,4 pg TEQ.kg<sup>-1</sup> de poids corporel, ce qui montre bien la bioaccumulation dans le corps (Béchaux *et al.* 2014). Cette étude montre également que, malgré un déclin du niveau des dioxines en France, le risque pour la santé reste présent.

Dans les rongeurs, les souris mâles sont moins sensibles que les femelles à la TCDD grâce à l'expression exclusivement dans les mâles de la protéine Major Urinary Protein (MUP). Cette protéine MUP présente dans les reins permet d'augmenter l'élimination de la TCDD par voie urinaire (Hakk *et al.* 2009, Sharrow *et al.* 2002).

Dans l'organisme, les effets de la TCDD sont, entre autres, dus à sa liaison au récepteur des hydrocarbures aromatiques (AhR) (Grassman *et al.* 1998). La constante de dissociation



(K<sub>d</sub>) de la TCDD pour le AhR est d'environ 1 nM chez l'Homme alors que dans la souris elle varie de 0.3 à 1.7 nM selon l'espèce (Ema *et al.* 1994).

#### II.2.4 Toxicité de la dioxine

##### ❖ Généralités

Les effets de la TCDD dépendent de nombreux paramètres tels que la voie d'exposition, le temps de contamination, la quantité absorbée, le sexe et l'âge. Les caractéristiques physicochimiques sont liées au degré de chloration des structures aromatiques, la TCDD étant la plus toxique des dioxines (Tableau 1). Elle a été classée dans le groupe 1 des cancérogènes certains pour l'homme par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC). Une exposition brève de l'Homme à la TCDD à forte concentration peut entraîner une chloracné, une altération de la fonction hépatique ainsi qu'un syndrome de cachexie (amaigrissement et fatigue). En revanche, une exposition chronique peut entraîner une perturbation du système immunitaire, nerveux et endocrinien (Grassman *et al.* 1998). La TCDD n'est pas mutagène mais opère comme un carcinogène non génotoxique. Elle agit comme un promoteur tumoral, et ne peut donc pas induire, à elle seule, des tumeurs cancéreuses.

##### ❖ Accidents

Une grande partie des informations relatives à la toxicité de la dioxine chez l'Homme, provient de données obtenues après des expositions accidentelles à de fortes doses dans les populations importantes.

En 1949, la libération accidentelle de TCDD, de l'usine chimique de Monsanto de Nitro en Virginie-Occidentale, a donné lieu à plusieurs cas médicaux de chloracné, d'altération hépatique, de pathologie sanguine et de tumeurs (Sanderman *et al.* 1957).

Lors de la guerre du Viêt-Nam (1962-1971), 72 millions de litres d'herbicide défoliant connu sous le nom d'agent orange, contaminé par la TCDD, ont été pulvérisés sur 10 % du territoire du sud du Viêt-Nam. Les sols étaient contaminés avec une concentration de 2,6 ng.kg<sup>-1</sup> de TCDD comparé à un sol contrôle qui ne contenait que 0,18 ng.kg<sup>-1</sup> (Sycheva *et al.* 2016). Les vétérans américains qui ont participé à cette guerre ont une prévalence supérieure pour les cancers de la thyroïde par rapport aux autres vétérans américains (Le *et al.* 2016). La population vietnamienne exposée à la TCDD présente une augmentation

significative des biomarqueurs de l'apoptose et des stades précoces et tardifs d'altérations nucléaires dans l'épithélium buccal et nasal (Inman *et al.* 2002).

Le 10 juillet 1976, l'accident de l'usine chimique fabriquant un herbicide et bactéricide (2,4,5-trichlorophénol) à Séveso en Italie, libère dans l'atmosphère un nuage de produits chimiques comportant 1 à 5 kg de TCDD. La synthèse de cet herbicide nécessite une température stable à 180°C en condition alcaline. L'augmentation de la température lors de l'explosion a conduit à la synthèse de la TCDD (Figure 9). Dès le lendemain, on pouvait apercevoir des chutes de feuilles des arbres ainsi que la mort de certains petits animaux (lapins, oiseaux). Cet accident a contaminé fortement une zone de 15 kilomètres carrés comportant 37 000 habitants. La surveillance de la population a montré une augmentation de la mortalité par tous types de cancers 15 à 20 ans après l'accident (Boffetta *et al.* 2011, Bertazzi *et al.* 2001a). Une autre étude épidémiologique sur cette cohorte a également mis en évidence une augmentation des tumeurs cancéreuses du système lymphoïde chez les habitants de la zone de Séveso (Pesatori *et al.* 2009).

Pour éviter les contaminations accidentelles de l'Homme par des polluants, liées à des accidents industriels, à des problèmes d'incinération conduisant à la production et à la vente d'aliments contaminés, une surveillance a été mise en place dans les années 2000. Cela permet une détection rapide de la présence de dioxine par exemple, dans les denrées alimentaires. En 1998, une contamination à la dioxine a toutefois été retrouvée dans des volailles et des œufs en Belgique, due à l'alimentation des animaux contaminée par des huiles industrielles usagées contenant des dioxines. De même, en 2008 en Irlande, plusieurs tonnes de viande de porc et de produits dérivés ont été rappelées car la quantité de dioxine était 200 fois supérieure au seuil toléré. L'origine de la contamination venait aussi de l'alimentation des animaux (OMS, 2014).

#### ❖ Toxicité animale

Les études chez l'Homme sont principalement épidémiologiques ou réalisées sur des modèles *in vitro*. Pour réaliser des études systémiques et mécanistiques, on utilise des modèles animaux. De nombreuses études ont été réalisées dans les rongeurs. Le Tableau 2 répertorie quelques exemples de l'effet de la TCDD dans les modèles animaux. Parmi ces effets, on peut remarquer l'importance de la toxicité hépatique (stéatose, fibrose, cancer hépatique) et de perturbations métaboliques dans le foie. La TCDD provoque l'induction de l'expression des EMX de phase I et de phase II. L'activation des CYP, enzymes de phase I (CYP1A2 et CYP1B1), par la TCDD peut jouer un rôle dans le métabolisme de l'œstradiol et donner des dérivés catéchols (réactifs électrophiles) connus pour leur propriétés cancérogènes (Camacho *et al.* 2005). L'induction des CYP est également accompagnée d'une augmentation des ERO (espèces réactives de l'oxygène) qui peuvent oxyder les macromolécules environnantes et en particulier les bases de l'ADN et entraîner des cassures simples ou doubles brins à l'origine de mutations génétiques (Alsharif *et al.* 1994, Barouki *et al.* 2007) expliquant potentiellement l'apparition de certains cancers (leucémie, cancer de l'appareil respiratoire (Bertazzi *et al.* 2001b). La TCDD est donc un promoteur de cancérogénèse mais n'est pas considéré comme un génotoxique. Les propriétés cancérogènes de la TCDD résultent aussi de sa capacité à stimuler la prolifération des cellules hépatiques (Tritscher *et al.* 1995).

Tableau 2 : Exemples de différentes études montrant des effets de la TCDD dans les animaux traités par gavage, ou par injection en intrapéritonéal (IP).

Les doses sont exprimées en kg de poids corporel

Références	Animaux	Traitement par la TCDD	Effets
(Pierre <i>et al.</i> 2014)	Souris C57BL/6J mâles	25 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (IP) (1 injection par semaine pendant 15 jours)	Fibrose hépatique
(Sato <i>et al.</i> 2008)	Souris C57BL/6J et AhR KO mâles	Gavage (5, 50 ou 500 $\text{ng.kg}^{-1}$ ) pendant 18 jours une fois par jour	Altération de la synthèse du cholestérol, des acides gras, et du métabolisme du glucose dans le foie
(Dragin <i>et al.</i> 2006)	Souris C57BL/6J femelles gestantes	25 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ par gavage au 10 <sup>ème</sup> jour de gestation et sacrifice au 18 <sup>ème</sup> jour de gestation	Altérations du développement neuronal embryonnaire.
(Camacho <i>et al.</i> 2005)	Souris C57BL/6J mâles et femelles	1 à 50 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ en IP (1 injection)	Activité apoptotique et une atrophie du thymus
(Van Miller <i>et al.</i> 1977)	Rats Sprague-Dawley mâles	1, 5, 50, 500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ dans la nourriture pendant 78 semaines	Carcinome des cellules squameuses du poumon Nodules néoplastiques et cholangiocarcinome
(Rao <i>et al.</i> 1988)	Hamsters syrien golden mâles	6 injections en IP à 100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pendant 4 semaines	Carcinome des cellules squameuses de la peau
(Della Porta <i>et al.</i> 1987)	souris C57BL/6J croisées avec C3Hf ou BALB/C, mâles et femelles	Gavage pendant 52 semaines à 5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (1 fois par semaine)	Nécrose hépatique Adénome hepatocellulaire Hépatocarcinome
(Kociba <i>et al.</i> 1978)	Rats Sprague Dawley femelles	Dans la nourriture pendant 2 ans à 0,1 $\mu\text{g.kg}^{-1}$	Nodule hyperplastique dans le foie Hépatocarcinome Carcinome de la langue

## II.3 Les polychlorobiphényles (PCB)

### II.3.1 Origine

Les PCB sont des hydrocarbures aromatiques polycycliques halogénés constitués de deux benzènes reliés directement entre eux dans lesquels des atomes d'hydrogène sont substitués par des chlores. Ils ont une structure plane apparentée à celle des dioxines et font partie des polluants organiques persistants bannis par la convention de Stockholm (Figure 7).

Les PCB peuvent être classés dans trois sous-groupes en fonction de la position de l'atome de chlore : les non-ortho, les mono-ortho et les poly-ortho substitués. Seul les non-ortho et les mono-ortho, peuvent lier le AhR et sont donc appelés « dioxin-like » (DL-PCB) (Van den Berg *et al.* 1998, 2006). Les congénères poly-ortho substitués sont appelés « non dioxin-like » PCB (non DL-PCB). Leur mécanisme d'action est encore peu connu. Ils ne se lient pas au AhR mais peuvent activer ou inhiber la transcription de gènes régulés par l'hormone thyroïdienne en interagissant avec le récepteur de cette hormone (Zoeller 2001).

Contrairement aux dioxines qui sont toujours des produits non intentionnels, les PCB sont parfois des produits commerciaux (Inui *et al.* 2014). La pollution environnementale par les PCB est diffuse et d'origine strictement anthropique. La production et l'utilisation de PCB en France sont interdites depuis 1987 et de nombreux procédés industriels ont été proscrits afin d'éviter la formation des PCB et la pollution de l'environnement. Ils ont été utilisés en tant que composant dans les peintures, plastiques, refroidisseurs, joints et mastics par exemple (EPA<sup>5</sup>, (Hu *et al.* 2011), OFEV<sup>6</sup>, 2012). Cependant à l'heure actuelle, des appareils fabriqués avant 1987, renfermant des PCB sont toujours présents et sont susceptibles de fuir, d'exploser ou de brûler, libérant alors dans l'atmosphère les PCB qu'ils contiennent (Tableau 3). Les autres sources actuelles de PCB sont des traitements de dépollution ou des actes de négligence (Abbes *et al.* 2009).

Les appareils contenant des PCB (dont la teneur est supérieure à 50 ppm) doivent être déclarés afin de procéder à leur décontamination et leur élimination selon le code de l'Environnement (huiles industrielles par exemple). Leur longue conservation et une mauvaise

---

<sup>5</sup> <https://www.epa.gov/pcbs/polychlorinated-biphenyls-pcbs-ships>

<sup>6</sup> <http://www.bafu.admin.ch/publikationen/publikation/00579/index.html?lang=fr>

élimination peuvent entraîner une libération dans l'atmosphère de ces toxiques, contaminant par la suite les denrées alimentaires de l'Homme et des animaux.

*Tableau 3 : Concentration de quelques PCB dans l'air et le sol au large d'Istanbul. Les concentrations retrouvées dans l'environnement du PCB126 qui est étudié dans ce projet sont encadrées en rouge. Extrait de (Kuzu et al. 2016)*

Congénères	phase gazeuse (pg.m <sup>-3</sup> )	phase particulaire (pg.m <sup>-3</sup> )	les sols (pg.m <sup>-3</sup> )
PCB6	3.5±10.2	0.4±1.1	5.9±16.7
PCB19	3.1±9	0.1±0.2	0.7±2.7
PCB18	8.8±12.7	0.1<	n.d.
PCB26	1.6±2.5	1.4±3.1	301.5±334
PCB22	6.6±9.4	0.2±0.5	154.5±244.2
PCB45	4±8.2	2.4±3.5	11.8±33.2
PCB52	5±4.6	0.1±0.2	39±122.3
PCB47	3.6±5.4	0.1<	8.7±36
PCB153	1.7±2.2	0.1<	88.4±109.1
PCB126	0.6±2.5	0.4±1.1	207.7±396.9

### II.3.2 Voies d'exposition aux DL-PCB

Tous les PCB sont hydrophobes et s'accumulent dans les graisses. La voie principale d'exposition est donc la voie alimentaire. D'autres études sur les animaux suggèrent que l'inhalation de l'air extérieur pollué ou de l'air intérieur contaminé par des peintures contenant des PCB, représenterait aussi une importante voie d'exposition (Dhakal *et al.* 2014, Hu *et al.* 2011).

Une fois ingérés, les DL-PCB s'accumulent dans le tissu adipeux mais peuvent également être séquestrés dans le foie (Watanabe *et al.* 2013, Diliberto *et al.* 1999). Dans les cellules, ils activent le AhR, et sont éliminés par les voies de dégradation métaboliques impliquant les CYP P450, décrites dans le paragraphe 1.3, ou de façon très lente dans les fécès (Beischlag *et al.* 2008). La demi-vie des PCB diffère selon l'isorfome. Elle est, par exemple, d'environ 11 ans chez l'homme pour la majorité des DL-PCB (Milbrath *et al.* 2009). Cependant, il a été décrit que le PCB126 a une demi-vie d'environ 3 ans chez l'Homme (Milbrath *et al.* 2009). Les PCB peuvent s'accumuler dans le lait maternel, et sont ainsi excrétés de la mère, devenant une source primaire d'exposition des nouveaux-nés (Wong *et al.* 2012). Le fœtus *in utero* est également exposé aux DL-PCB par la voie trans-placentaire (Jacobson *et al.* 1985). Lors d'une exposition chronique aux PCB de la mère, des effets neuro-comportementaux ont été observés chez le jeune enfant fortement exposé pendant la grossesse et l'allaitement (Wilhelm *et al.* 2008).

### II.3.3 Effets toxiques des PCB

De fortes expositions aux PCB lors de rejets accidentels ou au cours d'activités professionnelles peuvent provoquer des effets cutanés comme la chloracné, la pigmentation des ongles et de la peau, une hypersécrétion oculaire et une inhibition de l'activité de certaines enzymes hépatiques (Abbes *et al.* 2009). Ils représentent ainsi un facteur important dans l'apparition des maladies non alcooliques du foie (Wahlang *et al.* 2014). Les PCB peuvent également altérer les fonctions endocrines (Bell 2014) et neuronale, et induire le développement de tumeurs (Crinnion 2011, Glauert *et al.* 2001, Ludewig 2001). Une étude a par exemple montré l'implication des PCB dans l'apparition du cancer du poumon chez l'homme (Kimbrough & Krouskas 2003).

Un des congénères, le PCB 126 (Figure 10) que nous avons choisi d'étudier, a été classé cancérigène pour l'Homme (classe 1) (OMS, 2000). Tous les autres PCB apparentés ou non à la famille des dioxines ont été réévalués et classés dans la classe 1 en 2013 (Lauby-Secretan *et al.* 2016). L'OMS a fixé une dose journalière admissible de  $14 \text{ pg.kg}^{-1}$  de PCB126 (OMS, 2000).

Le PCB 126 est l'un des PCB les plus toxiques de l'environnement avec le TEF le plus élevé de 0,1. Outre son rôle dans la cancérogenèse, il est impliqué dans l'hypertrophie et la stéatose hépatique, l'involution du thymus et l'inflammation (Klaren *et al.* 2015, Lai *et al.* 2010, Wang *et al.* 2012, National Toxicology 2006). Le PCB 126, *via* l'activation du AhR, induirait le développement de cancers dans l'animal et l'Homme selon un processus identique à celui de la TCDD (Ludewig 2001).

Une étude de deux ans sur des rats femelles a montré qu'en fonction de la dose, le PCB 126 induisait une hépatotoxicité mais également une augmentation de l'incidence de certains cancers (cholangiocarcinome et adénome hépatocellulaire (National Toxicology 2006). Il semble jouer un rôle important dans la pathophysiologie de la NAFLD en augmentant la synthèse des TG hépatiques et en altérant leur élimination, dans les modèles de rongeurs et dans le modèle d'hépatocytes humains en culture primaire (Boucher *et al.* 2015, Wahlang *et al.* 2014). *Via* l'activation du AhR, il augmente la taille du foie, la concentration des lipides hépatiques et les espèces réactives de l'oxygène dans les souris 129S (Klaren *et al.* 2016). Il perturbe également l'équilibre redox, l'expression des enzymes antioxydantes (à l'origine de la synthèse de glutathion) et diminue le taux des métaux nécessaires à l'activité de ces enzymes (zinc, sélénium) dans le foie des rats Sprague Dawley (Lai *et al.* 2010).

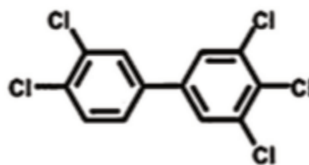


Figure 10 : Structure chimique du PCB 126 (3,3',4,4',5-pentachlorobiphényle)



## II.4 L'endosulfan

La présence de pesticides dans l'air est le signe de pratiques agricoles aux alentours des sites de mesures (AASQA<sup>7</sup>). Le taux des pesticides dans l'air suit un cycle saisonnier conditionné par leur utilisation. Le printemps et l'été sont les saisons où le taux de pesticides est le plus élevé. Nous avons choisi d'étudier un membre de la famille des pesticides organochlorés, l'endosulfan (Figure 11).

L'endosulfan est un insecticide et un acaricide (Balasubramanian *et al.* 1985) qui a été interdit en France en 2006 puis inscrit en 2011 sur la liste des POP reconnus par la Convention de Stockholm pour une interdiction progressive jusqu'en 2023. Cette molécule, le 6,7,8,9,10,10-hexachloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahydro-6,9-methano-2,4,3-benzodioxathiepin-3-oxide a été brevetée en 1956. L'insecticide commercialisé contient un mélange de deux stéréo-isomères avec une proportion de 70 % d' $\alpha$ -endosulfan et 30 % de  $\beta$ -endosulfan (Stanley *et al.* 2009). La neurotoxicité observée dans les insectes est attribuée à la forme alpha de l'endosulfan plus toxique que le stéréoisomère beta. Les effets neurologiques sont liés au fait que l'endosulfan est un antagoniste des récepteurs GABA. Il inhibe l'entrée des ions chlorure et entraîne une stimulation excessive du système nerveux central, léthal pour les insectes. En plus des effets neurotoxiques, des altérations du système reproducteur de la faune aquatique et terrestre ainsi que de l'Homme ont été observées (Sutherland *et al.* 2004).

L'endosulfan peut être métabolisé par les micro-organismes résidant dans les sols (champignons, bactéries). Il est alors oxydé en sulfate d'endosulfan ou hydrolysé en endosulfan diol (Figure 12) (Silva & Beauvais 2010). La nature physicochimique des sols (température, pH, eau) conditionne ces réactions. Les métabolites de ce pesticide sont également toxiques pour l'Homme. Ainsi, la demi-vie du pesticide et ses métabolites augmentent à de faibles températures, un pH bas et en condition anaérobie. Elle varie entre 9 mois à 6 ans. Ce pesticide a été détecté dans des zones très reculées de la planète démontrant sa caractéristique volatile et persistante (Jayashree & Vasudevan 2007, Goebel *et al.* 1982).

La teneur en endosulfan de l'ensemble des produits agricoles est limitée à 0,1 mg.kg<sup>-1</sup>. Dans les eaux destinées à la consommation humaine, la limite de 0,1  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Ces valeurs ont

---

<sup>7</sup> AASQA : Association Agrée de Surveillance de la Qualité de l'Air

été fixées par rapport à la NOAEL<sup>8</sup> de 0,7 mg.kg<sup>-1</sup>.jour<sup>-1</sup> (OMS)<sup>9</sup>. Récemment, la contamination de mères par l'endosulfan a été associée à un poids de naissance plus élevé des nouveau-nés contaminés *in utero* en Espagne du sud (Monteagudo *et al.* 2016).

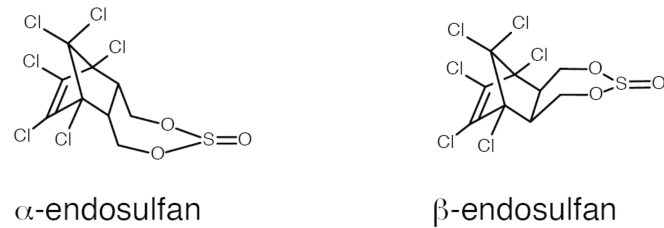


Figure 11 : Structure chimique des stéréoisomères alpha-endosulfan et beta-endosulfan

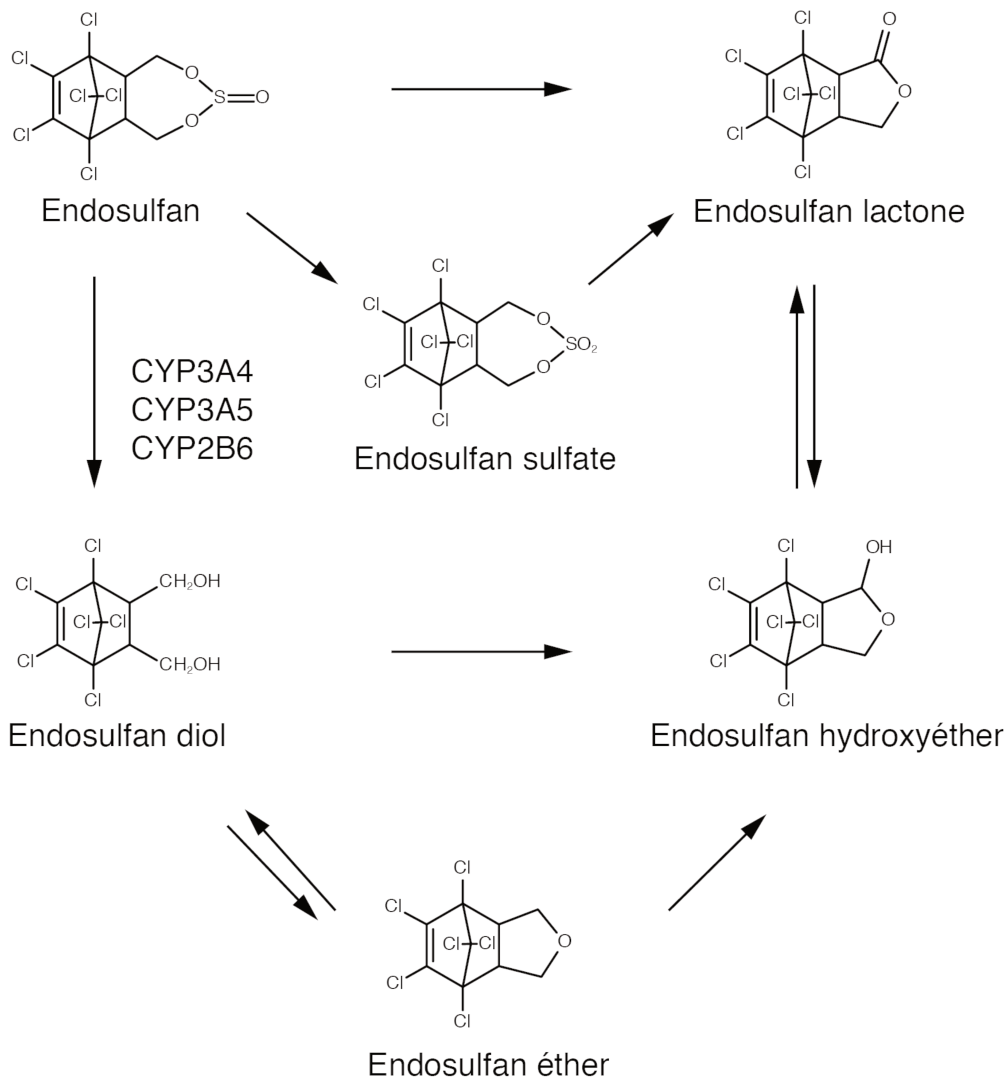


Figure 12 : Réactions chimiques de la formation des métabolites de l'endosulfan (Silva & Beauvais 2010)

<sup>8</sup> NOAEL : No Observable Adverse Effect Level (Dose sans effet toxique observable)

<sup>9</sup> [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/water-quality/guidelines/chemicals/endosulfan.pdf?ua=1](http://www.who.int/water_sanitation_health/water-quality/guidelines/chemicals/endosulfan.pdf?ua=1)

L'exposition à l'endosulfan et ses métabolites varie selon la population. La population générale est contaminée par ingestion de nourriture contaminée alors que les professionnels sont exposés à ces polluants par la voie aérienne majoritairement, et dans certains cas par la voie cutanée.

Dans l'organisme, l'endosulfan se loge dans le tissu adipeux ou dans le cerveau, et en quantité moindre dans les reins et le foie. Il est métabolisé par les enzymes de détoxification (CYP3A4, CYP3A5 et le CYP2B6 pour l'isomère alpha). L'endosulfan sulfate est le métabolite prédominant dans le tissu adipeux des animaux (Sutherland *et al.* 2004). L'endosulfan est capable de se lier à deux facteurs transcriptionnels xéno-senseurs, appartenant à la famille des récepteurs nucléaires, le pregnane X récepteur (PXR) (Coumoul *et al.* 2002, Casabar *et al.* 2010), et, de manière moindre, au constitutive androstane récepteur (CAR) (Casabar *et al.* 2010, Savary *et al.* 2014), ainsi qu'au récepteur des œstrogènes (ER) expliquant ses effets œstrogéniques et son classement comme perturbateur endocrinien (Coumoul *et al.* 2001). Le Tableau 4 recense les différents effets connus de l'endosulfan sur l'organisme.

Tableau 4 : Effets toxiques de l'endosulfan sur quelques espèces

Homme	Effets neurologiques : - excitation - hyperesthésie - perte de conscience - épilepsie pouvant entraîner la mort Toxicité hépatique Acidose métabolique Altérations cardiaques	(Yavuz <i>et al.</i> 2007, Eyer <i>et al.</i> 2004)
Poissons	Neurotoxicité embryonnaire Dégénérescence et nécrose intestinale Altération de la reproduction Altération de la structure des gonades et régression des ovaires Altération de l'expression des enzymes anti-oxydantes hépatiques (Induction GPx, GST, GSH et diminution de la catalase) ; augmentation de la peroxydation des lipides dans le foie et les reins Génotoxicité	(Stanley <i>et al.</i> 2009, Dutta & Arends 2003, Gill <i>et al.</i> 1991, Cengiz <i>et al.</i> 2001, Chakrabarty <i>et al.</i> 2012, B. Willey & Krone 2001, Palma <i>et al.</i> 2009)
Rongeurs	Effets neurologiques Altération du système immunitaire Toxicité hépatique Toxicité rénale Effets endocriniens	(Hack <i>et al.</i> 1995, Paul <i>et al.</i> 1994)



### III. Les récepteurs des polluants

#### III.1 Récepteur AhR

Certains polluants organiques persistants étudiés au cours de cette thèse sont des ligands du AhR (Aryl Hydrocarbon Receptor, Récepteur aux Hydrocarbures Aromatiques).

##### III.1.1 Structure et ligands du récepteur

Le AhR a été décrit à l'origine comme un senseur environnemental de 106 kDa appartenant à la famille bHLH-PAS (« Basic Helix Loop Helix (bHLH) – Period {Per}- AhR Nuclear Translocator {ARNT}-Single minded {Sim} »). Cette protéine est un facteur transcriptionnel constitué de différents domaines fonctionnels (Burbach et al., 1992; Ema et al., 1992; Swanson and Bradfield, 1993; Hankinson, 1995) (Figure 13). Le domaine bHLH contenant le domaine de liaison à l'ADN, est pourvu d'une séquence nommée Nuclear Localisation Signal (NLS), permettant à la protéine d'être transloquée dans le noyau. La région centrale contient deux domaines PAS (A et B), PAS B étant impliqué dans la liaison du ligand. La dernière région est un domaine de transactivation (TAD) riche en glutamines (Hoffman et al., 1991 ; Huang et al., 1993 ;Nambu et al.,1991).



Figure 13 : Structure du récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR).

Le AhR est constitué de différents domaines. Le bHLH permet la liaison à l'ADN et possède le signal de localisation nucléaire (NLS). Au centre le AhR est formé de deux régions PAS (A et B) dont PAS B permet la liaison avec le ligand. La dernière région renferme le domaine de transactivation (TAD). PPI : « Protein – Protein Interaction »

Le AhR est le seul membre de la famille bHLH/PAS à être activé par des ligands *via* le domaine « Ligand Binding Domain » (Bersten *et al.* 2013). Cette famille comporte d'autres protéines, en particulier son partenaire ARNT (AhR Nuclear Translocator aussi appelé « Hypoxia Inducible Factor 1  $\beta$  »), HIF1-alpha sensible à l'hypoxie, les SIM intervenant dans le développement neuronal ou la protéine CLOCK qui joue un rôle dans le cycle circadien. Les ligands endogènes connus sont les dérivés du tryptophane, la cynurénine, le FICZ (6-formylindolo[3,2-b]carbazole) et l'ITE (« 1'H-indol-3'carboxyl-thiazol-4-carboxylic acid méthyl ester ») (Figure 15) (Nguyen et Bradfield, 2008). Les ligands agonistes exogènes du récepteur

Ah, sont principalement les hydrocarbures aromatiques halogénés (HAH) tels que la TCDD, les composés polycycliques tels que le benzo(a)pyrène ou le 3-MéthylCholanthrène et les DL-PCB. Tous ces ligands ont la particularité d'avoir une partie co-planaire.

Le AhR est une protéine ubiquitaire exprimée dans différentes espèces. Dans les souris et chez l'Homme, il est exprimé dans de nombreux organes (foie, poumon, cœur, thymus, rein, cerveau) (Abbott *et al.* 1999, Kewley *et al.* 2004, Puga *et al.* 2009). Le poisson zèbre et les invertébrés, comme le ver nématode *C. elegans* ou la drosophile, expriment également un orthologue du AhR.

### III.1.2 Mode d'action

En absence de ligand, le AhR réside dans le cytoplasme où il est lié aux protéines chaperons et co-chaperons (HSP90, XAP2, p23 et la kinase SRC). Lorsqu'un ligand tel que la TCDD (Figure 8), hydrophobe et capable de traverser la membrane plasmique, arrive dans le cytoplasme, il se fixe au récepteur AhR induisant un changement de conformation (Figure 14). La protéine SRC est alors libérée dans le cytoplasme et active des voies de signalisation dites non génomiques (Bombick and Matsumura. 1987).

Le AhR lié au ligand est transloqué dans le noyau et s'hétérodimerise avec la protéine « AhR Nuclear Translocator » (ARNT). Cette liaison s'accompagne de la libération des protéines chaperons (HSP90, XAP2, p23) (Swanson *et al.* 1993, Crews 1998, Whitlock Jr 1999, Nebert & Dalton 2006, Mimura *et al.* 1999). Ce complexe AhR/ARNT agit comme facteur de transcription en se fixant sur une séquence consensus appelée « Dioxin Responsive Element » (DRE) ou « Xenobiotic Responsive Element » (XRE) (5'-TNGCGTG(A/C)-3') située dans les régions régulatrices des gènes cibles (Mimura *et al.* 1999).

L'activation de cette voie de signalisation du AhR dite « génomique » induit alors l'expression de gènes cibles, en particulier ceux codant pour les enzymes responsables du métabolisme des xénobiotiques (EMX), notamment les cytochromes P450 (CYP) 1A1, 1A2, 1B1 (Hankinson 1995) mais aussi des protéines du cycle cellulaire, de l'inflammation ou de la prolifération. Le complexe AhR/ARNT est ensuite désassemblé et la protéine AhR est exportée du noyau vers le cytoplasme où elle subit une ubiquitylation, signal de dégradation par le protéasome (Davarinos & Pollenz 1999, Abel & Haarmann-Stemmann 2010). Le répresseur de

la protéine AhR (AhRR), dont l'expression est augmentée par l'activation du AhR, permet également de réguler l'activité du AhR par un rétrocontrôle négatif (Mimura *et al.* 1999). Ce répresseur forme un complexe inactif avec ARNT, empêchant ainsi la liaison AhR/ARNT.

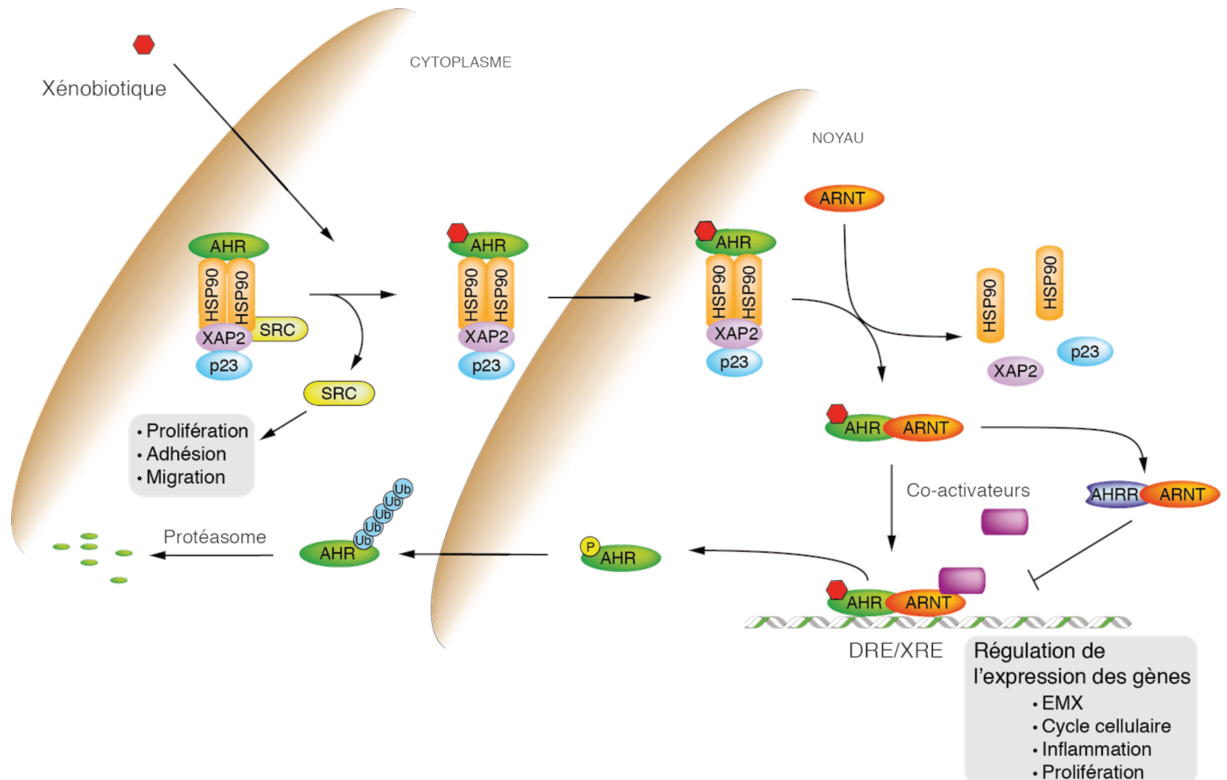


Figure 14 : Voies de signalisation du AhR

La liaison d'un xénobiotique au AhR peut activer la voie génomique (ARNT) ou non génomique (SRC). La voie génomique permet la transcription de gènes cibles (métabolisme des xénobiotiques (EMX), cycle cellulaire, inflammation ou prolifération). La voie non-génomique active les voies de signalisation ayant un rôle dans la prolifération, l'adhésion et la migration. A la suite de son activité transcriptionnelle, AhR est dégradé par le protéasome. AhRR, induit par AhR, joue le rôle de dominant négatif en se liant à ARNT.

L'activation de la voie de signalisation du AhR varie en fonction du ligand lié (agoniste, antagoniste). L'expression des enzymes cibles de la voie de signalisation AhR/ARNT peut varier dans le temps et en fonction de la concentration du ligand. Afin d'évaluer les effets des expositions aux composés chimiques qui sont des ligands du AhR (HAP, PCB, TCDD ou autres), le dosage de l'activité « 7-ethoxyresorufin-O-deethylase » (EROD) du CYP1A1 est utilisé comme biomarqueur. Le Tableau 5 indique l'activité EROD mesurée dans le foie isolé de rats femelles Sprague-Dawley traitées par gavage, 5 fois par semaine, à différentes doses de TCDD ou de PCB 126 pendant 14, 23 ou 53 semaines.

Tableau 5 : Activité EROD moyenne dans le foie des rats Sprague-Dawley après administration des ligands du AhR, TCDD et PCB 126 (National Toxicology Program 2006)<sup>10</sup>.

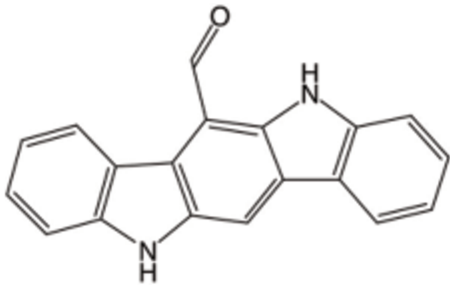
Congénères	Dose ng/kg/jour	Temps d'observation		
		14 semaines	31 semaines	53 semaines
TCDD	0	30.52 ± 1.48	30.93±1.26	30.22±1.59
	10	1550.31±116.12	1238.36±74	1280±95.3
	46	2064.69±134.62	2548.92±156.03	1726.81±107.57
	100	2129.73±88.57	2974.92±156.03	1871.47±109.14
PCB 126	0	13.29±0.8	22.88±1.91	40.39±2.42
	10	82.25±6.58	260.78±20.19	329.91±30.73
	30	290.88±30.93	659.68±85.36	1042.83±51.30
	100	854.62±60.43	1617.46±170.40	1537.23±121.73

Le degré d'activation du AhR varie en fonction des ligands qui se lient au récepteur et de leur mode d'administration. Par exemple, la TCDD induit l'expression du CYP1A1 par le AhR contrairement au resvératrol, aussi ligand du récepteur (Gouédard *et al.* 2004b). En revanche, le resvératrol induit plus l'expression de PON-1 (Paraoxonase-1) que la TCDD (Gouédard *et al.* 2004a). L'administration systémique du FICZ réduit les signes cliniques de l'encéphalomyélite (EAE) dans un modèle murin, alors que son injection locale, incorporée dans l'émulsion de l'antigène pour induire l'EAE, semble promouvoir l'activation des cellules Th17, aggravant ainsi la pathologie (Quintana *et al.* 2008).

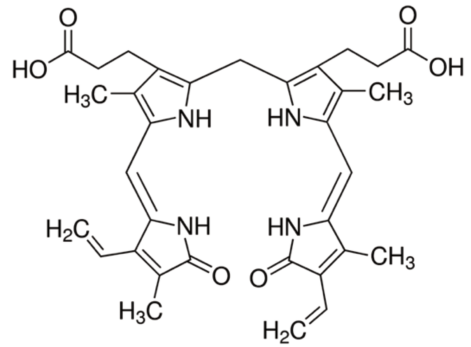
La quantité de protéine AhR est régulée par le système de dégradation ubiquitine/protéasome (Ma & Baldwin 2000). Le récepteur est dégradé par le protéasome après son activation par un ligand. Par exemple, un traitement à la TCDD dans des cellules de souris hépatiques diminue la demi-vie (de 28 heures à 3 heures) de la protéine AhR *via* le protéasome 26S (Ma & Baldwin 2000).

<sup>10</sup> valeurs pour la TCDD : [https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/lt\\_rpts/tr521.pdf](https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/lt_rpts/tr521.pdf)  
valeurs pour le PCB 126 : [https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/lt\\_rpts/tr520.pdf](https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/lt_rpts/tr520.pdf)

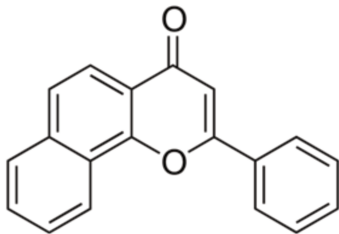




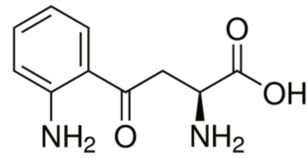
ITE : 2-(1H-Indol-3-ylcarbonyl)-4-thiazole



Billirubine



Alpha naphthoflavone



FICZ : 6-Formylindolo[3,2-b]carbazole

Figure 15 : Structure chimique de ligands endogènes du AhR

### III.1.3 Rôles du AhR

L'importance du rôle du AhR est soulignée par sa conservation et son évolution à travers les espèces (Qin & Powell-Coffman 2004, Qin *et al.* 2006, Williams *et al.* 1996). La fonction classiquement décrite chez l'Homme est liée à son rôle dans l'expression des EMX. Les invertébrés possèdent des orthologues du AhR sans ligand connu à ce jour et ne jouant pas de rôle dans la détoxification des xénobiotiques. L'orthologue du AhR dans *Drosophila melanogaster* est impliqué dans le développement de l'œil, des pattes et des ailes, comme le montre le mutant « Spineless » (Ss). Dans le nématode *Caenorhabditis elegans*, l'orthologue AHR-1 est essentiel pour la différenciation et la migration neuronale (Qin *et al.* 2006, Williams *et al.* 1996). Ces fonctions « historiques » sont probablement encore présentes chez l'Homme, rôle soutenu par le concept des fonctions « endogènes » du récepteur.

#### ❖ Rôle endogène du AhR

Les études sur des modèles de souris transgéniques invalidant le AhR, ont montré un rôle physiologique de ce récepteur dans le développement et l'homéostasie de certains organes (foie, système cardiovasculaire et immunitaire) (Fernandez-Salguero *et al.* 1996, Lahvis *et al.* 2000). Puis les études épidémiologiques basées sur la réponse cellulaire aux xénobiotiques, ont montré l'implication de la voie de signalisation du AhR dans différentes pathologies (altérations du système immunitaire, du métabolisme lipidique, dommages hépatiques et apparition de certains cancers) (Mulero-Navarro & Fernandez-Salguero 2016). Enfin, des travaux ont suggéré l'existence de ligands endogènes du AhR activant des réponses dépendant du type cellulaire (Nguyen & Bradfield 2008). Ces découvertes suggèrent ainsi que le rôle « classique » du AhR dans le métabolisme des xénobiotiques ne soit pas son unique fonction.

Les ligands endogènes connus sont les dérivés du tryptophane, la cynurénine, le FICZ et l'ITE (Figure 15) (Nguyen & Bradfield 2008). Par exemple, il a été démontré que le FICZ pouvait induire l'activité du CYP1A1 *via* le AhR (Rannug *et al.* 1987, Oberg *et al.* 2005). La bilirubine et la biliverdine sont également des agonistes du AhR (Kerkvliet 2009). La biliverdine est métabolisée en bilirubine qui est ensuite conjuguée à un acide glucuronique par l'enzyme UDP glucuronosyltransférase 1A1 (UGT1A1) afin de permettre son élimination à travers la bile. Le AhR activé par ces deux agonistes peut induire l'expression de l'UGT1A1 et ainsi éviter une

accumulation de bilirubine qui est le signe d'un ictère (Kapitulnik 2004, Togawa *et al.* 2008).

Des études réalisées principalement dans différents modèles murins KO pour le AhR, ont montré différents rôles du AhR dans la différenciation, la pluripotence, la prolifération cellulaire, dans la modulation de la chromatine, dans les fonctions de barrière épidermique et les régulations immunitaires (Fernandez-Salguero *et al.* 1996, 1995, Schmidt *et al.* 1993, Mimura *et al.* 1999, Lahvis *et al.* 2000). Des études ont également montré l'effet bénéfique des ligands du AhR retrouvés dans l'alimentation. Par exemple, les flavonoïdes ligands du AhR ont des effets anti-allergiques et anti-inflammatoires et pourraient être prescrits en complément alimentaire pour réguler l'expression et l'activation du récepteur endogène afin de conserver son rôle physiologique (Benavente-Garcia & Castillo 2008, Kawai *et al.* 2010).

#### ❖ L'approche thérapeutique du AhR

La recherche de ligands du AhR à des fins thérapeutiques a été mise en place afin de traiter des pathologies dans lesquelles ce récepteur est impliqué : cancers (rôle oncogène ou suppresseur de tumeur), altérations immunitaires, ou maladies inflammatoires, ... Son rôle dans la production des cellules souches hématopoïétiques en fait également une cible possible pour le contrôle de ce processus.

Le développement de médicaments ciblant le AhR est basé sur les modulateurs du AhR spécifiques (SAhRM) permettant une activité agoniste ou antagoniste vis-à-vis du récepteur (Jin *et al.* 2012). En effet, les différences d'activité du récepteur sont dues à de multiples facteurs tels que les changements de conformation, l'affinité pour son ligand, la nature et la concentration de ce dernier et le tissu dans lequel il est exprimé. Ces différents paramètres modulent ainsi l'expression des gènes cibles. Les différences d'activité du récepteur Ah pourraient être liées aussi au recrutement ou non du partenaire ARNT, et donc de la libération de la protéine chaperon HSP90 activant potentiellement d'autres voies comme la phosphorylation de la kinase de stress ERK (Puga *et al.* 2009).

Dans les cellules de l'hépatocarcinome humain HepG2, la TCDD induit l'expression du gène du « plasminogen activator inhibitor type 2 » (PAI-2 = serpine B2) (Gohl *et al.*, 1996) et du marqueur métastatique « anterior gradient 2 » (AGR2) (Ambolet-Camoit *et al.* 2010), qui favorisent la migration et l'invasion cellulaire. La cynurénine, ligand du AhR, est retrouvée en forte concentration dans certaines tumeurs humaines et favorise la progression tumorale

(Opitz *et al.* 2011). De même, d'autres études ont montré que l'inhibition de l'expression du AhR diminuait l'expression du facteur de croissance de fibroblastes (FGF) et de l'ostéopontine dans les cellules cancéreuses de poumon (Chuang *et al.* 2012). Le AhR étant fortement exprimé dans certaines tumeurs (pancréas, prostate, poumon, œsophage), une molécule antagoniste thérapeutique pourrait être un bon candidat pour le traitement de ces pathologies (Safe *et al.* 2013, Lin *et al.* 2003, Koliopanos *et al.* 2002, Jaffrain-Rea *et al.* 2009, Ishida *et al.* 2010, Gluschnaider *et al.* 2010). L'antagoniste le plus connu du AhR est l'alpha-naphthoflavone (figure 12) mais cette dernière a également une activité agoniste à forte concentration (Gasiewicz *et al.* 1996). Un antagoniste avec une très forte affinité, StemRegenin 1 (SR1), a été récemment développé. *In vitro*, il augmente la prolifération des cellules souches hématopoïétiques (HSC) CD34+ issues de l'Homme, du singe et du chien sans effet sur les HSC de souris (Boitano *et al.* 2010).

L'antagoniste ITE et la bilirubine sont des candidats pour diminuer les altérations immunitaires. La bilirubine diminue le développement de maladies auto-immunes dans les souris alors que sa déplétion augmente significativement la maladie (Kerkvliet 2009). L'administration d'ITE réduit le niveau d'expression du facteur transcriptionnel Oct4 et induit la différenciation des cellules souches cancéreuses en portant atteinte à leur potentiel tumorigène dans deux modèles de xénogreffes tumorales sous-cutanée et orthotopique (Zhao *et al.* 2015). Par ailleurs, dans le cancer de l'ovaire, il a été démontré que l'ITE régule la prolifération et la migration des cellules cancéreuses par l'intermédiaire du AhR dans des modèles *in vitro* et *in vivo*. La compréhension du mécanisme d'activité anti-proliférative du AhR dans les cellules cancéreuses ovariennes du AhR pourrait aider à optimiser les stratégies pour le traitement de cette pathologie (Wang *et al.* 2013). Les nouveaux rôles des dérivés du tryptophane (dont fait partie l'ITE), ainsi que l'implication probable de la voie AhR dans la régulation des cellules souches, ouvrent ainsi de nouvelles voies thérapeutiques intéressantes pour cibler les cellules cancéreuses.

#### ❖ Effets bénéfiques de l'utilisation des ligands du AhR dans les régimes alimentaires

De nombreux ligands antagonistes ou agonistes du AhR sont présents dans l'alimentation et seraient des outils potentiels contre la progression tumorale ou l'inflammation. Des polyphénols, ligands du AhR, sont retrouvés dans certains fruits et

légumes, le thé et le vin (les flavonoïdes comme quercétine, apigénine et kaempférol et les stilbénoides comme le resvératrol) (Van der Heiden *et al.* 2009). Dans cette famille, le resvératrol agit comme antagoniste du AhR et par conséquent de l'expression du CYP1A1 dans les cellules HepG2 (Ciolino *et al.* 1998) alors qu'il n'a aucun effet dans les cellules HuH7 (Gouédard *et al.* 2004b). En revanche, il active le gène PON-1 dans ce dernier modèle et dans des hépatocytes humains via le AhR (Gouédard *et al.* 2004a). Les différences peuvent être liées aux modèles cellulaires et aux gènes étudiés. Dans les deux cas, l'effet du resvératrol serait bénéfique (inhibition de l'activité du CYP1A1 et augmentation de l'expression de PON-1, protéine avec une activité cardio-protectrice). Les métabolites issus du catabolisme du resvératrol, l'indol-3-carbinol (I3C) et l'indolo{3,2}carbazole ont également une forte affinité pour le AhR (Bjeldanes *et al.* 1991). L'I3C possède des propriétés anti-cancéreuses, anti-oxydantes et anti-inflammatoires (Singh *et al.* 2014). L'I3C empêche le développement de tumeurs du foie ou des glandes mammaires (Wattenberg & Loub 1978, Katchamart & Williams 2001). Un essai clinique a utilisé l'I3C sous forme de complément alimentaire. Pris tous les jours à une dose allant de 400 mg à 800 mg, il a été très bien toléré en phase I clinique chez 17 femmes ayant un risque élevé du cancer du sein (Reed *et al.* 2005).

L'exposition de la mère aux agonistes du AhR peut être un facteur de risque de cancer du sein pour la génération suivante dans le modèle de rat Sprague Dawley. L'apparition de la pathologie s'explique par des modifications épigénétiques inhibant la protéine suppresseur de tumeur Breast cancer 1 (BRCA-1) partiellement annulées par la pré-exposition au resvératrol (Papoutsis *et al.* 2015). Un régime contenant des antagonistes du AhR pourrait ainsi avoir un effet protecteur contre le cancer du sein.

#### ❖ AhR et système immunitaire intestinal

Le AhR joue un rôle protecteur de la barrière épithéliale intestinale. En effet, lors d'attaques de cette barrière intestinale par des agents infectieux, l'activation du AhR induit une réponse du système immunitaire pour lutter contre les pathogènes et favorise la prolifération cellulaire pour réparer la barrière épithéliale lésée (Figure 16). Les ligands du AhR (TCDD et I3C) peuvent induire le développement des lymphocytes T-reg et supprimer la différenciation des lymphocytes TH17 *via* des miARN. Un régime riche en indole permet de réduire l'hypersensibilité due aux allergies en modifiant le rôle des Th17 pro-inflammatoires (Singh *et al.* 2014). Le tryptophane (contenant un indole) est l'un des neuf acides aminés

essentiels et l'un des plus abondants des 21 acides aminés dans l'alimentation humaine. Cet acide aminé et ses catabolites (cynurénine, acide cynurénique et tryptamine) sont connus pour leurs fonctions immunosuppressives. Dans l'intestin, le tryptophane est catabolisé soit par les lactobacilles commensaux ou par les enzymes indoléamine-2,3-dioxygénases (IDO) 1 et 2 qui sont fortement exprimées dans les tissus humains. L'activité de l'IDO est régulée après l'activation du AhR en réponse aux toxines environnementales et aux ligands endogènes (Romani *et al.* 2014), expliquant ainsi le rôle du AhR dans l'inflammation chronique de l'intestin par exemple. La conversion du tryptophane par les bactéries de la flore intestinale donne des catabolites ligands du AhR et cela conduit à la production d'IL-22 par les cellules lymphoïdes. L'IL-22 active la protéine STAT3 et avec l'IL-17 favorisent la production de peptides anti-bactérien AMP (Romani et al., 2014).



*Figure 16 : Activation du AhR par les dérivés du tryptophane pour la protection de la barrière épithéliale*  
*Les dérivés du tryptophane alimentaire formés par la flore intestinale lie le AhR, ce qui entraîne la production de l'IL-22 via les cellules lymphoïdes innée (ILC3). IL-22 active STAT3 et augmente la production des peptides anti-bactériens (AMP) (Romani et al., 2014).*

Les bactéries probiotiques et les levures de la flore intestinale humaine et de la peau sont capables de produire des ligands du AhR tels que l'indole-3-aldéhyde et l'indirubine. Ces ligands activent ainsi la fonction de barrière épithéliale de l'intestin et de la peau (Fukumoto *et al.* 2014). Le microbiome contient de nombreux ligands du AhR ayant des effets disparates sur l'homéostasie du système immunitaire. Les modifications de la flore microbienne influent sur la nature des ligands et entraînent ainsi des changements complexes de l'impact du AhR sur l'homéostasie immunitaire.

Le AhR est capable de moduler le processus inflammatoire en cas de psoriasis, une maladie auto-immune. Le AhR activé diminue l'inflammation, et la présence d'antagonistes de ce récepteur augmente l'inflammation. Le ligand endogène FICZ peut également réduire la

réponse inflammatoire dans les souris atteintes de cette pathologie (Di Meglio *et al.* 2014).

Tableau 6 : Récapitulatif succinct du rôle du AhR dans l'organisme

#### AhR et Cancer

- Migration et invasion cellulaire (PAI-2/AGR2)
- Prolifération des cellules cancéreuses
- Expression du facteur de croissance des fibroblastes (FGF)

#### Stratégies thérapeutiques potentielles :

- Antagoniste du AhR :
  - alpha-naphtoflavone
  - StemRegenin1 (SR1)
- Compléments alimentaires
  - Flavonoïdes

#### AhR et immunité

- Altération du système immunitaire
- Régulation des cellules souches
- Effet protecteur de la barrière épithéliale de la peau

#### Stratégies thérapeutiques potentielles :

- Antagoniste du AhR :
  - I3C : antiprolifératif, anti-cancéreux et anti-oxydant
- Compléments alimentaires
  - Flavonoïdes

### III.2 Récepteurs nucléaires

Les récepteurs PXR, CAR et ER sont tous des membres de la superfamille des récepteurs nucléaires (Tableau 7). Ce sont des protéines avec un domaine de liaison à l'ADN à deux doigts de zinc en N-terminal. Leur domaine de liaison au ligand et de transactivation, comportent 12 hélices alpha, est situé en C-terminal (Huang *et al.* 2010, Nagy & Schwabe 2004). Les récepteurs PXR et CAR régulent l'expression des gènes en formant des hétérodimères avec un autre récepteur nucléaire, le rétinol X récepteur (RXR) avant de se fixer sur les séquences des éléments de réponse de l'ADN tandis que le ER forme un homodimère. Le RXR est également impliqué dans la voie de signalisation de l'acide rétinoïque (Figure 30).

Je vais détailler uniquement le récepteur aux œstrogènes ainsi que sa voie de signalisation (dans le paragraphe suivant) puisque les résultats de l'article III ont montré que seul ce récepteur est impliqué dans les effets de l' $\alpha$ -endosulfan sur le métabolisme glucidique dans le modèle HepaRG.



Tableau 7 : Quelques caractéristiques des trois récepteurs nucléaires PXR, CAR et ER

Récepteur	Partenaire	Ligands	Gènes cibles	Rôle	Référence
PXR	hétérodimère avec RXR	Xénobiotiques Stéroïdes Acides biliaires Médicaments (Rifampicine et Taxol)	Enzymes de phase I (CYP3A, CYP2C) Phase II (UGT1A1, SULT) Phase III (MDR1, MRP2)	Détoxification des xénobiotiques et endobiotiques	(Ekins & Schuetz 2002, Gao & Xie 2010)
CAR	hétérodimère avec RXR	Médicaments (Barbiturique Phenobarbital Chlorpromazine Antiinflammatoire (acétaminophène)) Pesticide (TCPOBOP) Bilirubine	CYP2B10	Détoxification des xénobiotiques, endobiotiques Régulation des hormones thyroïdiennes	(Suino <i>et al.</i> 2004, Wei <i>et al.</i> 2000)
ER	Deux isomères alpha et beta homodimère ou, principalement, hétérodimère	Œstrogènes Phytoœstrogènes Antiœstrogènes Androgènes Perturbateurs endocriniens (Bisphenol A)	(UDP-glucose déshydrogénase) prolactine	Développement des organes sexuels Fertilité Homeostasie des lipides et du glucose Distribution de la masse adipeuse	(Mauvais-Jarvis <i>et al.</i> 2013)

### III.2.1 La voie de signalisation des œstrogènes

Les récepteurs aux œstrogènes, lorsqu'ils sont activés par des ligands spécifiques, agissent comme des facteurs de transcription en se liant spécifiquement aux éléments de réponse aux œstrogènes (ERE). Ces séquences sont situées dans les promoteurs des gènes cibles tels que la prolactine, la cathepsin D, l'« insulin-like growth factor » (IGF-1) (Klinge *et al.* 2004). Il existe différentes voies de signalisation dépendantes des récepteurs aux œstrogènes décrites dans la Figure 17. Les récepteurs aux œstrogènes complexés sous forme de dimères peuvent lier directement la séquence ERE qui est constituée de 13 paires de bases. Les récepteurs ER activés peuvent également se fixer à d'autres facteurs de transcription (« Activator Protein 1 » (AP-1), NF- $\kappa$ B, Sp1) permettant la transcription de gènes cibles différents. L'activation du ER peut aussi induire des voies de signalisation (protéine G, MAPK) qui recrutent à leur tour d'autres facteurs de transcription ou alors, ces voies de signalisation activées permettent la phosphorylation du récepteur ER dont l'activité transcriptionnelle induit, avec l'aide de co-facteurs, l'expression de gènes cibles sans la fixation d'un ligand.

Les deux isomères des récepteurs aux œstrogènes (ER $\alpha$  et ER $\beta$ ) proviennent de deux gènes distincts localisés respectivement sur les chromosomes 6 (q24-q27) et 14 (q21-q22). Ils contiennent tous les deux, cinq domaines. Le domaine N-terminal A/B contient la fonction activatrice (AF-1) qui module la transcription des gènes en fonction de la nature des tissus. La région centrale, appelée le domaine C, possède le domaine de liaison à l'ADN, et module également la dimérisation du récepteur. La fonction du domaine D, reste encore peu connue. La dernière région du récepteur aux œstrogènes renferme la séquence de liaison des ligands, des co-facteurs, de l'activation transcriptionnelle AF-2. Le signal de localisation nucléaire se trouve dans la région charnière entre le domaine C et AF-1. Les deux isoformes sont exprimés et ont une activité transcriptionnelle différente selon les tissus de l'organisme (Ellmann *et al.* 2009, Weihua *et al.* 2003). Le ER $\alpha$  est fortement exprimé dans les tissus cibles spécifiques des œstrogènes tels que l'utérus, le placenta, le système cardio-vasculaire et la glande pituitaire. Le ER $\beta$  est plus abondant dans le tractus urogénital, les follicules ovariens, le poumon et le système immunitaire. Les deux isoformes sont exprimées dans les tissus comme les glandes mammaires, les os et certaines régions du cerveau. L'isoforme ER $\alpha$  a été bien caractérisée dans le foie (Rossini *et al.* 1989).



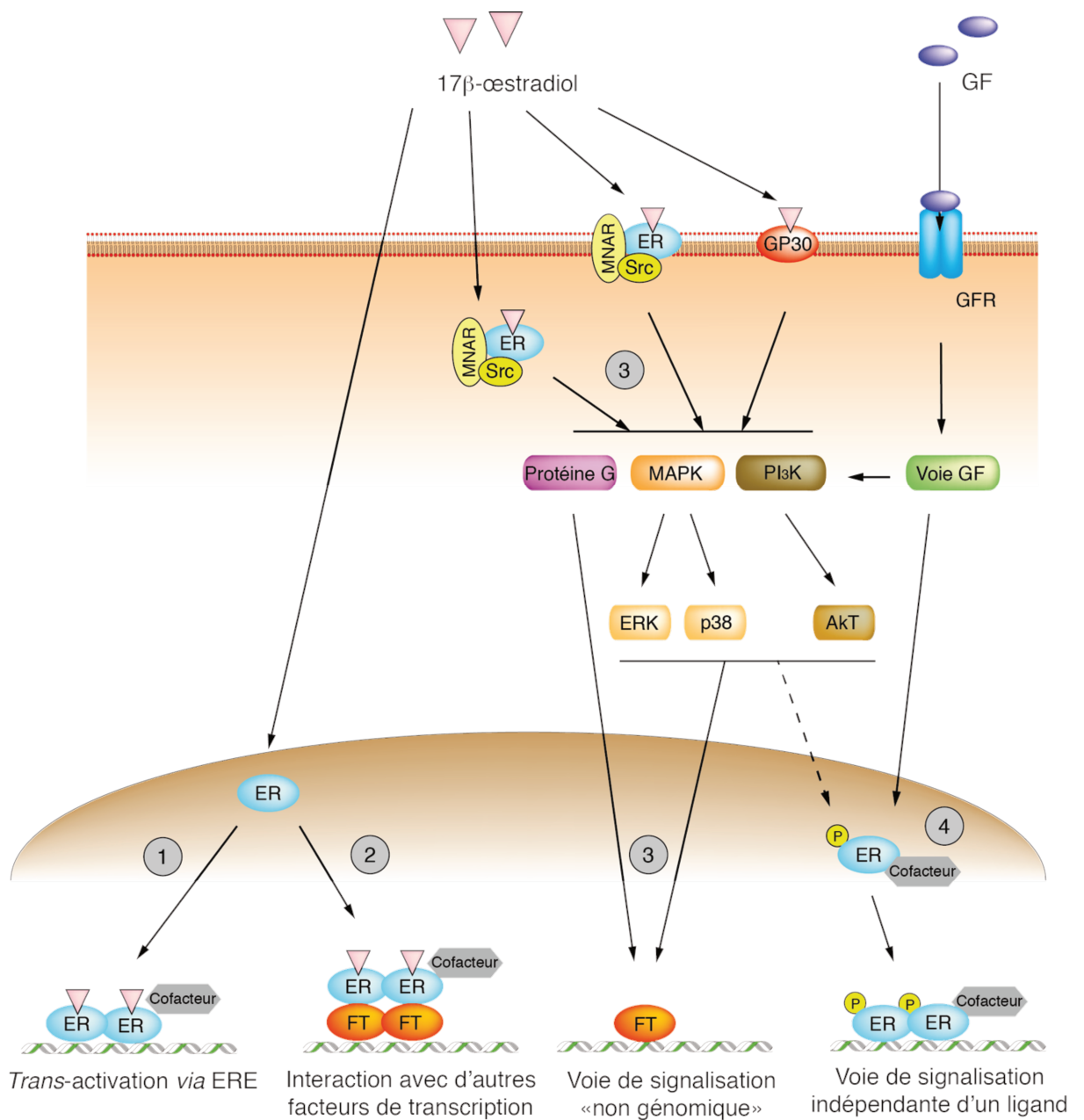


Figure 17 : Les différentes voies de signalisation ostrogéniques possibles

1 : voie de signalisation canonique dépendant de la séquence « estrogen responsive element » (ERE)

2 : voie de signalisation indépendante de la séquence ERE (FT=facteur de transcription)

3 : voie de signalisation non génomique

4 : voie de signalisation indépendante des ligands

D'après (Roman-Blas et al. 2009)

NMAR : Modulator of nongenomic action of estrogen receptors

FT : Facteur de transcription

GF : Growth Factor

GFR : Growth Factor Receptor

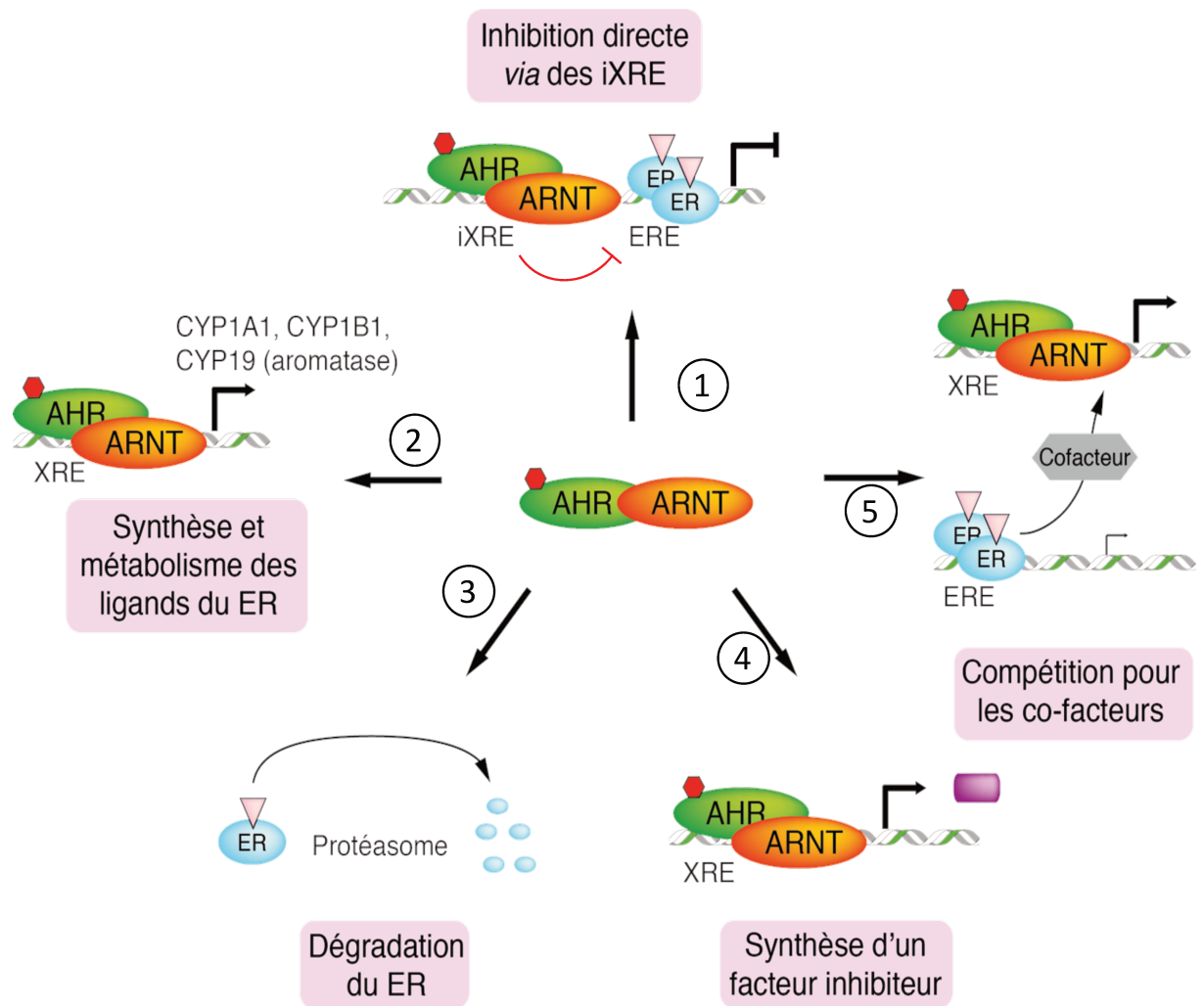


Figure 18 : Représentation des différentes interactions possibles entre le complexe AhR/ARNT activé par un ligand et l'activité des récepteurs aux estrogènes (ER).

L'activation du complexe AhR/ARNT peut réguler les actions du ER. Le complexe AhR/ARNT peut inhiber la transcription de gènes en se fixant sur un iXRE (XRE inhibiteur), activer le métabolisme de l'estradiol en induisant la transcription de gènes impliqués dans sa dégradation, augmenter la dégradation du ER par la voie du protéasome, activer la transcription de gènes inhibiteurs de la voie de signalisation du ER. La protéine ARNT joue le rôle de dominant négatif en se liant aux co-facteurs communs de la voie du ER. Schéma d'après (Matthews & Gustafsson 2006)

### III.2.2 Interactions ER et AhR

Plusieurs interactions entre la voie de signalisation du AhR et du ER ont été décrites (Safe & Wormke 2003, Matthews & Gustafsson 2006). Les mécanismes moléculaires d'interaction entre ces deux voies restent encore peu connus, et peuvent être une combinaison de différents mécanismes (Figure 18):

1 : Inhibition directe par le complexe AhR/ARNT liant un domaine xRE situé à proximité des séquences ERE présentes sur les gènes cibles du ER. Le complexe AhR/ARNT par sa proximité avec la séquence ERE empêche la transcription des gènes cibles.

2 : Transcription de gènes impliqués dans le métabolisme des ligands du ER, en particulier l'œstradiol

3 : Dégradation du ER par le protéasome induite par le complexe AhR/ARNT.

4 : Activation par le complexe AhR/ARNT de la transcription de gènes impliqués dans l'inhibition de la voie de signalisation du ER.

5 : Liaison du complexe AhR/ARNT à des co-facteurs communs (p300, CBP, p160) empêchant leur liaison avec le ER par compétition.

Ces différentes interactions montrent la complexité des régulations entre différentes voies de signalisation et l'intérêt de les étudier dans des conditions où elles sont stimulées simultanément par des molécules distinctes.

## IV. L'éthanol

### IV.1 Généralités

L'alcool éthylique ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ), provenant de la distillation des végétaux fermentés, est un des xénobiotiques les plus courants. De tout temps, les différentes civilisations ont toujours produit et consommé des breuvages alcoolisés et fermentés (Tableau 8).

Tableau 8 : Consommation d'alcool par quelques populations mondiales au cours du temps (Ansari et al. 2016)

Date	Populations	Boissons
7000 av J.C.	Egyptiens Chinois Indiens	Fermentation de boissons à base de grains (orge, seigle, maïs), de jus de fruits ou de miel
3000 et 2000 av. J.C.	Indiens	
2700 av. J.C.	Babyloniens	
XVIIIème siècle	Royaume Uni	Spiritueux (méthanol et fer)

L'alcool a été utilisé à des fins thérapeutiques en tant qu'analgésique et anesthésiant chirurgical. Au cours du XIXe siècle, un changement dans la fabrication de l'alcool, permet la suppression du méthanol, diminuant ainsi la toxicité des boissons due à la présence de cette molécule. En effet, le méthanol est toxique, et peut provoquer la cécité, des maux de ventre et de tête, une défaillance respiratoire et cardiaque pouvant entraîner la mort.

La France est l'un des pays les plus consommateurs d'alcool. Depuis cinquante ans cette consommation a diminué de moitié de façon régulière mais elle s'accompagne aussi d'une modification de la manière de boire avec une hausse de consommation excessive en un temps très court (« binge drinking ») chez les jeunes français et européens (Nordmann 2007). Les points de vue divergent sur les effets bénéfiques et néfastes de la consommation d'éthanol, nous y reviendrons dans le paragraphe IV.3. Aux États-Unis, l'abus d'alcool affecte plus de 20 millions de personnes et provoque plus de 100 000 décès chaque année (Li et al. 2004, McGinnis 1993). En France, l'alcool est la deuxième cause de mort prématurée malgré une importante baisse du nombre annuel de décès qui lui sont imputables. Les causes majoritaires de mortalité sont liées aux cancers (aérodigestifs), à la cirrhose alcoolique et aux

psychoses alcooliques. La consommation d'alcool peut également avoir un rôle indirect dans la survenue d'autres décès (accidents, suicides, cancers ...). A contrario, certaines études montrent un effet bénéfique de certains alcools (vin rouge) à faible dose sur la santé humaine avec une protection cardiovasculaire et neuronale (Collins *et al.* 2009). Des expériences dans des rats dans le cadre d'études précliniques ont montré que l'alcool ingéré pendant 12 semaines diminuait la pression artérielle systolique (Husain *et al.* 2005).

Afin de comparer les consommations individuelles de boissons avec différents degrés d'alcool, la notion d'unité (ou de verre) a été définie. Une unité correspond à 10 g d'alcool pur et, approximativement, à la quantité d'alcool servie à un débit de boisson (un demi de bière de 355 mL, un verre de vin de 148 mL) (Ansari *et al.* 2016, Babor *et al.* 2001). Une consommation modérée est définie comme inférieure à 30 grammes d'alcool par jour pour les hommes et inférieure à 20 grammes par jour les femmes avec un jour d'abstinence. Une consommation modérée et régulière d'alcool majore le risque de cancers, avec un risque d'autant plus élevé pour une consommation excessive (Institut National du Cancer). Au-delà de ces quantités, la consommation d'alcool est considérée comme problématique.

Cependant, l'alcool reste une substance addictive et toxique et peut conduire à des problèmes socio-médicaux. Toute consommation régulière peut entraîner une dépendance chez les personnes présentant une vulnérabilité.

## IV.2 Métabolisme

### IV.2.1 L'absorption et la dégradation de l'alcool

Une fois absorbé, l'alcool, très hydrophile, se diffuse dans tous les organes du corps : très rapidement dans les organes fortement vascularisés, lentement dans les muscles et pas du tout dans le tissu adipeux. L'alcool est également capable de traverser la barrière hémato-encéphalique produisant une stimulation du système nerveux central. La concentration sanguine maximale est observée 1 heure après la consommation.

Lors d'une consommation d'alcool, une faible quantité est éliminée du corps par la respiration (poumons), les urines (reins) et la sueur (peau). La majeure partie (90 %) de l'éthanol est oxydée dans les hépatocytes. On estime à 25 % la quantité d'alcool dégradé par le foie dès le premier passage intestin/foie/sang. Ce métabolisme fait intervenir deux oxydations successives transformant l'alcool en acétaldéhyde puis en acétate.



L'oxydation de l'éthanol se fait selon trois voies enzymatiques différentes en fonction du compartiment cellulaire et du tissu (Figure 19). Dans le cytoplasme, la première réaction fait intervenir des alcools déshydrogénases (ADH), métalloprotéines à zinc constituées de deux sous-unités identiques déplaçant les électrons et les protons de l'éthanol sur le coenzyme  $\text{NAD}^+$ . Chez l'Homme, il existe sept gènes qui codent pour les différentes sous-unités (Tableau 9). Après une longue ou forte exposition à l'alcool, cette première réaction d'oxydation peut également être réalisée par les cytochromes P450 (CYP2E1 majoritairement, CYP1A2 et CYP3A) (Cederbaum 2012, Lieber 2004), acteurs du système microsomal d'oxydation de l'éthanol (MEOS) dans le réticulum endoplasmique. D'autres voies d'oxydation de l'éthanol sont possibles mais minoritaires dans le foie, telle que l'oxydation par la catalase, voire par les radicaux libres comme le radical hydroxyle. L'alcool peut également être métabolisé en ester éthylique d'acide gras (FAEE) par la voie non oxydative décrite dans la revue « Bases moléculaires des effets toxiques de l'alcool » (Attignon *et al.* 2015) ci-après.

La deuxième oxydation, transformant l'acétaldéhyde en acétate, est réalisée par les aldéhydes déshydrogénases (ALDH). Ces enzymes sont retrouvées dans de nombreux organes tels que le foie, les reins et le cerveau. Chez l'Homme, les ALDH du métabolisme de l'alcool sont  $\text{NAD}^+$  dépendantes. La majorité de l'activité d'oxydation de l'alcool dans le foie est liée à l'ALDH2 mitochondriale.

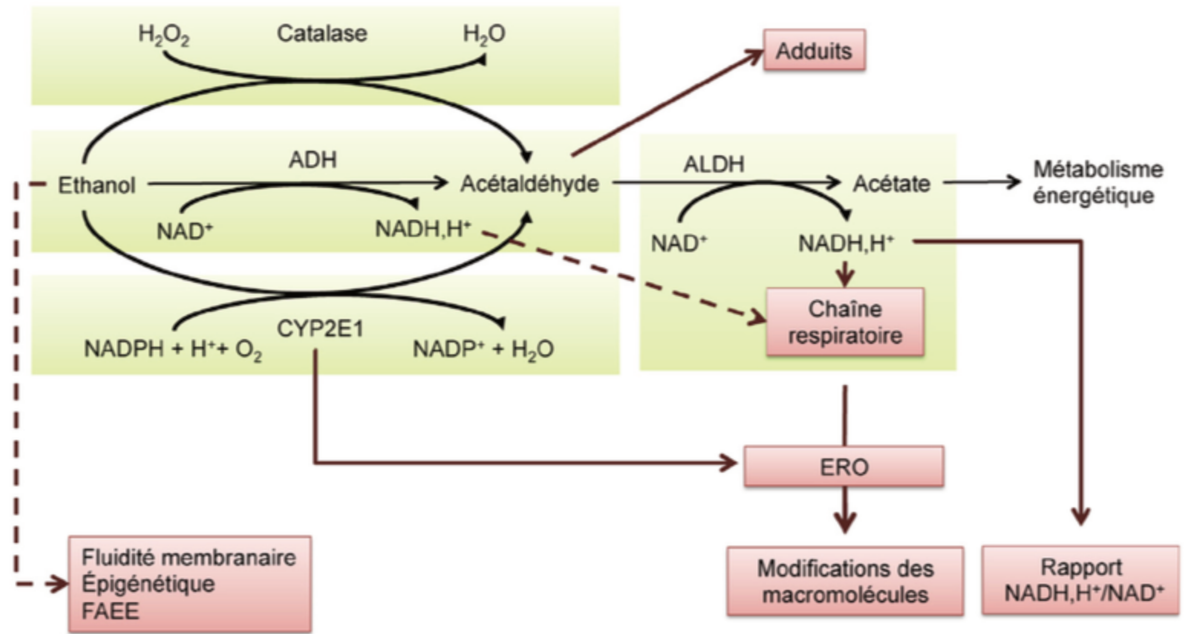


Figure 19 : Métabolisme oxydatif de l'éthanol et ses effets dans l'organisme

Les cadres rouges représentent les effets potentiellement toxiques dans l'organisme. L'éthanol peut être métabolisé par la voie de la catalase, des ADH et du CYP2E1. ADH : alcool déshydrogénase ; ALDH : aldéhyde déshydrogénase ; CYP2E1 : cytochrome P450 2E1 ; ERO : espèce réactive de l'oxygène ;  $\text{NAD}^+$  : nicotinamide adénine dinucléotide ;  $\text{NADP}^+$  : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ; FAEE : Fatty Acid Ethyl-Ester (Attignon *et al.* 2015)

#### IV.2.2 Les alcools déshydrogénases

Les gènes des ADH sont situés sur le même locus dans le chromosome 4 (q21-q25) (Figure 20). Les ADH, dont la structure primaire est composée de 375 acides aminés (40 kDa), forment un dimère et peuvent métaboliser l'éthanol, ingéré sous forme de boisson ou produit par les bactéries des intestins, le rétinol, des alcools aliphatiques et des hydroxystéroïdes (Cederbaum 2012). La réaction catalysée par l'ADH est réversible mais dépend de la quantité d'acétaldéhyde présent et du rapport  $\text{NADH,H}^+/\text{NAD}^+$ . La ré-oxydation du  $\text{NADH,H}^+$ , *via* la chaîne respiratoire, est une étape limitante du métabolisme de l'éthanol (Israel *et al.* 1970).



Figure 20 : Localisation des différents gènes pour chaque isoforme des ADH (ADH1 à ADH7).

Le locus contenant les différents gènes des ADH mesure 365 kb est situé sur le bras long du chromosome 4 (q21 à q25).

L'expression et l'activité des isoenzymes ADH diffèrent en fonction des tissus et de polymorphismes génétiques (Chen *et al.* 2009, Agarwal 2001). Bien que ces polymorphismes conduisent à des efficacités catalytiques différentes vis-à-vis de l'éthanol, jusqu'à présent, ils ont été très peu corrélés aux maladies alcooliques du foie (Cederbaum 2012). Les ADH ont des propriétés catalytiques qui diffèrent en fonction de leur affinité pour l'éthanol (Agarwal 2001, Cederbaum 2012, Lieber 2004). Le Tableau 9 montre les différentes ADH en fonction de leur classe et répertorie leur localisation dans l'organisme. Il indique également les différentes affinités pour leur substrat et la vitesse de réaction en présence d'alcool ou de rétinol *tout-trans*.

La voie du métabolisme oxydatif de l'alcool par les ADH puis l'ALDH conduit à l'augmentation du rapport  $\text{NADH,H}^+/\text{NAD}^+$  ce qui provoque une augmentation d'ERO, en particulier par la chaîne respiratoire, et une dérégulation des métabolismes du glucose et des lipides pour lesquels ces co-enzymes sont nécessaires. Les modifications liées à l'augmentation du rapport  $\text{NADH,H}^+/\text{NAD}^+$  sont décrites dans la revue « Bases moléculaires des effets toxiques de l'alcool ».

L'activité des ADH fluctue en fonction du statut nutritionnel et hormonal. Un régime hypocalorique ou avec une faible teneur en zinc diminue la vitesse d'élimination de l'alcool (Bosron & Li 1986). L'hormone de croissance augmente l'activité des ADH alors que les hormones thyroïdiennes diminuent cette activité. Chez l'Homme, il a été montré qu'un traitement aux androgènes diminuait la vitesse d'élimination de l'alcool (Mezey *et al.* 1988). Lors d'une consommation chronique et importante, l'activité des ADH est diminuée mais augmente après un sevrage (Thomas *et al.* 1982).

Tableau 9 : Les différentes classes d'alcool déshydrogénases et leur localisation dans l'organisme humain. Correspondance entre l'allèle, la classe et le type de sous-unité. Paramètres cinétiques (Km et Vmax) vis à vis de l'éthanol et du rétinol tout-trans pour chacune d'entre elle. Adapté de (Pares et al. 2008, Edenberg 2000)

Gène	Allèle	Classe	Sous-unité	Ethanol		Rétinol tout <i>trans</i>		localisation tissulaire
				Km (mM)	Vmax (min <sup>-1</sup> )	Km (μM)	Vmax (min <sup>-1</sup> )	
ADH1A	ADH1A	I	α	4,4	23	-	5,2	Foie
ADH1B	ADH1B*1	I	β	0,05	9	-	0,9	Foie, poumons
	ADH1B*2	I	β	0,94	340	0,3	0,5	
	ADH1B*3	I	β	31	320	-	-	
ADH1C	ADH1C*1	I	γ	1	88	-	5,5	Foie, estomac
	ADH1C*2	I	γ	0,63	35	-	-	
ADH4	ADH4	II	π	34	20	0,14	9,1	Foie
ADH5	ADH5	III	χ	> 1 000	-	-	-	Tous tissus
ADH6	ADH6	V	-	-	-	-	-	Foie
ADH7	ADH7	IV	σ, μ	37	1510	0,3	59	Œsophage, estomac

### IV.3 Les effets délétères de l'alcool

En France, la consommation excessive d'alcool est responsable de 49 000 décès par cancer, cirrhose, psychose et dépendance alcoolique. C'est la deuxième cause de mortalité évitable après le tabac. C'est la première cause d'accident de la route, d'accident au travail et de précarisation. Par ailleurs, l'alcoolisation fœtale est la première cause non génétique de handicap mental chez l'enfant. En France, le syndrome d'alcoolisation fœtale touche au moins 1 % des naissances, ce qui signifie qu'environ 500 000 français souffrent à des degrés différents du ce syndrome (Académie Française<sup>11</sup>).

La consommation excessive chronique ou aiguë d'alcool provoque des dysfonctionnements biochimiques et métaboliques, principalement au niveau hépatique (voir paragraphe IV.3.2) et cérébral. Au niveau du cerveau, il provoque plusieurs dysfonctionnements : syndrome de sevrage, coma, problème de mémoire. Enfin, l'alcool est capable de traverser la barrière placentaire et peut causer des anomalies graves du fœtus. Il peut avoir un effet tératogène pouvant entraîner la mort (fausses-couches, mort périnatale). Il

<sup>11</sup> <http://www.academie-medecine.fr/alcoolisation-foetale-de-nouveaux-outils-efficaces-au-service-des-meres-et-des-enfants-en-danger/>

peut aussi causer le syndrome d'alcoolisation foetal caractérisé par des malformations, un retard mental et des troubles du développement et de l'apprentissage (HAS<sup>12</sup>).

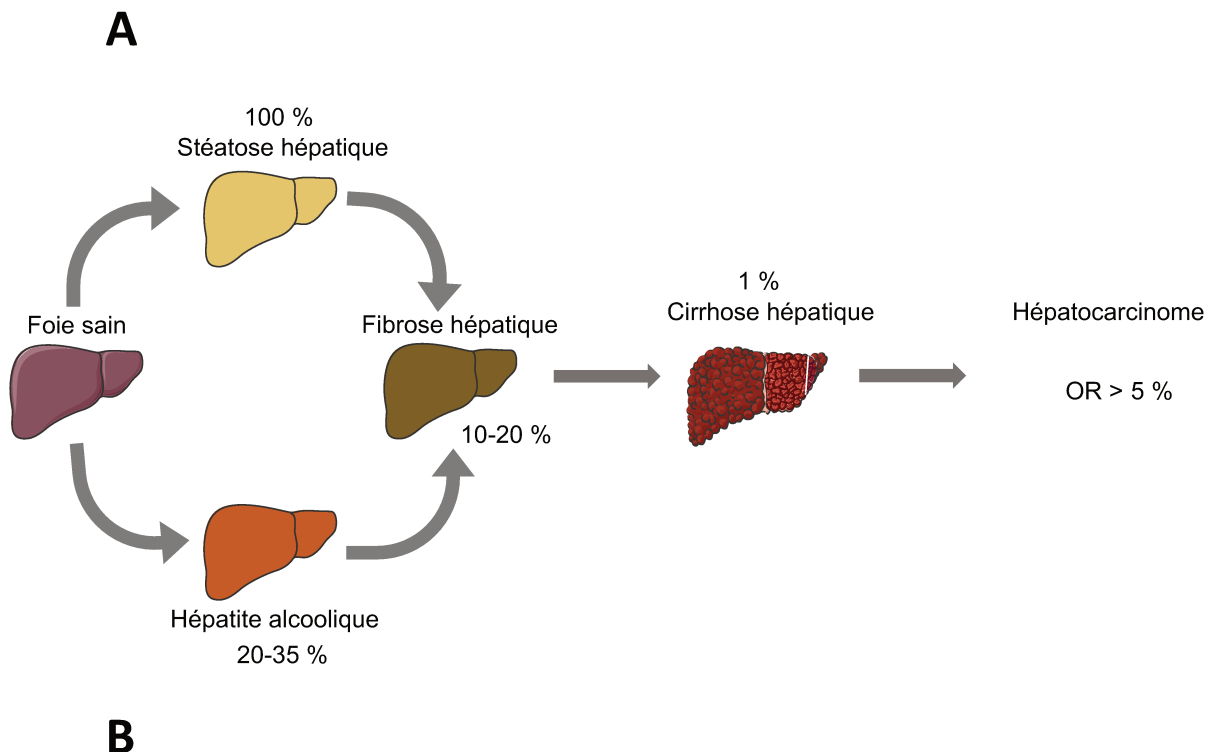


Figure 21 : A : Schéma simplifié de la progression des maladies du foie avec leur incidence. B : Mécanismes moléculaires et conséquences des maladies alcooliques du foie.

Une consommation d'alcool peut engendrer une stéatose hépatique ou une hépatite alcoolique. Ces deux pathologies peuvent s'aggraver en fibrose hépatique puis en cirrhose (Nagy 2015). OR : Odd ratio

<sup>12</sup> HAS : Haute Autorité de Santé. [http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2013-09/troubles\\_causes\\_par\\_lalcoolisation\\_foetale\\_reperage\\_-\\_fiche\\_memo.pdf](http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2013-09/troubles_causes_par_lalcoolisation_foetale_reperage_-_fiche_memo.pdf)

### IV.3.1 Toxicité

Compte tenu du rôle majeur du métabolisme dans la toxicité de l'alcool, un des enjeux de santé publique serait, en plus de diminuer la consommation d'alcool, de réduire l'expression (protéique, ou plus en amont au niveau des ARNm) des enzymes du métabolisme de l'alcool (ADH et CYP2E1) afin d'atténuer leur implication dans les pathologies liées à l'alcool. Une étude réalisée par Arthur Cederbaum a montré que le CYP2E1 contribuait aux lésions induites par l'éthanol (stress oxydant et lésion hépatique) (Cederbaum 2012). Cependant, la quantité d'alcool non métabolisé augmenterait dans le sang, ce qui serait alors toxique pour les organes extra-hépatiques, en particulier le cerveau. Ces enzymes peuvent en outre être impliquées dans d'autres métabolismes, dont celui des rétinoïdes, et la modification de leur expression pourrait engendrer d'autres pathologies. Par exemple, il a été montré une corrélation entre la gravité de certains cancers et l'absence d'expression d'ADH : ADH1 dans le cancer du sein (Triano *et al.* 2003) et ADH4 dans l'hépatocarcinome (Wei *et al.* 2011).

### IV.3.2 Pathologies hépatiques liées à l'alcool

Une consommation excessive et chronique d'alcool peut engendrer l'apparition de maladies chroniques du foie (stéatose, stéato-hépatite alcoolique, fibrose, cirrhose, voire hépatocarcinome) (Gao & Bataller 2011, Purohit *et al.* 2009) (Figure 21). Par exemple, les individus qui boivent 60 g d'alcool par jour (correspondant à 6 verres de vin par exemple) développent pratiquement tous une stéatose, parmi eux environ 1 % développe une cirrhose (Lucey *et al.* 2009, Seitz & Stickel 2010). Par ailleurs, il a été démontré que le risque de développer une cirrhose alcoolique devient important dès 50 grammes par jour chez l'homme. Enfin, une consommation excessive d'alcool (100 grammes par jour) augmenterait le risque de cirrhose hépatique d'un facteur 27 (Carrao, 2007). Il faut noter, sur le plan du tableau clinique, que le développement de ces pathologies hépatiques alcooliques est très souvent associé à des complications graves comme une insuffisance rénale, des hémorragies internes, des ascites ou une encéphalopathie.

Les caractéristiques principales de ces maladies chroniques du foie ont été décrites dans le paragraphe I.4 pour les mêmes pathologies « non alcooliques ». En effet, les

symptômes de ces pathologies sont équivalents. Il existe tout de même des différences : chez les patients atteints de maladie alcoolique du foie, on retrouve des formes sévères voir aiguës d'inflammation engageant leur pronostic vital. En revanche, les patients atteints de NAFLD présentent rarement des foyers inflammatoires massifs. La vitesse de sédimentation des érythrocytes qui est un marqueur d'inflammation est plus élevée chez les patients atteints de maladie alcoolique du foie comparé aux patients ayant une NAFLD (Das *et al.* 2011). Il n'est pas encore clair si les mécanismes moléculaires qui conduisent au développement de ces pathologies sont entièrement similaires. Le développement des formes sévères des pathologies hépatiques chez les alcooliques n'apparaît qu'après plusieurs années de consommation et touche uniquement 10 à 20 % des patients atteints d'une stéatose hépatique (Day & James 1998) ce qui laisse supposer une part possible à l'exposition à d'autres facteurs de risque. Il est en effet connu qu'une infection virale hépatique (VHC), le diabète, la consommation de cigarettes ou médicaments, et l'exposition à des contaminants environnementaux comme le benzène ou des toxines comme l'aflatoxine, favorisent le développement de ces pathologies hépatiques (Tsukamoto *et al.* 2009). Une exposition simultanée à l'alcool et à l'un de ces facteurs de risque augmente significativement la sévérité de la maladie hépatique et par conséquent la mortalité et la morbidité (Day 2007, Becker *et al.* 1996, Bellentani *et al.* 1997).

Les agents hépatotoxiques cités ci-dessus, ont la capacité d'induire des lésions hépatiques en modifiant les conditions physiologiques du foie. En particulier, ils augmentent le stress oxydatif et nitrique, ce qui déséquilibre le système redox, et engendre des altérations mitochondriales. Une consommation excessive d'alcool entraîne également un déséquilibre du système redox en augmentant les espèces réactives de l'oxygène (anions superoxydes, radicaux hydroxyles, etc). En effet, un taux élevé d'alcool augmente le CYP2E1, la NADPH, la « nitric oxide synthase » iNOS et la xanthine oxydase responsables de la génération des ERO (Spruss *et al.* 2011, Aubert *et al.* 2011). Même si les molécules antioxydantes (GSH) et certaines vitamines (vitamine A, B1, C, E) peuvent être augmentées après une exposition à l'alcool (Cederbaum 2012), il a été montré que l'alcool diminue l'activité de plusieurs enzymes anti-oxydantes : la glutathion peroxidase (Gpx), la catalase, et la superoxide dismutase (SOD) (Abdelmegeed *et al.* 2010, Carmiel-Haggai *et al.* 2005, Song *et al.* 2013). Ces modifications du système oxydatif induisent entre autres, une peroxydation des lipides qui peut, par la suite,

activer les cellules de Kupffer qui libèrent des cytokines inflammatoires (TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ ) et des substances profibrotiques comme le collagène (Lucey *et al.* 2009).

La production simultanée d'espèces réactives de l'oxygène et d'espèces réactives nitriques (ROS/RNS) mène à une surproduction de peroxy-nitrite qui entraîne une modification des résidus tyrosines des protéines (Abdelmegeed & Song 2014, Song *et al.* 2013). Le stress nitrique peut entraîner des modifications post-traductionnelles des protéines dans le réticulum endoplasmique et dans les mitochondries. Ces changements altèrent alors les fonctions des protéines modifiées (notamment les enzymes de la  $\beta$ -oxydation). A terme, un stress du réticulum et un stress mitochondrial conduisent à une accumulation de lipides dans le foie (Moon *et al.* 2006).

Ces modifications de la balance redox, entraînent l'activation des protéines kinases « c-Jun-N-terminal protein kinase » (JNK) et p38 MAP kinase (p38 MAPK), qui peuvent phosphoryler la protéine pro-apoptotique Bax, activant la mort cellulaire par apoptose (Cederbaum *et al.* 2015).

Au cours de ma thèse, j'ai publié une revue « Les bases moléculaires impliquées dans la toxicité de l'alcool » qui recense les différentes modifications moléculaires impliquées dans la toxicité de l'alcool ou de ses métabolites.

#### IV.3.3 Les bases moléculaires impliquées dans la toxicité de l'alcool









Nous nous sommes intéressés au TGF- $\beta$ 1 pour deux raisons principales : la TCDD inhibe l'expression des ADH comme nous le montrons dans le premier chapitre des résultats et une étude de Ciucan et collaborateurs avait montré une diminution de l'expression de l'ADH1 par cette cytokine (Ciucan et al, 2010) ; plusieurs études dont deux du laboratoire ont montré que la TCDD augmentait la quantité de TGF- $\beta$ 1 dans des souris qui développent une fibrose (Pierre et al, 2010 ; Duval et al, 2016). Le paragraphe suivant décrit les différentes voies de signalisation activées par la superfamille du TGF- $\beta$ , puis les différentes pathologies hépatique associées aux cytokines TGF- $\beta$ .

## V. La cytokine Transforming Growth Factor Beta 1 (TGF- $\beta$ 1)

La superfamille des « Transforming Growth Factor Beta » (TGF- $\beta$ ) comprend les TGF- $\beta$ , les « bone morphogenetic proteins » (BMPs), les activines, les nodals et les myostatines. Ces cytokines sont impliquées dans divers processus physiologiques notamment au cours de l'embryogenèse, dans la réparation de tissus, dans la différenciation, la migration et la croissance cellulaire (Massagué *et al.* 2000). Le rôle du TGF- $\beta$  est ambivalent et dépend du tissu dans lequel il est exprimé. La dérégulation de l'expression du TGF- $\beta$  est très étudiée à cause de son rôle dans la progression de différentes maladies comme la fibrose, les maladies auto-immunes et le développement de tumeurs (Corchero *et al.* 2004, Letterio & Roberts 1998, Massagué 2008). Néanmoins, il a été montré, son implication dans l'inhibition de la croissance des cellules épithéliales et donc un rôle de suppresseur de tumeur dans des carcinomes (Reiss 2001).

### V.1 Synthèse et sécrétion extracellulaire

Il existe trois isoformes humaines du TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3) codées par trois gènes distincts, et exprimées par de nombreux types cellulaires (plaquettes, macrophages, fibroblastes) ainsi que par certaines cellules tumorales. Les isoformes du TGF- $\beta$  chez le mammifère ont une activité autocrine, paracrine et/ou endocrine permettant un développement correct des organes mais également le maintien de l'homéostasie tissulaire chez l'adulte (Massagué 2012). Ces isoformes ont environ 80 % d'identité entre leurs séquences protéiques.

Ces cytokines sont transcrites sous forme d'un précurseur latent, le pré-pro TGF- $\beta$ . Ce précurseur est composé d'un peptide signal de sécrétion en N-terminal, d'une région centrale

nommée Latent Associated Protein (LAP), et du futur TGF- $\beta$  mature situé dans la région C-terminale.

Lors de son transit intracellulaire, le pré-pro TGF- $\beta$  est clivé dans le réticulum endoplasmique par la famille des endonucléases convertases libérant ainsi le peptide signal. Le pro-TGF- $\beta$  se structure sous forme d'un dimère dont les monomères sont reliés par des ponts disulfures (Figure 22). La protéase furine convertase clive entre les arginines 278 et 279 de chaque monomère, libérant les séquences du LAP et les parties du TGF- $\beta$ . Cependant, après ce clivage, le TGF- $\beta$  mature et le LAP restent en interaction par des liaisons non covalentes formant le « small latent complex » (SLC) (Figure 23). En cachant les épitopes reconnus par le récepteur du TGF- $\beta$  mature, le LAP permet de maintenir la cytokine sous forme latente. Dans le réticulum endoplasmique, un membre de la famille des protéines « Latent TGF- $\beta$  binding protein », LTBP, lie le complexe SLC par un pont disulfure formant ainsi le « Large Latent Complex » (LLC) (Figure 22 et 23). La liaison du SLC au LTBP, dans la majorité des cas, permet l'excrétion de ce complexe hors de la cellule et l'interaction avec la matrice extracellulaire (MEC) où il est stocké.

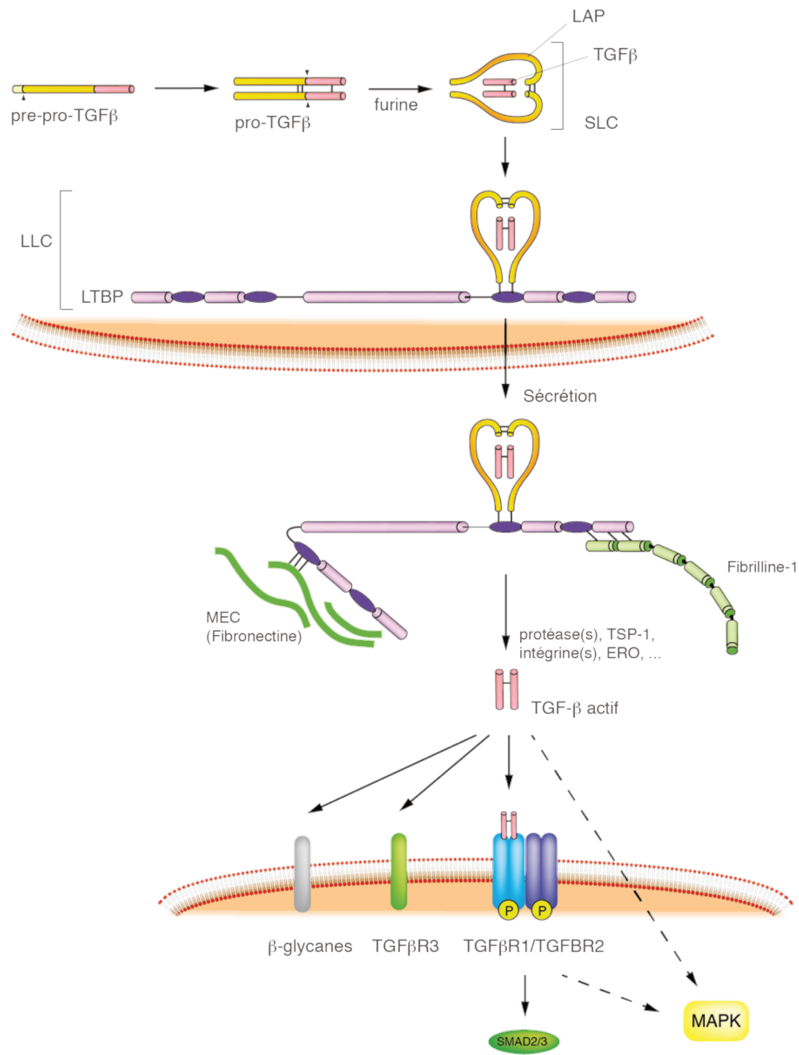


Figure 22 : Mécanisme de la voie de synthèse du TGF-β1

La formation du TGF-β mature requiert le clivage du pré-pro-TGF-β et du SLC, puis la mise en place d'un complexe appelé LLC contenant le TGF-β mature entouré du LAP et fixé à la protéine LTBP. La sécrétion du LLC permet d'une part sa fixation à la MEC et d'autre part la libération du TGF-β. Le TGF-β peut induire différentes voies de signalisation SMAD2,3/MAPK, en se liant à l'un de ses récepteurs. Inspiré de (ten Dijke & Arthur 2007)

## V.2 Le rôle des Latent TGF- $\beta$ binding proteins (LTBP)

Il existe de nombreux points de régulation modulant le stockage, la sécrétion et l'activité du TGF- $\beta$ . Un des plus important est l'activité des protéines LTBP. Ces protéines font partie de la famille des fibrillines et sont les composants majeurs de la matrice extracellulaire. Quatre isoformes ont été identifiées chez l'Homme. L'expression des isoformes de LTBP diffère selon le type cellulaire grâce à l'activité des promoteurs et les épissages alternatifs. La structure commune des quatre isoformes est la présence d'une séquence « EGF-like » (Epidermal Growth Factor) et d'une répétition de 8 cystéines dans la partie N-terminale (Todorovi et Rifkin 2012). Les LTBP1, LTBP3 et, à un degré plus faible, le LTBP4 lient le SLC contrairement à la forme LTBP2 (Saharinen & Keski-Oja 2000a).

Dans le réticulum endoplasmique, le LTBP lie le SLC *via* un pont disulfure sur la cystéine 33 (C33). Une étude dans la souris a montré l'importance de la présence de la C33 dans la formation du complexe LTBP-TGF- $\beta$  et ainsi dans la maturation du TGF- $\beta$ . Lorsque l'on empêche la formation du pont disulfure par une mutation de la C33 en sérine, les souris ont un phénotype inflammatoire et tumorigène plus important comparées aux souris sauvages et équivalent à celui des souris TGF- $\beta$ 1 -/- (Yoshinaga *et al.* 2008).

Les LTBP permettent d'une part l'excrétion du SLC et d'autre part l'ancrage à la MEC du complexe formé (Dallas *et al.* 1995) : la région N-terminale des LTBP lie la fibronectine, et la région C-terminale lie le domaine N-terminal de la fibrilline-1, composant des microfibrilles élastiques (Figure 22). Les transglutaminases forment des liaisons isopeptides entre le LTBP1 et la MEC (Nunes *et al.* 1997) (Figure 23). Plusieurs mécanismes (protéases, pH, ERO) ont été décrits pour déclencher la libération du TGF- $\beta$  mature (Wipff & Hinz 2008, Aznavoorian *et al.* 1993). Le LTBP ancré à la MEC peut aussi créer un étirement *via* l'activation des intégrines, qui modifie la conformation du LAP libérant ainsi le TGF- $\beta$ 1. Plusieurs types d'intégrines ont été décrites en fonction du type cellulaire :  $\alpha_v\beta_6$  dans des cellules épithéliales de poumon (Annes *et al.* 2003), ou  $\alpha_v\beta_1$  et  $\beta_3$  dans les myofibroblastes (Wipff & Hinz 2008).



Figure 23 : Structure du complexe « Large Latent Complex » (LLC) fixé à la MEC

Le LLC est composé du TGF- $\beta$ 1 (noir), du LAP (LAP1) (rouge) et du LTBP. Le TGF- $\beta$ 1 et le LAP interagissent par une liaison non covalente schématisée par une tête de flèche noire. Le LLC est lié à la matrice extracellulaire par une liaison peptidique (vert). Le domaine charnière du LTBP (grande flèche noire) est une région sensible aux protéases permettant la libération du LLC de la matrice extracellulaire. (Annes et al. 2003).

### V.3 Activation de la voie de signalisation du TGF- $\beta$

La voie de réponse la plus classique des cytokines de la famille TGF- $\beta$  est celle de l'activation des récepteurs membranaires au TGF- $\beta$  (TGF $\beta$ R) par leur ligand. Cette voie est relayée dans la cellule par l'intermédiaire des protéines SMAD (SMA and MAD related protein) détaillée plus loin. Il existe cependant d'autres voies de signalisation du TGF- $\beta$  indépendantes des SMAD en passant par exemple par les voies JNK et p38 MAPK (Figure 22). La liaison directe entre la cytokine et ces protéines kinases n'a pas été décrite. Mais le TGF $\beta$  et BMP4 peuvent par exemple activer par phosphorylation la protéine TAK1 (MAPKKK) (Derynck & Zhang 2003).



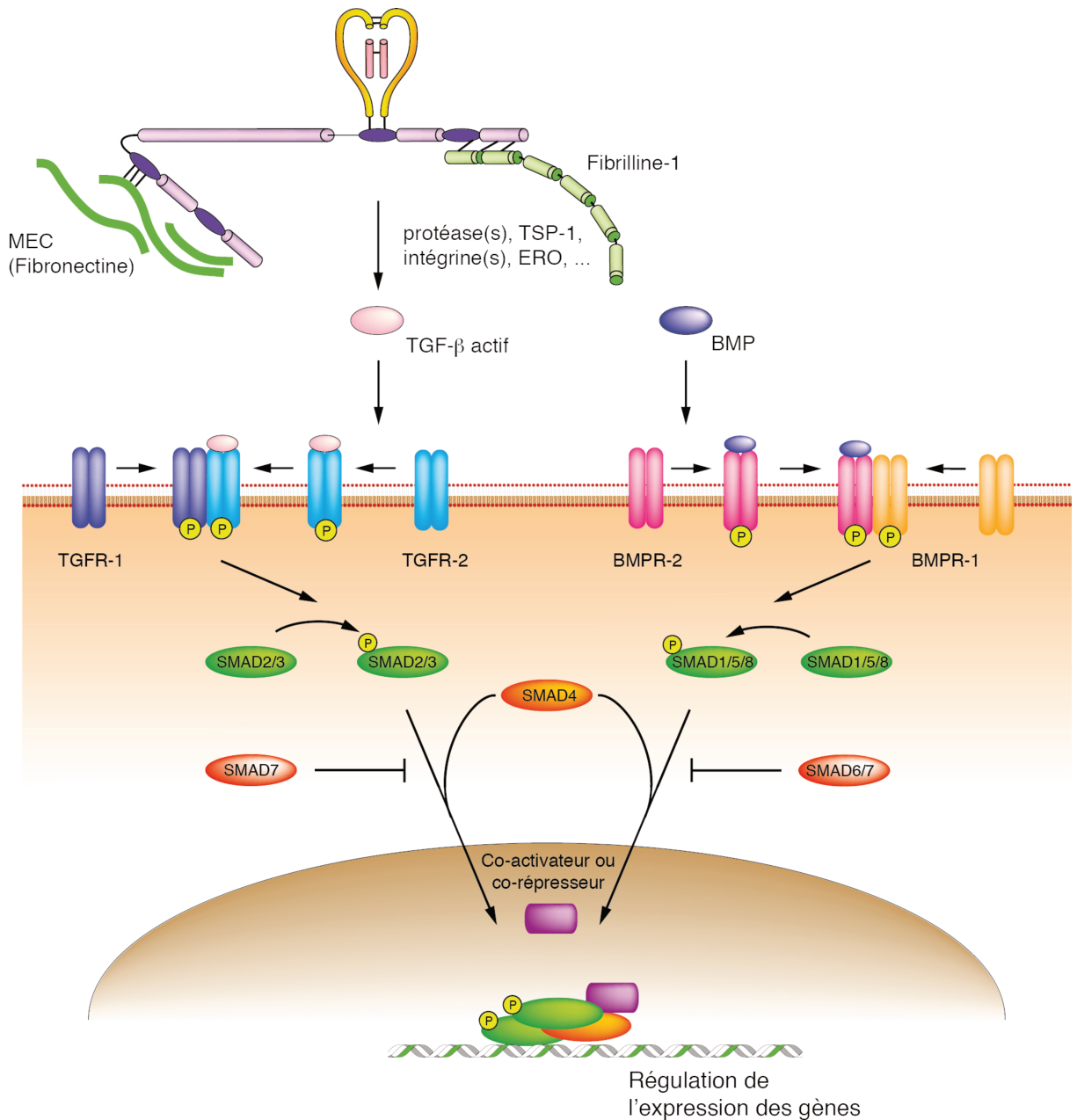


Figure 24 : Voie de signalisation des ligands de la superfamille des TGF-β.

Le TGF-β, libéré du complexe LLC lie le récepteur TGFβRII (TGFR-2) qui forme un complexe avec le TGFβRI (TGFR1) pour phosphoryler les SMAD2/3. La protéine BMP utilise la même stratégie avec les récepteurs BMPR-2 (ALK2) et BMPR-1 (ALK1) pour phosphoryler les SMAD1/5/8. Ces SMAD activées se complexent à SMAD4 pour modifier la régulation des gènes cibles dans le noyau. Les régulations peuvent être contrecarrées par les SMAD inhibitrices (SMAD6/7). Inspiré de (Moustakas et al. 2001)

Dans l'activation de la voie classique, il existe deux types de récepteurs, I et II (TGF $\beta$ RI et TGF $\beta$ RII), similaires du point de vue structural. La voie de signalisation du TGF- $\beta$  est stimulée par la fixation du ligand TGF- $\beta$  sur le récepteur transmembranaire homodimère II (TGF $\beta$ RII) de type sérine thréonine kinase conduisant à son autophosphorylation puis au recrutement du récepteur de type I (TGF $\beta$ RI). Dans les conditions basales en absence de ligand, le TGF $\beta$ RI forme un homodimère inactif à la surface de la cellule, adoptant une conformation qui bloque le domaine kinase de son site actif (Huse *et al.* 1999, Derynck & Zhang 2003). La liaison du TGF $\beta$ RII avec le TGF $\beta$ RI forme un complexe tétramérique, et conduit à la phosphorylation de ce dernier qui permet alors une activité kinase du récepteur. Le TGF $\beta$ RI est phosphorylé sur des résidus sérines et thréonines dans son domaine GS (Glycine-Sérine) proche du domaine kinase (Abdollah *et al.* 1997). Le TGF $\beta$ RI active ensuite des protéines de la famille SMAD par phosphorylation (Tableau 10 et paragraphe suivant). Chez les mammifères, sept récepteurs TGF $\beta$ RI (appelé également « Activin receptor-Like Kinase » (ALK)) et cinq récepteurs TGF $\beta$ RII ont été identifiés. Le Tableau 10 présente les trois voies possibles de signalisation des cytokines de la famille du TGF- $\beta$  selon le ligand fixé aux récepteurs : activine/TGF- $\beta$ , BMP ou myostatine/nodal.

Les différentes combinaisons possibles d'interactions pour former le récepteur tétramérique (2 TGF $\beta$ RII et 2 TGF $\beta$ RI) dépendent de la liaison ligand-récepteur (Tableau 10), et permettent une modulation de la réponse en fonction du ligand fixé. La voie classique d'activation des protéines SMAD2/3 par le TGF- $\beta$  correspond à la liaison du ligand au complexe TGF $\beta$ RII/TGF $\beta$ RI mais lorsque le ligand est de type BMP, le TGF $\beta$ RII forme un complexe avec ALK1 (BMPR1) ou ALK2 (ActRI), et ce sont les protéines SMAD1/5/8 qui sont activées. L'équilibre entre ces différentes voies d'activation est important pour des processus physiologiques comme le maintien de l'état de l'endothélium des vaisseaux sanguins (ten Dijke & Arthur 2007).

Certaines protéines secondaires comme nodal améliorent ou modifient la spécificité de la liaison ligand-récepteur. Par exemple, la protéine Nodal agit *via* le récepteur ActRIIB et ActRIB/ALK4 et permet l'activation de SMAD2 impliqué dans la neurogenèse (Massagué & Wotton 2000).

Tableau 10 : Les différentes voies de signalisation possibles de la famille du TGF- $\beta$

Chaque ligand active des types de récepteurs I ou II différents. R-SMAD correspond aux isoformes de SMAD phosphorylées après activation de la voie. Co-SMAD (SMAD4) correspond au partenaire des R-SMAD recruté afin d'agir comme facteur de transcription. iSMAD (SMAD6/7) correspond à l'isoforme capable d'inhiber la voie de signalisation. Les flèches noires représentent une interaction possible entre la voie de signalisation BMP et TGF. Inspiré de Moustakas et al. 2001).

Voie	Ligand	Récepteur de type II	Récepteur de type I	R-SMAD	co-SMAD	iSMAD
Activine/TGF $\beta$	Activine A	ActRII	ALK4 (ActRIB)	SMAD2/3	SMAD4	SMAD7
	Activine B	ActRIIB	ALK7			
	Activine AB					
	Inhibine A	ActRII				
	Inhibine B	ActRIIB				
		BMPRII				
	TGF- $\beta$ 1	TGF $\beta$ RII	ALK5 (TGF $\beta$ RI)			
TGF- $\beta$ 2		ALK1 (TSR1)				
TGF- $\beta$ 3						
BMP	BMP-2	ActRII	ALK1 (TSR1)	SMAD1/5/8	SMAD4	SMAD6
	BMP-4	ActRIIB	ALK2 (ActRI)			
	BMP-7	BMPRII	ALK3 (BMPRIA)			
Myostatine	Myostatine	ActRII	ALK4 (ActRIB)			
		ActRIIB	ALK5 (TGF $\beta$ RI)			
Nodal	Nodal	ActRII	ALK4 (ActRIB)			
		ActRIIB	ALK7			

#### V.4 Les protéines SMAD

Chez les vertébrés, il existe 8 protéines SMAD (Tableau 10), activatrices ou inhibitrices réparties en trois groupes : les R-SMAD (SMAD associées aux Récepteurs), les Co-SMAD et les I-SMAD (SMAD inhibitrice). Les R-SMAD correspondent aux isoformes 1, 2, 3, 5, et 8 et interagissent directement avec les TGF $\beta$ RI activés. Leur activation est dépendante du ligand. Les Co-SMAD, composées actuellement uniquement de SMAD4, sont des médiateurs communs de la voie de signalisation. Enfin, les I-SMAD correspondent aux isoformes 6 et 7 et régulent la voie de signalisation par inhibition. Les SMAD sont exprimées dans la plupart des types cellulaires.

Toutes les protéines SMAD ont un domaine d'homologie MAD2 (MH2) permettant une interaction entre elles (Figure 25). Les R-SMAD ont un domaine MH1 qui permet la liaison à l'ADN contrairement aux protéines I-SMAD. Cette différence de structure confère à ces dernières leur rôle d'inhibiteur agissant comme des dominants négatifs. Dans le cas des R-SMAD, la partie C-terminale du domaine MH2 interagit et recrute des co-activateurs nucléaires (CREB-binding protein, p300, Sno) et participe à l'activation ou l'inhibition transcriptionnelle. Les deux domaines MH1 et MH2 peuvent interagir avec des facteurs de transcription (Derynck & Zhang 2003).

Les R-SMAD sont activées par phosphorylation de deux sérines distales du motif SSXS situé en C-terminal du domaine MH2, par les récepteurs de type I. Après activation, elles interagissent dans le cytoplasme pour former un dimère en général pris en charge par la protéine commune SMAD4 pour être transloquées dans le noyau. Cependant, il a été montré, dans une lignée de fibroblastes de souris déficiente en SMAD4, que cette protéine n'est pas essentielle à l'efficacité de la réponse TGF- $\beta$  alors qu'elle reste indispensable à la réponse de certains facteurs comme BMP (Fink *et al.* 2003, Sirard *et al.* 2000).



Figure 25 : Structure des SMAD et fonction des différents domaine

Les SMAD (1,2,3,4,5,8) sont constituées d'un domaine MH1 liant l'ADN et pouvant interagir avec des facteurs de transcription, d'un domaine MH2 qui interagit avec les autres SMAD et les facteurs de transcription. La protéine SMAD 4 n'a pas de site de phosphorylation en C-terminal. Les protéines SMAD6,7 n'ont pas de domaine MH1 (Derynck & Zhang 2003).

Les iSMAD 6 et 7 sont régulées par des signaux extracellulaires et peuvent agir comme rétrocontrôle négatif. Par exemple, l'activation de certains récepteurs tels que les récepteurs du facteur de croissance épidermique (EGFR) et de l'interféron gamma *via* STAT (signal transducer and activator of transcription) et l'activation de NFκB par le TNF-α induisent une augmentation de SMAD7, provoquant une diminution de la voie de signalisation TGF-β (Derynck & Zhang 2003).

De manière générale, le niveau d'expression des SMAD peut également être régulé par le protéasome. Les protéines ubiquitine ligases de la famille « homologous to the E6 AP carboxy terminus » E3 HECT mais également « SMAD ubiquitination-regulatory factor » (Smurf) 1 et 2 dirigent les SMAD vers le protéasome qui les dégrade.

## V.5 Régulation de l'expression de gènes par la voie de signalisation du TGF- $\beta$

La voie de signalisation de la superfamille du TGF- $\beta$  peut être régulée en différents points : pendant la synthèse et la maturation des cytokines ou du LTBP, lors de l'excrétion des cytokines et également lors de l'activation de la voie de signalisation. Une fois stimulée, cette voie peut activer ou réprimer la transcription de gènes. Les co-activateurs connus sont CBP<sup>13</sup>/p300, SMIF<sup>14</sup>, ARC105<sup>15</sup>, et les co-represseurs sont c-Ski<sup>16</sup>/SnoN<sup>17</sup>, TGIF<sup>18</sup>, p107, ZEB2<sup>19</sup> (SIP1), ATF3<sup>20</sup>. La voie de signalisation du TGF- $\beta$  active de nombreux gènes dont par exemple ceux impliqués dans la régulation du cytosquelette d'actine (Fibronectine, Intégrine), ou dans l'adhésion cellulaire (collagène, protéine kinase C, cavéoline) (Ranganathan *et al.* 2007). Il existe également des rétrocontrôles par les protéines inhibitrices SMAD 6, 7. L'altération de l'homéostasie du TGF- $\beta$ 1 est associée à diverses pathologies (croissance tumorale, fibrose et maladie auto-immune) (Blobe *et al.* 2000).

### V.5.1 Inhibition de l'expression de gènes par la voie de signalisation du TGF- $\beta$ 1

Dans la littérature, très peu de cas montrent une diminution de l'expression de gènes par la voie de signalisation du TGF- $\beta$ . Ce type de régulation négative nous intéresse particulièrement en ce qui concerne la diminution de l'expression de l'ADH1 (voir le 2<sup>ème</sup> chapitre des Résultats). Cette régulation peut être directe, par l'intermédiaire de co-represseurs, ou indirecte, par la transcription d'une protéine inhibitrice. Le paragraphe ci-dessous énumère quelques exemples.

#### ❖ Inhibition de c-MYC

Le TGF- $\beta$  inhibe la progression du cycle cellulaire en inhibant la transcription des gènes impliqués dans ce mécanisme. Par exemple, l'inhibition de l'expression de c-MYC est modulée par le TGF- $\beta$  par l'intermédiaire de la voie impliquant un complexe SMAD3/4. Ce complexe en

---

<sup>13</sup> CBP : CREB-Binding Protein

<sup>14</sup> SMIF : SMAD4-Interacting Transcription Factor

<sup>15</sup> ARC105 : Activator Recruited co-Factor

<sup>16</sup> Ski : Sloan Kettering Institute

<sup>17</sup> SnoN : Ski related Novel gene (Skil)

<sup>18</sup> TGIF : TGF- $\beta$  Induced Factor

<sup>19</sup> ZEB2 : Zinc Finger E-box Binding homeoBox2

<sup>20</sup> ATF3 : Activating Transcription Factor

s'associant aux facteurs de transcription E2F4 et E2F5 et au co-répresseur p107, reconnaît et se fixe sur un élément proximal du promoteur de c-MYC permettant ainsi l'inhibition de la transcription du gène (Jang *et al.* 2002).

❖ Inhibition de l'expression du gène « Inhibitor of DNA binding 1 » (ID1)

Le TGF- $\beta$  module la différenciation cellulaire en régulant les protéines de la famille des ID dont la fonction est d'inhiber l'activité des facteurs de transcription de la famille bHLH, *via* la formation d'hétérodimères incapables de se lier à l'ADN. Le TGF- $\beta$  *via* SMAD3 induit l'expression d'ATF3. SMAD3 et ATF3 forment ensuite un complexe qui inhibe l'activité du promoteur d'ID1. En revanche, le BMP induit la protéine SMAD1 qui se fixe sur le promoteur du gène ID1 et permet l'activation de la transcription de ce gène (Kang *et al.* 2003).

❖ Inhibition de la différenciation cellulaire

Le TGF- $\beta$  inhibe l'expression des acteurs jouant un rôle fonctionnel dans la différenciation des myoblastes, ostéoblastes et adipocytes. La protéine SMAD3 inhibe la transcription de MyoD *via* les co-facteurs Runx2/CBFA1 (runt domain / core-binding factor) dans les ostéoblastes différenciés (Alliston *et al.* 2001). Elle inhibe également la fonction de la protéine MyoD en interagissant avec son domaine « Helix Loop Helix » (HLH) empêchant ainsi sa dimérisation avec E12/E47 et son recrutement sur les séquences E-box de l'ADN (Liu *et al.* 2001). Cette régulation est spécifique du tissu. En effet, SMAD3 coopère avec Runx2 pour activer la transcription dans les cellules épithéliales mais inhibe la transcription sur le même promoteur dans les cellules mésenchymateuses.

❖ Inhibition de l'E-cadhérine

Le TGF- $\beta$  induit la protéine « multi zinc finger » ZEB2 (SIP1) qui, elle-même, inhibe l'expression de l'E-cadhérine (Comijn *et al.* 2001). La diminution de l'expression de l'E-cadhérine est un marqueur de la transition épithélio-mésenchymateuse impliquée par exemple dans la fibrose du foie.

## V.6 Pathologies hépatiques liées au TGF- $\beta$

Nous avons vu dans les paragraphes précédents le rôle et l'importance du TGF- $\beta$  dans de nombreuses fonctions physiologiques. Cette cytokine maintient l'homéostasie des tissus et empêche la progression des tumeurs naissantes en régulant, d'une part la prolifération, la différenciation, la survie et l'adhésion cellulaire et, d'autre part en contrôlant le microenvironnement cellulaire. La dérégulation de ce système a été décrit comme étant à l'origine ou participant au développement de différentes pathologies.

Le Tableau 11 recense certaines pathologies associées à une dérégulation de la voie de signalisation de la superfamille des cytokines TGF- $\beta$ . Différents gènes de la voie de la superfamille du TGF- $\beta$  ont été invalidés dans des modèles de souris, et sont responsables de la malformation de certains organes, d'un retard de croissance et de pathologies parfois létales *in utero*. De plus, les cellules cancéreuses ont également la capacité d'éviter ou de falsifier la fonction « suppresseur de tumeurs » de la voie du TGF- $\beta$ , ce qui favorise la tumorigenèse.



Tableau 11 : Exemples de pathologies associées à une perturbation de différentes voies de signalisation du TGF- $\beta$  dans des souris par invalidation de l'expression du ligand ou des protéines impliquées.

KO	Pathologies	Référence
KO TGF- $\beta$ 1	Malformation des os Mort embryonnaire avec défaut vasculaire Mort postnatale due aux maladies auto-immunes	(Dickson <i>et al.</i> 1995, Shull <i>et al.</i> 1992)
KO TGF- $\beta$ 2	Malformation cardiaque mort périnatale	(Sanford <i>et al.</i> 1997)
KO TGF- $\beta$ 3	Retard de la maturation pulmonaire mort rapide après la naissance	(Proetzel <i>et al.</i> 1995)
KO TGFBR2	Défaut vasculaire et mort embryonnaire	(Oshima <i>et al.</i> 1996)
KO TGFBR1	Altération de l'angiogénèse mort embryonnaire	(Larsson <i>et al.</i> 2001)
KO SMAD1	Mort par altération de la circulation sanguine	(Goumans & Mummery 2002)
KO SMAD2	Mort embryonnaire Malformation du mésoderme et de la gastrulation	(Weinstein <i>et al.</i> 1998, Nomura & Li 1998, Waldrip <i>et al.</i> 1998)
KO SMAD3	Métastase colorectale Altération du système immunitaire	(Zhu <i>et al.</i> 1998)
KO SMAD4	Retard de croissance Pas de formation du mésoderme Anomalie de l'endoderme	(Sirard <i>et al.</i> 1998)
KO SMAD5	Mort embryonnaire	(Chang <i>et al.</i> 1999)
KO SMAD6	Altération cardiaque	(Galvin <i>et al.</i> 2000)

### V.6.1 Interactions entre l'alcool et le TGF- $\beta$ 1

Lorsque le foie est altéré, une réponse physiologique se met en place pour induire sa réparation. Le TGF- $\beta$  alors inactif dans le compartiment extracellulaire devient actif *via* différentes protéases (metalloprotéases, élastases et plasmines) qui clivent le LTBP, libérant le complexe SLC (Figure 22) (Saharinen & Keski-Oja 2000b). L'activation du TGF- $\beta$  permet alors la régénérescence du tissu altéré. Cependant, lorsque les blessures hépatiques sont récurrentes, la surexpression/suractivation de TGF- $\beta$  entraîne une fibrose hépatique.

Il a été démontré que la consommation d'alcool induisait la production de TGF- $\beta$  hépatique à l'origine de l'apparition de la fibrose hépatique (Breitkopf *et al.* 2005). Dans le cadre d'une consommation d'alcool excessive, plusieurs mécanismes conduisent à l'expression du TGF- $\beta$ . D'une part le métabolisme oxydatif par le CYP2E1 et la production d'ERO activent les cellules de Kupffer qui produisent du TGF- $\beta$  (Li *et al.* 2012). Les endotoxines bactériennes de type Lipopolysacharrides (LPS) retrouvées sur la membrane externe des bactéries à Gram négative sont des molécules activant les cellules de Kupffer (Ansari *et al.* 2016). Une consommation chronique d'alcool mène à la perméabilisation des parois intestinales et diminue la clairance hépatique. Ce dysfonctionnement conduit à une élévation de la concentration d'endotoxines dans le foie et donc à une augmentation de l'activation des cellules de Kupffer et du système immunitaire. L'activation des cellules de Kupffer conduit à une libération de cytokines pro-inflammatoires, et amplifie le phénomène de sécrétion du TGF- $\beta$ . Ce dernier stimule alors la formation de collagène et inhibe les MMP, ce qui conduit à une restructuration de la MEC à l'origine de la fibrose.

A plus long terme, le TGF- $\beta$  joue également un rôle important dans la modification du microenvironnement favorable à la croissance de tumeurs et à l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse. La voie de signalisation du TGF- $\beta$  est impliquée dans le développement de l'hépatocarcinome par deux mécanismes : une activité intrinsèque autocrine et paracrine du facteur de croissance et un changement du microenvironnement (augmentation des fibroblastes associés au cancer, des cellules T et des médiateurs de l'inflammation). Un inhibiteur de la voie de signalisation du TGF- $\beta$ , le LY2157299, a ainsi été développé afin de bloquer la croissance du carcinome hépatocellulaire et la progression de la TEM dans différents modèles expérimentaux (Giannelli *et al.* 2014).

Les cellules stellaires hépatiques activent le TGF- $\beta$  qui stimule la formation de collagène et inhibe les MMP. Les médiateurs de la voie de signalisation du TGF- $\beta$  peuvent donc être des cibles thérapeutiques contre la fibrose hépatique d'origine alcoolique, mais aussi non alcoolique. Dans ce cadre thérapeutique, il faut néanmoins rester prudent. En effet, le TGF- $\beta$  peut par exemple jouer deux rôles opposés : promotion des tumeurs ou effet anti-tumoral.

Avec de plus en plus de preuves cliniques que le TGF- $\beta$  joue un rôle d'immunosuppresseur ou d'inducteur de tumeur, il y a un intérêt croissant à l'utiliser comme

cible thérapeutique. Une intervention pharmacologique pourrait être effective à différents niveaux :

- Fibro-prévention en diminuant les altérations des cellules hépatiques en utilisant des médicaments protecteurs des hépatocytes ou pouvant éliminer l'agent toxique
- Suppression de la production des composants de la matrice en empêchant la formation de la MEC
- Utilisation d'un agent capable de supprimer la matrice dégradée (fibrinolyse)

### V.6.2 Lien entre AhR et TGF- $\beta$ 1

Comme je l'ai expliqué dans le paragraphe III.1.3, le AhR est un facteur de transcription récemment associé à des fonctions endogènes de la cellule : contrôle de la prolifération, de la différenciation et de la migration cellulaire, de l'angiogénèse et survenue de certains cancers (Barouki *et al.* 2007, Puga *et al.* 2009, Veldhoen *et al.* 2008).

Il a été montré une interaction entre la voie de signalisation du AhR et celle du TGF- $\beta$ 1. Les études d'inactivation ou d'activation de ces voies montrent des effets contradictoires et parfois paradoxaux. Les études de l'équipe du Dr Fernandez-Salguero (Fernandez-Salguero *et al.* 1996) ont montré que les souris C57Bl/6J invalidées pour l'expression du AhR (AhR-/-) développent différentes altérations hépatiques comme une fibrose hépatique portale. Dans les hépatocytes de ces souris, le taux de TGF- $\beta$  est augmenté et corrélé avec une augmentation des cellules apoptotiques (Zaher *et al.* 1998). L'ARNm de LTBP1 et la protéine correspondante sont surexprimés et contribuent à l'augmentation du TGF- $\beta$ 1 actif (Santiago-Josefat *et al.* 2004a). Cependant, le mécanisme complet d'apparition de la fibrose en absence du AhR n'a pas encore été déterminé.

Des études sur un ligand agoniste du AhR, l'ITE, ont montré que celui-ci dérégulait la voie de signalisation du TGF- $\beta$ 1 en inhibant la translocation du complexe SMAD2/3/4 dans le noyau et bloquait ainsi la différenciation des myofibroblastes AhR-/- (Lehmann *et al.* 2011).

Une étude au sein du laboratoire a montré que la TCDD induisait une fibrose hépatique dans les souris C57bl/6J. L'expression de l'ARNm du TGF- $\beta$  était également induite dans le foie de ces souris (Pierre *et al.* 2014).

Les travaux de Gramatski et collaborateurs, en 2009, ont montré que la régulation de la voie de signalisation du TGF- $\beta$  par le AhR était spécifique du tissu ; en effet, dans les cellules

gliales, AhR régule positivement la voie de signalisation des TGF- $\beta$ 1, 2 et 3 et LTBP-1 alors que dans les astrocytes, le AhR inhibe cette voie.

A l'inverse, il a été également décrit que le TGF- $\beta$ 1 pouvait réguler l'expression ou la localisation du AhR (Staršíchová *et al.* 2012). Le TGF- $\beta$ 1 actif libéré des fibroblastes ou de l'épithélium du système respiratoire lors d'une exposition chronique à certains allergènes (cafard) et à la TCDD, induit une différenciation cellulaire et une réponse immunitaire exacerbées par l'activation du AhR (Zhou *et al.* 2014).

Ces interactions entre le AhR et le TGF- $\beta$  nous ont conduit à nous intéresser au rôle que cette cytokine pourrait jouer dans l'inhibition, par des ligands du AhR (TCDD), de certains gènes, en particulier, les ADH.



## Objectif de thèse

L'objectif général de mon projet est d'étudier les effets des polluants de l'environnement sur le métabolisme de l'alcool et sur le métabolisme énergétique dans le foie. En effet, une étude antérieure de puces Affymétrie a montré qu'un traitement de 30 heures par 25 nM de TCDD des cellules hépatiques humaines (HepaRG) diminuait l'expression des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'alcool et des rétinoïdes, mais également que le mélange de 25 nM de TCDD et de 10  $\mu$ M d'alpha-endosulfan (pesticide organochloré) diminuait très fortement l'expression des enzymes du métabolisme des carbohydrates (Ambolet-Camoit *et al.* 2015).

Mon travail de thèse s'est décliné en plusieurs parties :

- I) Etudier le rôle du AhR dans la diminution de l'expression des enzymes du métabolisme de l'alcool et des rétinoïdes en présence de xénobiotiques
- II) Etudier l'implication de la voie de signalisation du TGF- $\beta$ 1 lors de la régulation de l'expression des enzymes du métabolisme de l'alcool et des rétinoïdes en présence de TCDD
- III) Etudier les effets du mélange des polluants TCDD et pesticide organochloré dans les cellules hépatiques humaines (HepaRG) sur le métabolisme glucidique

## Modèle utilisé

Le foie est l'organe majeur impliqué dans la biotransformation et la détoxification des xénobiotiques dans l'organisme. La culture primaire d'hépatocytes issus de rongeurs est très utilisée mais pose un problème de variabilité inter-espèce pour des études toxicologiques, ainsi que pour l'extrapolation des effets sur l'Homme, et de ce fait, les modèles humains sont en meilleure adéquation pour la transposition des résultats *in vitro* - *in vivo*.

Il existe de nombreux modèles humains *in vitro* pour les études toxicologiques (fractions subcellulaires d'hépatocytes, cellules en culture). Le plus représentatif reste les hépatocytes humains en culture primaire (HHP) car ils correspondent au modèle humain le plus proche de la réalité. Lorsqu'ils sont fraîchement isolés, les hépatocytes gardent leur structure et conservent transitoirement la plupart des fonctions hépatiques. Mais leur disponibilité, leur coût, la variabilité interindividuelle et leur survie limitée sont des inconvénients à leur utilisation.

Les lignées cellulaires hépatiques disponibles, peu chères et immortelles sont alors un avantage pour les études *in vitro*. Cependant la plupart des lignées hépatiques comme HepG2 ou HUH7 n'expriment pas toutes les enzymes des fonctions hépatiques comme les EMX de phase I et II ou les transporteurs membranaires. Les cellules HepaRG différenciées ont l'avantage d'avoir les mêmes fonctions que les hépatocytes différenciés et représentent une alternative aux HHP ou aux cellules induites pluripotentes (iPS). Aujourd'hui, beaucoup de laboratoires utilisent la lignée HepaRG comme substitut de culture primaire d'hépatocyte pour des études prédictives de cinétiques et d'interactions médicamenteuses (McGinnity *et al.* 2009). L'analyse du profil d'expression de l'ensemble du génome de ces cellules a montré beaucoup de similitudes avec des hépatocytes primaires en culture ou des tissus hépatiques humains comparés à la lignée humaine HepG2. Les cellules différenciées HepaRG sont donc un modèle adéquat pour l'étude des xénobiotiques et des toxicités hépatiques (Hart *et al.* 2010).

Les cellules HepaRG utilisées pour cette étude, proviennent du laboratoire du professeur Christiane Guillouzo situé à Rennes (INSERM 991) (Aninat *et al.*, 2006) qui les a développées. Cette lignée a été isolée à partir d'un cholangio-hépatocarcinome d'une

patiente atteinte également d'une infection chronique par le virus de l'hépatite C (Gripon *et al.* 2002). Ces cellules ont la capacité de se différencier et de se transdifférencier en hépatocytes et cellules de type biliaire en présence de DMSO 1,5 % pendant 15 jours (Cerec *et al.* 2007). A faible densité, environ  $2,6 \cdot 10^4$  cellules.cm<sup>-2</sup>, les cellules sont indifférenciées et ont une forte capacité d'auto-renouvellement. De forme allongée lors de leur prolifération, leur morphologie se modifie progressivement au fur et à mesure de la densification pour prendre les caractéristiques de cellules épithéliales granuleuses entourées de cellules épithéliales plus étalées et claires. Après 14 jours de prolifération, lorsque les cellules sont arrivées à confluence, l'ajout de 1,5 % de DMSO permet de potentialiser leur différenciation en deux types cellulaires : les cellules hépatiques et les cellules biliaires. Ce mélange est en proportion d'environ 50-50 % (Figure 26).

Les cellules HepaRG conservent leurs caractéristiques morphologiques pendant 4 semaines après leur différenciation (Josse *et al.* 2008). Plusieurs paramètres ont été considérés pour caractériser leur différenciation en cellules hépatocytaires. Elles sont capables d'assurer le métabolisme oxydatif des xénobiotiques (Aninat *et al.* 2006, Kanebratt & Andersson 2008) et la synthèse de glycogène (Samanez *et al.* 2012). Elles expriment également des gènes spécifiques des hépatocytes (l'aldolase B et le CYP3A4, ...), des gènes impliqués dans le métabolisme et le transport de xénobiotiques (CYP1A1, CYP1A2, CYP2E1, UGT1A1, MDR1 ...), et des récepteurs nucléaires (CAR, PXR, ER,...).

Les cellules sont cultivées dans du milieu williams' E sans L-glutamine (Invitrogen), enrichi en sérum de veau fœtal (SVF, 10 %, Hyclone puis Eurobio), L-glutamine (2 mM, Invitrogen), insuline (5 µg/mL, Sigma), hydrocortisone (50 µM, Sigma), pénicilline (50 UI/mL) et streptomycine (50 µg/mL, Invitrogen). Deux millions de cellules sont incubées dans une flasque 75 cm<sup>2</sup> sous une atmosphère humide à 37°C avec 5 % de CO<sub>2</sub> pendant 14 jours, et leur milieu de culture est changé tous les deux jours jusqu'à confluence. Au quinzième jour, 1,5 % de DMSO sont ajoutés au milieu de culture pendant 14 jours pour entraîner la différenciation des cellules (Figure 26). Généralement les cellules sont trypsinées puis ré-ensemencées dans des puits et laissées 3 jours en culture pour qu'elles retrouvent leur morphologie différenciée. Les traitements reçus par les cellules différenciées ont été réalisés dans du milieu contenant en permanence 1,5 % de DMSO pour maintenir leur état de différenciation. Les transfections sont réalisées pendant le passage des cellules, par la méthode de reverse-transfection.



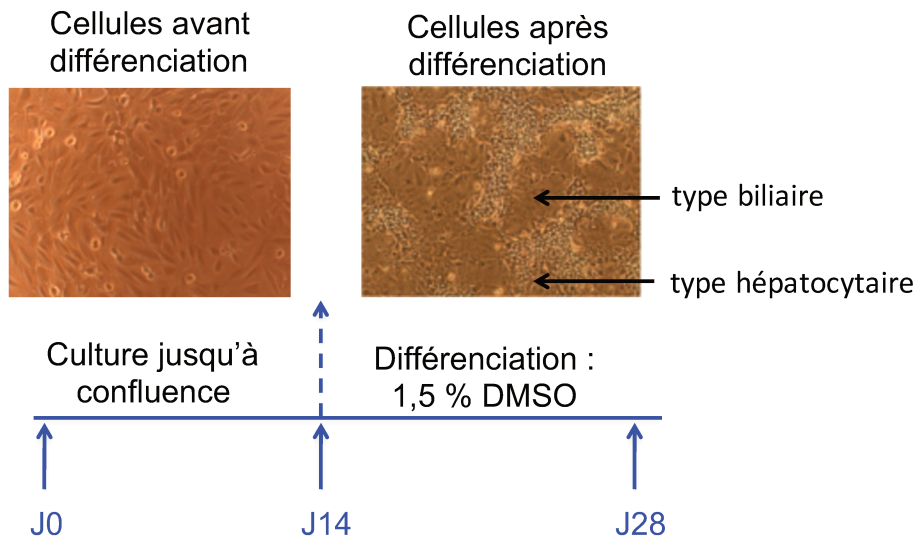


Figure 26 : Image au microscope optique de la lignée cellulaire HepaRG en culture pendant le processus de prolifération (image de gauche) puis de différenciation (image de droite).

La différenciation, induite par 1,5% DMSO pendant 14 jours, fait apparaître les deux types cellulaires, hépatocyttaire et biliaire (grossissement 200x)

## **Partie 1**

---

**Rôle du AhR dans la régulation de l'expression des enzymes du  
métabolisme de l'alcool et des rétinoïdes en présence de  
xénobiotiques**

## Effets des ligands du AhR sur l'expression des enzymes du métabolisme de l'alcool et des rétinoïdes

Au cours du siècle dernier, le développement industriel s'est accompagné d'une augmentation du nombre de molécules chimiques utilisées. Mon premier objectif a été d'étudier les effets de la TCDD, un xénobiotique lipophile classé cancérigène pour l'Homme, sur l'expression des alcool déshydrogénases (ADH), enzymes impliquées dans le métabolisme de l'alcool et des rétinoïdes. La TCDD appartient à la famille des polluants organiques persistants et est prise en charge dans la cellule par le récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR). La liaison de la TCDD au AhR entraîne sa translocation dans le noyau des cellules et le recrutement de son partenaire, la protéine « AhR Nuclear Translocator » (ARNT). Ce complexe régule l'expression de nombreux gènes, notamment ceux impliqués dans la dégradation et l'élimination des xénobiotiques. Même si la TCDD est de moins en moins présente dans l'environnement, elle est utilisée dans cette étude comme modèle d'activation de la voie de signalisation du AhR induite par de nombreux HAP.

### I. Introduction

Une étude transcriptomique sur puce Affymétrie a été réalisée dans le but de déterminer si l'exposition à la TCDD pouvait altérer les fonctions hépatiques (Ambolet-Camoit *et al.* 2015). Cette étude a été effectuée sur un modèle *in vitro* de cellules hépatiques différenciées (HepaRG) et a montré que 25 nM de TCDD pendant 30 heures diminuait l'expression des gènes codant pour les enzymes du métabolisme de l'alcool (CYP2E1, ADH1A, 1B, 1C, ADH4, ADH6) et des rétinoïdes (ADH1A, 1B et 1C, 4 et 6, RDH16<sup>21</sup>) (Ambolet *et al.*, 2015). Les ADH catalysent l'oxydation des alcools et la réduction des aldéhydes. Elles sont composées de 375 acides aminés et forment un dimère actif qui dépend du zinc, et utilise le NAD<sup>+</sup>/NADH, H<sup>+</sup> comme co-facteur. Elles jouent donc un rôle important dans le métabolisme des molécules d'alcool et d'aldéhydes exogènes mais également dans les fonctions métaboliques physiologiques, comme par exemple le métabolisme des rétinoïdes. A l'heure actuelle, les différents rôles physiologiques des ADH ne sont pas complètement établis. Cependant, compte tenu de leur activité catalytique, les ADH pourraient en plus participer au métabolisme des stéroïdes, des amines, des acides gras  $\omega$ -hydroxylés, et à l'élimination des

---

<sup>21</sup> RDH16 : Rétinol Déshydrogénase 16 (tout-*trans*)

lipides peroxydés (Jörnvall *et al.* 2013). Les ADH sont également impliquées dans le métabolisme de l'oxyde nitrique (Hedberg *et al.* 2003).

L'étude approfondie de la régulation des ADH par la TCDD est originale. Il s'agit en effet de la première observation d'une diminution de l'expression du CYP2E1 et de 5 ADH sur les 7 isoformes existantes après traitement par la TCDD. Par ailleurs, très peu d'études portent sur une diminution d'expression de gènes après une activation du AhR (principalement connu pour activer l'expression de gènes). L'objectif de cette étude est d'analyser les mécanismes transcriptionnels par lesquels l'expression des alcool déshydrogénases est diminuée en présence de TCDD dans les cellules hépatiques HepaRG.

Cette étude a fait l'objet d'une publication dans le journal Archives of Toxicology en 2016.







## II. Conclusion-Perspectives

Dans cette première étude, nous avons analysé les effets de la voie de signalisation du AhR sur la régulation des ADH (1, 4 et 6) dans différents modèles hépatiques (HepaRG, HepG2, HHP et foie de souris C57/Bl6J). L'expression en ARNm des ADH et du CYP2E1 ((Attignon *et al.* 2015), et Figure 27, Figure 28) diminue dès 8 heures de traitement par 25 nM de TCDD. Cette diminution est également observée à des concentrations plus faibles, de 0,1 nM à 5 nM à 24 heures. La quantité en protéines des ADH diminue après 72 heures de traitement avec 25 nM de TCDD. La demi-vie de l'ARNm des ADH n'est pas modifiée par la TCDD, ce qui suggère que la régulation est transcriptionnelle.

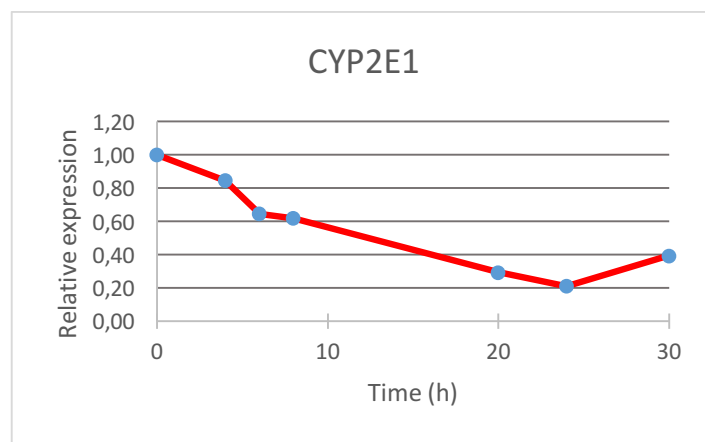


Figure 27 : Expression de l'ARNm CYP2E1 régulée par la TCDD en fonction du temps. Mesure par RT-qPCR de l'ARNm CYP2E1 en fonction du temps de traitement des cellules HepaRG différenciées par 25 nM de TCDD (4 à 30 heures) (n=3)

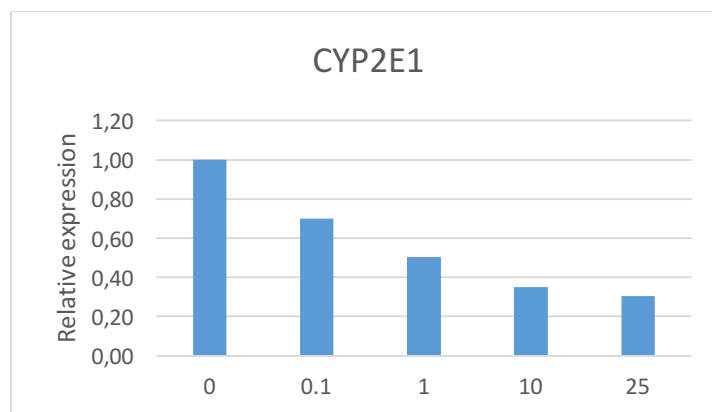


Figure 28 : Expression de l'ARNm CYP2E1 régulée en fonction de la concentration de TCDD (nM). Mesure par RT-qPCR de l'ARNm CYP2E1 en fonction de la concentration de TCDD (0,1 nM à 25 nM) après 24 heures des cellules HepaRG différenciées (n=3).

Pour étudier le rôle de l'activation du AhR par la TCDD dans la régulation des enzymes du métabolisme de l'alcool, nous avons tout d'abord utilisé un inhibiteur compétitif pharmacologique spécifique du récepteur, le CH-223191, et différents siARN contre AhR,



ARNT et c-SRC. Nous avons vérifié que l'inhibiteur était bien actif dans notre modèle puisqu'il diminue l'induction du CYP1A1 par la TCDD de plus de 80 %, d'une manière dépendante de la dose. Avec ce même traitement, l'expression des ADH est entièrement restaurée au niveau du contrôle. Le mécanisme de régulation met donc en jeu la liaison de la TCDD à son récepteur. L'utilisation de siARN nous a ensuite permis de montrer que la voie génomique *via* le complexe AhR/ARNT participe à cette régulation et que ces deux protéines sont nécessaires. En revanche, la voie non génomique impliquant la protéine c-SRC ne joue aucun rôle.

Le même type de régulation des ADH a été retrouvé en utilisant d'autres ligands du AhR (3-méthylcholanthrène et du PCB126).

Cette étude mécanistique soulève plusieurs questions. **Par quel moyen l'activation du complexe AhR/ARNT, qui est plutôt *trans*-activatrice, conduit-elle à la diminution de l'expression des ADH ?** Pour répondre à cette question nous avons émis l'hypothèse de l'implication de la voie du TGF- $\beta$  que nous étudions dans la partie 2 des Résultats de cette thèse. En effet, une étude a montré que le TGF- $\beta$  inhibait l'expression de l'ADH1 dans la souris, avec des dommages hépatiques importants en présence d'alcool (Ciuclan *et al.* 2010b). Par ailleurs de nombreux liens entre les voies de signalisation AhR et TGF- $\beta$  ont été décrits.

Une autre question découle de nos observations et de la littérature. **Quel est l'effet de la diminution des ADH sur les fonctions physiologiques de la cellule HepaRG en présence ou non d'alcool ?** Nous nous sommes intéressés au métabolisme des rétinoïdes, molécules importantes de signalisation cellulaire. Il est en effet connu que les ADH interviennent dans ce métabolisme en oxydant le rétinol (vitamine A) en rétinaldéhyde lors de la production de l'acide rétinoïque (Molotkov *et al.* 2002a).

## II.1 Les Rétinoïdes

Les rétinoïdes sont des molécules indispensables à la survie de nombreux types cellulaires. Ils jouent un rôle essentiel dans le développement embryonnaire, la croissance, la reproduction et sont également impliqués dans la différenciation cellulaire et l'apoptose (Dersch & Zile 1993). L'ensemble du métabolisme des rétinoïdes permet de stocker la vitamine A (tout-*trans*-rétinol), de produire des acides rétinoïques impliqués dans de nombreuses voies de signalisation et de dégrader tout excès de ces acides afin de maintenir leur homéostasie dans les cellules.

## II.2 Métabolisme

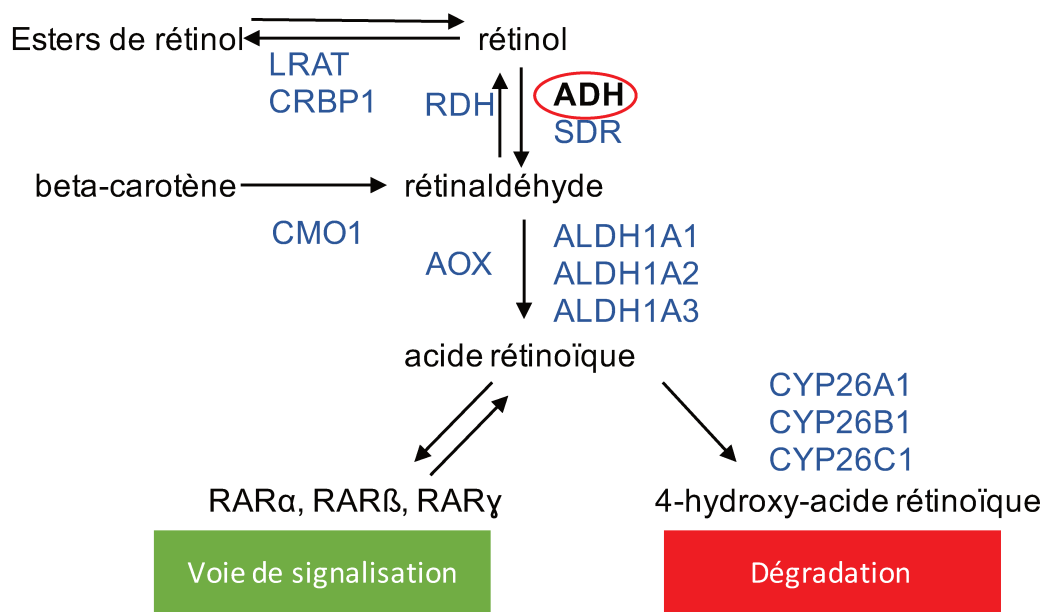


Figure 29 : Voie du métabolisme des rétinoïdes

Lors du processus de stockage, le rétinol est estérifié en ester de rétinol par la *lécithine-rétinol acyltransférase* (LRAT) en présence de la protéine cellulaire de liaison du rétinol (« *cellular retinol-binding protein-1* » (CRBP1) (Ghyselinck et al., 1999 ; O'Byrne et al., 2005). La réaction inverse se fait par hydrolyse (Harrison, 1993 ; Strom et al., 2009). SDR= « *short-chain dehydrogenase/reductase* » ; CMO1=«*β-carotene-15,15'-oxygenase*», AOX : *Aldehyde Oxidase*. D'après (Kumar et al. 2012)

Les deux sources majeures de rétinoïdes sont le  $\beta$ -carotène et les esters de rétinol (Figure 29). Le clivage du  $\beta$ -carotène (pro-vitamine A) par l'enzyme caroténoïde-15,15'-oxygénase (CMO1), génère le rétinaldéhyde dont la réduction produit le rétinol (vitamine A), qui est la forme de stockage à court terme circulant dans le sang, liée à la protéine RBP4 (retinol binding protein 4). Les esters de rétinol servent de stockage à plus long terme et proviennent de l'alimentation ou de l'estérification du rétinol. Les esters de rétinol sont stockés dans les réserves de l'intestin ou dans les cellules étoilées du foie.

Dans la cellule, la forme la plus active des rétinoïdes est l'acide rétinoïque. Il est formé à partir du rétinol en deux étapes. La première réaction d'oxydation transforme le rétinol en rétinaldéhyde. Différentes enzymes ont été identifiées pour catalyser cette première réaction limitante et réversible. Elle est réalisée par les ADH1 et 4 dans le foie et les ADH5 et 7 dans les tissus extra-hépatiques ou les déshydrogénases/réductases à chaînes courtes (SDR) (RDH1, RDH10) (Pares et al. 2008, Molotkov et al. 2002b, Sandell et al. 2007, Zhang-Gandhi & Drew 2007). La réaction inverse est effectuée par des RDH (RDH12) ou des aldo-céto réductases

(AKR1B10) (Gallego *et al.* 2006). Ces enzymes existent dans la plupart des espèces (Nadauld *et al.* 2005, Strate *et al.* 2009).

La deuxième réaction d'oxydation est irréversible et transforme le rétinaldéhyde en acide rétinoïque. Cette réaction est possible grâce aux rétinaldéhydes déshydrogénases (RALDH1, 2, 3) qui sont des membres de la famille des aldéhydes déshydrogénases (ALDH). Ces enzymes ont un profil d'expression différent selon le stade du développement humain. L'ALDH1A1 (RALDH1) et l'ALDH18A1 (RALDH4) sont surtout exprimées dans les épithéliums qui dépendent de l'acide rétinoïque pour leur développement physiologique. Des homologues ont été également retrouvés dans le poisson zèbre et le xénope (Begemann *et al.* 2004, Grandel *et al.* 2002, Pittlik *et al.* 2008).

L'acide rétinoïque, quant à lui, est dégradé en métabolites polaires au cours de plusieurs étapes d'oxydation. La première étape est réalisée par les cytochromes de la famille CYP26A1, B1, C1 par l'ajout d'un groupement hydroxyle sur plusieurs positions possibles de l'acide rétinoïque, facilitant son élimination (Frolik *et al.* 1979). Les CYP26 sont des gènes cibles de la voie de signalisation induite par l'acide rétinoïque permettant un rétrocontrôle négatif. En effet, un excès d'acide rétinoïque est toxique pour l'organisme. Il a été démontré par exemple que le métabolite 4-oxo-acide rétinoïque provenant de la dégradation de l'acide rétinoïque, et l'acide rétinoïde ont des effets tératogènes s'ils sont introduits dans les embryons de xénope (Pijnappel *et al.* 1993). Une absence totale de CYP26A1 ou CYP26B1 (par invalidation génique) provoque ainsi des anomalies du développement. Le rôle des CYP26 serait donc de diminuer le taux d'acide rétinoïque dans certaines régions de l'embryon afin de maintenir sa survie et favoriser son développement normal (Parisotto *et al.* 2006, Pennimpede *et al.* 2010).

### II.3 Fonction

L'acide rétinoïque se fixe sur les récepteurs des acides rétinoïques (RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , RAR $\gamma$ ) ou les récepteurs X des rétinoïdes (RXR $\alpha$ , RXR $\beta$ , RXR $\gamma$ ), tous membres de la superfamille des récepteurs nucléaires (Figure 29). Ces récepteur activés s'hétérodimérisent et régulent la transcription de gènes cibles (tels que par exemple les « organic cation transporters » (OATP)

ou le CYP26A1) en se liant à des séquences RARE ou RXRE situées dans les promoteurs de ces gènes (Figure 30) (Vasios *et al.* 1989, de Thé *et al.* 1991). Différentes configurations possibles de ces récepteurs montrent la complexité combinatoire, assurant ainsi différents niveaux de régulation de l'expression des gènes cibles par les acides rétinoïques (Parisotto *et al.* 2006). Le système est d'autant plus complexe que les RXR peuvent se lier à d'autres récepteurs endogènes (thyroïde (TR), vitamine D (VDR), « peroxisome-proliférateur activé » (PPAR), et « récepteur X du foie » (LXR) pour permettre leur liaison à l'ADN (Mascrez *et al.* 2009). Par ailleurs, il existe plusieurs types d'acides rétinoïques (tout-*trans*, le plus abondant, 9-*cis*, 13-*cis*, ...) dont les différences d'affinités pour les récepteurs conduisent à l'induction de gènes cibles variés.

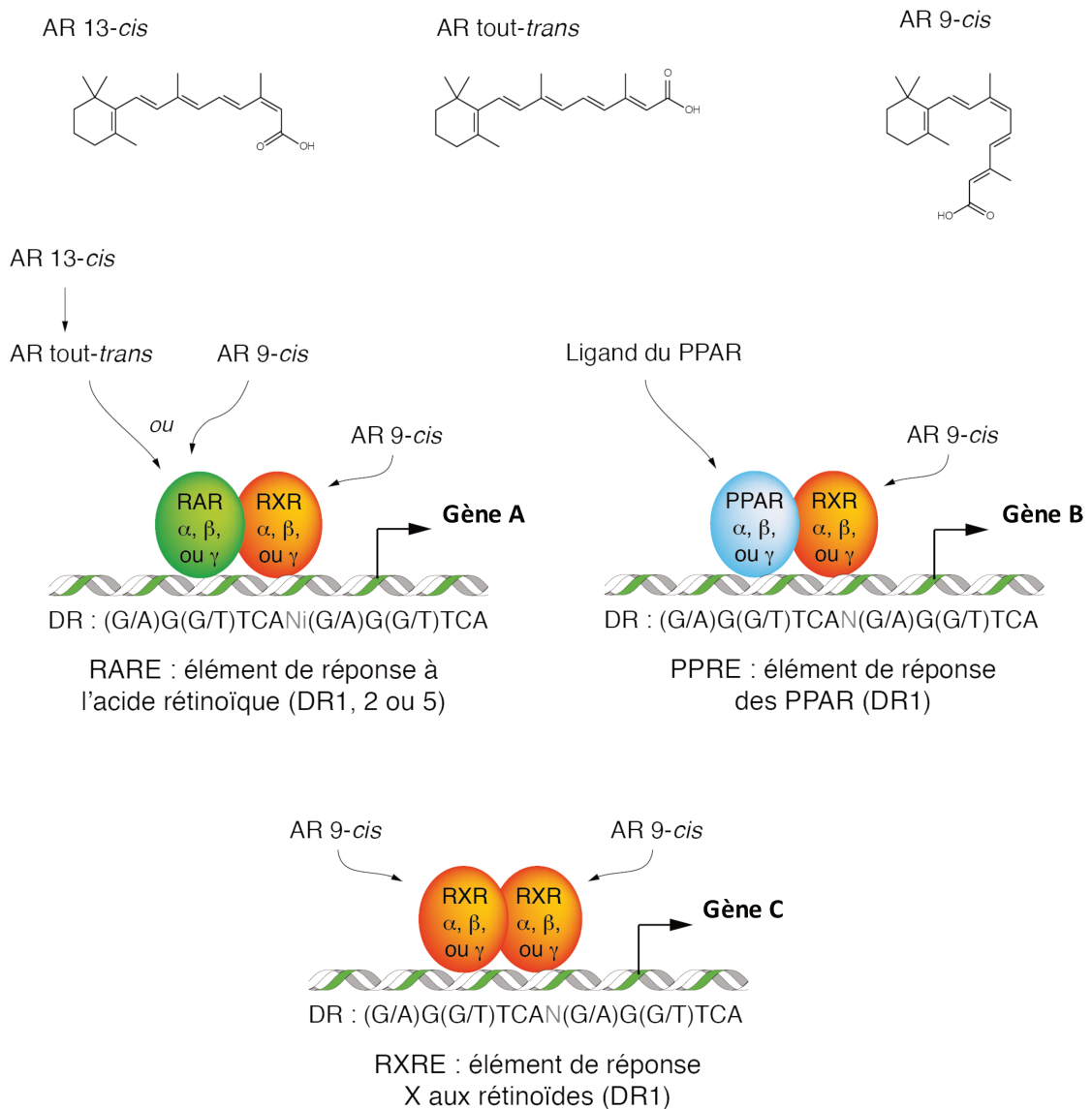


Figure 30 : Induction de l'expression des gènes par les rétinoïdes par l'intermédiaire des combinaisons possibles du RXR avec différents partenaires, inspiré par Parisotto, 2006.

Les sites de liaison sont similaires au niveau de leurs séquences consensus, bien qu'elles soient plus ou moins dégénérées. Par ailleurs le nombre de nucléotides entre les deux parties consensus ainsi que le sens des répétitions sont également variables pour un même récepteur. D'autres récepteurs sont également partenaires (TR, LXR, VDR ...) avec des séquences consensus homologues. Les différentes formes de l'acide rétinoïque (AR 13-cis, AR 9-cis ou AR tout-trans) peuvent se lier au RAR. Le RAR peut former un complexe avec le RXR qui reconnaît seulement la forme de l'AR 9 cis. Le complexe RAR/RXR lié à un élément de réponse RARE active la transcription de gènes cibles. Le RXR lié avec l'AR 9-cis peut lier le récepteur PPAR. Cet hétérodimère reconnaît une séquence PPARE et active ainsi la transcription de gènes. L'homodimère RXR activé par le ligand AR 9-cis lie une séquence RXRE pour activer la transcription de gènes. D'après (Parisotto et al. 2006)

## II.4 Effet d'une dérégulation

Le métabolisme du rétinol (vitamine A) permet de protéger l'organisme d'une intoxication à la vitamine A. Plusieurs études ont montré des altérations lors d'une déficience des enzymes de ce métabolisme. Le Tableau 12 résume les effets observés dans les souris

invalidées pour les gènes codant les enzymes qui catalysent la réaction de transformation du rétinol en acide rétinoïque (Kumar *et al.* 2012).

Tableau 12 : Effets d'une invalidation par KO de gènes impliqués dans le métabolisme des rétinoïdes et de l'alcool dans la souris (d'après (Kumar *et al.* 2012) sauf \*(Molotkov *et al.* 2002b)

<b>Enzymes invalidées</b>	<b>Effets dans les souris KO</b>
<b>ADH1 classe I</b>	Non léthal et les adultes sont fertiles Hypersensibilité à la toxicité induite par la vitamine A à cause d'une accumulation du rétinol difficile à éliminer Augmentation des rétynyles esters
<b>*ADH classe I + II</b>	Non léthal et les adultes sont fertiles Diminution de la production de l'acide rétinoïque
<b>*ADH classe II</b>	Non léthal et les adultes sont fertiles
<b>ADH classe III</b>	Non léthal et les adultes sont fertiles
<b>ADH classe IV</b>	Diminution de la survie postnatale lors d'une déficience en vitamine A
<b>RDH1</b>	Non léthal et les adultes sont fertiles Augmentation du poids, du tissu adipeux et du taux de rétynyles esters
<b>RDH10</b>	Léthal à 13,5 jours du développement embryonnaire Défaut craniofacial membres plus petits
<b>RALDH 1</b>	Non léthal et les adultes sont fertiles Hypersensibilité à la vitamine A à cause d'un excès de rétinaldéhyde difficile à réduire Protection contre l'obésité à l'âge adulte
<b>RALDH2</b>	Léthal à 9,5 jours du développement embryonnaire Malformation <i>in utero</i> des membres et de certains organes (cœur, cerveau)
<b>RALDH3</b>	Non viable à la naissance

## II.5 Interaction entre la voie du AhR et le métabolisme des rétinoïdes

Des études montrent que la TCDD modifie l'activité ou l'expression de certaines enzymes impliquées dans le métabolisme des rétinoïdes (RALDH, ALDH) (Törrönen *et al.* 1992). La TCDD diminue significativement le taux de vitamine A dans les organes (foie et rein) dans les rongeurs (rats, souris, cochon d'Inde, hamster) (Fletcher *et al.* 2001) et augmente le taux d'acide rétinoïque hépatique en augmentant les ARNm de l'enzyme rétinol oxydase et de la RALDH, ce qui perturbe ainsi l'homéostasie de la vitamine A dans l'organisme. Il a également été décrit que la TCDD ne modifiait pas l'absorption de la vitamine A mais qu'elle altérait son métabolisme et son stockage (Yang *et al.* 2005). La TCDD agit également comme un inhibiteur compétitif et diminue la liaison de l'acide rétinoïque tout-*trans* au RAR dans les kératinocytes. La TCDD pourrait donc agir en modulant directement l'action du RAR (Lorick *et al.* 1998).

## II.6 Résultats préliminaires sur ADH et métabolisme des rétinoïdes

Nous avons débuté l'analyse des effets de l'activation du AhR sur le métabolisme des rétinoïdes. Notre hypothèse est que la diminution des ADH par la TCDD empêche la transformation du rétinol en acide rétinoïque et donc la *trans*-activation des gènes cibles (Figure 31). Afin d'analyser si ce métabolisme pouvait être perturbé par l'ajout de TCDD, nous avons traité les cellules HepaRG différenciées par du rétinol tout-*trans* (1 ; 5 ou 10  $\mu$ M) pendant 24 heures et mesuré l'expression du CYP26A1, un gène cible du facteur de transcription RAR activé par l'acide rétinoïque, produit terminal de l'oxydation du rétinol (Le Vee *et al.* 2010). Les cellules ont été traitées 3 jours avec de la TCDD 5 nM pour que l'expression des protéines ADH soit diminuée au moment du traitement par le rétinol tout-*trans*. La concentration plus faible de TCDD permet de préserver la viabilité des cellules HepaRG traitées sur un temps long, tout en conservant une réponse *via* la voie du AhR (données du laboratoire).

Nous avons d'abord validé que le gène CYP26A1 était bien cible de la voie de signalisation de l'acide rétinoïque. Une augmentation de l'expression du gène est obtenue par un traitement par 5  $\mu$ M d'acide rétinoïque tout-*trans*. On observe une forte induction dose-dépendante de l'expression de ce gène après l'ajout du rétinol (ROH) qui indique que la

formation d'acide rétinoïque à partir de la molécule apportée est bien effective dans notre modèle (Figure 32).

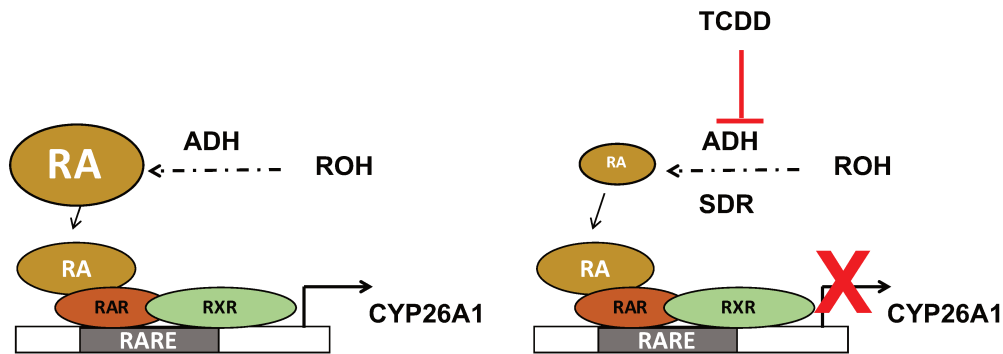


Figure 31 : Hypothèse de régulation du métabolisme des rétinoïdes après une diminution des ADH par la TCDD

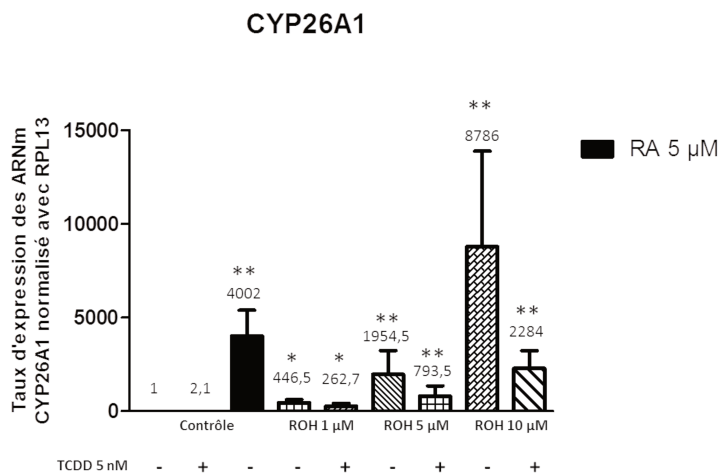


Figure 32 : Effet du rétinol (ROH) et de l'acide rétinoïque (RA) sur la régulation de l'expression du cytochrome P450 26A1 par la TCDD dans les cellules HepaRG.

Les cellules différenciées ont été pré-traitées 3 jours par la TCDD puis traitées ou non pendant 24 heures par le ROH à 1, 5 ou 10 µM ou par le RA à 5 µM. Les ARNs ont été amplifiés par RT-qPCR, et l'expression du gène CYP26A1 a été quantifiée après normalisation avec le gène référent RPL13A et comparée au contrôle. Les résultats sont représentés par la moyenne ± l'écart type de 3 expériences indépendantes. \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ .

Le pré-traitement à la TCDD diminue l'expression du CYP26A1 par rapport au rétinol seul. Cette diminution de 50 % environ, bien que non statistiquement significative, semble reproductible et est observée quelles que soient les doses de rétinol (Figure 32). Il est nécessaire de réaliser plus d'expériences afin d'augmenter la puissance statistique de ce résultat. La TCDD pourrait donc perturber l'induction du CYP26A1 par le rétinol, probablement en diminuant son oxydation en acide rétinoïque *via* la diminution de l'expression de plusieurs ADH.



### III. Etude préliminaire des promoteurs des ADH

#### III.1 Mesure de l'activité du promoteur du gène de l'ADH4

Nos résultats, décrits dans l'article I, démontrent que la TCDD diminue l'expression des ADH *via* la voie de signalisation génomique du AhR impliquant son partenaire ARNT. Cependant le mécanisme moléculaire de cette inhibition n'est toujours pas connu. Quelques études ont exploré l'inhibition de l'expression de gènes (NPC1, Cathepsin D, cycline D1, intégrine  $\alpha_6$ ) par le AhR (Podechard *et al.* 2009, Brantley *et al.* 2016, Krishnan *et al.* 1994, Latchney *et al.* 2011) et dans le cas de la cathepsine D ont montré le rôle d'un XRE. Nous avons initié une étude du promoteur du gène ADH4.

L'étude *in silico* du promoteur de ce gène a montré la présence d'une séquence XRE potentielle pouvant lier le complexe AhR/ARNT, en -5113 pb du point de départ de la transcription. Un plasmide contenant cette séquence XRE de l'ADH4 placée devant le promoteur minimal (395 pb) du gène de l'ADH4 et le gène rapporteur *Gaussia luciférase* a été construit à partir du plasmide commercial p*Gaussia-Luciférase* (pGLuc) (New England Biolabs) (Figure 33).

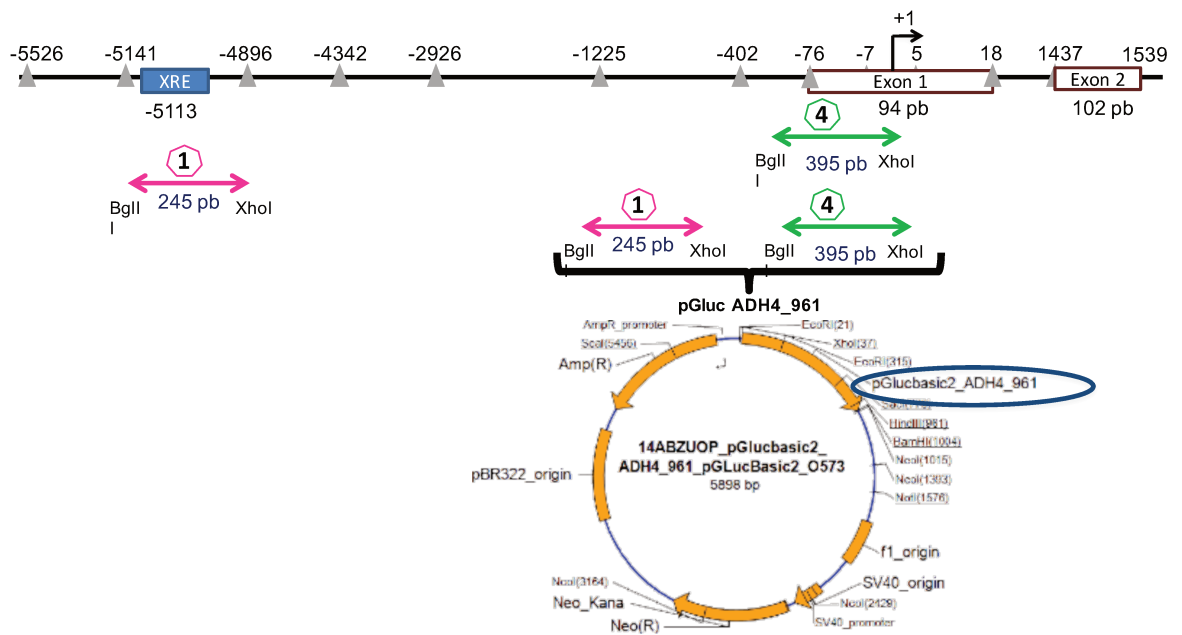


Figure 33 : Construction du plasmide pGluc contenant la séquence XRE et le promoteur minimal du gène ADH4. La séquence XRE du gène ADH4 se situe en -5113 pb. Le plasmide est constitué de la séquence XRE et du promoteur minimal de l'exon 1. Ces séquences sont placées en amont du gène rapporteur *Gaussia Luciférase*, pour obtenir le plasmide pADH4XRE.

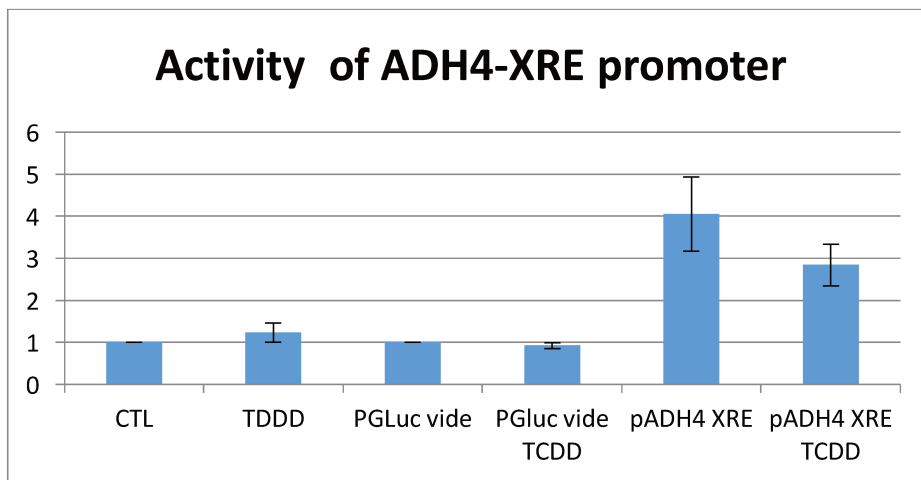


Figure 34 : Quantification de l'activité du promoteur pADH4 XRE. Les cellules HepaRG différenciées ont été co-transfectées par le plasmide pADH4XRE-*Gaussia luciférase* ou par le plasmide pGluc vide et avec le plasmide contrôle *Cypridina-luciférase* (New England Biolabs) (Rapport 3 : 1), témoin de l'efficacité de la transfection. Soixante-douze heures après la transfection, les cellules ont été traitées par 25 nM de TCDD, puis le surnageant a été récupéré 24 heures après ce traitement pour doser deux luciférases *Gaussia* et *Cypridina* selon le protocole de dosage du fournisseur (New England Biolabs). L'activité luciférase a été dosée avec le lecteur de plaques ENspire (Perkin Elmer). Les conditions CTL et TCDD correspondent aux cellules non transfectées. La luminescence a été mesurée et rapportée à *Cypridina* puis au contrôle. Les résultats sont représentés par la moyenne  $\pm$  l'écart type de 3 expériences indépendantes

La transfection du plasmide pADH4XRE a permis d'obtenir une activité luciférase 4 fois supérieure à la valeur basale du plasmide vide pGluc. Cependant, aucune différence significative d'activité luciférase après traitement par 25 nM TCDD n'a été observée, suggérant

donc que la régulation l'expression du gène ADH4 par la TCDD n'implique pas cette séquence XRE potentielle (Figure 34) ou qu'elle n'est pas suffisante. D'autres séquences des promoteurs de l'ADH4 et d'autres ADH régulées par la TCDD sont en cours d'évaluation (Tableau 13 : Listes des séquences XRE potentielles sur les gènes ADH1A, 1B, 6).

Tableau 13 : Listes des séquences XRE potentielles sur les gènes ADH1A, 1B, 6

ADH6		
	Séquence	Position du 5' par rapport à l'ATG
Séquence canonique	GAATG <b>GCGT</b> GAAAC	
XRE1	5' -AGGTGT <b>GCGT</b> GATAGC-3'	-6859
XRE2	5' -GTGCAGTAG <b>GCGT</b> GA TCT-3'	-6699
XRE3	5' -AAAAAAGAG <b>GCGT</b> G CAT-3'	-5419

ADH1A		
	Séquence	Position du 5' par rapport à l'ATG
Séquence canonique	GAATG <b>GCGT</b> GAAAC	
XRE2	5' -ATAAACAT <b>GCGT</b> G TGC-3'	-8040
XRE3	5' -ATGTATTT <b>GCGT</b> G GTT-3'	-5271
XRE4	5' -TTTGTTAA <b>GCGT</b> G CTG-3'	-3118

ADH1B		
	Séquence	Position du 5' par rapport à l'ATG
Séquence canonique	GAATG <b>GCGT</b> GAAAC CNG <b>GCGT</b> G A/G G/C C (iXRE)	
XRE1	5' -TAGA <b>GCGT</b> G GTT-3' Brin antisens	-9752
XRE2	5' -TATA <b>GCGT</b> G TGC-3' Brin antisens	-9706
XRE3	En 3' 5'	-8638
XRE4	5' -TTGG <b>GCGT</b> G CAT-3' Brin antisens	-7231
XRE5	5' -GAAG <b>GCGT</b> G TGT-3' Brin antisens	-3835

### III.2 Niveau d'expression des ADH et du CYP2E1 et pathologies

Plusieurs études décrivent l'existence ou la sévérité de pathologies en lien avec le niveau d'expression des enzymes du métabolisme de l'alcool. Il a été montré une corrélation entre la diminution des ADH et la gravité de certains cancers. L'expression de l'ADH1 est diminuée dans le cancer du sein invasif (Triano *et al.* 2003) et la diminution d'expression de l'ADH4 dans l'hépatocarcinome est associée à un mauvais pronostic (Wei *et al.* 2011).

Dans notre système, il reste à déterminer les conséquences métaboliques de la diminution de l'expression des ADH après activation du complexe AhR/ARNT. Une étude métabolomique par RMN est en cours en collaboration avec la plateforme de RMN du Centre Universitaire des Saints-Pères (Dr G Bertho) afin d'étudier les conséquences de la régulation de l'expression des ADH modulée par les ligands du AhR. Pour cela, nous avons transfecté des siARN dirigés contre les ADH (1, 4, 6) qui sont diminuées par la TCDD, et nous mesurerons les concentrations des métabolites dans le surnageant et dans le cytoplasme (fraction polaire et apolaire) des cellules HepaRG dans les différentes conditions.

Une consommation excessive d'alcool peut conduire, *via* différents mécanismes, aux maladies alcooliques du foie (stéatose, cirrhose alcoolique, hépatocarcinome). Les études épidémiologiques et celles sur les animaux laissent à penser que l'exposition à des POP peut conduire à de la stéatose et de la fibrose (non alcoolique) (Pierre *et al.* 2014, Duval *et al.* 2016). Il n'est pas encore clair si les mécanismes dans les deux cas sont similaires. Une co-exposition entre les POP liant le AhR et l'alcool, conduirait à une diminution de l'expression des ADH et l'alcool ne serait ainsi plus métabolisé. Dans ce cas, le foie, organe principal de l'oxydation de l'alcool, serait ainsi moins touché, mais le passage d'une quantité plus importante d'alcool dans le sang pourrait engendrer une augmentation de la toxicité de l'alcool par lui-même au niveau des organes périphériques. Il serait intéressant d'analyser si l'alcool non métabolisé peut se transformer, par le métabolisme non oxydatif, en ester éthylique d'acide gras (FAEE pour « Fatty Acid Ethyl Ester »). Ces molécules sont produites par les FAEE synthases lorsque l'éthanol se trouve en présence d'acides gras libres (Aleryani *et al.* 1996). Le rôle de ces molécules a été beaucoup étudié dans le cas de pancréatites, mais il a également été montré qu'elles pouvaient conduire *in vitro* à l'apoptose de leucocytes (Alhomsy *et al.* 2008) ou des cellules HepG2 (Wu *et al.* 2006). Dans la lignée cellulaire HepG2, en absence de CYP2E1, une diminution des ADH entraîne une augmentation de la concentration des FAEE après une exposition à (Wu *et al.* 2006). Ces molécules peuvent être dosées dans le sérum de consommateurs d'alcool et ont également été détectées dans le méconium des nouveaux nés exposés à l'alcool *in utero* (Wassenaar & Koch 2015). Les FAEE ont ainsi été proposées comme marqueurs potentiels de la consommation d'alcool. A l'heure actuelle, aucune étude n'a été réalisée sur les effets des polluants sur la synthèse des FAEE.

L'article de Cuiclan et ses collaborateurs, publié en 2010, montre une corrélation entre la cytokine pro-fibrotique TGF- $\beta$ 1 et la diminution de l'expression de l'ARNm des ADH dans les

hépatocytes humains et de souris. L'article de (Pierre *et al.* 2014) montre que la TCDD augmente l'expression du TGF- $\beta$ 1 dans la souris C57BL/6J. Nous avons donc choisi d'étudier le rôle du TGF- $\beta$ 1 dans notre modèle cellulaire HepaRG sur l'expression des ADH en présence de TCDD, ce qui constitue la deuxième partie des résultats.

Ces études pourraient donner des pistes pour expliquer comment l'exposition inévitable à divers xénobiotiques, qui diminuent l'expression des ADH par l'activation du AhR, interviendrait dans le développement des pathologies alcooliques et non alcooliques du foie.

## **Partie 2**

---

**Implication de la voie du TGF- $\beta$ 1 dans la diminution de l'expression des ADH en présence de TCDD**

## **Implication de la voie du TGF- $\beta$ 1 dans la diminution de l'expression des ADH en présence de TCDD**

L'article présenté dans la première partie des résultats montre que l'expression des ARNm et la quantité de protéines des ADH1, 4 et 6 sont diminuées après une exposition à la TCDD. Nous avons montré que cette régulation se fait par l'intermédiaire du complexe AHR/ARNT. Cependant, le mécanisme ne semble pas direct, puisque la plupart des effets connus modulés par le complexe AhR/ARNT conduit à l'activation de gènes cibles. Par ailleurs, les quelques XRE potentiels présents en amont des gènes des ADH se trouvent dans des régions très distales (plus de 3000 bp), voire sont parfois inexistantes (Tableau 13 : Listes des séquences XRE potentielles sur les gènes ADH1A, 1B, 6).

A l'heure actuelle, le mécanisme de régulation des ADH par les POP n'a pas été étudié. Plusieurs éléments de réponse à des facteurs de transcription ont été décrits dans les promoteurs de ces gènes : HNF (« hepatocyte nuclear factors »), TCF/LEF (« T-cell factor/lymphoid-enhancing factor »), USF (« upstream stimulatory factor »), ou C/EBP (« CCAAT/enhancer-binding protein ») (Edenberg 2000). Il a également été montré que le TGF- $\beta$ 1, par la voie de signalisation ALK5/SMAD2/3, diminuait l'expression du gène codant pour l'ADH1 dans les hépatocytes humains et de souris (Cuiclan et al., 2010). Or, plusieurs études ont montré que la TCDD induisait l'expression et la production de TGF- $\beta$ 1 mature (Pierre et al., 2014 et Zhou et al., 2014). Nous proposons donc comme hypothèse que la TCDD, *via* sa liaison au AhR, induise l'expression et la production de TGF- $\beta$ 1 mature pouvant être à l'origine de l'arrêt de la transcription des ARNm des ADH.

### I. Matériel et Méthodes

#### Modèle cellulaire et produits utilisés

Pour les cellules HepaRG, nous avons utilisé le protocole de culture décrit dans l'article de Attignon et al, 2016. Les cellules HepaRG ont été repiquées à 140 000 cellules.cm<sup>-2</sup> dans des plaques 6 ou 12 puits. Dans la majorité des expériences, les cellules ont été traitées par 25 nM ou 3 nM de TCDD pendant 24 heures.

L'inhibiteur SB431542 (Sigma-Aldrich), la TCDD (155  $\mu$ M dans du nonane, Cerilliant, #ED-901), le TGF- $\beta$ 1 (R&D), les siARN ON-TARGET plus smartPOOL (Dharmacon) utilisés proviennent des distributeurs indiqués.

### Traitement par un inhibiteur du TGF- $\beta$ R1

L'inhibiteur SB431542 des récepteurs ALK4, 5, 7 a été ajouté aux cellules HepaRG différenciées à 10  $\mu$ M, 1 heure avant l'ajout de TCDD. La dose administrée a été choisie par rapport à la littérature (Inman *et al.* 2002).

### Transfection des cellules par des siARN

Après différenciation, les cellules HepaRG ont été transfectées par des siARN dirigés contre les différents SMAD de la voie de signalisation du TGF- $\beta$  et BMP (siSMAD1, 2, 3, 4, 5, 8) et par un siLTBP1 (Dharmacon) au cours du repiquage des cellules dans des plaques douze puits pour l'analyse des ARN messagers et dans des plaques six puits pour l'analyse des protéines. Un siARN contrôle (Dharmacon) a été utilisé comme contrôle. Pour un puits de plaque 12 puits (3,8  $\text{cm}^2$ ), 12 pmoles de siARN sont dilués dans 250  $\mu$ L de milieu sans sérum (OptiMEM, Invitrogen). Cette solution est mélangée à 250  $\mu$ L de milieu OptiMEM auxquels ont été ajoutés 2  $\mu$ L de lipofectamine RNAimax (Invitrogen). Les 500  $\mu$ L de mélange sont placés au fond du puits et les cellules resuspendues dans le milieu E-Williams complet sont ajoutées à raison de 100 000 cellules par  $\text{cm}^2$ . Après 72 heures, les cellules sont traitées par 25 nM de TCDD et/ou 2,5  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  de TGF- $\beta$ 1.

### Analyse des ARN

Les ARN totaux ont été extraits avec le Kit GenElute<sup>TM</sup> Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma), puis ils ont été quantifiés par mesure de la densité optique à 260 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible, le NanoDrop ND-1000. Les ARN ont été transcrits en ADN complémentaire (ADNc) en utilisant le kit « high capacity cDNA archive » (Applied Biosystems). L'amplification des ADNc est détectée par qPCR à l'aide de SYBR Green<sup>®</sup> (Takyon), selon la technique décrite dans l'article 1 (Attignon *et al.* 2016).

Les variations d'expressions des gènes cibles ont été analysées sur le logiciel SDS puis normalisées avec le gène de référence RPL13A (Elenitoba-Johnson *et al.* 2002).

### Analyse des protéines par immunoblot

#### Extraction protéique

Après les traitements, les cellules ont été rincées au PBS et lysées à l'aide du tampon Radio Immuno Precipitation Assay (RIPA composé de PBS 1 X, 0,5 % de déoxycholate, 0,1 % de sodium dodécyl sulfate et 1 % de NP40) auquel on ajoute des inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Sigma) dilués au 1/100 le jour de l'extraction. Après un passage à -80°C, les



débris cellulaires ont été séparés par centrifugation, 10 minutes à 9000 g et à 4°C. Les protéines totales présentes dans le surnageant ont été quantifiées par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA).

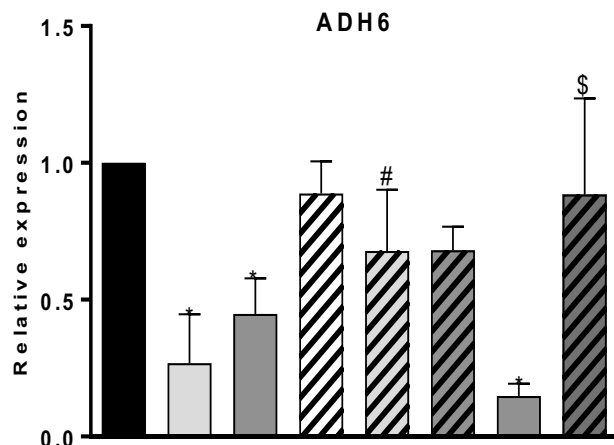
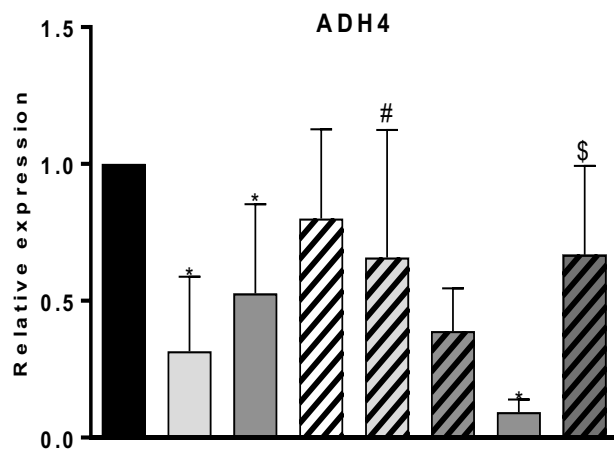
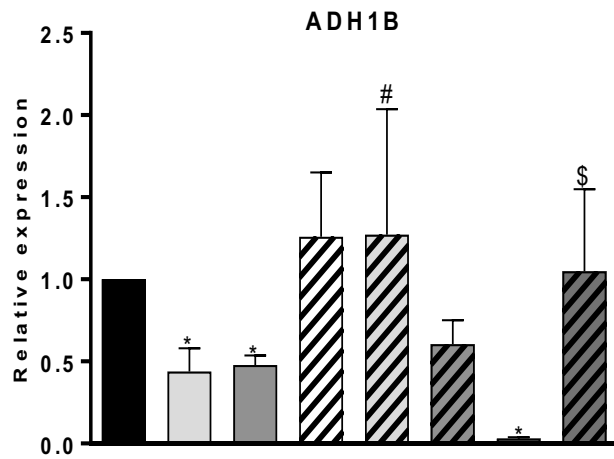
#### Détection de sprotéines par western-blot

Les protéines ont été séparées sur gel de polyacrylamide gradient 4-15 % (Biorad), puis transférées pendant 10 minutes par transfert semi-sec rapide sur une membrane de nitrocellulose, selon la technique décrite dans l'article 1 (Attignon *et al.* 2016). Les protéines d'intérêt (pan-ADH1, ADH4, TGF- $\beta$ 1 et SMAD) ont été révélées à l'aide des anticorps primaires dirigés contre la protéine d'intérêt (Tableau 14), selon le protocole décrit dans Attignon *et al.*, 2016. La membrane a été incubée pendant 1 heure à température ambiante, en présence de l'anticorps secondaire (Tableau 14). Après plusieurs lavages, les protéines d'intérêt sont révélées par chimio-luminescence (Kit ECL, GE Healthcare) et quantifiées par le logiciel Image Quant. Les résultats ont été normalisés par les niveaux de la  $\beta$ -actine ou de l' $\alpha$ -tubuline, comme cela a été décrit précédemment (Attignon *et al.* 2016).

Tableau 14 : Anticorps utilisés

Protéine d'intérêt	Référence des anticorps	Dilution	Anticorps secondaire
Pan-ADH1	Acris #AP16311PU-N	1/1000	Anti-goat
ADH4	Abgent #AP10128b	1/1000	Anti-rabbit
TGF $\beta$ 1	Cell signaling #3711	1/1000	Anti-rabbit
SMAD 4	Cell signaling #9515	1/1000	Anti-rabbit
Alpha-Tubuline	Sigma #T9026	1/5000	Anti-mouse
Actine	Abgent ab8226	1/5000	Anti-mouse





TCDD 3 nM	-	+	-	-	+	-	-	-
TCDD 25 nM	-	-	+	-	-	+	-	-
SB 431542 10 μM	-	-	-	+	+	+	-	+
TGFβ1 2.5 ng.μL <sup>-1</sup>	-	-	-	-	-	-	+	+

Figure 35 : Effet de l'inhibiteur SB431542 (spécifique du récepteur de la voie de signalisation du TGFβ1), sur la régulation des enzymes du métabolisme de l'alcool par la TCDD dans les cellules HepaRG. Les cellules différenciées ont été traitées ou non pendant 24 heures par 3 nM ou 25 nM de TCDD 1 heure après l'ajout du SB431542 10 μM. Les ARNs ont été amplifiés par Q-PCR et l'expression des gènes d'intérêt a été quantifiée après normalisation avec le gène référent RPL13A et comparée au contrôle. Les résultats sont représentés par la moyenne ± l'écart-type de 3 expériences indépendantes. Les \* au-dessus des barres correspondent à la significativité statistique par rapport au contrôle seul. \*\*\*p < 0,001, \*\*p < 0,01, \*p < 0,05. Le # correspond à la significativité statistique par rapport à 3 nM de TCDD. Le \$ correspond à la significativité statistique par rapport à 2,5 ng.μL<sup>-1</sup> de TGFβ1.

## II. Résultats

### Rôle du TGF- $\beta$ 1 dans la régulation des enzymes du métabolisme de l'alcool en présence de TCDD

Seule la régulation de l'expression de l'ADH1 par le TGF- $\beta$  a été montrée dans un modèle d'hépatocytes humains en culture primaire (Ciuclan *et al.* 2010a). L'impact de la cytokine sur les autres isoformes des ADH n'est pas connu et cette régulation n'a jamais été évaluée dans le modèle HepaRG. Nous avons traité les cellules HepaRG différenciées avec 2,5 ng. $\mu$ L<sup>-1</sup> de TGF- $\beta$ 1 pendant 24 heures, et nous observons une diminution d'environ 90 % de l'expression des ARNm de ADH1B, 4, 6 (Figure 35). Par ailleurs, le SB431542, inhibiteur de l'activité des récepteurs ALK 4, 5, 7 (Tableau 10) inhibe l'effet du TGF- $\beta$ 1 sur l'expression des ADH. L'inhibiteur est donc efficace dans notre modèle cellulaire et la régulation des ADH par le TGF- $\beta$ 1 implique le récepteur ALK 5 et probablement la voie de signalisation en aval qui active les SMAD2/3 (Figure 24).

Afin de déterminer si la diminution de l'expression des ADH après le traitement à la TCDD (3 nM et 25 nM) pendant 24 heures, observée dans notre premier article, pouvait être relayée par la voie du TGF- $\beta$ , nous avons pré-incubé les cellules HepaRG avec l'inhibiteur SB431542 avant le traitement à la TCDD. Le SB431542 à 10  $\mu$ M abolit l'effet de 3 nM de TCDD sur l'expression des ADH, mais cette concentration n'est pas suffisante pour abolir les effets de 25 nM de TCDD (Figure 35).

Ces effets sont également visibles au niveau protéique. On observe une diminution de 70 % de la quantité de protéine ADH1 en présence de 3 nM de TCDD par rapport au contrôle. Cette régulation est abolie en présence de l'inhibiteur SB431542 de la voie de signalisation du TGF- $\beta$ 1 (Figure 36).

Pour confirmer l'implication de la voie de signalisation du TGF- $\beta$ 1 dans la régulation de l'expression des ADH en présence de TCDD, nous avons étudié la voie de signalisation en aval du récepteur qui phosphoryle et active les SMAD2/3. Nous avons utilisé des siARN dirigés contre SMAD2, SMAD3 et SMAD4. Au cours de chaque expérience décrite, l'analyse de l'expression de l'ARNm CYP1A1 permet de contrôler les effets de la TCDD (Figure 37, Figure 38, Figure 43). Nous avons tout d'abord vérifié l'efficacité de l'interférence pour toutes les SMAD invalidées.

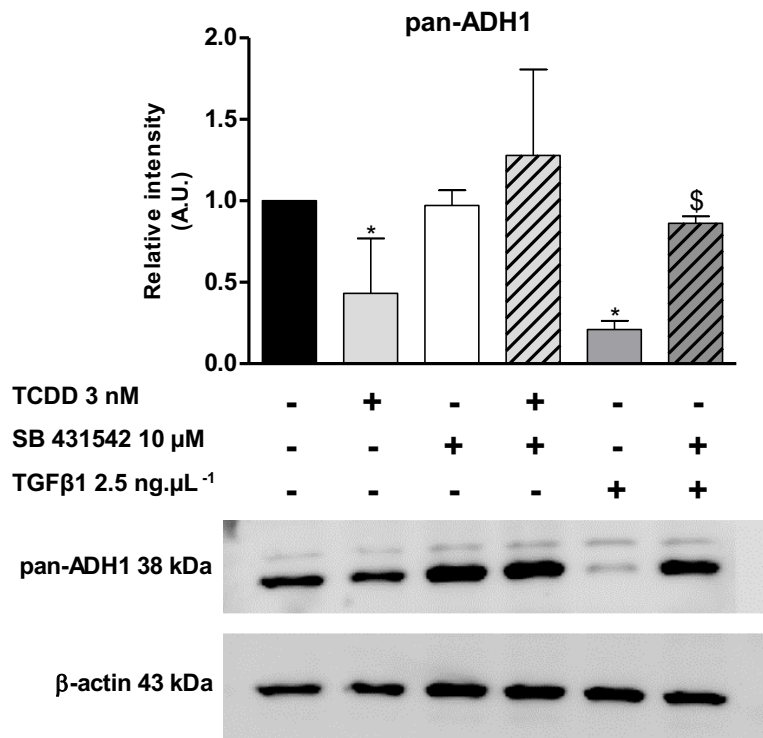


Figure 36: Effet de l'inhibiteur SB431542 (spécifique du récepteur de la voie de signalisation du TGF- $\beta$ 1), sur l'expression des protéines ADH1 modulée par la TCDD dans les cellules HepaRG. Les cellules différenciées ont été traitées ou non pendant 72 heures par 3 nM de TCDD 1 heure après l'ajout du SB431542 10  $\mu$ M. Après extraction des cellules par le tampon RIPA, un immunoblot a été réalisé avec un anticorps dirigé contre les 3 isoformes d'ADH1. La quantification de l'ADH1 est normalisée par rapport à la  $\beta$ -actine et rapportée au contrôle. Les résultats sont représentés par la moyenne  $\pm$  l'écart-type de 3 expériences indépendantes.

Soixante-douze heures après la transfection et après 24 heures de traitement ou non par 3 nM de TCDD, les taux des ARNm de SMAD2 et de SMAD3 sont diminués de manière significative de 70 % et 50% respectivement par les siSMAD2 et siSMAD3 (Figure 37). Les siRNA dirigés contre SMAD4 permettent de diminuer de 70 % la quantité de l'ARNm (Figure 38).

La TCDD inhibe l'expression des ARNm des ADH 1B et 4 en présence ou non des siARN SMAD2 et SMAD3 seuls ou en mélange (Figure 37). Les deux isoformes étant impliquées dans la même voie, leur fonction pourrait être redondante. Nous avons donc également invalidé simultanément les deux isoformes. Dans cette condition l'expression des ADH n'est pas non plus restaurée. Bien que l'interprétation des résultats soit rendue difficile par l'augmentation de l'expression de l'ARNm ADH1B par le siSMAD2 et par une assez grande variabilité des mesures, il semble que la présence des SMAD2 et 3 ne soit pas nécessaire à la diminution de l'expression des ADH 1, 4 par la TCDD.

La diminution des ARNm des SMAD2 et surtout de SMAD3 n'est cependant pas totale et il faut remarquer que l'invalidation n'empêche pas l'effet du TGF- $\beta$ 1 sur l'expression des ADH. Il se pourrait que la quantité de protéine restante suffise à leur activité. Nous avons inhibé la protéine SMAD4, qui est leur partenaire commun, par un siARN spécifique. Le traitement des cellules différenciées HepaRG avec 3 nM de TCDD, diminue comme attendu l'expression des ARNm ADH1B et ADH4. En présence de siARN dirigés contre SMAD4, l'expression de l'ADH4 est toujours diminuée par le traitement à la TCDD alors que celle de l'ADH1B n'est plus inhibée au niveau de l'ARNm (Figure 38). Les résultats préliminaires en western blot ne permettent pas de conclure (Figure 39). Ces premiers résultats semblent donc indiquer que la TCDD pourrait réguler l'expression des ADH, *via* l'activation de la voie du TGF- $\beta$  impliquant ALK5, la co-SMAD SMAD4.

Nous avons également étudié le mécanisme en amont des récepteurs ALK4, 5, 7, c'est-à-dire le mécanisme de production du TGF- $\beta$ 1 après exposition à la dioxine, impliquant son expression, sa maturation, sa sécrétion et son activation. Une cinétique de traitements de 30 minutes à 30 heures, montre que la TCDD 3 nM ne modifie pas l'expression des ARNm du TGF- $\beta$ 1 (Figure 40). Il faut noter que l'expression des ARNm des différents TGF- $\beta$  n'était pas modifiée dans les puces Affymetrix réalisées par le laboratoire (cellules HepaRG traitées ou non par la TCDD 25 nM, 30 heures)

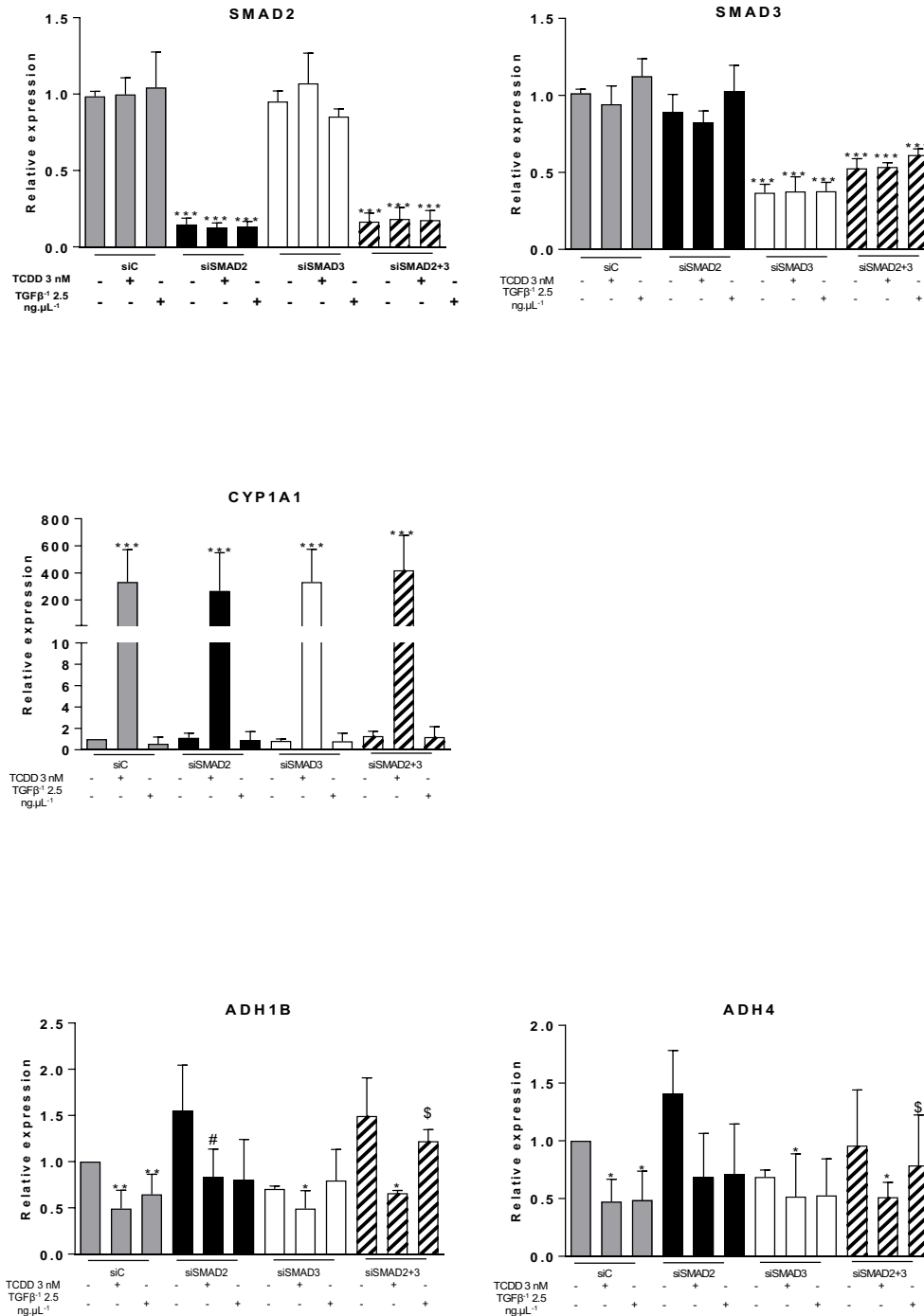


Figure 37 : Rôle des protéines SMAD2/3 dans la régulation de l'expression des enzymes du métabolisme de l'alcool en présence de TCDD.

Les cellules HepaRG différenciées ont été transfectées par des siARN contrôle ou dirigés contre SMAD2 et/ou 3. Trois jours après, les cellules ont été traitées ou non pendant 24 heures par 3 nM de TCDD ou du TGF-β1 2,5 ng.μL<sup>-1</sup>. Les ARNs ont été amplifiés par Q-PCR et l'expression des gènes d'intérêt a été quantifiée après normalisation avec le gène référent RPL13A et comparée au siC. Les résultats sont représentés par la moyenne ± l'écart-type de 5 expériences indépendantes. \*\*\*p < 0,001, \*\*p < 0,01, \*p < 0,05. Le # correspond à la significativité statistique par rapport à 3 nM de TCDD. Le § correspond à la significativité statistique par rapport à 2,5 ng.μL<sup>-1</sup> de TGF-β1.

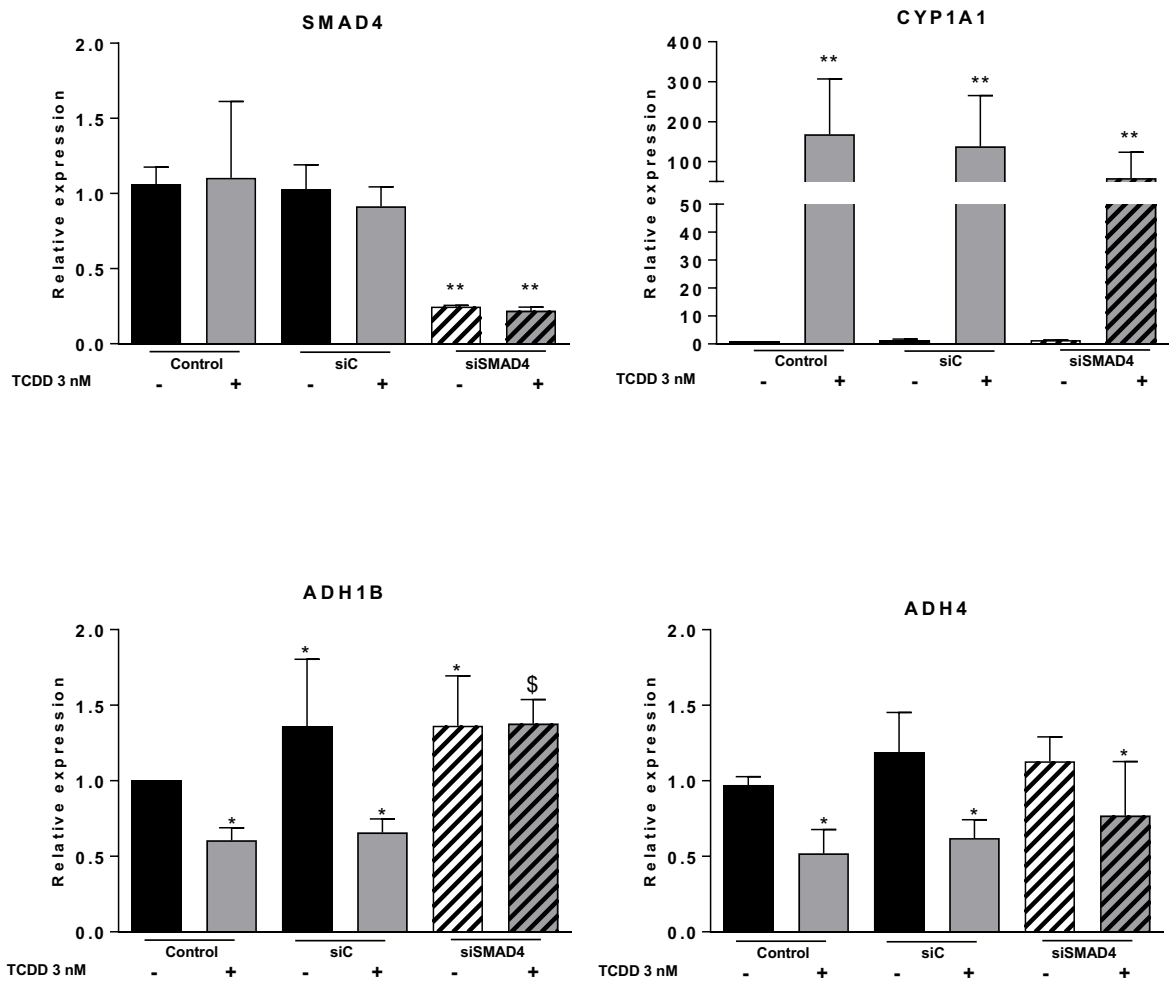


Figure 38 : Effet de la protéine SMAD4 sur l'expression des enzymes du métabolisme de l'alcool modulée par la TCDD. Les cellules HepaRG différenciées ont été transfectées par des siARN contrôle ou dirigés contre SMAD4. Trois jours après, elles ont été traitées ou non pendant 24 heures par 3 nM de TCDD. Les ARNs ont été amplifiés par Q-PCR et l'expression des gènes d'intérêt a été quantifiée après normalisation avec le gène référent RPL13A et comparée au contrôle. Les résultats sont représentés par la moyenne  $\pm$  l'écart-type de 5 expériences indépendantes. \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  par rapport au contrôle. Le \$,  $p < 0,05$ , correspond à la significativité statistique par rapport à 3 nM de TCDD.



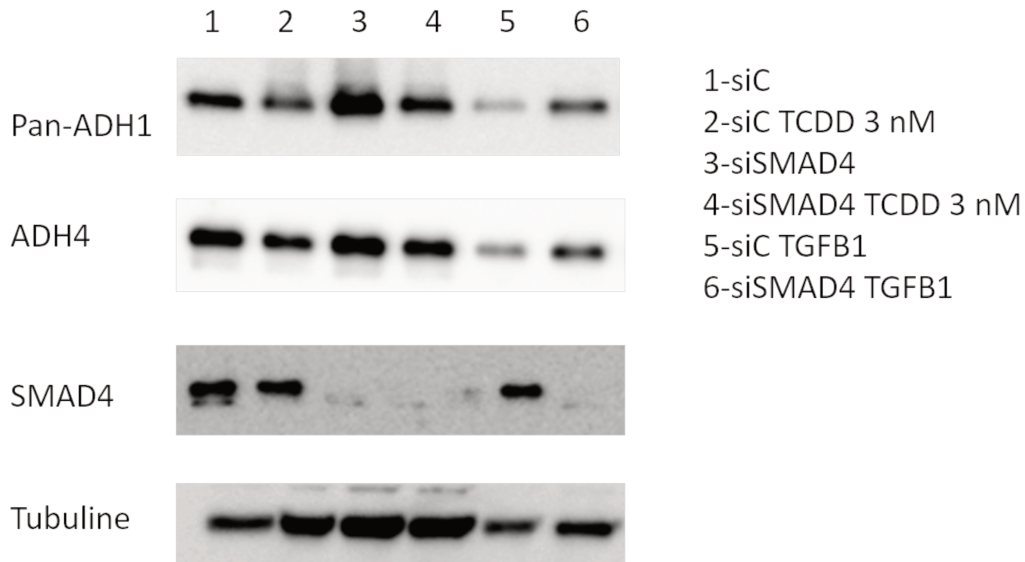


Figure 39 : Effet de la protéine SMAD4 sur l'expression des protéines ADH1 et ADH4 modulée par la TCDD dans les cellules HepaRG.

Les cellules différenciées ont été transfectées par des siARN dirigés contre SMAD4. Trois jours après, elles ont été traitées ou non pendant 72 heures par 3 nM de TCDD ou 2,5 ng.μL<sup>-1</sup> de TGF-β1. Après extraction des cellules par le tampon RIPA, un immunoblot a été réalisé avec les différents anticorps.

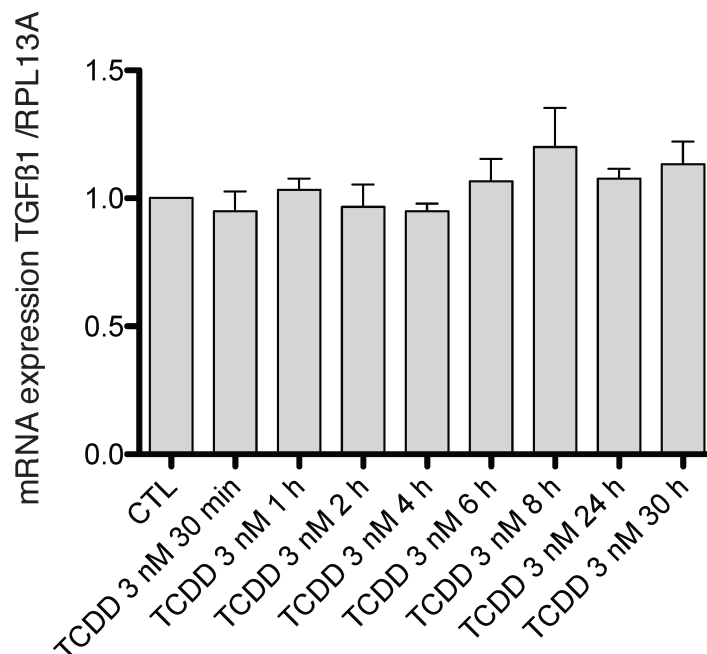


Figure 40 : Cinétique de l'expression de l'ARNm TGF-β1 lors d'un traitement par la TCDD 3 nM.

Les cellules différenciées ont été traitées ou non pendant 30 minutes à 30 heures par 3 nM de TCDD. Les ARNs ont été amplifiés par Q-PCR et l'expression des gènes d'intérêt a été quantifiée après normalisation avec le gène référent RPL13A et comparée au contrôle. Les résultats sont représentés par la moyenne ± l'écart-type de 3 expériences indépendantes.

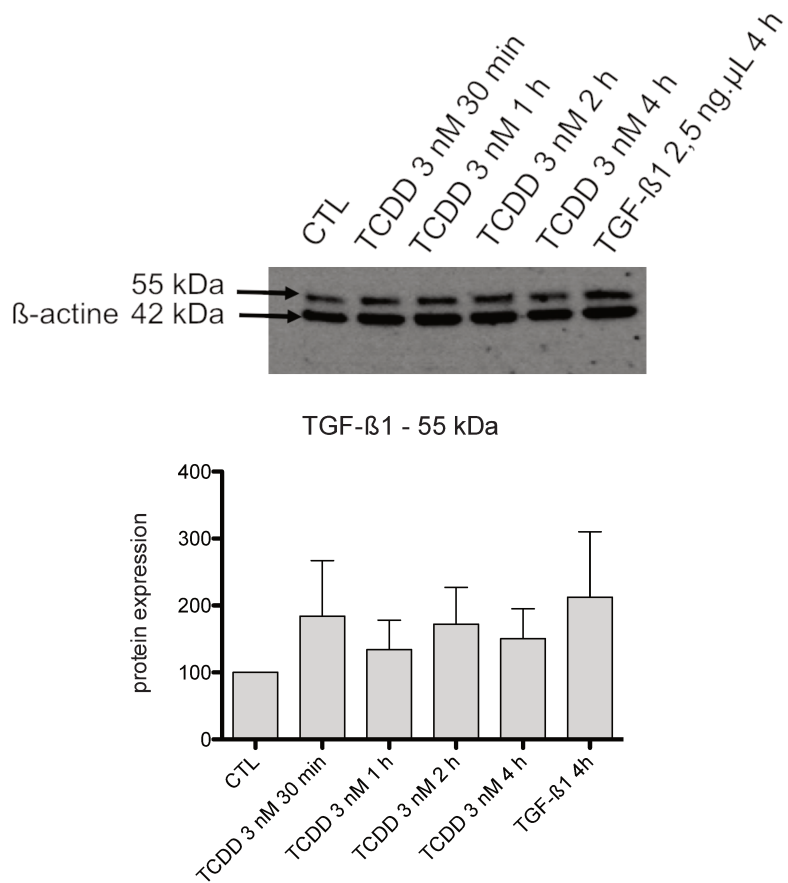


Figure 41 : Quantification de la protéine TGF-β1 après un traitement des cellules différenciées HepaRG par 3 nM de TCDD. Les cellules ont reçu les traitements indiqués. Après extraction par le tampon RIPA, l'immunoblot a été réalisé avec les différents anticorps (n=2).

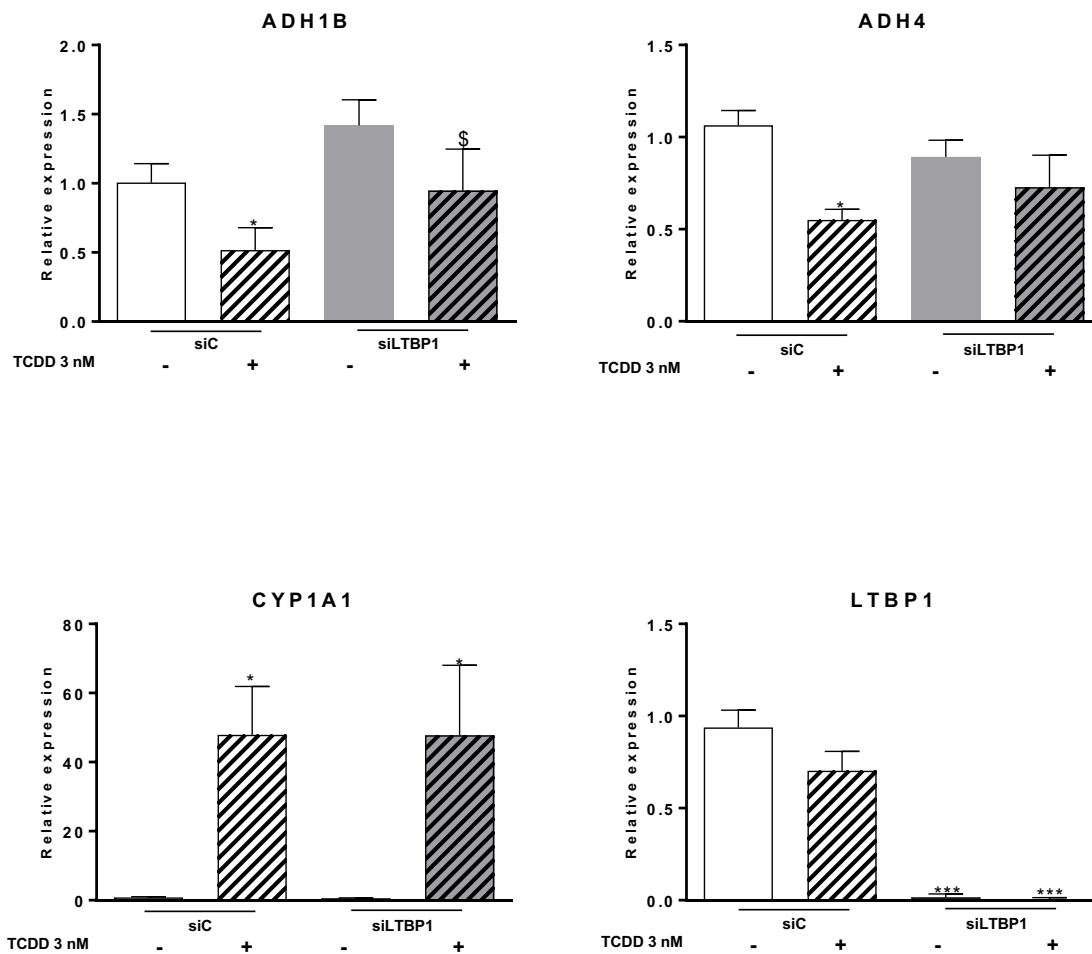


Figure 42 : Rôle de la protéine LTBP1 sur l'expression des enzymes du métabolisme de l'alcool modulée par la TCDD. Les cellules HepaRG différenciées ont été transfectées par des siARN contrôle (siC) ou dirigés contre LTBP1. Trois jours après, elles ont été traitées ou non pendant 24 heures par 3 nM de TCDD. Les ARNs ont été amplifiés par Q-PCR et l'expression des gènes d'intérêt a été quantifiée après normalisation avec le gène référent RPL13A et comparée au siC. Les résultats sont représentés par la moyenne  $\pm$  l'écart type de 5 expériences indépendantes. \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  par rapport au siC. §  $p < 0,05$  par rapport au siC+ TCDD 3 nM.

Nous avons alors analysé la quantité de la protéine TGF- $\beta$ 1 dans le cytoplasme des cellules HepaRG après un traitement à la TCDD. Les résultats préliminaires indiquent que le taux de protéine TGF- $\beta$ 1 semble augmenter avec la TCDD. Nous observons une augmentation générale, bien que non statistiquement significative, de la quantité de TGF- $\beta$ 1 (bande à 55 kDa) (Figure 22) et (Figure 41). Ces expériences préliminaires, demandent à être répétées. Nous avons ensuite tenté de doser le TGF- $\beta$ 1 présent dans le surnageant des cellules par la technique de cytométrie en flux, avec le kit de dosage BD Biosciences, mais les résultats ne sont pas reproductibles actuellement, probablement à cause de la faible quantité du TGF- $\beta$ 1 présent dans le surnageant des cellules.

Il a été montré, dans la littérature, que la protéine LTBP1 permet la libération du TGF- $\beta$ 1 dans le milieu extracellulaire, facilitant ainsi son activation (Zhou *et al.* 2014). L'expression en ARNm du LTBP1 n'est pas modulée par la TCDD de 2 heures à 24 heures de traitement (résultats non montrés). La présence de siARN dirigés contre LTBP1 inhibe totalement l'expression de l'ARNm LTBP1 (Figure 42). Cette invalidation empêche l'inhibition de l'ADH1B par la TCDD (Figure 42) mais n'a qu'un faible effet sur la régulation de l'expression de l'ADH4 (Figure 42). L'effet du siLTBP1 seul qui augmente l'expression de l'ADH1B de 30 % et diminue celle de l'ADH4 de 20 % rend néanmoins difficile l'interprétation des résultats. Elle surestime l'effet du siARN dans le cas de l'ADH1B et le sous-estime dans le cas de l'ADH4.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'activation du AhR par la TCDD permet la libération et l'activation de la cytokine TGF- $\beta$ 1 prise en charge par la protéine LTBP1. La protéine LTBP1 fait le lien entre le traitement à la TCDD et la diminution de l'expression de l'ADH1B. Le mécanisme de la régulation de l'ADH4 par la TCDD reste encore incertain.

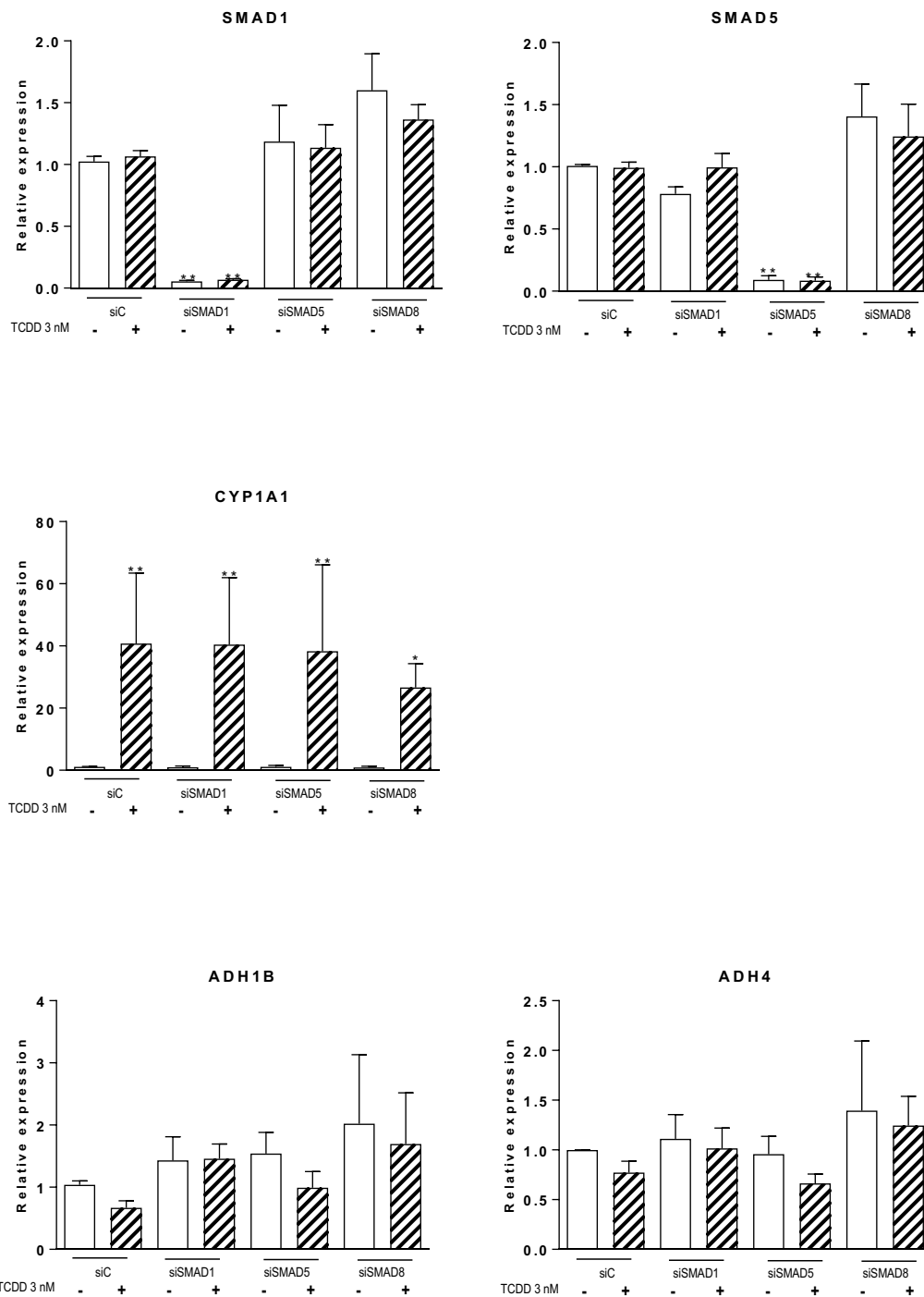


Figure 43 : Rôle des des protéines SMAD1/5/8 dans la régulation de l'expression des enzymes du métabolisme de l'alcool en présence de TCDD.

Les cellules HepaRG différenciées ont été transfectées par des siARN dirigés contre SMAD1/5/8. Trois jours après, les cellules ont été traitées ou non pendant 24 heures par 3 nM de TCDD ou du TGF- $\beta$ 1 2,5 ng. $\mu$ L<sup>-1</sup>. Les ARNs ont été amplifiés par Q-PCR et l'expression des gènes d'intérêt a été quantifiée après normalisation avec le gène référent RPL13A et comparée au siC. Les résultats sont représentés par la moyenne  $\pm$  l'écart-type de 5 expériences indépendantes. \*\*p < 0,01, \*p < 0,05.

### III. Discussion

Notre première étude a montré que la TCDD, ainsi que d'autres ligands du AHR *via* la voie de signalisation AHR/ARNT, induit une diminution de l'expression des ARNm des ADH1, 4 et 6 dans les hépatocytes dès 6 heures de traitement. Il s'agit donc d'un mécanisme cellulaire rapide qui laisse supposer un arrêt de la transcription des gènes. Dans cette deuxième étude, nous avons analysé si cette régulation mettait en jeu la voie du TGF- $\beta$ 1. L'ensemble de nos résultats semble montrer que la voie du TGF- $\beta$ 1 serait une voie de signalisation impliquée, au moins partiellement, dans la régulation de certaines ADH (ADH1B) par la TCDD. Cependant, ces résultats doivent être confirmés.

Le traitement des cellules HepaRG différenciées par la TCDD augmente très rapidement (30 minutes) la quantité de protéine TGF- $\beta$ 1 intracellulaire, sans doute au stade pro-TGF- $\beta$ 1 (55 kDa) de la maturation, sans modifier la quantité des ARNm. Il pourrait donc s'agir d'une augmentation de la traduction des ARNm déjà présents dans la cellule permettant une réponse cellulaire rapide, cohérente avec la régulation des ADH dès 6 heures de traitement par certains ligands du AhR. Le lien entre la TCDD et le TGF- $\beta$ 1 n'a pas été encore clairement démontré dans notre modèle. De nombreux travaux ont montré des interrelations entre les deux voies de signalisation AhR et TGF- $\beta$ 1. En fonction du type cellulaire, l'activation de AhR peut moduler positivement ou négativement l'expression du TGF- $\beta$ . Cette régulation est même parfois transitoire. Il a été montré qu'elle pouvait être transcriptionnelle ou être liée à une augmentation de l'expression de la protéine LTBP1 qui favorise la maturation et la sécrétion de la cytokine. Une étude récente, dans des fibroblastes humains des voies respiratoires, montre une augmentation transitoire de l'expression de LTBP1 par 1 nM de TCDD, visible dès 2 heures de traitement et absente à 48 heures. Elle s'accompagne d'une augmentation du TGF- $\beta$ 1 (Zhou *et al.* 2014). Dans nos expériences, un traitement des cellules HepaRG par la TCDD n'augmente pas le niveau de l'ARNm LTBP1. Il reste encore à vérifier si la TCDD régule le taux de protéine LTBP1. Néanmoins, nous avons observé que l'inactivation transitoire de la protéine LTBP1 par des siARN spécifiques empêche la régulation de l'expression des ARNm ADH1B (Figure 38) et peut être l'ADH4 par la TCDD. Ce résultat montre que cette protéine est nécessaire au mécanisme qui permet à la TCDD de réguler certaines ADH.

Un traitement des cellules HepaRG par du TGF- $\beta$ 1 diminue l'expression des ADH et le SB431542, inhibiteur de l'activité kinase des récepteurs ALK4, 5, 7, annule cet effet. Le seul récepteur commun entre le ligand TGF- $\beta$ 1 et les cibles de l'inhibiteur est l'ALK5 (Tableau 10), qui est donc un bon candidat pour être un intermédiaire entre l'induction de la voie du TGF- $\beta$ 1 par la TCDD et l'expression des ADH. En aval de ce récepteur la signalisation conduit à la phosphorylation des protéines SMAD2 et/ou SMAD3 (Figure 24). L'implication de ces protéines dans la diminution de l'expression des ADH n'a pas pu être démontrée dans le modèle cellulaire HepaRG. L'utilisation de siARN n'a empêché que partiellement les effets de la TCDD. La quantité des protéines SMAD2/3 n'ayant pas été vérifiée à la fin du traitement, il se pourrait qu'une quantité de SMAD2/3 suffisante soit encore présente après l'invalidation de l'ARNm. Elles continueraient alors à jouer leur rôle dans la régulation de l'expression des ADH en présence de TCDD. En revanche, l'invalidation de la protéine commune SMAD4 par un siARN spécifique abolit l'action de la TCDD sur l'expression de l'ADH1B. Pour tirer des conclusions plus définitives, il faudrait à l'avenir s'assurer d'une invalidation plus forte, voire totale des différentes protéines SMAD. Le rétablissement partiel de l'expression des ADH après l'invalidation des SMAD2/3 et le fait que l'inhibiteur SB431542, utilisé à une dose de 10  $\mu$ M, annule l'effet d'une concentration en TCDD de 3 nM mais pas de 25 nM laisse supposer que la TCDD puisse saturer le système et que la présence d'inhibiteur ou de siARN ne suffise pas à retrouver le niveau de base. Il se pourrait également que la voie du TGF- $\beta$ 1 ne soit pas la seule impliquée dans la diminution de l'expression des enzymes du métabolisme de l'alcool en présence de TCDD. Un article montre que des BMP appartenant également à la superfamille du TGF- $\beta$  sont augmentées par la TCDD (Wang et al., 2016). La protéine SMAD4 joue également un rôle dans la voie de signalisation des BMP. Ces cytokines induisent d'autres isoformes SMAD (SMAD1, 5, 8) qui peuvent conduire à une régulation des gènes similaire à celle des SMAD2/3 que nous avons testés (Figure 43) (Moustakas *et al.* 2001). Des expériences supplémentaires seront utiles pour vérifier dans notre modèle, d'une part si la TCDD augmente les BMP et d'autre part si d'autres cytokines de la superfamille du TGF $\beta$  diminuent l'expression des ADH. Des résultats préliminaires indiquent que BMP2 et BMP4 diminuent l'expression des ARNm ADH1B, 4, 6, qui sont, parmi les ADH, celles régulées par les polluants ligands du AhR que nous avons testés (TCDD, PCB126, 3MC). La protéine LTBP1 peut également jouer un rôle dans la libération d'autres cytokines de la superfamille du TGF- $\beta$ 1. Il serait intéressant de vérifier, dans notre modèle, si la protéine LTBP1 prend en charge d'autres

cytokines telles que les BMP, et si leur libération est régulée par l'activation du AhR. L'ensemble de ces résultats et la littérature suggèrent donc que la voie de signalisation du TGF- $\beta$ 1 au sens strict ne serait pas la seule impliquée dans la diminution des ADH.

En fin de voie, restera l'identification des co-répresseurs qui se lient aux complexes SMADs pour inhiber l'expression des ADH (par exemple SnoN, c-Ski, c-Myc, ATF3, TGIF ...). En parallèle, l'analyse de la séquence et des activités des promoteurs des gènes des ADH permettrait d'identifier une séquence cible de la voie du TGF- $\beta$  permettant l'inhibition de l'expression des ADH. Les complexes composés des SMAD lient des séquences consensus différentes (avec une partie commune correspondant à SMAD4) donnant une piste sur la voie de signalisation en amont.

Nous n'avons pas détecté de production accrue de TGF- $\beta$  par les cellules HepaRG après un traitement à la TCDD. L'explication première serait un défaut de détection de la technique ou une très faible sécrétion par les cellules. Cependant, il a été proposé, dans des hépatocytes, un mécanisme original d'une signalisation intracrine du TGF- $\beta$  qui ne nécessite pas la sécrétion de la cytokine (Gressner et al., 2008). Il met en jeu l'activation intracellulaire du TGF- $\beta$  par des calpaïnes qui démasquent le SLC (LTBP/TGF $\beta$ ) conduisant à une activation interne du récepteur ALK5. Celui-ci phosphoryle SMAD2 qui forme alors un complexe avec SMAD4. Les calpaïnes sont des protéases dépendantes du Ca<sup>2+</sup> et cruciales dans les processus de remodelage tissulaire et de la fibrose.

Dans des fibroblastes de souris AhR<sup>-/-</sup>, le taux d'activation du TGF- $\beta$ 1 et de SMAD4 est augmenté par rapport aux fibroblastes de souris AhR sauvage (Chang *et al.* 2007). Dans ce modèle, l'inhibition de la réponse au TGF- $\beta$  par la surexpression de SMAD7 reverse le phénotype prolifératif des cellules AhR<sup>-/-</sup>. Une autre équipe a montré que ces souris KO développaient différentes altérations hépatiques comme la fibrose en lien avec l'augmentation de LTBP et du TGF- $\beta$  (Santiago-Josefat *et al.* 2004). Ces résultats sont comparables à l'exposition à la TCDD dans notre modèle. Le mécanisme mis en jeu serait alors une déviation du rôle endogène du AhR après fixation d'un ligand exogène, qui pourrait être à l'origine de pathologies hépatiques.



Mis à part les effets des polluants, nous montrons, pour la première fois, que le TGF- $\beta$ 1 diminue totalement l'expression des ADH (ADH1B, 4 et 6) dans le modèle hépatique humain HepaRG. Dans ce modèle, cette régulation passe par la voie de signalisation impliquant la protéine SMAD4. En présence de l'inhibiteur SB431542 qui empêche la phosphorylation du récepteur ALK4, 5, 7, l'expression des ARNm de ces ADH et la quantité protéique de l'ADH1, ne sont plus diminuées. Les régulations de l'expression des ADH divergent cependant en fonction des isoformes mesurées. Nous avons clairement établi le rôle du TGF- $\beta$ 1 dans la régulation de l'ADH1B. En revanche, dans notre modèle, cette cytokine semble moins affecter les isoformes ADH4. Il serait intéressant de vérifier si ces deux isoformes ne sont pas régulées par d'autres cytokines de la superfamille des TGF- $\beta$  (Activine, BMP, Myostatine, Nodal). Une étude très récente a montré que l'expression des ARNm de ADH1 et ALDH1 est diminuée dans un modèle murin entraînant des maladies alcooliques du foie, alors que l'expression du TGF- $\beta$ 1 est augmentée (Kumar *et al.* 2016). L'augmentation de la quantité de TGF- $\beta$  liée à la consommation d'alcool est largement décrite et impliquée dans l'apparition de la fibrose alcoolique. Il serait intéressant d'analyser si la diminution de l'expression des ADH que nous décrivons est corrélée au développement et à la gravité de ces pathologies.

En conclusion, nous avons montré dans la première partie que l'expression des ADH était régulée par l'activation du AhR en présence de ligands agonistes (TCDD, PCB126, 3MC) (Figure 44). Cette diminution nécessite la présence de l'ARNT. La deuxième partie consistait à identifier le rôle du TGF- $\beta$ 1 dans la régulation du taux d'ADH en présence de TCDD. L'inhibiteur des récepteurs ALK4, 5, 7 de la voie de signalisation du TGF- $\beta$ 1 empêche la diminution de l'expression des ARNm ADH1B, 4, 6 induite par la TCDD. Ce résultat confirme l'implication du TGF- $\beta$ 1 dans la régulation du taux des ADH par la TCDD. L'implication de la protéine LTBP1 et de la protéine SMAD4 est confirmée dans cette régulation dans notre modèle HepaRG.

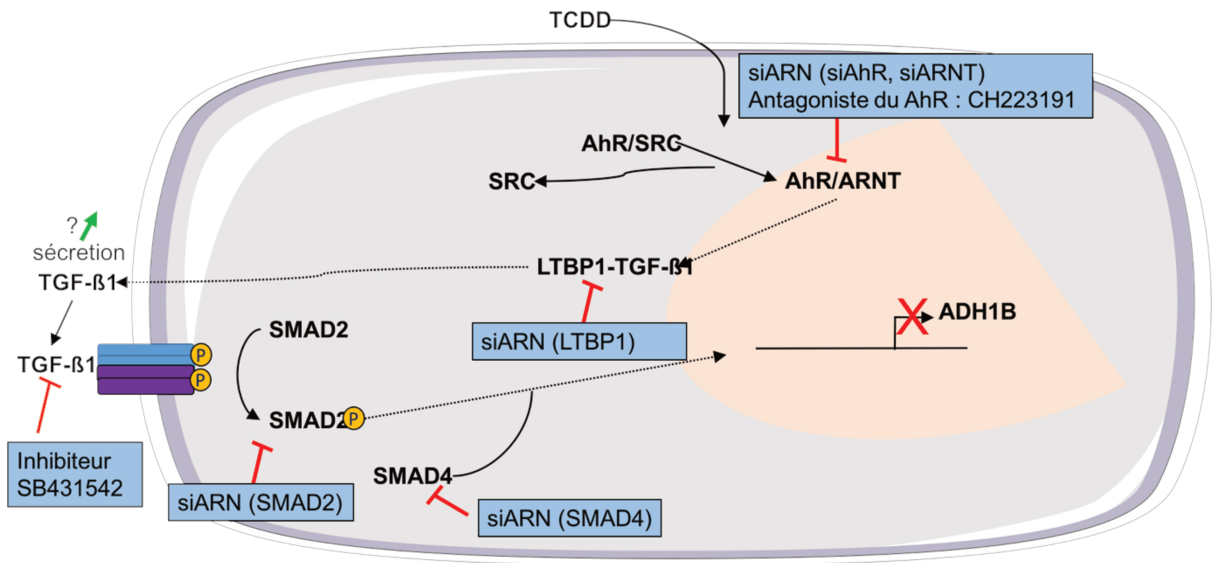


Figure 44 : Schéma récapitulatif de l'implication de la voie du TGF-β en présence de TCDD

Le complexe AhR/ARNT est nécessaire pour la diminution des ADH1B en présence de TCDD. La protéine LTBP1 participe à la diminution de l'expression de l'ADH1B en présence de TCDD. L'activation du récepteur du TGF-β1 et la phosphorylation de SMAD2 sont impliquées dans la diminution de l'ADH1B.



## **Partie 3**

---

**Etude mécanistique des effets d'un mélange de POP sur le métabolisme du glucose dans la lignée hépatique humaine HepaRG**

## I. Introduction

### I.1 La problématique des mélanges de polluants

Les contaminants environnementaux affectent de nombreux mécanismes biologiques dans différentes espèces. L'effet toxique des molécules chimiques est souvent analysé individuellement afin de déterminer la dose ne montrant pas d'effets nocifs (« NO Adverse Effect Level » NOAEL) et de comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu. Cependant, l'exposition à une substance unique n'étant pas représentative de la réalité, il est plus pertinent d'étudier les effets de mélanges de substances. Selon la nature du mélange de polluants, le(s) mécanisme(s) de toxicité peut(vent) varier. Deux molécules peuvent agir selon un mécanisme d'action similaire, la prédiction des effets est alors souvent simple, il suffit d'additionner les doses. Mais deux molécules peuvent interagir ensemble pour devenir plus toxiques, c'est un effet synergique, ou alors, elles peuvent être moins toxiques, on parle d'effet antagoniste. Les différentes combinaisons possibles de substances chimiques sont multiples dues aux différentes voies de signalisation activées, à la dose et à la fenêtre d'exposition, et les toxiques peuvent provenir de sources diverses (aliments, médicaments, cosmétiques, polluants volatils) par voie digestive, aérienne ou cutanée. L'EFSA (autorité européenne de sécurité des aliments) s'est fixé la priorité de la mise en place d'une méthodologie pour évaluer une exposition à de multiples substances chimiques simultanément (EFSA 2013). La compréhension du mécanisme de toxicité des polluants est donc primordiale pour estimer l'exposition réelle de l'Homme et des écosystèmes. De nouveaux outils sont également utilisés pour prédire la toxicité des mélanges (modèles mathématiques et biologiques pour prévoir les mécanismes de toxicité et d'élimination des substances dans l'organisme).

Dans un article précédent (Ambolet-Camoit *et al.* 2015), une étude transcriptomique a analysé les effets de deux polluants connus pour utiliser des voies de signalisation différentes, la TCDD et l' $\alpha$ -endosulfan, le principal isomère d'un pesticide organochloré. La TCDD peut être produite non intentionnellement lors d'une synthèse mal contrôlée de molécules organochlorées. Ainsi, elle peut être un sous-produit de la synthèse de

l'endosulfan. Il est donc possible que ces deux polluants persistants se retrouvent en mélange dans l'environnement. Ils ont été choisis comme molécules modèles car leurs mécanismes d'action sont différents. Nous avons donc poursuivi l'étude transcriptomique initiée en analysant plus en détail les effets de ce mélange sur le métabolisme glucidique dans le modèle d'hépatocytes différenciés HepaRG. Il s'agit en effet d'un des métabolismes inhibés par le mélange, mis en évidence par le logiciel Ingenuity® qui regroupe par grandes fonctions les gènes dont l'expression est modifiée. Les cellules HepaRG ont été traitées par les polluants seuls (25 nM de TCDD ou 10 µM d'α-endosulfan) ou le mélange de ces deux polluants pendant 30 heures. L'analyse de ces traitements a montré que le mélange des POP inhibait de 80 à 90 % l'expression de deux gènes importants pour le métabolisme des glucides (le transporteur SLC2A2 ou GLUT2 et la dernière enzyme de la gluconéogenèse, la glucose 6 phosphatase ou G6PC) alors que les polluants seuls ne les diminuaient que de 50 % environ.

## I.2 Métabolisme glucidique

Dans le foie, le métabolisme glucidique permet de réguler la glycémie de l'organisme. Le taux normal de glycémie chez l'Homme est entre 0,8 et 1,2 g.L<sup>-1</sup> (soit 4,5 à 6,5 mmol.L<sup>-1</sup>). En cas d'hyperglycémie (après un repas par exemple), le glucose est transformé en énergie sous forme d'ATP par le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire, ou stocké sous forme de glycogène (glycogénogenèse) et de lipides (lipogenèse). A l'inverse, en cas d'hypoglycémie, le glucose est synthétisé à partir du stock de glycogène grâce à la glycogénolyse. En cas d'hypoglycémie prolongée, il est synthétisé par la voie de la néoglucogenèse à partir de substrats non glucidiques comme le lactate, le pyruvate, le glycérol et quelques acides aminés glucogéniques. La régulation hormonale de la glycémie est assurée principalement par les sécrétions endocrines du pancréas qui libère dans le sang l'insuline et le glucagon. En période postprandiale, l'insuline qui est une hormone hypoglycémisante, domine, permettant ainsi la glycolyse et la glycogénogenèse. En revanche à jeun, le glucagon, hormone hyperglycémisante, permet la gluconéogenèse et la glycogénolyse hépatique. D'autres hormones telles que le GH<sup>22</sup> et l'ACTH<sup>23</sup>, les glucocorticoïdes, l'adrénaline et les hormones thyroïdiennes peuvent aussi jouer un rôle dans la régulation de la glycémie.

---

<sup>22</sup> GH : Growth Hormone (Hormone de croissance)

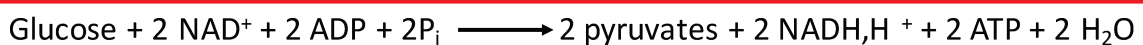
<sup>23</sup> ACTH : Adrenocorticotropic Hormone (Hormone corticotrope)

### I.2.1 Glycolyse

Les réactions de glycolyse consistent à dégrader le glucose composé de 6 carbones en deux molécules de pyruvate, composé chacun de 3 carbones et de produire de l'énergie sous forme d'ATP (Figure 45). La première phase de la glycolyse appelée phase de préparation, consomme de l'énergie et produit deux trioses phosphates. La deuxième phase, la phase de restitution, permet la production d'énergie sous forme d'ATP.

Le glucose sanguin provenant de l'alimentation pénètre dans les hépatocytes *via* le transporteur passif bidirectionnel GLUT2 (Glucose Transporteur 2 ou SLC2A2). Dans le cytoplasme, le glucose est immédiatement phosphorylé par la glucokinase sur son carbone 6 pour donner le glucose-6-phosphate (G6P). Cette réaction consomme une molécule d'ATP et empêche le glucose de sortir de la cellule en lui conférant une charge négative à pH7. La majorité des étapes suivantes sont des réactions réversibles sauf celles catalysées par la PKF1 (Phosphofructokinase 1) et la PK (Pyruvate kinase, PKLR dans le cas du foie). Ces deux dernières sont donc des étapes clefs qui seront finement régulées.

Le bilan de la glycolyse est :



Selon les conditions physiologiques de la cellule, le pyruvate peut emprunter différentes voies métaboliques. En absence d'oxygène, dans les levures et les bactéries, le pyruvate sera réduit en éthanol par la fermentation alcoolique. Lors de cette réaction, le pyruvate est d'abord transformé en acétaldéhyde par la pyruvate décarboxylase. L'acétaldéhyde est ensuite pris en charge par les ADH pour donner de l'éthanol comme décrit dans l'introduction (Figure 19).

Chez l'Homme et les animaux de manière générale, en absence d'oxygène, le pyruvate emprunte la voie de la fermentation lactique. Il est transformé en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH), réaction couplée à la ré-oxydation du NADH,H<sup>+</sup> ce qui permet à la glycolyse de continuer à fonctionner. Cette réaction a lieu dans les organes extra-hépatiques, en particulier dans les muscles pour permettre une production rapide d'énergie pendant l'effort. Le lactate est ensuite transféré dans le foie pour redonner du glucose par la néoglucogenèse.

Dans les conditions aérobies, le pyruvate formé par la glycolyse pénètre dans la mitochondrie. La pyruvate déshydrogénase (PDH) catalyse trois réactions successives pour

produire de acétylCoA et du NADH,H<sup>+</sup>. L'acétylCoA intègre ensuite le cycle de Krebs pour soit produire de l'énergie, soit jouer le rôle de précurseur dans divers métabolismes (synthèse des lipides et des acides aminés) par l'intermédiaire des réactions anaplerotiques du cycle. Le NADH,H<sup>+</sup> régénéré par la chaîne respiratoire permet la synthèse d'ATP.

### I.2.2 Néoglucogenèse

La néoglucogenèse est active en période de jeûne et permet de réguler la glycémie dans l'organisme. Le glucagon inhibe la glycolyse et stimule la néoglucogénèse *via* la voie de l'AMPc et de la protéine kinase A. La synthèse *de novo* de glucose se fait à partir de substrats non glucidiques (acides aminés, lactate, glycérol, pyruvate). Cette voie métabolique schématisée dans la Figure 45 est majoritairement active dans le foie mais peut également être réalisée dans le rein principalement à partir d'acides aminés. Les réactions inverses de celles de la glycolyse sont réalisées en utilisant les mêmes enzymes dans le cas des réactions réversibles et des enzymes spécifiques pour les réactions irréversibles. Dans le cytoplasme de cellules hépatiques, le pyruvate est pris en charge par la pyruvate carboxylase (PC), et donne de l'oxaloacétate qui est ensuite phosphorylé et décarboxylé par la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PCK) pour donner de le phosphoénolpyruvate. Celui-ci va subir les réactions réversibles pour donner le fructose-1,6-bisphosphate. Ce dernier est déphosphorylé par la fructose-1,6-bisphosphatase. Le groupement phosphate du fructose-6-phosphate est ensuite déplacé sur la « chaîne carbonée » formant ainsi le glucose-6-phosphate. La dernière étape a lieu dans le réticulum endoplasmique où la glucose-6-phosphatase (G6PC) déphosphoryle le glucose-6-phosphate en glucose.

### I.2.3 Glycogénogenèse et glycogénolyse

La glycogénogenèse est stimulée par l'insuline en période postprandiale. Le polymère de glycogène est formé de molécules de glucose, notamment par la glycogène synthase (GYS2). Une molécule de glycogène contient environ 50 000 glucoses. En période de jeûne, le glycogène est dégradé notamment par la glycogène phosphorylase (PYGL) activée par phosphorylation en réponse au glucagon, permettant la libération de glucose et donc le maintien de la glycémie.



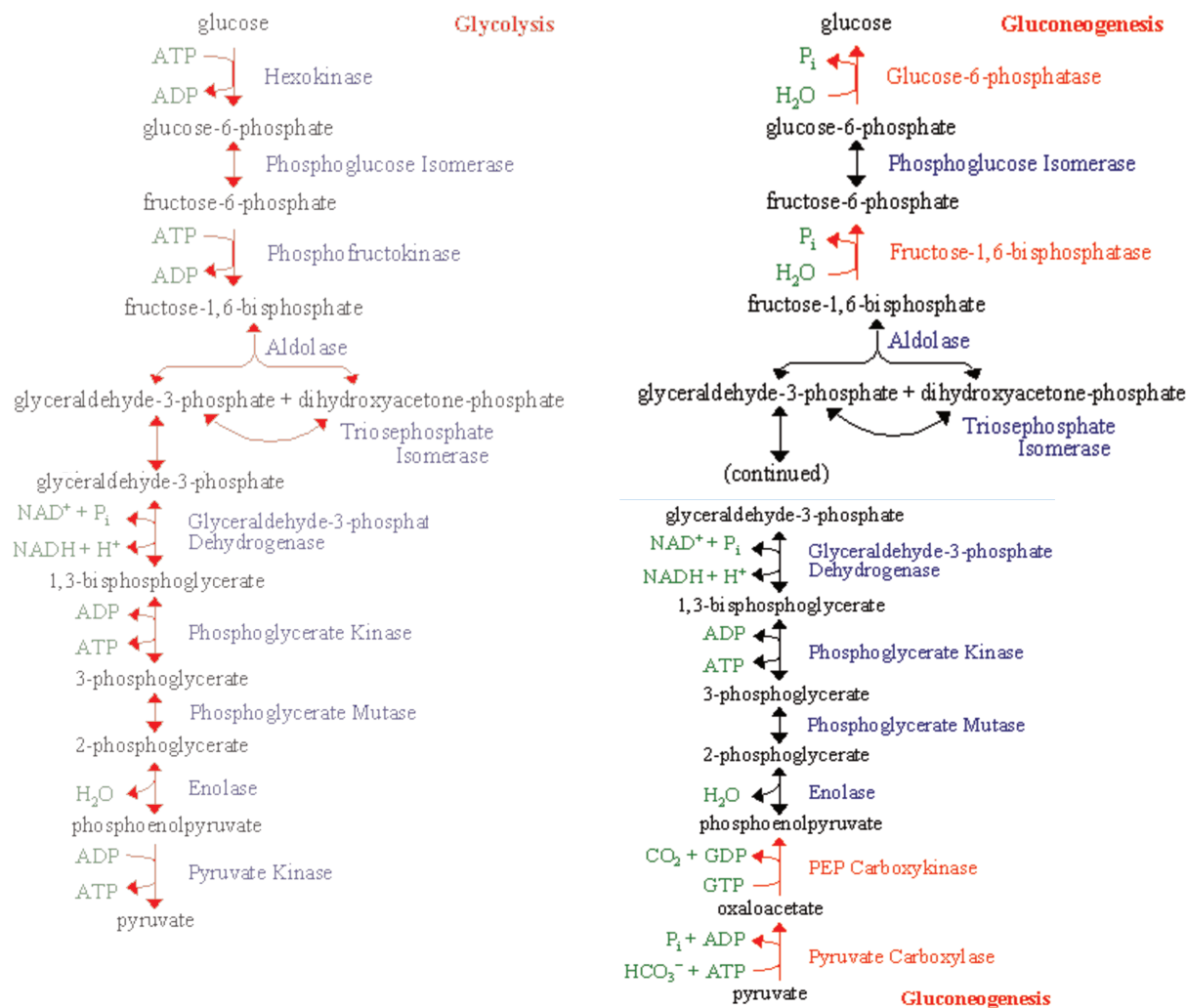


Figure 45 : Schéma du métabolisme glucidique (Schéma de la glycolyse et de la néoglucogenèse)

## II. Résultats

L'étude transcriptomique réalisée au laboratoire publiée dans l'article Ambolet-Camoit en 2015 a démontré une diminution de l'expression de certains ARNm de la voie métabolique du glucose par les polluants seuls ou en mélange (25 nM de TCDD et 10  $\mu$ M d' $\alpha$ -endosulfan) dans les cellules HepaRG mise dans un milieu en condition glycolytique. Nous avons analysé la régulation de l'expression des gènes clefs du métabolisme du glucose appartenant à :

- La voie de la néoglucogenèse (G6PC, FBP, Pyruvate Carboxylase)
- La voie de la glycolyse (« Phosphoénolpyruvate carboxykinase mitochondriale » (PCK2) et cytosolique (PCK1), HK2, « liver Pyruvate Kinase » (PKLR), Pyruvate Déshydrogénase Kinase 2 et 4 (PDK 2 et 4), PhosphoFructoKinase (PFK)
- La voie du métabolisme du glycogène (Glycogène Synthase 2 : GYS2, Glycogène Phosphorylase liver : PGYL),
- Le récepteur GLUT2 impliqué dans le transport du glucose dans les hépatocytes

Les expériences ont été effectuées dans différentes conditions nutritionnelles afin de déterminer si la modification d'expression de certains ARNm était uniquement due aux effets des polluants ou alors si elle était influencée par le contexte énergétique de la cellule. Certaines des protéines codées par ces gènes ne sont parfois actives que dans l'une des conditions nutritionnelles (PFK1 par exemple ne fonctionne que dans des conditions de glycolyse). Pour créer les conditions glycolytiques, les cellules ont été incubées dans du milieu Williams complet à 11 mM (2 g.L<sup>-1</sup>) de glucose pendant le traitement de 30 heures aux mélanges de POP. Pour les conditions néoglucogéniques, les premières 24 ou 66 heures de traitement (selon le paramètre mesuré) sont réalisées dans un milieu Williams complet puis pour les 6 dernières heures de traitement, les cellules sont incubées dans un milieu Williams sans glucose mais contenant de la glutamine, du lactate et du pyruvate, utilisables comme substrats énergétiques et glucogéniques.

Le glucose a été mesurée dans le surnageant des cellules après un traitement aux POP de 72 heures (66 heures dans le milieu complet puis 6 heures dans les conditions néoglucogéniques). Le flux glycolytique a été analysé après un traitement de 72 heures par les

polluants dans le milieu Williams complet : la production de lactate et l'oxydation du glucose, radio-marqué par du carbone 14 sur tous les carbones, en CO<sub>2</sub> ont été mesurées.

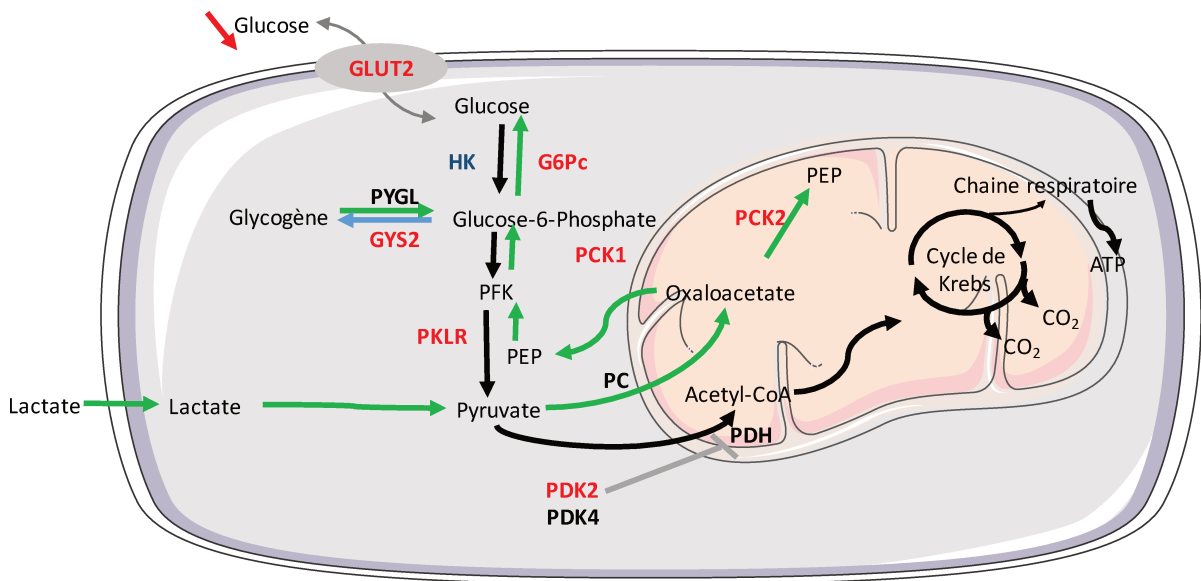
Une cinétique (4, 8, 16 et 30 heures) de traitement des polluants a été effectuée sur les cellules HepaRG. Des siARN ont été utilisés afin de définir les voies de signalisation impliquées dans les régulations des gènes en présence de TCDD (AhR) et d' $\alpha$ -endosulfan (PXR, CAR ER $\alpha$ ).

Un traitement « sub-chronique » par les polluants à des doses plus faibles a été réalisé sur les cellules HepaRG pendant 8 jours afin de déterminer si les effets observés sont les mêmes qu'après un traitement aigu à forte dose.

Cette étude a permis la rédaction d'un article mis en forme pour le journal Archives of Toxicology.







PEP : Phosphoénol-pyruvate

Figure 46 : Schéma récapitulatif sur les effets d'un mélange de polluants (25 nM de TCDD, 10 µM d'alpha-endosulfan) dans les cellules hepaRG différenciées.

Les enzymes en rouge sont diminuées, en noire stables et en bleu augmentées. Les flèches noires montre la glycolyse, les flèches vertes représentent la néoglucogenèse.

PEP : PhosphoEnol Pyruvate

## I. Conclusion et Perspectives

Cette étude a permis d'analyser les effets de deux polluants seuls ou en mélange dans un modèle hépatique, la lignée cellulaire HepaRG. La TCDD appartient à la famille des hydrocarbures aromatiques polycycliques et agit *via* la voie de signalisation du AhR. L'alpha-endosulfan est un pesticide organochloré qui agit, dans notre système, *via* la voie du ER. Bien que leur mode d'action soit différent, nous avons constaté qu'ils pouvaient tout deux déréguler le métabolisme glucidique avec un effet supérieur du mélange par rapport aux polluants seuls. Le mélange de polluants altère la production de glucose en diminuant l'expression des ARNm des enzymes de la néoglucogenèse (GLUT2, G6Pc, PCK2, PCK1) (Figure 46). Dans des conditions glycolytiques, ils diminuent l'oxydation du glucose en CO<sub>2</sub> sans modifier la production de lactate. Le mécanisme complet de cette inhibition n'est pas entièrement compris. Cette étude montre des effets plus importants du mélange de polluants que de chaque molécule prise isolément sur le métabolisme glucidique. Néanmoins nous ne pouvons pas conclure sur un effet additif ou synergique des deux molécules puisque des courbes dose réponse de chacun des polluants n'ont pas été faites.

La diminution de l'expression du GLUT2 par les polluants conduit à limiter l'entrée du glucose dans la cellule, mais l'augmentation de l'expression de l'hexokinase 2 pourrait contrebalancer cet effet et permettre un apport en glucose-6-P équivalent dans la glycolyse. Des mesures de l'incorporation de glucose sont envisagées pour préciser ce point. L'altération du métabolisme énergétique pourrait également conduire à un métabolisme alternatif de la cellule. L'hypothèse de l'augmentation de la synthèse des lipides a été testée au sein du laboratoire par Alix Leblanc. Dans ce cas les carbones du glucose ne sont pas oxydés en CO<sub>2</sub> mais se retrouveraient dans la structure des acides gras néo-synthétisés. Des expériences préliminaires de coloration des lipides au red oil montrent que l'alpha-endosulfan semble être le seul à augmenter la synthèse des gouttelettes lipidiques dans notre modèle HepaRG. Elles ne sont pas détectées après une exposition à la TCDD et au mélange des polluants. Ces résultats sont contradictoires avec une étude publiée dans la littérature, qui montre que dans les hépatocytes humains en culture primaire, la TCDD permet l'accumulation d'acides gras (Forgacs *et al.* 2013).

La dioxine peut avoir des effets anti-œstrogéniques et œstrogéniques. A titre d'exemple, elle peut induire une endométriose et des tumeurs dépendantes des œstrogènes (Rier & Foster 2002). D'autre part, le AhR activé par le 3MC peut activer ou inhiber la voie de signalisation induite par le E2, ligand du ER, selon le type cellulaire (Swedenborg *et al.* 2008).

Les doses choisies dans cette étude (25 nM TCDD et 10 µM α-endosulfan) correspondent aux doses fortes utilisées dans les puces Affymétrie. Cependant, nous avons observé que l'expression des enzymes étudiées dans le métabolisme du glucose (G6PC, GLUT2) diminue également après un traitement de 8 jours à des doses plus faibles dès 0,2 nM de TCDD et 1 ou 3 µM d'α-endosulfan (). Cette expérience a été réalisée pour se rapprocher de la réalité et mimer une exposition « semi-chronique » en lien avec les résultats du modèle PBPK<sup>24</sup> décrit dans l'article.

---

<sup>24</sup> PBPK : Pharmacologically Based Biokinetic





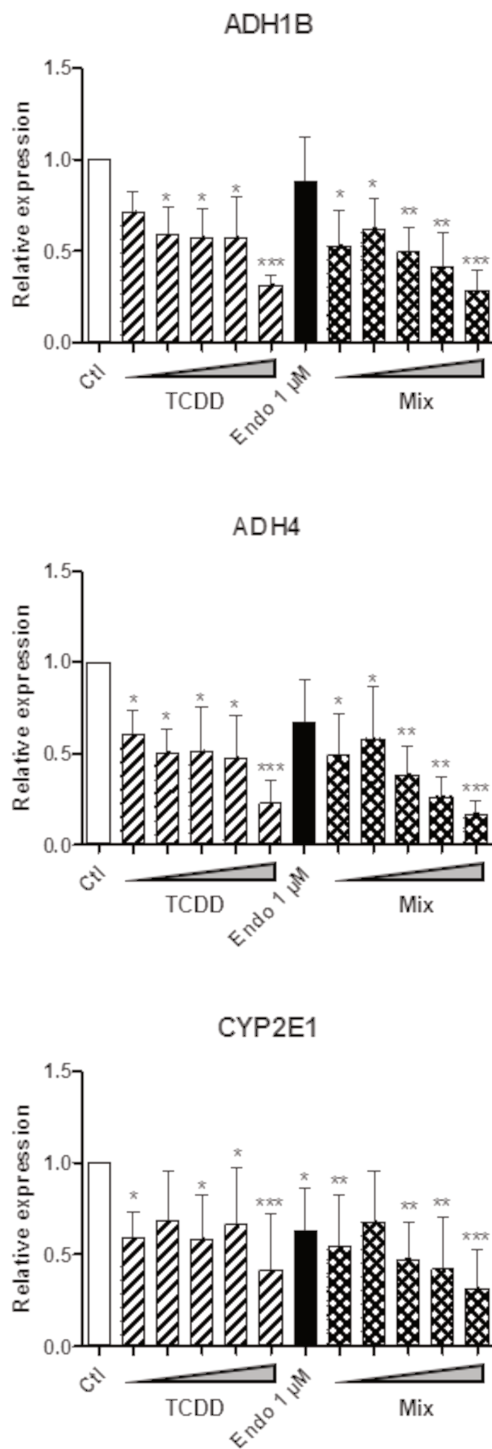


Figure 47 : L'expression des ARNm ADH1B, ADH4 et CYP2E1 régulée par la TCDD, l' $\alpha$ -endosulfan et du mélange (mix) dépend de la concentration.

Mesure par qRT-PCR des ARNm ADH1B, ADH4 et CYP2E1 en fonction de la concentration de TCDD (0,1-0,2-0,5-1- 5 nM), de l' $\alpha$ -endosulfan (1  $\mu$ M) et du mix (1  $\mu$ M d' $\alpha$ -endosulfan et de la TCDD (0,1 nM à 5 nM) pendant 8 jours dans les cellules HepaRG différenciées (n=5). Les \* au-dessus des barres correspondent à la significativité statistique par rapport au contrôle seul. \*\*\*p < 0,001, \*\*p < 0,01, \*p < 0,05.

### Résultats complémentaires

Dans le premier article de ma thèse, nous avons montré que la TCDD inhibait l'expression des ADH (1, 4, 6) par l'activation du complexe AhR/ARNT et nous avons mis en évidence l'intervention de la voie de signalisation du TGF- $\beta$  sur certaines cibles. L'analyse de résultats de transcriptomique utilisés dans cette troisième étude, a montré que l' $\alpha$ -endosulfan inhibait l'expression des ADH (1, 4, 6) après un traitement de 30 heures et que le mélange diminuait fortement leur expression au niveau ARN (Ambolet-Camoit *et al.*, 2015).

Nous avons analysé l'expression des ADH (1, 4, 6) et du CYP2E1 dans les cellules différenciées HepaRG après exposition aux polluants seuls ou en mélange pendant 8 jours. La Figure 47, montre que le traitement par 1  $\mu$ M d' $\alpha$ -endosulfan diminue l'expression d'ADH4 et du CYP2E1. Le mélange diminue l'expression de l'ADH1B, l'ADH4, et du CYP2E1 quelle que soit la concentration de TCDD (entre 0,1 et 5 nM de TCDD). La régulation des enzymes du métabolisme de l'alcool par l'endosulfan n'a jamais été montrée. Cette diminution ne fait pas intervenir les récepteurs nucléaires CAR et PXR (résultats non montrés). Il reste à tester si le récepteur nucléaire ER est impliqué dans cette régulation, comme pour les enzymes du métabolisme glucidique présenté dans le chapitre 3.



## Conclusion Générale – Perspectives

### **La lignée cellulaire hépatique HepaRG est-elle un modèle adéquat pour l'étude des effets des polluants organiques persistants sur le métabolisme de l'alcool, des rétinoïdes et des glucides ?**

Le modèle cellulaire HepaRG utilisé pour nos études est une lignée cellulaire différenciée en cellules de type biliaire et en cellules de type hépatocytaire couramment utilisée pour les études toxicologiques depuis une dizaine d'années. En effet ce modèle exprime toutes les enzymes du métabolisme des xénobiotiques, de l'alcool et des rétinoïdes ainsi que les enzymes du métabolisme glucidique. Cependant, nous ne pouvons confirmer si les effets observés par les polluants se déroulent dans les cellules hépatiques ou dans les cellules biliaires, ou dans les deux. Bien que des protocoles aient été décrits pour enrichir la population hépatocytaire, leur mise en œuvre reste variable (Pernelle *et al.* 2011). La mise au point d'un protocole de tri par FACS est en cours au sein du laboratoire pour pouvoir les séparer et différencier les effets des deux populations. La séparation nécessite l'identification de marqueurs extra-cellulaires spécifiques de chacun des deux types cellulaires (intégrine- $\alpha$ 1 pour les hépatocytes, intégrine- $\alpha$ 6 pour les cellules biliaires) et exprimés dans le modèle. Par exemple, l'intégrine- $\alpha$ 5 $\beta$ 6 spécifique des hépatocytes, n'est pas exprimée dans les cellules HepaRG.

L'utilisation d'un autre modèle hépatique qui exprime aussi toutes les enzymes étudiées serait intéressante pour éviter la présence des deux types cellulaires. Le modèle le plus évident est l'utilisation d'hépatocytes humains en culture primaire (HHP). Ce modèle a l'avantage d'être le plus proche de l'Homme en terme d'activités enzymatiques et réponses cellulaires. Néanmoins ces cellules, issues de donneurs ne sont pas disponibles facilement et présentent une grande variabilité inter-individuelle qui rend généralement l'interprétation des résultats plus difficile. Par ailleurs, elles perdent assez rapidement leurs caractères de différenciation. Les cellules iPS (« inducible pluripotent cells ») seraient peut-être aussi de bons candidats. Il s'agit de cellules souches dont on peut induire la différenciation en hépatocytes. Comme les HHP, les iPS sont des cellules saines, mais elles ont l'avantage d'être facile d'accès par simple biopsie chez l'adulte sans poser de problème éthique et leur culture avant différenciation permet d'en avoir en abondance.

L'étude toxicologique des polluants sur des cellules cultivées en 3-D pourrait aussi être un moyen d'être plus représentatif de la réalité en se rapprochant de la biodistribution des toxiques dans l'organisme (Andersson *et al.* 2012, Gunness *et al.* 2013). A terme, des cocultures avec une autre lignée comme par exemple des cellules stellaires ou des cellules pancréatiques, afin d'étudier le métabolisme du glucose dans son ensemble, permettraient de s'approcher davantage de l'organisme.

### **La dose des polluants utilisée pour ces études toxicologiques est-elle représentative de l'exposition réelle ?**

Nous avons choisi dans un premier temps d'utiliser dans les puces Affymétrie une forte dose de TCDD (25 nM) et d' $\alpha$ -endosulfan (10  $\mu$ M) pour observer des effets importants sur l'expression de gènes. Nos études complémentaires avec des doses plus faibles, ont cependant montré des effets identiques : l'expression des ADH est diminuée dès 0,1 nM de TCDD pendant 24 heures (article 1), dès 0,05 nM de TCDD ou 1  $\mu$ M d' $\alpha$ -endosulfan pendant 8 jours (article 3), l'expression des enzymes clés du métabolisme des glucides (G6PC et GLUT2) diminue dès 0,2 nM de TCDD après 30 heures de traitement (article 3) ; l'expression des ARNm G6PC et GLUT2 diminue dès 3  $\mu$ M d' $\alpha$ -endosulfan et 0,2 nM de TCDD pendant 8 jours (article 3). Une étude à faible dose de polluants à des temps encore plus longs (2 à 3 semaines) permettrait de se rapprocher encore plus d'une exposition « semi-chronique » à des doses environnementales. A ce titre, l'utilisation d'un « Physiologically Based BioKinetic model » (PBBK), dans le cadre du projet européen HEALS sur l'exposome, et qui est présenté dans l'article 3 de cette thèse montre que les doses utilisées *in vitro* sont proches de la limite supérieure des expositions humaines, au niveau du foie, dans des accidents ou au cours de l'exposition des travailleurs.

### **Cette étude répond-elle à la problématique des effets des mélanges ?**

Dans la troisième partie des résultats, nous avons choisi d'étudier deux polluants qui agissent sur deux voies de signalisation distinctes dans la cellule et avons déterminé les voies de signalisation activées en leur présence. Nous avons montré que le métabolisme du glucose, au niveau cellulaire, était davantage modifié par le mélange d'un pesticide organochloré et d'une dioxine que lors de l'exposition à chaque POP séparément. Cependant, l'exposition réelle ne s'arrête pas à deux polluants. Les effets des polluants en mélange dépendent de leur composition et peut être que l'ajout d'un troisième polluant inhiberait les effets des deux polluants étudiés (TCDD, endosulfan). La notion d'exposome, relativement récente, a été développée par le Dr C Wild en 2005, et intégrée dans la loi de « modernisation de notre système de santé » parue au journal officiel du 27 janvier 2016. Dans cette loi, l'exposome est défini comme « l'intégration sur la vie entière de l'ensemble des expositions qui peuvent influencer la santé humaine ». Il représente la totalité des expositions aux divers facteurs environnementaux que subit un organisme tout au long de son existence dès le développement *in utero*. Cette définition englobe ainsi les facteurs environnementaux, psychologiques et économiques donnant une vision multidimensionnelle entre l'environnement et la santé. L'Europe est également intéressée par ce concept avec le financement de différents projets, comme le projet HEALS (2013-2018) auquel participe mon équipe d'accueil.

Des études *in silico* permettraient de sélectionner des molécules toxiques à tester en mélange dans les modèles *in vitro* ou *in vivo*. La modélisation de l'activation des récepteurs en présence de polluants suspectés ou de molécules nouvelles par exemple serait une solution pour prédire leurs effets délétères potentiels dans la cellule. La méthode QSAR<sup>25</sup> analyse les interactions entre les ligands et un récepteur en corrélant différents paramètres : les caractéristiques physico-chimiques des molécules, les affinités pour un récepteur et les différentes activités biologiques. Une autre méthode permet de modéliser la force des liaisons et les atomes impliqués dans l'interaction entre le ligand et son récepteur. Ces méthodes permettraient de choisir au mieux les différentes combinaisons de polluants/composés à

---

<sup>25</sup> QSAR : « Quantitative Structure Activity Relationship »

étudier, en conjonction avec les résultats des études épidémiologiques sur les contaminants présents dans le sang et/ou dans l'urine.

### **Le mécanisme de diminution de l'expression des ADH induit par les polluants ligands du AhR est-il entièrement disséqué ?**

La première étude a montré l'implication de la voie de signalisation du récepteur aux hydrocarbures (AhR) sur les enzymes du métabolisme de l'alcool et des rétinoïdes (alcool déshydrogénase) en présence de polluants organiques persistants, activateurs de ce récepteur. Les résultats indiquent que l'activation du AhR par la TCDD, le PCB126 ou le 3MC inhibe l'expression des ARNm et des protéines de certaines ADH (1, 4, 6) et a mis en évidence l'implication du partenaire du AhR, l'ARNT, sans implication de la voie non-génomique, dans cette régulation.

La deuxième étude montre le rôle de la voie de signalisation de la superfamille du TGF- $\beta$  dans la diminution des ADH après activation du complexe AhR/ARNT par la TCDD. Nous nous sommes particulièrement intéressés au TGF- $\beta$ 1. Le lien entre la voie de signalisation génomique du AhR et la voie de signalisation du TGF- $\beta$ 1 n'a pas encore été totalement établi et des études supplémentaires sont nécessaires. Dans un premier temps il faudrait confirmer que l'activation de cytokines de la superfamille du TGF- $\beta$  est augmentée en présence d'activateurs du AhR (TCDD, 3MC, PCB126). Le dosage du TGF- $\beta$  dans le surnageant a été réalisé mais les résultats n'ont pas été reproductibles ni par FACS ni par ELISA. Cela est probablement dû à un problème technique dans l'expérience ou au fait que le TGF- $\beta$  pourrait jouer un rôle intracrine sans sortir de la cellule. Pour tester cette dernière hypothèse des analyses d'immunofluorescence sont prévues. L'étude des autres membres de la superfamille du TGF- $\beta$  permettrait d'obtenir une vue d'ensemble de l'implication de cette famille.

Les régulations des ADH pourraient être épigénétiques, en particulier par la méthylation de l'ADN. La diminution de la transcription peut survenir après une hyperméthylation d'îlots CpG proches des gènes ou « clusters » de gènes. Le fait que les différentes isoformes d'ADH régulées par la TCDD soient regroupées au centre du cluster des ADH sur le chromosome 4, indique qu'elles pourraient avoir une régulation commune. Il est connu que la TCDD peut modifier, en fonction du type cellulaire, l'expression de différentes



isoformes de DNA méthyltransférase (DNMT) qui catalysent la méthylation de l'ADN (Papoutsis *et al.* 2013). Bien que l'étude transcriptomique que nous avons réalisée, ne montre aucune modification de l'expression de ces enzymes après 30 heures de traitement à la TCDD, il n'est pas exclu qu'une modification post-transcriptionnelle permette une modification de l'activation de ces enzymes rapidement après l'exposition. A l'heure actuelle, aucune étude de méthylation du locus des ADH n'a été réalisée. *In silico*, nous pouvons définir la présence de différents îlots CpG susceptibles de subir une méthylation. Une étude par pyroséquencage de l'état de méthylation de ces îlots en fonction de l'exposition à la TCDD est envisagée.

D'autres mécanismes peuvent également être mis en jeu pour expliquer une régulation négative, rapide (8 heures) après l'exposition. Récemment, Chadwick *et al.*, ont proposé que la diminution de l'expression de Sox9 après activation de AhR soit due à l'induction d'un LncARN (Long non-coding RNA, long ARN non codant) (Chadwick et Tanguay communication personnelle<sup>26</sup>). Celui-ci empêche la transcription de l'ARNm de Sox9, sans modifier sa stabilité, 6 heures après l'activation du récepteur. Ce mécanisme cadrerait parfaitement avec la cinétique de la régulation des ADH que nous observons dès 8 heures d'exposition des cellules à la TCDD et l'activation du complexe de transactivation AhR/ARNT.

### **La diminution des ADH en présence de certains polluants organiques persistants est-elle néfaste pour l'organisme ?**

Au cours de cette étude, les conséquences d'une diminution de l'activité des ADH dans les cellules HeparG, et de manière plus générale dans le foie, n'ont pas été évaluées. Cette réponse est-elle physiologique pour se défendre de la présence d'un xénobiotique, ou est-elle pathologique ? Un criblage à grande échelle par métabolomique est en cours afin de déterminer si la diminution des ADH entraîne dans la cellule une modification de la quantité des métabolites.

Il se pourrait que cette régulation des ADH soit un moyen de défense. En effet, dans la cellule, l'exposition à des polluants induit les cytochromes P450 qui oxydent ces molécules pour faciliter leur élimination. Cette oxydation correspond à l'introduction d'oxygène dans la

---

<sup>26</sup> Conserved AHR-dependent control of Sox9 long non coding RNA expression.

structure moléculaire et la formation régulière de fonctions alcool, nécessaires à la conjugaison des groupements spécifiques et l'élimination du xénobiotique. Réduire l'expression des ADH permettrait ainsi à la cellule de favoriser cette fonctionnalisation par les CYP et de faciliter l'élimination des polluants. De plus, cela permettrait d'éviter l'oxydation de la fonction alcool formée, en fonction aldéhyde très réactive à l'origine de la formation d'adduits aux macromolécules (protéines, acides nucléiques ...). En utilisant les données des structures cristallographiques connues des ADH et CYP impliqués, nous pourrions rechercher *via* l'analyse de différentes chimiothèques, l'existence de molécules produites par des cytochromes P450 (en particulier les CYP1 induits par les polluants *via* le AhR) qui pourraient potentiellement être substrats des ADH.

D'un autre côté, l'agressivité ou le mauvais pronostic de différents cancers (sein, poumon, foie) ont été associés à une diminution de l'expression d'isoformes d'ADH. On ne peut donc pas exclure qu'une diminution de leur expression ne soit pas une cause du développement de la pathologie. Les polluants *via* d'autres mécanismes pourraient avoir des effets dans ces pathologies. Afin d'éviter cet artéfact de l'analyse, il faudrait réaliser des invalidations d'expression de chaque isoforme des ADH, séparément ou ensemble, par des siARN. Pour s'assurer des effets de l'invalidation, nous pourrions produire de nouvelles lignées en réalisant un KO par la méthode CRISPR.

Au cours de ce travail nous avons observé une diminution de l'expression des ADH par les ligands du AhR (TCDD, 3MC, PCB126) et par l' $\alpha$ -endosulfan, ligand du ER. Ces résultats suggèrent que la régulation des ADH par les POP peut emprunter plusieurs voies de signalisation, laissant la porte ouverte à d'autres voies de régulation. Cependant, des études préliminaires avec d'autres polluants qui provoquent une réponse cellulaire différente, comme le bisphénol A, le MeHP (un phtalate) ou l'acide perfluorooctanesulfonique (PFOS), semblent indiquer que ces polluants n'ont aucun effet sur l'expression des ADH.

**En cas de consommation d'alcool et d'une exposition à des polluants, la diminution des ADH entraîne-t-elle une augmentation de la toxicité de l'alcool non métabolisé par le métabolisme oxydatif ?**

Il faut déterminer le devenir et la toxicité de l'alcool non pris en charge par le métabolisme oxydatif par suite de la diminution des ADH et du CYP2E1. Cette inhibition des ADH pourrait entraîner une augmentation du métabolisme non oxydatif et par conséquent une augmentation des éthyl ester d'acides gras (FAEE), molécules détectées chez des grands consommateurs d'alcool. Après s'être assuré de leur formation, il faudrait analyser les effets d'une augmentation des FAEE dans le modèle HepaRG ainsi que dans l'organisme. Une étude *in vivo* sur des souris, permettrait d'une part d'identifier les conséquences d'une diminution des enzymes du métabolisme de l'alcool sur le foie et d'autre part de vérifier si l'alcool peut endommager différents organes cibles de l'alcool (cerveau, reins,...).

**Les mécanismes de la diminution des enzymes du métabolisme du glucose en présence d'un mélange de polluants TCDD/endosulfan, sont-ils disséqués ?**

L'étude des effets des polluants (TCDD/endosulfan) sur le métabolisme du glucose a montré que le mélange diminuait l'expression des ARNm (GluT2, G6Pc) impliqués dans le métabolisme du glucose. Bien que leur mode d'action soit différent, ces polluants peuvent tous deux déréguler le métabolisme glucidique avec un effet supérieur pour le mélange. La TCDD modifie l'expression des gènes du métabolisme du glucose en activant le récepteur Ah dans notre modèle cellulaire hépatique humain. Pour comprendre la voie de signalisation impliquée dans la diminution de l'expression des gènes du métabolisme glucidique en présence de TCDD, nous avons étudié le rôle de TiPARP. C'est un gène cible du AhR jouant un rôle dans la toxicité de la TCDD. Cependant le rôle de TiPARP semble être spécifique des espèces (effet opposé sur la néoglucogénèse dans les modèles d'embryon de poulets ou dans les souris). Dans notre modèle cellulaire, TiPARP ne semble pas jouer un rôle dans l'inhibition de l'expression des gènes du métabolisme du glucose en présence de TCDD. La voie du TGF- $\beta$  est impliquée dans la modification de l'expression de gènes du métabolisme de l'alcool et des rétinoïdes, en revanche, elle ne semble pas impliquée dans le métabolisme du glucose dans notre modèle hépatique humain.

L'alpha-endosulfan diminue l'expression des ARNm G6Pc et GLUT2 ainsi que la production du glucose. Dans notre modèle cellulaire, les effets du pesticide organochloré impliquent partiellement le ER. Nous avons montré que les récepteurs nucléaires PXR et CAR ne sont pas impliqués dans la dérégulation du métabolisme du glucose en présence d'alpha-endosulfan.

Cette étude montre que l'exposition à deux composés de familles différentes peut avoir des effets plus forts que chaque composé seul. Cependant nous n'avons pas démontré si les effets étaient additifs ou synergiques. Il est donc nécessaire de poursuivre les effets cocktails sur le métabolisme hépatique. Les résultats pour ce type d'étude, pourraient conduire à moyen terme, à une modification à la baisse des normes d'expositions.

L'ensemble de mon travail a permis de montrer, pour la première fois, la régulation de nouvelles cibles (enzymes du métabolisme de l'alcool) par certains contaminants et d'augmenter en partie à la compréhension des mécanismes d'action des polluants environnementaux et leurs conséquences. De nombreuses mesures ont été mises en place pour réduire l'émission ou la fabrication des polluants délétères pour l'organisme. Mais il reste encore à approfondir les mécanismes d'action de POP encore présents dans notre environnement et à étudier les effets de mélanges de polluants plus complexes, ce qui a été abordée dans le troisième volet de cette thèse, sur des organismes modèles ou *in vitro* pour *in fine* pouvoir faire le lien avec les pathologies, à travers les études épidémiologiques (Attignon *et al.* 2016).





## Bibliographie

- ABBES, K., L. BIZZOZERO, K. JACQUELINE-BOUTROS, and K. JEAN. 2009. Les Polychlorobiphényles. Un problème nouveau pour une pollution ancienne. Available at: [http://fulltext.bdsp.ehesp.fr/Ehesp/memoires/persan\\_igs/2010/pcb.pdf](http://fulltext.bdsp.ehesp.fr/Ehesp/memoires/persan_igs/2010/pcb.pdf) [Accessed October 11, 2016].
- ABBOTT, B. D., J. E. SCHMID, J. G. BROWN, C. R. WOOD, R. D. WHITE, A. R. BUCKALEW, and G. A. HELD. 1999. RT-PCR quantification of AHR, ARNT, GR, and CYP1A1 mRNA in craniofacial tissues of embryonic mice exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and hydrocortisone. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 47: 76–85.
- ABDELMEGEED, M. A., K.-H. MOON, C. CHEN, F. J. GONZALEZ, and B.-J. SONG. 2010. Role of cytochrome P450 2E1 in protein nitration and ubiquitin-mediated degradation during acetaminophen toxicity. *Biochem. Pharmacol.* 79: 57–66. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295209006704> [Accessed October 11, 2016].
- ABDELMEGEED, M. A., and B.-J. SONG. 2014. Functional roles of protein nitration in acute and chronic liver diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014. Available at: <http://www.hindawi.com/journals/omcl/2014/149627/abs/> [Accessed October 11, 2016].
- ABDOLLAH, S., M. MACÍAS-SILVA, T. TSUKAZAKI, H. HAYASHI, L. ATTISANO, and J. L. WRANA. 1997. T $\beta$ RI phosphorylation of Smad2 on Ser465 and Ser467 is required for Smad2-Smad4 complex formation and signaling. *J. Biol. Chem.* 272: 27678–27685. Available at: <http://www.jbc.org/content/272/44/27678.short> [Accessed October 11, 2016].
- ABEL, J., and T. HAARMANN-STEMMANN. 2010. An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology. *Biol. Chem.* 391: 1235–1248. Available at: <http://www.degruyter.com/view/j/bchm.2010.391.issue-11/bc.2010.128/bc.2010.128.xml> [Accessed October 11, 2016].
- AGARWAL, D. P. 2001. Genetic polymorphisms of alcohol metabolizing enzymes. *Pathol. Biol.* 49: 703–709. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0369811401002425> [Accessed October 11, 2016].
- AHMED, M. 2015. Non-alcoholic fatty liver disease in 2015. *World J. Hepatol.* 7: 1450–1459. Available at: <http://europemc.org/articles/pmc4462685> [Accessed October 10, 2016].
- AL-ERYANI, L., B. WAHLANG, K. C. FALKNER, J. J. GUARDIOLA, H. B. CLAIR, R. A. PROUGH, and M. CAVE. 2015. Identification of environmental chemicals associated with the development of toxicant-associated fatty liver disease in rodents. *Toxicol. Pathol.* 43: 482–497. Available at: <http://tpx.sagepub.com/content/43/4/482.short> [Accessed October 10, 2016].
- ALERYANI, S., A. KABAKIBI, J. CLUETTE-BROWN, and M. LAPOSATA. 1996. Fatty acid ethyl ester synthase, an enzyme for nonoxidative ethanol metabolism, is present in serum after liver and pancreatic injury. *Clin. Chem.* 42: 24–27. Available at: <http://www.clinchem.org/content/42/1/24.short> [Accessed October 11, 2016].
- ALHOMSI, K., M. SELIG, T. SUSTIC, E. KATRANGI, V. WEISSIG, and M. LAPOSATA. 2008. Induction of apoptosis and necrosis in human peripheral blood mononuclear cells by fatty acid ethyl esters. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 32: 534–543. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1530-0277.2007.00597.x/full> [Accessed October 11, 2016].
- ALLISTON, T., L. CHOY, P. DUCY, G. KARSENTY, and R. DERYNCK. 2001. TGF- $\beta$ -induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast

- differentiation. *EMBO J.* 20: 2254–2272. Available at: <http://emboj.embopress.org/content/20/9/2254> [Accessed November 5, 2016].
- ALSHARIF, N. Z., T. LAWSON, and S. J. STOHS. 1994. Oxidative stress induced by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin is mediated by the aryl hydrocarbon (Ah) receptor complex. *Toxicology* 92: 39–51. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0300483X9490166X> [Accessed October 11, 2016].
- AMBOLET-CAMOIT, A., L. C. BUI, S. PIERRE, A. CHEVALLIER, A. MARCHAND, X. COUMOUL, M. GARLATTI, K. ANDREAU, R. BAROUKI, and M. AGGERBECK. 2010. 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin counteracts the p53 response to a genotoxicant by up-regulating expression of the metastasis marker AGR2 in the hepatocarcinoma cell line HepG2. *Toxicol. Sci.* kfq082. Available at: <http://toxsci.oxfordjournals.org/content/early/2010/03/18/toxsci.kfq082.short> [Accessed October 11, 2016].
- AMBOLET-CAMOIT, A., C. OTTOLENGHI, A. LEBLANC, M. J. KIM, F. LETOURNEUR, S. JACQUES, N. CAGNARD, C. GUGUEN-GUILLOUZO, R. BAROUKI, and M. AGGERBECK. 2015. Two persistent organic pollutants which act through different xenosensors (alpha-endosulfan and 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin) interact in a mixture and downregulate multiple genes involved in human hepatocyte lipid and glucose metabolism. *Biochimie* 116: 79–91.
- ANDERSSON, T. B., K. P. KANEBRATT, and J. G. KENNA. 2012. The HepaRG cell line: a unique in vitro tool for understanding drug metabolism and toxicology in human. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 8: 909–920. Available at: <http://informahealthcare.com.gate2.inist.fr/doi/abs/10.1517/17425255.2012.685159> [Accessed September 12, 2014].
- ANINAT, C., A. PITON, D. GLAISE, T. LE CHARPENTIER, S. LANGOUËT, F. MOREL, C. GUGUEN-GUILLOUZO, and A. GUILLOUZO. 2006. Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 34: 75–83.
- ANNES, J. P., J. S. MUNGER, and D. B. RIFKIN. 2003. Making sense of latent TGF $\beta$  activation. *J. Cell Sci.* 116: 217–224. Available at: <http://jcs.biologists.org/content/116/2/217> [Accessed August 11, 2015].
- ANSARI, R. A., K. HUSAIN, and S. A. A. RIZVI. 2016. Role of Transcription Factors in Steatohepatitis and Hypertension after Ethanol: The Epicenter of Metabolism. *Biomolecules* 6: 29. Available at: <http://www.mdpi.com/2218-273X/6/3/29> [Accessed July 15, 2016].
- ATTIGNON, E. A., A. F. LEBLANC, B. LE-GRAND, C. DUVAL, M. AGGERBECK, H. ROUACH, and E. B. BLANC. 2016. Novel roles for AhR and ARNT in the regulation of alcohol dehydrogenases in human hepatic cells. *Arch. Toxicol.*
- ATTIGNON, E. A., H. ROUACH, and E. B. BLANC. 2015. les bases moléculaires de l'alcool Attignon. Available at: <https://www.google.fr/webhp?sourceid=chrome-instant&ion=1&espv=2&ie=UTF-8#q=les+bases+mol%C3%A9culaires+de+l'alcool+Attignon> [Accessed October 11, 2016].
- AUBERT, J., K. BEGRICHE, L. KNOCKAERT, M.-A. ROBIN, and B. FROMENTY. 2011. Increased expression of cytochrome P450 2E1 in nonalcoholic fatty liver disease: mechanisms and pathophysiological role. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* 35: 630–637. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2210740111001732> [Accessed October 11, 2016].
- AYLWARD, L. L., J. J. COLLINS, K. M. BODNER, M. WILKEN, and C. M. BODNAR. 2013. Elimination rates of dioxin congeners in former chlorophenol workers from Midland, Michigan. *Environ.*



- Health Perspect. 121: 39. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3552814/> [Accessed October 11, 2016].
- AZNAVOORIAN, S., A. N. MURPHY, W. G. STETLER-STEVENSON, and L. A. LIOTTA. 1993. Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. *CANCER-Phila.* 71: 1368–1368. Available at: [https://www.researchgate.net/profile/Anne\\_Murphy/publication/229560777\\_Molecular\\_aspects\\_of\\_tumor\\_cell\\_invasion\\_and\\_metastasis/links/5456570a0cf2cf5164802f27.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Anne_Murphy/publication/229560777_Molecular_aspects_of_tumor_cell_invasion_and_metastasis/links/5456570a0cf2cf5164802f27.pdf) [Accessed October 11, 2016].
- BABOR, T. F., J. C. HIGGINS-BIDDLE, J. B. SAUNDERS, and M. G. MONTEIRO. 2001. Audit. Alcohol Use Disord. Identif. Test AUDIT Guidel. Use Prim. Care. Available at: [http://pftp.paho.org/Public/NMH/Alcohol/Cartagena/Articulos%20USB/AuditBro-3.pdf?Mobile=1&Source=%2F\\_layouts%2Fmobile%2Fview.aspx%3FList%3De0923874-ac8b-4798-b0ae-be309b53f0b8%26View%3Db9b59ee1-e24f-4a75-8826-6b6128274b00%26RootFolder%3D%252FPublic%252FNMH%252FAlcohol%252FCartagena%252FArticulos%2520USB%26CurrentPage%3D1](http://pftp.paho.org/Public/NMH/Alcohol/Cartagena/Articulos%20USB/AuditBro-3.pdf?Mobile=1&Source=%2F_layouts%2Fmobile%2Fview.aspx%3FList%3De0923874-ac8b-4798-b0ae-be309b53f0b8%26View%3Db9b59ee1-e24f-4a75-8826-6b6128274b00%26RootFolder%3D%252FPublic%252FNMH%252FAlcohol%252FCartagena%252FArticulos%2520USB%26CurrentPage%3D1) [Accessed October 8, 2016].
- BALASUBRAMANIAN, G., S. CHELLIAH, and OTHERS. 1985. Chemical control of pests of sunflower. *Pesticides* 19: 21–22.
- BARAN, B., and F. AKYÜZ. 2014. Non-alcoholic fatty liver disease: what has changed in the treatment since the beginning. *World J Gastroenterol* 20: 14219–14229. Available at: <http://www.wjgnet.com/esps/DownloadFile.aspx?Type=Digital&SubType=1&DOI=10.3748%2Fwjg.v20.i39.14219&FilePath=Pub%5C10.3748%5Cv20%5Ci39%5CWJG-20-14219.pdf> [Accessed October 10, 2016].
- BAROUKI, R., X. COUMOUL, and P. M. FERNANDEZ-SALGUERO. 2007. The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. *FEBS Lett.* 581: 3608–3615. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/j.febslet.2007.03.046/full> [Accessed October 11, 2016].
- BATALLER, R., and D. A. BRENNER. 2005. Liver fibrosis. *J. Clin. Invest.* 115: 209–218. Available at: <http://www.jci.org/articles/view/24282> [Accessed October 10, 2016].
- BEAUNE, P. H., and M.-A. LORIOT. 2000. Bases moléculaires de la susceptibilité aux xénobiotiques: aspects métaboliques. Available at: <http://ipubli-inserm.demo.inist.fr/handle/10608/1524> [Accessed October 10, 2016].
- BECHAUX, C., M. ZEILMAKER, M. MERLO, B. BOKKERS, and A. CREPET. 2014. An integrative risk assessment approach for persistent chemicals: A case study on dioxins, furans and dioxin-like PCBs in France. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 70: 261–269. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0273230014001585> [Accessed August 4, 2016].
- BECKER, U., A. DEIS, T. I. SORENSEN, M. GRONBAEK, K. BORCH-JOHNSEN, C. F. MULLER, P. SCHNOHR, and G. JENSEN. 1996. Prediction of risk of liver disease by alcohol intake, sex, and age: a prospective population study. *Hepatology* 23: 1025–1029. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.510230513/full> [Accessed October 11, 2016].
- BEGEMANN, G., M. MARX, K. MEBUS, A. MEYER, and M. BASTMEYER. 2004. Beyond the neckless phenotype: influence of reduced retinoic acid signaling on motor neuron development in the zebrafish hindbrain. *Dev. Biol.* 271: 119–129. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160604002490> [Accessed October 11, 2016].
- BEISCHLAG, T. V., J. L. MORALES, B. D. HOLLINGSHEAD, and G. H. PERDEW. 2008. The Aryl Hydrocarbon Receptor Complex and the Control of Gene Expression. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 18: 207–250. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2583464/> [Accessed July 28, 2016].

- BELLENTANI, S., G. SACCOCCIO, G. COSTA, C. TIRIBELLI, F. MANENTI, M. SODDE, L. S. CROCE, F. SASSO, G. POZZATO, G. CRISTIANINI, and OTHERS. 1997. Drinking habits as cofactors of risk for alcohol induced liver damage. *Gut* 41: 845–850. Available at: <http://gut.bmj.com/content/41/6/845.short> [Accessed October 11, 2016].
- BELL, M. R. 2014. Endocrine-disrupting actions of PCBs on brain development and social and reproductive behaviors. *Curr. Opin. Pharmacol.* 19: 134–144. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471489214001192> [Accessed October 11, 2016].
- BELOT, A., P. GROSCLAUDE, N. BOSSARD, E. JOUGLA, E. BENHAMOU, P. DELAFOSSE, A.-V. GUIZARD, F. MOLINIE, A. DANZON, S. BARA, and OTHERS. 2008. Cancer incidence and mortality in France over the period 1980–2005. *Rev. Épidémiologie Santé Publique* 56: 159–175. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0398762008003192> [Accessed October 11, 2016].
- BENAVENTE-GARCIA, O., and J. CASTILLO. 2008. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J. Agric. Food Chem.* 56: 6185–6205. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf8006568> [Accessed October 11, 2016].
- BERSTEN, D. C., A. E. SULLIVAN, D. J. PEET, and M. L. WHITELAW. 2013. bHLH–PAS proteins in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 13: 827–841. Available at: <http://www.nature.com/doi/abs/10.1038/nrc3621> [Accessed July 28, 2016].
- BERTAZZI, P. A., D. CONSONNI, S. BACHETTI, M. RUBAGOTTI, A. BACCARELLI, C. ZOCCHETTI, and A. C. PESATORI. 2001a. Health effects of dioxin exposure: a 20-year mortality study. *Am. J. Epidemiol.* 153: 1031–1044. Available at: <http://aje.oxfordjournals.org/content/153/11/1031.short> [Accessed October 11, 2016].
- BERTAZZI, P. A., D. CONSONNI, S. BACHETTI, M. RUBAGOTTI, A. BACCARELLI, C. ZOCCHETTI, and A. C. PESATORI. 2001b. Health effects of dioxin exposure: a 20-year mortality study. *Am. J. Epidemiol.* 153: 1031–1044. Available at: <http://aje.oxfordjournals.org/content/153/11/1031.short> [Accessed October 11, 2016].
- BIRON, C. A., K. B. NGUYEN, G. C. PIEN, L. P. COUSENS, and T. P. SALAZAR-MATHER. 1999. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 189–220. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.immunol.17.1.189> [Accessed October 10, 2016].
- BJELDANES, L. F., J.-Y. KIM, K. R. GROSE, J. C. BARTHOLOMEW, and C. A. BRADFIELD. 1991. Aromatic hydrocarbon responsiveness-receptor agonists generated from indole-3-carbinol in vitro and in vivo: comparisons with 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 9543–9547. Available at: <http://www.pnas.org/content/88/21/9543.short> [Accessed October 11, 2016].
- BLOBE, G. C., W. P. SCHIEMANN, and H. F. LODISH. 2000. Role of transforming growth factor  $\beta$  in human disease. *N. Engl. J. Med.* 342: 1350–1358. Available at: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM200005043421807> [Accessed October 11, 2016].
- BOFFETTA, P., K. A. MUNDT, H.-O. ADAMI, P. COLE, and J. S. MANDEL. 2011. TCDD and cancer: a critical review of epidemiologic studies. *Crit. Rev. Toxicol.* 41: 622–636. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10408444.2011.560141> [Accessed October 11, 2016].
- BOITANO, A. E., J. WANG, R. ROMEO, L. C. BOUCHEZ, A. E. PARKER, S. E. SUTTON, J. R. WALKER, C. A. FLAVENY, G. H. PERDEW, M. S. DENISON, and OTHERS. 2010. Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. *Science* 329: 1345–

1348. Available at: <http://science.sciencemag.org/content/329/5997/1345.short> [Accessed October 11, 2016].
- BOSRON, W. F., and T.-K. LI. 1986. Genetic polymorphism of human liver alcohol and aldehyde dehydrogenases, and their relationship to alcohol metabolism and alcoholism. *Hepatology* 6: 502–510. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.1840060330/full> [Accessed October 11, 2016].
- BOUCHER, M.-P., C. LEFEBVRE, and N. A. CHAPADOS. 2015. The effects of PCB126 on intra-hepatic mechanisms associated with non alcoholic fatty liver disease. *J. Diabetes Metab. Disord.* 14: 88.
- BRANTLEY, E., M. A. CALLERO, D. E. BERARDI, P. CAMPBELL, L. ROWLAND, D. ZYLSTRA, L. AMIS, M. YEE, M. SIMIAN, L. TODARO, A. I. LOAIZA-PEREZ, and U. SOTO. 2016. AhR ligand Aminoflavone inhibits  $\alpha 6$ -integrin expression and breast cancer sphere-initiating capacity. *Cancer Lett.* 376: 53–61.
- BRENNER, D. A., T. WATERBOER, S. K. CHOI, J. N. LINDQUIST, B. STEFANOVIC, E. BURCHARDT, M. YAMAUCHI, A. GILLAN, and R. A. RIPPE. 2000. New aspects of hepatic fibrosis. *J. Hepatol.* 32: 32–38. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168827800804134> [Accessed October 10, 2016].
- BRUNT, E. M., C. G. JANNEY, A. M. DI BISCEGLIE, B. A. NEUSCHWANDER-TETRI, and B. R. BACON. 1999. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am. J. Gastroenterol.* 94: 2467–2474. Available at: <http://www.nature.com/ajg/journal/v94/n9/abs/ajg1999597a.html> [Accessed October 10, 2016].
- BUSER, H. R., I. S. DOLEZAL, M. WOLFENSBERGER, and C. RAPPE. 1991. Polychlorodibenzothiophenes, the sulfur analogs of the polychlorodibenzofurans identified in incineration samples. *Environ. Sci. Technol.* 25: 1637–1643. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es00021a016> [Accessed October 11, 2016].
- B. WILLEY, J., and P. H. KRONE. 2001. Effects of endosulfan and nonylphenol on the primordial germ cell population in pre-larval zebrafish embryos. *Aquat. Toxicol.* 54: 113–123. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X00001788> [Accessed September 30, 2016].
- CALDWELL, S., and C. ARGO. 2010. The natural history of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig. Dis.* 28: 162–168. Available at: <http://www.karger.com/Article/Abstract/282081> [Accessed September 25, 2016].
- CAMACHO, I. A., N. SINGH, V. L. HEGDE, M. NAGARKATTI, and P. S. NAGARKATTI. 2005. Treatment of Mice with 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin Leads to Aryl Hydrocarbon Receptor-Dependent Nuclear Translocation of NF- $\kappa$ B and Expression of Fas Ligand in Thymic Stromal Cells and Consequent Apoptosis in T Cells. *J. Immunol.* 175: 90–103. Available at: <http://www.jimmunol.org/content/175/1/90> [Accessed May 20, 2014].
- CARMIEL-HAGGAI, M., A. I. CEDERBAUM, and N. NIETO. 2005. A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. *FASEB J.* 19: 136–138. Available at: <http://www.fasebj.org/content/19/1/136.short> [Accessed October 11, 2016].
- CASABAR, R. C., P. C. DAS, G. K. DEKREY, C. S. GARDINER, Y. CAO, R. L. ROSE, and A. D. WALLACE. 2010. Endosulfan induces CYP2B6 and CYP3A4 by activating the pregnane X receptor. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 245: 335–343. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X10001146> [Accessed October 11, 2016].
- CEDERBAUM, A. I. 2012. Alcohol metabolism. *Clin. Liver Dis.* 16: 667–685.

- CEDERBAUM, A. I., Y. LU, X. WANG, and D. WU. 2015. Synergistic toxic interactions between CYP2E1, LPS/TNF $\alpha$ , and JNK/p38 MAP kinase and their implications in alcohol-induced liver injury. *In* *Biological Basis of Alcohol-Induced Cancer*. pp. 145–172, Springer. Available at: [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-09614-8\\_9](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-09614-8_9) [Accessed October 11, 2016].
- CENGİZ, E. I., E. UNLÜ, and K. BALCI. 2001. The histopathological effects of thiodan on the liver and gut of mosquitofish, *Gambusia affinis*. *J. Environ. Sci. Health B* 36: 75–85.
- CENTIS, E., R. MARZOCCHI, A. SUPPINI, R. DALLE GRAVE, N. VILLANOVA, I. J. HICKMAN, and G. MARCHESINI. 2013. The role of lifestyle change in the prevention and treatment of NAFLD. *Curr. Pharm. Des.* 19: 5270–5279. Available at: <http://www.ingentaconnect.com/content/ben/cpd/2013/00000019/00000029/art00008> [Accessed October 10, 2016].
- CEREC, V., D. GLAISE, D. GARNIER, S. MOROSAN, B. TURLIN, B. DRENOU, P. GRIPON, D. KREMSDORF, C. GUGUEN-GUILLOUZO, and A. CORLU. 2007. Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor. *Hepatology* 45: 957–967. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.21536/abstract> [Accessed October 11, 2016].
- CHAKRABARTY, S., A. RAJAKUMAR, K. RAGHUVEER, P. SRIDEVI, A. MOHANACHARY, Y. PRATHIBHA, L. BASHYAM, A. DUTTA-GUPTA, and B. SENTHILKUMARAN. 2012. Endosulfan and flutamide, alone and in combination, target ovarian growth in juvenile catfish, *Clarias batrachus*. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.* CBP 155: 491–497.
- CHANG, H., D. HUYLEBROECK, K. VERSCHUEREN, Q. GUO, M. M. MATZUK, and A. ZWIJSEN. 1999. Smad5 knockout mice die at mid-gestation due to multiple embryonic and extraembryonic defects. *Development* 126: 1631–1642. Available at: <http://dev.biologists.org/content/126/8/1631> [Accessed October 11, 2016].
- CHANG, X., Y. FAN, S. KARYALA, S. SCHWEMBERGER, C. R. TOMLINSON, M. A. SARTOR, and A. PUGA. 2007. Ligand-Independent Regulation of Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 Expression and Cell Cycle Progression by the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Mol. Cell. Biol.* 27: 6127–6139. Available at: <http://mcb.asm.org/content/27/17/6127> [Accessed January 31, 2014].
- CHENG, Y., U.-H. JIN, C. D. ALLRED, A. JAYARAMAN, R. S. CHAPKIN, and S. SAFE. 2015. Aryl hydrocarbon receptor activity of tryptophan metabolites in young adult mouse colonocytes. *Drug Metab. Dispos.* 43: 1536–1543. Available at: <http://dmd.aspetjournals.org/content/43/10/1536.short> [Accessed November 2, 2016].
- CHEN, Y.-C., G.-S. PENG, M.-F. WANG, T.-P. TSAO, and S.-J. YIN. 2009. Polymorphism of ethanol-metabolism genes and alcoholism: correlation of allelic variations with the pharmacokinetic and pharmacodynamic consequences. *Chem. Biol. Interact.* 178: 2–7. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279708005681> [Accessed October 11, 2016].
- CHOUDHARY, G., and H. HANSEN. 1998. Human health perspective of environmental exposure to hydrazines: A review. *Chemosphere* 37: 801–843. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653598000885> [Accessed November 2, 2016].
- CHUANG, C.-Y., H. CHANG, P. LIN, S.-J. SUN, P.-H. CHEN, Y.-Y. LIN, G.-T. SHEU, J.-L. KO, S.-L. HSU, and J. T. CHANG. 2012. Up-regulation of osteopontin expression by aryl hydrocarbon receptor via both ligand-dependent and ligand-independent pathways in lung cancer. *Gene* 492: 262–269. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378111911005968> [Accessed October 11, 2016].
- CIUCLAN, L., S. EHNERT, I. ILKAVETS, H.-L. WENG, H. GAITANTZI, H. TSUKAMOTO, E. UEBERHAM, N. M. MEINDL-BEINKER, M. V. SINGER, K. BREITKOPF, and S. DOOLEY. 2010a. TGF-beta

- enhances alcohol dependent hepatocyte damage via down-regulation of alcohol dehydrogenase I. *J. Hepatol.* 52: 407–416.
- CIUCLAN, L., S. EHNERT, I. ILKAVETS, H.-L. WENG, H. GAITANTZI, H. TSUKAMOTO, E. UEERHAM, N. M. MEINDL-BEINKER, M. V. SINGER, K. BREITKOPF, and S. DOOLEY. 2010b. TGF- $\beta$  enhances alcohol dependent hepatocyte damage via down-regulation of alcohol dehydrogenase I. *J. Hepatol.* 407–416. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168827809008046> [Accessed January 29, 2014].
- COHEN, J. C., J. D. HORTON, and H. H. HOBBS. 2011. Human Fatty Liver Disease: Old Questions and New Insights. *Science* 332: 1519–1523. Available at: <http://www.sciencemag.org.gate2.inist.fr/content/332/6037/1519> [Accessed March 6, 2014].
- COLLINS, M. A., E. J. NEAFSEY, K. J. MUKAMAL, M. O. GRAY, D. A. PARKS, D. K. DAS, and R. J. KORTHUIS. 2009. Alcohol in moderation, cardioprotection, and neuroprotection: epidemiological considerations and mechanistic studies. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 33: 206–219. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1530-0277.2008.00828.x/full> [Accessed October 11, 2016].
- COMIJN, J., G. BERX, P. VERMASSEN, K. VERSCHUEREN, L. VAN GRUNSVEN, E. BRUYNEEL, M. MAREEL, D. HUYLEBROECK, and F. VAN ROY. 2001. The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol. Cell* 7: 1267–1278. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S109727650100260X> [Accessed October 11, 2016].
- CONSONNI, D., A. C. PESATORI, C. ZOCCHETTI, R. SINDACO, L. C. D'ORO, M. RUBAGOTTI, and P. A. BERTAZZI. 2008. Mortality in a population exposed to dioxin after the Seveso, Italy, accident in 1976: 25 years of follow-up. *Am. J. Epidemiol.* 167: 847–858. Available at: <http://aje.oxfordjournals.org/content/167/7/847.short> [Accessed October 11, 2016].
- CORCHERO, J., G. MARTIN-PARTIDO, S. L. DALLAS, and P. M. FERNANDEZ-SALGUERO. 2004. Liver portal fibrosis in dioxin receptor-null mice that overexpress the latent transforming growth factor-beta-binding protein-1. *Int. J. Exp. Pathol.* 85: 295–302.
- COUMOUL, X., M. DIRY, and R. BAROUKI. 2002. PXR-dependent induction of human CYP3A4 gene expression by organochlorine pesticides. *Biochem. Pharmacol.* 64: 1513–1519. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295202012984> [Accessed October 11, 2016].
- COUMOUL, X., M. DIRY, C. ROBILLOT, and R. BAROUKI. 2001. Differential regulation of cytochrome P450 1A1 and 1B1 by a combination of dioxin and pesticides in the breast tumor cell line MCF-7. *Cancer Res.* 61: 3942–3948. Available at: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/61/10/3942.short> [Accessed October 11, 2016].
- CRESPO, I., M. V. GARCIA-MEDIAVILLA, M. ALMAR, P. GONZALEZ, M. J. TUÑÓN, S. SANCHEZ-CAMPOS, and J. GONZALEZ-GALLEGO. 2008. Differential effects of dietary flavonoids on reactive oxygen and nitrogen species generation and changes in antioxidant enzyme expression induced by proinflammatory cytokines in Chang Liver cells. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 46: 1555–1569.
- CREWS, S. T. 1998. Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins. *Genes Dev.* 12: 607–620. Available at: <http://genesdev.cshlp.org/content/12/5/607.short> [Accessed October 11, 2016].
- CRINNION, W. J. 2011. The Role of persistent organic pollutants in the worldwide epidemic of type 2 diabetes mellitus and the possible connection to farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Altern. Med. Rev.* 16: 301–314. Available at: <http://go.galegroup.com/ps/i.do?id=GALE%7CA277520354&sid=googleScholar&v=2.1&it=>

- r&linkaccess=fulltext&issn=10895159&p=AONE&sw=w [Accessed October 11, 2016].
- DALLAS, S. L., K. MIYAZONO, T. M. SKERRY, G. R. MUNDY, and L. F. BONEWALD. 1995. Dual role for the latent transforming growth factor-beta binding protein in storage of latent TGF-beta in the extracellular matrix and as a structural matrix protein. *J. Cell Biol.* 131: 539–549. Available at: <http://jcb.rupress.org/content/131/2/539.abstract> [Accessed October 11, 2016].
- DAS, S. K., S. MUKHERJEE, D. M. VASUDEVAN, and V. BALAKRISHNAN. 2011. Comparison of haematological parameters in patients with non-alcoholic fatty liver disease and alcoholic liver disease. *Singapore Med. J.* 52: 175–181. Available at: <http://apamedcentral.org/search.php?where=aview&id=10.0000%2Fsmj.2011.52.3.175&code=0022SMJ&vmode=FULL> [Accessed October 31, 2016].
- DAVARINOS, N. A., and R. S. POLLENZ. 1999. Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export. *J. Biol. Chem.* 274: 28708–28715. Available at: <http://www.jbc.org/content/274/40/28708.short> [Accessed October 11, 2016].
- DAY, C. P. 2007. Treatment of alcoholic liver disease. *Liver Transpl.* 13. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/lt.21336/full> [Accessed October 11, 2016].
- DAY, C. P., and O. F. JAMES. 1998. Steatohepatitis: a tale of two “hits”? *Gastroenterology* 114: 842–845. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016508598705992> [Accessed October 11, 2016].
- DEL BEN, M., L. POLIMENI, F. BARATTA, D. PASTORI, L. LOFFREDO, and F. ANGELICO. 2014. Modern approach to the clinical management of non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 20: 8341–8350. Available at: <http://www.wjgnet.com/esps/DownloadFile.aspx?Type=Digital&SubType=1&DOI=10.3748%2Fwjg.v20.i26.8341&FilePath=Pub%5C10.3748%5Cv20%5Ci26%5CWJG-20-8341.pdf> [Accessed October 10, 2016].
- DELLA PORTA, G., T. A. DRAGANI, and G. SOZZI. 1987. Carcinogenic effects of infantile and long-term 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin treatment in the mouse. *Tumori* 73: 99–107.
- DERSCH, H., and M. H. ZILE. 1993. Induction of Normal Cardiovascular Development in the Vitamin A-Deprived Quail Embryo by Natural Retinoids. *Dev. Biol.* 160: 424–433. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160683713187> [Accessed October 6, 2016].
- DERYNCK, R., and Y. E. ZHANG. 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- $\beta$  family signalling. *Nature* 425: 577–584. Available at: <http://www.nature.com.gate2.inist.fr/nature/journal/v425/n6958/full/nature02006.html> [Accessed May 24, 2016].
- DHAKAL, K., E. UWIMANA, A. ADAMCAKOVA-DODD, P. S. THORNE, H.-J. LEHMLER, and L. W. ROBERTSON. 2014. Disposition of phenolic and sulfated metabolites after inhalation exposure to 4-chlorobiphenyl (PCB3) in female rats. *Chem. Res. Toxicol.* 27: 1411–1420. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/tx500150h> [Accessed October 11, 2016].
- DICKSON, M. C., J. S. MARTIN, F. M. COUSINS, A. B. KULKARNI, S. KARLSSON, and R. J. AKHURST. 1995. Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Development* 121: 1845–1854. Available at: <http://dev.biologists.org/content/develop/121/6/1845.full.pdf> [Accessed October 11, 2016].
- TEN DIJKE, P., and H. M. ARTHUR. 2007. Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 857–869.
- DILIBERTO, J. J., D. E. BURGIN, and L. S. BIRNBAUM. 1999. Effects of CYP1A2 on disposition of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, 2, 3, 4, 7, 8-pentachlorodibenzofuran, and 2, 2', 4, 4', 5, 5'-

- hexachlorobiphenyl in CYP1A2 knockout and parental (C57BL/6N and 129/Sv) strains of mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 159: 52–64. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X99987203> [Accessed October 11, 2016].
- DI MEGLIO, P., J. H. DUARTE, H. AHLFORS, N. D. OWENS, Y. LI, F. VILLANOVA, I. TOSI, K. HIROTA, F. O. NESTLE, U. MROWIETZ, and OTHERS. 2014. Activation of the aryl hydrocarbon receptor dampens the severity of inflammatory skin conditions. *Immunity* 40: 989–1001. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074761314001836> [Accessed October 11, 2016].
- DRAGIN, N., T. P. DALTON, M. L. MILLER, H. G. SHERTZER, and D. W. NEBERT. 2006. For Dioxin-induced Birth Defects, Mouse or Human CYP1A2 in Maternal Liver Protects whereas Mouse CYP1A1 and CYP1B1 Are Inconsequential. *J. Biol. Chem.* 281: 18591–18600. Available at: <http://www.jbc.org/content/281/27/18591> [Accessed October 8, 2016].
- DUCHEIX, S., M. C. VEGLIANTE, G. VILLANI, N. NAPOLI, C. SABBA, and A. MOSCHETTA. 2016. Is hepatic lipogenesis fundamental for NAFLD/NASH? A focus on the nuclear receptor coactivator PGC-1 $\beta$ . *Cell. Mol. Life Sci.* 1–14. Available at: <http://link.springer.com.gate2.inist.fr/article/10.1007/s00018-016-2331-x> [Accessed September 8, 2016].
- DUTTA, H. M., and D. A. ARENDS. 2003. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. *Environ. Res.* 91: 157–162. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013935102000622> [Accessed October 11, 2016].
- DUVAL, C., F. TEIXEIRA-CLERC, A. F. LEBLANC, S. TOUCH, C. EMOND, M. GUERRE-MILLO, S. LOTERSZTAJN, R. BAROUKI, M. AGGERBECK, and X. COUMOUL. 2016. Chronic Exposure to Low Doses of Dioxin Promotes Liver Fibrosis Development in the C57BL6/J Diet-Induced Obesity Mouse Model. *Environ. Health Perspect.*
- DYKE, P. H., C. FOAN, and H. FIEDLER. 2003. PCB and PAH releases from power stations and waste incineration processes in the UK. *Chemosphere* 50: 469–480. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653502006276> [Accessed October 10, 2016].
- DYSON, J. K., Q. M. ANSTEE, and S. MCPHERSON. 2014. Non-alcoholic fatty liver disease: a practical approach to treatment. *Frontline Gastroenterol.* 5: 277–286. Available at: <http://fg.bmj.com/content/5/4/277.short> [Accessed October 10, 2016].
- EDENBERG, H. J. 2000. Regulation of the mammalian alcohol dehydrogenase genes. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 64: 295–341. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079660300640084> [Accessed October 11, 2016].
- EFSA, A. 2013. Panel (EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food), 2013. *Sci. Opin. Re-Eval. Aspartame E 951 Food Addit. EFSA J.* 11: 3496.
- EKINS, S., and E. SCHUETZ. 2002. The PXR crystal structure: the end of the beginning. *Trends Pharmacol. Sci.* 23: 49–50. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165614702019776> [Accessed October 3, 2016].
- ELENITOBA-JOHNSON, K. S., S. D. BOHLING, S. D. JENSON, Z. LIN, K. A. MONNIN, and M. S. LIM. 2002. Fluorescence PCR quantification of cyclin D1 expression. *J. Mol. Diagn.* 4: 90–96. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1525157810606861> [Accessed October 11, 2016].
- ELLMANN, S., H. STICHT, F. THIEL, M. W. BECKMANN, R. STRICK, and P. L. STRISSEL. 2009.

- Estrogen and progesterone receptors: from molecular structures to clinical targets. *Cell. Mol. Life Sci.* 66: 2405–2426. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00018-009-0017-3> [Accessed October 11, 2016].
- EMA, M., N. OHE, M. SUZUKI, J. MIMURA, K. SOGAWA, S. IKAWA, and Y. FUJII-KURIYAMA. 1994. Dioxin binding activities of polymorphic forms of mouse and human arylhydrocarbon receptors. *J. Biol. Chem.* 269: 27337–27343. Available at: <http://www.jbc.org/content/269/44/27337.short> [Accessed October 11, 2016].
- EYER, F., N. FELGENHAUER, E. JETZINGER, R. PFAB, and T. R. ZILKER. 2004. Acute endosulfan poisoning with cerebral edema and cardiac failure. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 42: 927–932.
- FAUST, J. R., J. L. GOLDSTEIN, and M. S. BROWN. 1977. Receptor-mediated uptake of low density lipoprotein and utilization of its cholesterol for steroid synthesis in cultured mouse adrenal cells. *J. Biol. Chem.* 252: 4861–4871. Available at: <http://www.jbc.org/content/252/14/4861> [Accessed October 4, 2016].
- FERNANDEZ-SALGUERO, P. M., D. M. HILBERT, S. RUDIKOFF, J. M. WARD, and F. J. GONZALEZ. 1996. Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 140: 173–179. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X96902100> [Accessed October 11, 2016].
- FERNANDEZ-SALGUERO, P., T. PINEAU, D. M. HILBERT, T. MCPHAIL, S. S. LEE, S. KIMURA, D. W. NEBERT, S. RUDIKOFF, J. M. WARD, and F. J. GONZALEZ. 1995. Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science* 268: 722–726.
- FIEDLER, H. 2007. National PCDD/PCDF release inventories under the Stockholm convention on persistent organic pollutants. *Chemosphere* 67: S96–S108. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653506016006> [Accessed October 11, 2016].
- FINK, S. P., D. MIKKOLA, J. K. WILLSON, and S. MARKOWITZ. 2003. TGF- $\beta$ -induced nuclear localization of Smad2 and Smad3 in Smad4 null cancer cell lines. *Oncogene* 22: 1317–1323. Available at: <http://www.nature.com/onc/journal/v22/n9/full/1206128a.html> [Accessed October 11, 2016].
- FLETCHER, N., A. HANBERG, and H. HÅKANSSON. 2001. Hepatic Vitamin A Depletion Is a Sensitive Marker of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) Exposure in Four Rodent Species. *Toxicol. Sci.* 62: 166–175. Available at: <http://toxsci.oxfordjournals.org/content/62/1/166> [Accessed September 27, 2016].
- FORGACS, A. L., E. DERE, M. M. ANGRISH, and T. R. ZACHAREWSKI. 2013. Comparative Analysis of Temporal and Dose-Dependent TCDD-Elicited Gene Expression in Human, Mouse and Rat Primary Hepatocytes. *Toxicol. Sci.* Available at: <http://toxsci.oxfordjournals.org/content/early/2013/02/15/toxsci.kft028> [Accessed February 20, 2013].
- FROLIK, C. A., A. B. ROBERTS, T. E. TAVELA, P. P. ROLLER, D. L. NEWTON, and M. B. SPORN. 1979. Isolation and identification of 4-hydroxy- and 4-oxoretinoic acid. In vitro metabolites of all-trans-retinoic acid in hamster trachea and liver. *Biochemistry (Mosc.)* 18: 2092–2097. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00577a039> [Accessed October 11, 2016].
- FUKUMOTO, S., T. TOSHIMITSU, S. MATSUOKA, A. MARUYAMA, K. OH-OKA, T. TAKAMURA, Y. NAKAMURA, K. ISHIMARU, Y. FUJII-KURIYAMA, S. IKEGAMI, and OTHERS. 2014. Identification of a probiotic bacteria-derived activator of the aryl hydrocarbon receptor that inhibits colitis. *Immunol. Cell Biol.* 92: 460. Available at: <http://search.proquest.com/openview/44bf8344218f238640217d898af38539/1?pq-origsite=gscholar&cbl=2041954> [Accessed October 11, 2016].



- GALLEGO, O., O. V. BELYAEVA, S. PORTE, F. X. RUIZ, A. V. STETSENKO, E. V. SHABROVA, N. V. KOSTEREVA, J. FARRES, X. PARES, and N. Y. KEDISHVILI. 2006. Comparative functional analysis of human medium-chain dehydrogenases, short-chain dehydrogenases/reductases and aldo-keto reductases with retinoids. *Biochem. J.* 399: 101–109. Available at: <http://www.biochemj.org/content/399/1/101.abstract> [Accessed October 11, 2016].
- GALVIN, K. M., M. J. DONOVAN, C. A. LYNCH, R. I. MEYER, R. J. PAUL, J. N. LORENZ, V. FAIRCHILD-HUNTRESS, K. L. DIXON, J. H. DUNMORE, M. A. GIMBRONE, D. FALB, and D. HUSZAR. 2000. A role for Smad6 in development and homeostasis of the cardiovascular system. *Nat. Genet.* 24: 171–174. Available at: [http://www.nature.com/ng/journal/v24/n2/full/ng0200\\_171.html](http://www.nature.com/ng/journal/v24/n2/full/ng0200_171.html) [Accessed October 11, 2016].
- GAO, B., and R. BATALLER. 2011. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology* 141: 1572–1585.
- GAO, J., and W. XIE. 2010. Pregnane X Receptor and Constitutive Androstane Receptor at the Crossroads of Drug Metabolism and Energy Metabolism. *Drug Metab. Dispos.* 38: 2091–2095. Available at: <http://dmd.aspetjournals.org/content/38/12/2091> [Accessed June 5, 2013].
- GASIEWICZ, T. A., A. S. KENDE, G. RUCCI, B. WHITNEY, and J. J. WILLEY. 1996. Analysis of structural requirements for Ah receptor antagonist activity: ellipticines, flavones, and related compounds. *Biochem. Pharmacol.* 52: 1787–1803. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295296006004> [Accessed October 11, 2016].
- GIANNELLI, G., E. VILLA, and M. LAHN. 2014. Transforming growth factor- $\beta$  as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 74: 1890–1894.
- GILL, T. S., J. PANDE, and H. TEWARI. 1991. Effects of endosulfan on the blood and organ chemistry of freshwater fish, *Barbus conchoni* Hamilton. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 21: 80–91.
- GLAUERT, H. P., L. W. ROBERTSON, and E. M. SILBERHORN. 2001. PCBs and tumor promotion. *PCBs Recent Adv. Environ. Toxicol. Health Eff.* 2001: 355–371. Available at: <https://books.google.fr/books?hl=fr&lr=&id=g9i7AiYR8GsC&oi=fnd&pg=PA355&dq=Silberhorn+AND+PCB+126+tumor&ots=nJHNGtx5Hx&sig=-aO9CIknQxi6uCB2jF4Q20dML7c> [Accessed October 11, 2016].
- GLUSCHNAIDER, U., G. HIDAS, G. COJOCARU, V. YUTKIN, Y. BEN-NERIAH, and E. PIKARSKY. 2010.  $\beta$ -TrCP Inhibition Reduces Prostate Cancer Cell Growth via Upregulation of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *PloS One* 5: e9060. Available at: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0009060> [Accessed October 11, 2016].
- GOEBEL, H., S. GORBACH, W. KNAUF, R. H. RIMPAU, and H. HÜTTENBACH. 1982. Properties, effects, residues, and analytics of the insecticide endosulfan. *Residue Rev.* 83: 1–174.
- GOUEDARD, C., R. BAROUKI, and Y. MOREL. 2004a. Dietary polyphenols increase paraoxonase 1 gene expression by an aryl hydrocarbon receptor-dependent mechanism. *Mol. Cell. Biol.* 24: 5209–5222. Available at: <http://mcb.asm.org/content/24/12/5209.short> [Accessed October 11, 2016].
- GOUEDARD, C., R. BAROUKI, and Y. MOREL. 2004b. Induction of the paraoxonase-1 gene expression by resveratrol. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24: 2378–2383.
- GOUMANS, M. J., and C. MUMMERY. 2002. Functional analysis of the TGF $\beta$  receptor/Smad pathway through gene ablation in mice. *Int. J. Dev. Biol.* 44: 253–265. Available at: <http://www.ijdb.ehu.es/web/paper/10853822> [Accessed October 11, 2016].
- GRANDEL, H., K. LUN, G.-J. RAUCH, M. RHINN, T. PIOTROWSKI, C. HOUART, P. SORDINO, A. M. KÜCHLER, S. SCHULTE-MERKER, R. GEISLER, and OTHERS. 2002. Retinoic acid signalling in the

- zebrafish embryo is necessary during pre-segmentation stages to pattern the anterior-posterior axis of the CNS and to induce a pectoral fin bud. *Development* 129: 2851–2865. Available at: <http://dev.biologists.org/content/129/12/2851.short> [Accessed October 11, 2016].
- GRASSMAN, J. A., S. A. MASTEN, N. J. WALKER, and G. W. LUCIER. 1998. Animal models of human response to dioxins. *Environ. Health Perspect.* 106 Suppl 2: 761–775. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9599728> [Accessed June 4, 2012].
- GREIM, L. W. W. H. 1997. The toxicity of brominated and mixed-halogenated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans: an overview. *J. Toxicol. Environ. Health A* 50: 195–216. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/009841097160456> [Accessed October 11, 2016].
- GRESSNER, O. A., and A. M. GRESSNER. 2008. Connective tissue growth factor: a fibrogenic master switch in fibrotic liver diseases. *Liver Int.* 28: 1065–1079. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1478-3231.2008.01826.x/full> [Accessed October 11, 2016].
- GRIPON, P., S. RUMIN, S. URBAN, J. L. SEYEC, D. GLAISE, I. CANNIE, C. GUYOMARD, J. LUCAS, C. TREPO, and C. GUGUEN-GUILLOUZO. 2002. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 15655–15660. Available at: <http://www.pnas.org/content/99/24/15655> [Accessed October 11, 2016].
- GUNNESS, P., D. MUELLER, V. SHEVCHENKO, E. HEINZLE, M. INGELMAN-SUNDBERG, and F. NOOR. 2013. 3D Organotypic Cultures of Human HepaRG Cells: A Tool for In Vitro Toxicity Studies. *Toxicol. Sci.* 133: 67–78. Available at: <http://toxsci.oxfordjournals.org/content/133/1/67> [Accessed October 4, 2016].
- HACK, R., E. EBERT, and K.-H. LEIST. 1995. Chronic toxicity and carcinogenicity studies with the insecticide endosulfan in rats and mice. *Food Chem. Toxicol.* 33: 941–950. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0278691595000638> [Accessed May 20, 2014].
- HAKK, H., J. J. DILIBERTO, and L. S. BIRNBAUM. 2009. The effect of dose on 2, 3, 7, 8-TCDD tissue distribution, metabolism and elimination in CYP1A2 (-/-) knockout and C57BL/6N parental strains of mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 241: 119–126. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X09003457> [Accessed October 11, 2016].
- HANKINSON, O. 1995. The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35: 307–340. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.pa.35.040195.001515> [Accessed October 11, 2016].
- HART, S. N., Y. LI, K. NAKAMOTO, E. SUBILEAU, D. STEEN, and X. ZHONG. 2010. A comparison of whole genome gene expression profiles of HepaRG cells and HepG2 cells to primary human hepatocytes and human liver tissues. *Drug Metab. Dispos.* 38: 988–994. Available at: <http://dmd.aspetjournals.org/content/38/6/988.short> [Accessed October 11, 2016].
- HASSANINASAB, A., Y. HASHIMOTO, K. TOMITA-YOKOTANI, and M. KOBAYASHI. 2011. Discovery of the curcumin metabolic pathway involving a unique enzyme in an intestinal microorganism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108: 6615–6620. Available at: <http://www.pnas.org/content/108/16/6615.short> [Accessed November 2, 2016].
- HASSAN, K., V. BHALLA, M. E. EL REGAL, and H. H. A-KADER. 2014. Nonalcoholic fatty liver disease: a comprehensive review of a growing epidemic. *World J Gastroenterol* 20: 12082–12101. Available at: <http://www.wjgnet.com/esps/DownloadFile.aspx?Type=Digital&SubType=1&DOI=10.3748%2Fwjg.v20.i34.12082&FilePath=Pub%5C10.3748%5Cv20%5Ci34%5CWJG-20-12082.pdf> [Accessed October 10, 2016].

- HEDBERG, J. J., W. J. GRIFFITHS, S. J. NILSSON, and J.-O. HÖÖG. 2003. Reduction of S-nitrosoglutathione by human alcohol dehydrogenase 3 is an irreversible reaction as analysed by electrospray mass spectrometry. *Eur. J. Biochem.* 270: 1249–1256. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1432-1033.2003.03486.x/full> [Accessed October 11, 2016].
- HEINBUCH, D., and L. STIEGLITZ. 1993. Formation of brominated compounds on fly ash. *Chemosphere* 27: 317–324. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/004565359390308R> [Accessed October 11, 2016].
- HUANG, P., V. CHANDRA, and F. RASTINEJAD. 2010. Structural Overview of the Nuclear Receptor Superfamily: Insights into Physiology and Therapeutics. *Annu. Rev. Physiol.* 72: 247–272. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3677810/> [Accessed October 6, 2016].
- HU, D., A. MARTINEZ, and K. C. HORNBuckle. 2011. Sedimentary records of non-Aroclor and Aroclor PCB mixtures in the Great Lakes. *J. Gt. Lakes Res.* 37: 359–364. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0380133011000529> [Accessed October 11, 2016].
- HUNG, H., A. A. KATSOYIANNIS, E. BRORSTRÖM-LUNDEN, K. OLAFSDOTTIR, W. AAS, K. BREIVIK, P. BOHLIN-NIZZETTO, A. SIGURDSSON, H. HAKOLA, R. BOSSI, H. SKOV, E. SVERKO, E. BARRESI, P. FELLIN, and S. WILSON. 2016. Temporal trends of Persistent Organic Pollutants (POPs) in arctic air: 20 years of monitoring under the Arctic Monitoring and Assessment Programme (AMAP). *Environ. Pollut.* 217: 52–61. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749116300793> [Accessed September 25, 2016].
- HUSAIN, K., J. MEJIA, J. LALLA, and S. KAZIM. 2005. Dose response of alcohol-induced changes in BP, nitric oxide and antioxidants in rat plasma. *Pharmacol. Res.* 51: 337–343. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661804002506> [Accessed October 11, 2016].
- HUSE, M., Y.-G. CHEN, J. MASSAGUE, and J. KURIYAN. 1999. Crystal structure of the cytoplasmic domain of the type I TGF  $\beta$  receptor in complex with FKBP12. *Cell* 96: 425–436. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867400805553> [Accessed October 11, 2016].
- HUWE, J. K. 2002. Dioxins in food: a modern agricultural perspective. *J. Agric. Food Chem.* 50: 1739–1750.
- INMAN, G. J., F. J. NICOLAS, J. F. CALLAHAN, J. D. HARLING, L. M. GASTER, A. D. REITH, N. J. LAPING, and C. S. HILL. 2002. SB-431542 Is a Potent and Specific Inhibitor of Transforming Growth Factor- $\beta$  Superfamily Type I Activin Receptor-Like Kinase (ALK) Receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol. Pharmacol.* 62: 65–74. Available at: <http://molpharm.aspetjournals.org/content/62/1/65> [Accessed January 30, 2014].
- INUI, H., T. ITOH, K. YAMAMOTO, S.-I. IKUSHIRO, and T. SAKAKI. 2014. Mammalian Cytochrome P450-Dependent Metabolism of Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins and Coplanar Polychlorinated Biphenyls. *Int. J. Mol. Sci.* 15: 14044–14057. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4159838/> [Accessed June 30, 2016].
- ISHIDA, M., S. MIKAMI, E. KIKUCHI, T. KOSAKA, A. MIYAJIMA, K. NAKAGAWA, M. MUKAI, Y. OKADA, and M. OYA. 2010. Activation of the aryl hydrocarbon receptor pathway enhances cancer cell invasion by upregulating the MMP expression and is associated with poor prognosis in upper urinary tract urothelial cancer. *Carcinogenesis* 31: 287–295. Available at: <http://carcin.oxfordjournals.org/content/31/2/287.short> [Accessed October 11, 2016].

- ISRAEL, Y., J. M. KHANNA, and R. LIN. 1970. Effect of 2, 4-dinitrophenol on the rate of ethanol elimination in the rat in vivo. *Biochem. J.* 120: 447. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1179619/> [Accessed October 11, 2016].
- JACOBSON, S. W., G. G. FEIN, J. L. JACOBSON, P. M. SCHWARTZ, and J. K. DOWLER. 1985. The effect of intrauterine PCB exposure on visual recognition memory. *Child Dev.* 853–860. Available at: <http://www.jstor.org/stable/1130097> [Accessed October 11, 2016].
- JAFFRAIN-REA, M.-L., M. ANGELINI, D. GARGANO, M. A. TICHOMIROWA, A. F. DALY, J.-F. VANBELLINGHEN, E. D'INNOCENZO, A. BARLIER, F. GIANGASPERO, V. ESPOSITO, and OTHERS. 2009. Expression of aryl hydrocarbon receptor (AHR) and AHR-interacting protein in pituitary adenomas: pathological and clinical implications. *Endocr. Relat. Cancer* 16: 1029–1043. Available at: <http://erc.endocrinology-journals.org/content/16/3/1029.short> [Accessed October 11, 2016].
- JANG, C.-W., C.-H. CHEN, C.-C. CHEN, J. CHEN, Y.-H. SU, and R.-H. CHEN. 2002. TGF- $\beta$  induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase. *Nat. Cell Biol.* 4: 51–58. Available at: <http://www.nature.com/ncb/journal/v4/n1/full/ncb731.html> [Accessed October 11, 2016].
- JAYASHREE, R., and N. VASUDEVAN. 2007. Effect of tween 80 added to the soil on the degradation of endosulfan by *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 4: 203–210. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1007/BF03326275> [Accessed October 11, 2016].
- JIN, U.-H., S. LEE, and S. SAFE. 2012. Aryl hydrocarbon receptor (AHR)-active pharmaceuticals are selective AHR modulators in MDA-MB-468 and BT474 breast cancer cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 343: 333–341.
- JOLY, C., J. GAY-QUEHEILLARD, A. LEKE, K. CHARDON, S. DELANAUD, V. BACH, and H. KHORSI-CAUET. 2013. Impact of chronic exposure to low doses of chlorpyrifos on the intestinal microbiota in the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME) and in the rat. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 20: 2726–2734.
- JÖRNVALL, H., J. HEDLUND, T. BERGMAN, Y. KALLBERG, E. CEDERLUND, and B. PERSSON. 2013. Origin and evolution of medium chain alcohol dehydrogenases. *Chem. Biol. Interact.* 202: 91–96. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279712002529> [Accessed June 24, 2014].
- JOSSE, R., C. ANINAT, D. GLAISE, J. DUMONT, V. FESSARD, F. MOREL, J.-M. POUL, C. GUGUEN-GUILLOUZO, and A. GUILLOUZO. 2008. Long-term functional stability of human HepaRG hepatocytes and use for chronic toxicity and genotoxicity studies. *Drug Metab. Dispos.* 36: 1111–1118. Available at: <http://dmd.aspetjournals.org/content/36/6/1111.short> [Accessed October 11, 2016].
- KAMIMURA, S., and H. TSUKAMOTO. 1995. Cytokine gene expression by Kupffer cells in experimental alcoholic liver disease. *Hepatology* 22: 1304–1309. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.1840220441/full> [Accessed October 10, 2016].
- KANEBRATT, K. P., and T. B. ANDERSSON. 2008. Evaluation of HepaRG cells as an in vitro model for human drug metabolism studies. *Drug Metab. Dispos.* 36: 1444–1452. Available at: <http://dmd.aspetjournals.org/content/36/7/1444.short> [Accessed October 11, 2016].
- KANG, Y., C.-R. CHEN, and J. MASSAGUE. 2003. A self-enabling TGF $\beta$  response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol. Cell* 11: 915–926. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276503001096> [Accessed October 11, 2016].
- KAPITULNIK, J. 2004. Bilirubin: an endogenous product of heme degradation with both cytotoxic and cytoprotective properties. *Mol. Pharmacol.* 66: 773–779. Available at:

- <http://molpharm.aspetjournals.org/content/66/4/773.short> [Accessed October 11, 2016].
- KARIM, M. F., M. AL-MAHTAB, S. RAHMAN, and C. R. DEBNATH. 2015. Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)-A Review. *Mymensingh Med. J. MMJ* 24: 873–880. Available at: <http://europepmc.org/abstract/med/26620035> [Accessed October 10, 2016].
- KATCHAMART, S., and D. E. WILLIAMS. 2001. Indole-3-carbinol modulation of hepatic monooxygenases CYP1A1, CYP1A2 and FMO1 in guinea pig, mouse and rabbit. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 129: 377–384. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1532045601002174> [Accessed October 11, 2016].
- KAWAI, Y. K., Y. IKENAKA, S. FUJITA, and M. ISHIZUKA. 2010. The CYP1D subfamily of genes in mammals and other vertebrates. *Mamm. Genome* 21: 320–329. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00335-010-9263-9> [Accessed October 11, 2016].
- KERKVLJET, N. I. 2009. AHR-mediated immunomodulation: the role of altered gene transcription. *Biochem. Pharmacol.* 77: 746–760. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295208007958> [Accessed October 11, 2016].
- KEWLEY, R. J., M. L. WHITELAW, and A. CHAPMAN-SMITH. 2004. The mammalian basic helix–loop–helix/PAS family of transcriptional regulators. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36: 189–204. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357272503002115> [Accessed September 22, 2016].
- KIMBROUGH, R. D., and C. A. KROUSKAS. 2003. Human Exposure to Polychlorinated Biphenyls and Health Effects. *Toxicol. Rev.* 22: 217–233. Available at: <http://link.springer.com/article/10.2165/00139709-200322040-00004> [Accessed October 11, 2016].
- KIM, K. S., Y. HIRAI, M. KATO, K. URANO, and S. MASUNAGA. 2004. Detailed PCB congener patterns in incinerator flue gas and commercial PCB formulations (Kanechlor). *Chemosphere* 55: 539–553. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653503011998> [Accessed October 10, 2016].
- KISH, L., N. HOTTE, G. G. KAPLAN, R. VINCENT, R. TSO, M. GÄNZLE, K. P. RIOUX, A. THIESEN, H. W. BARKEMA, E. WINE, and K. L. MADSEN. 2013. Environmental particulate matter induces murine intestinal inflammatory responses and alters the gut microbiome. *PloS One* 8: e62220.
- KLAREN, W. D., S. FLOR, K. N. GIBSON-CORLEY, G. LUDEWIG, and L. W. ROBERTSON. 2016. Metallothionein’s role in PCB126 induced hepatotoxicity and hepatic micronutrient disruption. *Toxicol. Rep.* 3: 21–28.
- KLAREN, W. D., G. S. GADUPUDI, B. WELS, D. L. SIMMONS, A. K. OLIVIER, and L. W. ROBERTSON. 2015. Progression of micronutrient alteration and hepatotoxicity following acute PCB126 exposure. *Toxicology* 338: 1–7. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300483X15300366> [Accessed October 11, 2016].
- KLINGE, C. M., S. C. JERNIGAN, K. A. MATTINGLY, K. E. RISINGER, and J. ZHANG. 2004. Estrogen response element-dependent regulation of transcriptional activation of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  by coactivators and corepressors. *J. Mol. Endocrinol.* 33: 387–410.
- KOCIBA, R. J., D. J. KEYES, J. E. BEYER, and R. M. CARREON. 1978. Toxicologic studies of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in rats. *Toxicol. Occup. Med.* 4: 281–287.
- KOLIOPANOS, A., J. KLEEFF, Y. XIAO, S. SAFE, A. ZIMMERMANN, M. W. BUECHLER, and H. FRIESS. 2002. Increased arylhydrocarbon receptor expression offers a potential therapeutic target for

- pancreatic cancer. *Oncogene* 21: 6059–6070. Available at: [https://www.researchgate.net/profile/Joerg\\_Kleeff/publication/11185727\\_Increased\\_aryl\\_hydrocarbon\\_receptor\\_expression\\_offers\\_a\\_potential\\_therapeutic\\_target\\_in\\_pancreatic\\_cancer/links/53e9c5100cf2dc24b3cad303.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Joerg_Kleeff/publication/11185727_Increased_aryl_hydrocarbon_receptor_expression_offers_a_potential_therapeutic_target_in_pancreatic_cancer/links/53e9c5100cf2dc24b3cad303.pdf) [Accessed October 11, 2016].
- KRISHNAN, V., X. WANG, and S. SAFE. 1994. Estrogen receptor-Sp1 complexes mediate estrogen-induced cathepsin D gene expression in MCF-7 human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 269: 15912–15917. Available at: <http://www.jbc.org/content/269/22/15912.short> [Accessed October 11, 2016].
- KUMAR, S., L. L. SANDELL, P. A. TRAINOR, F. KOENTGEN, and G. DUESTER. 2012. Alcohol and aldehyde dehydrogenases: Retinoid metabolic effects in mouse knockout models. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1821: 198–205. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1388198111000473> [Accessed October 9, 2016].
- KUMAR, S., J. WANG, R. RANI, and C. R. GANDHI. 2016. Hepatic Deficiency of Augmenter of Liver Regeneration Exacerbates Alcohol-Induced Liver Injury and Promotes Fibrosis in Mice. *PLOS ONE* 11: e0147864. Available at: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0147864> [Accessed September 2, 2016].
- KUZU, S. L., A. SARAL, G. GÜNES, and A. KARADENİZ. 2016. Evaluation of background soil and air polychlorinated biphenyl (PCB) concentrations on a hill at the outskirts of a metropolitan city. *Chemosphere* 154: 79–89. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653516304131> [Accessed July 13, 2016].
- LAHVIS, G. P., S. L. LINDELL, R. S. THOMAS, R. S. MCCUSKEY, C. MURPHY, E. GLOVER, M. BENTZ, J. SOUTHARD, and C. A. BRADFIELD. 2000. Portosystemic shunting and persistent fetal vascular structures in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 10442–10447. Available at: <http://www.pnas.org/content/97/19/10442.short> [Accessed October 11, 2016].
- LAI, I., Y. CHAI, D. SIMMONS, G. LUTHE, M. C. COLEMAN, D. SPITZ, W. M. HASCHEK, G. LUDEWIG, and L. W. ROBERTSON. 2010. Acute toxicity of 3, 3', 4, 4', 5-pentachlorobiphenyl (PCB 126) in male Sprague–Dawley rats: effects on hepatic oxidative stress, glutathione and metals status. *Environ. Int.* 36: 918–923. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412009002323> [Accessed October 11, 2016].
- LARSSON, J., M.-J. GOUMANS, L. J. SJÖSTRAND, M. A. VAN ROOIJEN, D. WARD, P. LEVEEN, X. XU, P. TEN DIJKE, C. L. MUMMERY, and S. KARLSSON. 2001. Abnormal angiogenesis but intact hematopoietic potential in TGF- $\beta$  type I receptor-deficient mice. *EMBO J.* 20: 1663–1673. Available at: <http://emboj.embopress.org/content/20/7/1663.abstract> [Accessed October 11, 2016].
- LATCHNEY, S. E., D. T. LIOY, E. C. HENRY, T. A. GASIEWICZ, F. G. STRATHMANN, M. MAYER-PRÖSCHEL, and L. A. OPANASHUK. 2011. Neural precursor cell proliferation is disrupted through activation of the aryl hydrocarbon receptor by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Stem Cells Dev.* 20: 313–326.
- LAUBY-SECRETAN, B., D. LOOMIS, R. BAAN, F. EL GHISSASSI, V. BOUVARD, L. BENBRAHIM-TALLAA, N. GUHA, Y. GROSSE, and K. STRAIF. 2016. Use of mechanistic data in the IARC evaluations of the carcinogenicity of polychlorinated biphenyls and related compounds. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23: 2220–2229. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1007/s11356-015-4829-4> [Accessed October 11, 2016].
- LAURENCIKIENE, J., T. SKURK, A. KULYTE, P. HEDEN, G. \AASTRÖM, E. SJÖLIN, M. RYDEN, H. HAUNER, and P. ARNER. 2011. Regulation of lipolysis in small and large fat cells of the same

- subject. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96: E2045–E2049. Available at: <http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/jc.2011-1702> [Accessed October 10, 2016].
- LEHMANN, G. M., X. XI, A. A. KULKARNI, K. C. OLSEN, S. J. POLLOCK, C. J. BAGLOLE, S. GUPTA, A. E. CASEY, K. R. HUXLIN, P. J. SIME, S. E. FELDON, and R. P. PHIPPS. 2011. The Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand ITE Inhibits TGF $\beta$ 1-Induced Human Myofibroblast Differentiation. *Am. J. Pathol.* 178: 1556–1567. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002944011000125> [Accessed October 7, 2016].
- LE, K. T., M. P. SAWICKI, M. B. WANG, J. M. HERSHMAN, and A. M. LEUNG. 2016. HIGH PREVALENCE OF AGENT ORANGE EXPOSURE AMONG THYROID CANCER PATIENTS IN THE NATIONAL VA HEALTHCARE SYSTEM. *Endocr. Pract. Off. J. Am. Coll. Endocrinol. Am. Assoc. Clin. Endocrinol.* 22: 699–702.
- LETTERIO, J. J., and AND A. B. ROBERTS. 1998. REGULATION OF IMMUNE RESPONSES BY TGF- $\beta$ . *Annu. Rev. Immunol.* 16: 137–161. Available at: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.16.1.137> [Accessed October 7, 2016].
- LE VEE, M., E. JOUAN, and O. FARDEL. 2010. Involvement of aryl hydrocarbon receptor in basal and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced expression of target genes in primary human hepatocytes. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 24: 1775–1781.
- LIEBER, C. S. 2004. The Discovery of the Microsomal Ethanol Oxidizing System and Its Physiologic and Pathologic Role. *Drug Metab. Rev.* 36: 511–529. Available at: <http://dx.doi.org/10.1081/DMR-200033441> [Accessed January 12, 2016].
- LI, H., H.-W. ZHENG, H. CHEN, Z.-Z. XING, H. YOU, M. CONG, and J.-D. JIA. 2012. Hepatitis B virus particles preferably induce Kupffer cells to produce TGF- $\beta$ 1 over pro-inflammatory cytokines. *Dig. Liver Dis.* 44: 328–333. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1590865811004324> [Accessed October 11, 2016].
- LIN, P., H. CHANG, W.-T. TSAI, M.-H. WU, Y.-S. LIAO, J.-T. CHEN, and J.-M. SU. 2003. Overexpression of aryl hydrocarbon receptor in human lung carcinomas. *Toxicol. Pathol.* 31: 22–30. Available at: <http://tpx.sagepub.com/content/31/1/22.short> [Accessed October 11, 2016].
- LI, T.-K., B. G. HEWITT, and B. F. GRANT. 2004. Alcohol use disorders and mood disorders: A National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism perspective. *Biol. Psychiatry* 56: 718–720. Available at: [/article/S0006-3223\(04\)00393-2/abstract](/article/S0006-3223(04)00393-2/abstract) [Accessed October 11, 2016].
- LIU, D., B. L. BLACK, and R. DERYNCK. 2001. TGF- $\beta$  inhibits muscle differentiation through functional repression of myogenic transcription factors by Smad3. *Genes Dev.* 15: 2950–2966. Available at: <http://genesdev.cshlp.org/content/15/22/2950.short> [Accessed October 11, 2016].
- LLOPIS, M. ET AL. 2016. Intestinal microbiota contributes to individual susceptibility to alcoholic liver disease. *Gut* 65: 830–839.
- LOOMBA, R., and A. J. SANYAL. 2013. The global NAFLD epidemic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 10: 686–690.
- LORICK, K. L., D. L. TOSCANO, and W. A. TOSCANO. 1998. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin Alters Retinoic Acid Receptor Function in Human Keratinocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243: 749–752. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X98981736> [Accessed October 11, 2016].
- LUCEY, M. R., P. MATHURIN, and T. R. MORGAN. 2009. Alcoholic hepatitis. *N. Engl. J. Med.* 360: 2758–2769. Available at: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmra0805786> [Accessed

October 11, 2016].

- LUDEWIG, G. 2001. Cancer initiation by PCBs. *PCBs Recent Adv. Environ. Toxicol. Health Eff. Univ. Press Ky.* 337–354. Available at: [https://books.google.fr/books?hl=fr&lr=&id=mLkeBgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA337&dq=Lu+dewig++AND+PCB+126+tumor&ots=1GegV-WtVH&sig=w1B2\\_JKJ8oF4mhxUI3APF5W7ZvM](https://books.google.fr/books?hl=fr&lr=&id=mLkeBgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA337&dq=Lu+dewig++AND+PCB+126+tumor&ots=1GegV-WtVH&sig=w1B2_JKJ8oF4mhxUI3APF5W7ZvM) [Accessed October 11, 2016].
- LU, K., R. MAHBUB, and J. G. FOX. 2015. Xenobiotics: Interaction with the Intestinal Microflora. *ILAR J.* 56: 218–227.
- LYSYCHENKO, G., R. WEBER, V. KOVACH, M. GERTSIUK, A. WATSON, and I. KRASNOVA. 2015. Threats to water resources from hexachlorobenzene waste at Kalush City (Ukraine)—a review of the risks and the remediation options. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22: 14391–14404. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1007/s11356-015-5184-1> [Accessed October 11, 2016].
- MANDAL, P. K. 2005. Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology. *J. Comp. Physiol. B* 175: 221–230. Available at: <http://link.springer.com.gate2.inist.fr/article/10.1007/s00360-005-0483-3> [Accessed August 4, 2016].
- MA, Q., and K. T. BALDWIN. 2000. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced Degradation of Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) by the Ubiquitin-Proteasome Pathway ROLE OF THE TRANSCRIPTION ACTIVATON AND DNA BINDING OF AhR. *J. Biol. Chem.* 275: 8432–8438. Available at: <http://www.jbc.org.gate2.inist.fr/content/275/12/8432> [Accessed September 25, 2016].
- MASCREZ, B., N. B. GHYSELINCK, P. CHAMBON, and M. MARK. 2009. A transcriptionally silent RXR $\alpha$  supports early embryonic morphogenesis and heart development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106: 4272–4277. Available at: <http://www.pnas.org/content/106/11/4272.short> [Accessed October 11, 2016].
- MASSAGUE, J. 2008. TGF $\beta$  in Cancer. *Cell* 134: 215–230. Available at: <http://www.cell.com/article/S0092867408008787/abstract> [Accessed July 24, 2016].
- MASSAGUE, J. 2012. TGF $\beta$  signalling in context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13: 616–630. Available at: <http://www.nature.com/nrm/journal/v13/n10/abs/nrm3434.html> [Accessed October 11, 2016].
- MASSAGUE, J., S. W. BLAIN, and R. S. LO. 2000. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 103: 295–309.
- MASSAGUE, J., and D. WOTTON. 2000. Transcriptional control by the TGF- $\beta$ /Smad signaling system. *EMBO J.* 19: 1745–1754. Available at: <http://emboj.embopress.org/content/19/8/1745> [Accessed January 31, 2014].
- MATTHEWS, J., and J.-Å. GUSTAFSSON. 2006. Estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. *Nucl. Recept. Signal.* 4.
- MAURICE, C. F., H. J. HAISER, and P. J. TURNBAUGH. 2013. Xenobiotics shape the physiology and gene expression of the active human gut microbiome. *Cell* 152: 39–50. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867412014286> [Accessed November 2, 2016].
- MAUVAIS-JARVIS, F., D. J. CLEGG, and A. L. HEVENER. 2013. The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. *Endocr. Rev.* 34: 309–338.
- MCGINNIS, J. M. 1993. Actual Causes of Death in the United States. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 270: 2207. Available at: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.1993.03510180077038> [Accessed October 11, 2016].



- McGINNITY, D. F., G. ZHANG, J. R. KENNY, G. A. HAMILTON, S. OTMANI, K. R. STAMS, S. HANEY, P. BRASSIL, D. M. STRESSER, and R. J. RILEY. 2009. Evaluation of multiple in vitro systems for assessment of CYP3A4 induction in drug discovery: human hepatocytes, pregnane X receptor reporter gene, and Fa2N-4 and HepaRG cells. *Drug Metab. Dispos.* 37: 1259–1268. Available at: <http://dmd.aspetjournals.org/content/37/6/1259.short> [Accessed October 11, 2016].
- MEHAL, W., and U. TO. 2016. New approaches for fibrosis regression in alcoholic cirrhosis. *Hepatol. Int.* 10: 773–778. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1007/s12072-016-9752-3> [Accessed October 10, 2016].
- MEHAL, W. Z., and D. SCHUPPAN. 2015. Antifibrotic therapies in the liver. *In* *Seminars in liver disease*. pp. 184–198, Thieme Medical Publishers. Available at: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/s-0035-1550055> [Accessed October 10, 2016].
- MENSENKAMP, A. R., L. M. HAVEKES, J. A. ROMIJN, and F. KUIPERS. 2001. Hepatic steatosis and very low density lipoprotein secretion: the involvement of apolipoprotein E. *J. Hepatol.* 35: 816–822. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827801002495> [Accessed October 10, 2016].
- MEZEY, E., C. J. KOLMAN, A. M. DIEHL, M. C. MITCHELL, and H. F. HERLONG. 1988. Alcohol and dietary intake in the development of chronic pancreatitis and liver disease in alcoholism. *Am. J. Clin. Nutr.* 48: 148–151. Available at: <http://ajcn.nutrition.org/content/48/1/148.short> [Accessed October 11, 2016].
- MILBRATH, M. O., Y. WENGER, C.-W. CHANG, C. EMOND, D. GARABRANT, B. W. GILLESPIE, and O. JOLLIET. 2009. Apparent half-lives of dioxins, furans, and polychlorinated biphenyls as a function of age, body fat, smoking status, and breast-feeding. *Environ. Health Perspect.* 117: 417. Available at: <http://search.proquest.com/openview/626f5cf7a3fd7986f34f893365111226/1?pq-origsite=gscholar> [Accessed October 11, 2016].
- MIMURA, J., M. EMA, K. SOGAWA, and Y. FUJII-KURIYAMA. 1999. Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev.* 13: 20–25. Available at: <http://genesdev.cshlp.org/content/13/1/20.short> [Accessed October 11, 2016].
- MITTAL, S., H. B. EL-SERAG, Y. H. SADA, F. KANWAL, Z. DUAN, S. TEMPLE, S. B. MAY, J. R. KRAMER, P. A. RICHARDSON, and J. A. DAVILA. 2016. Hepatocellular Carcinoma in the Absence of Cirrhosis in United States Veterans is Associated With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 14: 124–131.e1.
- MITTAL, S., Y. H. SADA, H. B. EL-SERAG, F. KANWAL, Z. DUAN, S. TEMPLE, S. B. MAY, J. R. KRAMER, P. A. RICHARDSON, and J. A. DAVILA. 2015. Temporal Trends of Nonalcoholic Fatty Liver Disease–Related Hepatocellular Carcinoma in the Veteran Affairs Population. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 13: 594–601. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1542356514012282> [Accessed October 10, 2016].
- MOLOTKOV, A., X. FAN, L. DELTOUR, M. H. FOGGIO, S. MARTRAS, J. FARRAS, X. PARES, and G. DUESTER. 2002a. Stimulation of retinoic acid production and growth by ubiquitously expressed alcohol dehydrogenase Adh3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 5337–5342.
- MOLOTKOV, A., X. FAN, L. DELTOUR, M. H. FOGGIO, S. MARTRAS, J. FARRAS, X. PARES, and G. DUESTER. 2002b. Stimulation of retinoic acid production and growth by ubiquitously expressed alcohol dehydrogenase Adh3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 5337–5342.
- MONTEAGUDO, C., M. MARISCAL-ARCAS, L. HERAS-GONZALEZ, D. IBAÑEZ-PEINADO, A. RIVAS, and F. OLEA-SERRANO. 2016. Effects of maternal diet and environmental exposure to organochlorine pesticides on newborn weight in Southern Spain. *Chemosphere* 156: 135–142.

Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653516305938> [Accessed October 11, 2016].

- MOON, K.-H., B. L. HOOD, B.-J. KIM, J. P. HARDWICK, T. P. CONRADS, T. D. VEENSTRA, and B. J. SONG. 2006. Inactivation of oxidized and S-nitrosylated mitochondrial proteins in alcoholic fatty liver of rats. *Hepatology* 44: 1218–1230. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.21372/full> [Accessed October 11, 2016].
- MOORE, J. B., P. J. GUNN, and B. A. FIELDING. 2014. The role of dietary sugars and de novo lipogenesis in non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrients* 6: 5679–5703. Available at: <http://www.mdpi.com/2072-6643/6/12/5679/htm> [Accessed October 10, 2016].
- MOUSTAKAS, A., S. SOUCHELNYTSKYI, and C.-H. HELDIN. 2001. Smad regulation in TGF- $\beta$  signal transduction. *J. Cell Sci.* 114: 4359–4369. Available at: <http://jcs.biologists.org/content/114/24/4359> [Accessed July 24, 2016].
- MULERO-NAVARRO, S., and P. M. FERNANDEZ-SALGUERO. 2016. New Trends in Aryl Hydrocarbon Receptor Biology. *Front. Cell Dev. Biol.* 4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4863130/> [Accessed October 8, 2016].
- NADAULD, L. D., D. N. SHELTON, S. CHIDESTER, H. J. YOST, and D. A. JONES. 2005. The zebrafish retinol dehydrogenase, *rdh11*, is essential for intestinal development and is regulated by the tumor suppressor adenomatous polyposis coli. *J. Biol. Chem.* 280: 30490–30495. Available at: <http://www.jbc.org/content/280/34/30490.short> [Accessed October 11, 2016].
- NAGY, L. E. 2015. The Role of Innate Immunity in Alcoholic Liver Disease. *Alcohol Res. Curr. Rev.* 37: 237–250.
- NAGY, L., and J. W. R. SCHWABE. 2004. Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. *Trends Biochem. Sci.* 29: 317–324. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096800040400088X> [Accessed October 6, 2016].
- NATIONAL TOXICOLOGY, N. T. 2006. NTP toxicology and carcinogenesis studies of 3, 3', 4, 4', 5-pentachlorobiphenyl (PCB 126)(CAS No. 57465-28-8) in female Harlan Sprague-Dawley rats (Gavage Studies). *Natl. Toxicol. Program Tech. Rep. Ser.* 4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16628245> [Accessed October 11, 2016].
- NEBERT, D. W., and T. P. DALTON. 2006. The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 6: 947–960. Available at: <http://www.nature.com/nrc/journal/v6/n12/abs/nrc2015.html> [Accessed October 11, 2016].
- NELSON, S. D., J. R. MITCHELL, J. A. TIMBRELL, W. R. SNODGRASS, and G. B. CORCORAN. 1976. Isoniazid and iproniazid: activation of metabolites to toxic intermediates in man and rat. *Science* 193: 901–903. Available at: [https://www.researchgate.net/profile/George\\_Corcoran/publication/23125035\\_III\\_Isoniazid\\_and\\_iproniazid\\_Activation\\_of\\_metabolites\\_to\\_toxic\\_intermediates\\_in\\_man\\_and\\_rat/links/02e7e519e1dbed8caa000000.pdf](https://www.researchgate.net/profile/George_Corcoran/publication/23125035_III_Isoniazid_and_iproniazid_Activation_of_metabolites_to_toxic_intermediates_in_man_and_rat/links/02e7e519e1dbed8caa000000.pdf) [Accessed November 5, 2016].
- NETGEN. 2016. Le microbiote dans les maladies du foie et du tube digestif : la révolution annoncée. *Rev. Médicale Suisse.* Available at: <http://www.revmed.ch/RMS/2011/RMS-307/Le-microbiote-dans-les-maladies-du-foie-et-du-tube-digestif-la-revolution-annoncee> [Accessed October 10, 2016].
- NGUYEN, L. P., and C. A. BRADFIELD. 2008. The Search for Endogenous Activators of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Chem. Res. Toxicol.* 21: 102–116. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2572005/> [Accessed September 25, 2016].
- NGUYEN, P., V. LERAY, M. DIEZ, S. SERISIER, J. L. BLOC'H, B. SILIART, and H. DUMON. 2008. Liver lipid metabolism. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 92: 272–283. Available at:

- <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0396.2007.00752.x/full> [Accessed October 10, 2016].
- NIES, A. T., M. SCHWAB, and D. KEPPLER. 2008. Interplay of conjugating enzymes with OATP uptake transporters and ABCC/MRP efflux pumps in the elimination of drugs. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 4: 545–568. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1517/17425255.4.5.545> [Accessed October 10, 2016].
- NOMURA, M., and E. LI. 1998. Smad2 role in mesoderm formation, left–right patterning and craniofacial development. *Nature* 393: 786–790. Available at: <http://www.nature.com/nature/journal/v393/n6687/abs/393786a0.html> [Accessed October 11, 2016].
- NUNES, I., P.-E. GLEIZES, C. N. METZ, and D. B. RIFKIN. 1997. Latent transforming growth factor- $\beta$  binding protein domains involved in activation and transglutaminase-dependent cross-linking of latent transforming growth factor- $\beta$ . *J. Cell Biol.* 136: 1151–1163. Available at: <http://jcb.rupress.org/content/136/5/1151.abstract> [Accessed October 11, 2016].
- OBBERG, M., L. BERGANDER, H. HÅKANSSON, U. RANNUG, and A. RANNUG. 2005. Identification of the tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole, in cell culture medium, as a factor that controls the background aryl hydrocarbon receptor activity. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 85: 935–943.
- OPITZ, C. A., U. M. LITZENBURGER, F. SAHM, M. OTT, I. TRITSCHLER, S. TRUMP, T. SCHUMACHER, L. JESTAEDT, D. SCHRENK, M. WELLER, M. JUGOLD, G. J. GUILLEMIN, C. L. MILLER, C. LUTZ, B. RADLWIMMER, I. LEHMANN, A. VON DEIMLING, W. WICK, and M. PLATTEN. 2011. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 478: 197–203. Available at: <http://www.nature.com/gate2.inist.fr/nature/journal/v478/n7368/full/nature10491.html> [Accessed May 20, 2014].
- OSHIMA, M., H. OSHIMA, and M. M. TAKETO. 1996. TGF- $\beta$  Receptor Type II Deficiency Results in Defects of Yolk Sac Hematopoiesis and Vasculogenesis. *Dev. Biol.* 179: 297–302. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160696902596> [Accessed October 11, 2016].
- OWEN, O. E., A. P. MORGAN, H. G. KEMP, J. M. SULLIVAN, M. G. HERRERA, and G. F. CAHILL. 1967. Brain Metabolism during Fasting\*. *J. Clin. Invest.* 46: 1589–1595. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC292907/> [Accessed September 7, 2016].
- PALMA, P., V. L. PALMA, C. MATOS, R. M. FERNANDES, A. BOHN, A. M. V. M. SOARES, and I. R. BARBOSA. 2009. Assessment of the pesticides atrazine, endosulfan sulphate and chlorpyrifos for juvenoid-related endocrine activity using *Daphnia magna*. *Chemosphere* 76: 335–340.
- PAN, J.-J., and M. B. FALLON. 2014. Gender and racial differences in nonalcoholic fatty liver. *World J. Gastroenterol.* 6: 274–283. Available at: <http://www.wjgnet.com/esps/DownloadFile.aspx?Type=InPress&FilePath=UserFiles%5CManuscript%5C7380%5CWJH-6-274.pdf> [Accessed October 10, 2016].
- PAPOUTSIS, A. J., O. I. SELMIN, J. L. BORG, and D. F. ROMAGNOLO. 2013. Gestational exposure to the AhR agonist 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces BRCA-1 promoter hypermethylation and reduces BRCA-1 expression in mammary tissue of rat offspring: Preventive effects of resveratrol. *Mol. Carcinog.* n/a–n/a. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mc.22095/abstract> [Accessed October 21, 2013].
- PAPOUTSIS, A. J., O. I. SELMIN, J. L. BORG, and D. F. ROMAGNOLO. 2015. Gestational exposure to the AhR agonist 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces BRCA-1 promoter hypermethylation and reduces BRCA-1 expression in mammary tissue of rat offspring: preventive effects of resveratrol. *Mol. Carcinog.* 54: 261–269.

- PARADIS, V., S. ZALINSKI, E. CHELBI, N. GUEDJ, F. DEGOS, V. VILGRAIN, P. BEDOSSA, and J. BELGHITI. 2009. Hepatocellular carcinomas in patients with metabolic syndrome often develop without significant liver fibrosis: A pathological analysis. *Hepatology* 49: 851–859. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.22734/abstract> [Accessed October 29, 2016].
- PARES, X., J. FARRÉS, N. KEDISHVILI, and G. DUESTER. 2008. Medium-and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families. *Cell. Mol. Life Sci.* 65: 3936–3949. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00018-008-8591-3> [Accessed October 11, 2016].
- PARISOTTO, M., H. BRODEUR, P. V. BHAT, and S. MADER. 2006. [Retinoid metabolism and cancer]. *Med. Sci.* MS 22: 1101–1106. Available at: <http://europepmc.org/abstract/med/17156733> [Accessed October 11, 2016].
- PARK, E.-Y., H. CHOI, J.-Y. YOON, I.-Y. LEE, Y. SEO, H.-S. MOON, J.-H. HWANG, and H.-S. JUN. 2015. Polyphenol-Rich Fraction of *Ecklonia cava* Improves Nonalcoholic Fatty Liver Disease in High Fat Diet-Fed Mice. *Mar. Drugs* 13: 6866–6883.
- PAUL, V., E. BALASUBRAMANIAM, and M. KAZI. 1994. The neurobehavioural toxicity of endosulfan in rats: a serotonergic involvement in learning impairment. *Eur. J. Pharmacol.* 270: 1–7.
- PENNIMPEDE, T., D. A. CAMERON, G. A. MACLEAN, H. LI, S. ABU-ABED, and M. PETKOVICH. 2010. The role of CYP26 enzymes in defining appropriate retinoic acid exposure during embryogenesis. *Birt. Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* 88: 883–894. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bdra.20709/full> [Accessed October 11, 2016].
- PERNELLE, K., R. LE GUEVEL, D. GLAISE, C. G.-D. STASIO, T. LE CHARPENTIER, B. BOUAITA, A. CORLU, and C. GUGUEN-GUILLOUZO. 2011. Automated detection of hepatotoxic compounds in human hepatocytes using HepaRG cells and image-based analysis of mitochondrial dysfunction with JC-1 dye. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 254: 256–266. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X11001670> [Accessed August 27, 2012].
- PESATORI, A. C., D. CONSONNI, M. RUBAGOTTI, P. GRILLO, and P. A. BERTAZZI. 2009. Cancer incidence in the population exposed to dioxin after the “Seveso accident”: twenty years of follow-up. *Environ. Health* 8: 1. Available at: <http://ehjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-069X-8-39> [Accessed October 11, 2016].
- PETTINELLI, P., A. M. OBREGON, L. A. VIDELA, and OTHERS. 2011. Molecular mechanisms of steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Nutr Hosp* 26: 441–50. Available at: [http://scielo.isciii.es/pdf/nh/v26n3/03\\_revision\\_03.pdf](http://scielo.isciii.es/pdf/nh/v26n3/03_revision_03.pdf) [Accessed October 10, 2016].
- PIERRE, S., A. CHEVALLIER, F. TEIXEIRA-CLERC, A. AMBOLET-CAMOIT, L.-C. BUI, A.-S. BATS, J.-C. FOURNET, P. FERNANDEZ-SALGUERO, M. AGGERBECK, S. LOTERSZTAJN, R. BAROUKI, and X. COUMOUL. 2014. Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of liver fibrosis by dioxin. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 137: 114–124.
- PIJNAPPEL, W. W. M., H. F. J. HENDRIKS, G. E. FOLKERS, C. E. VAN DEN BRINK, E. J. DEKKER, C. EDELENBOSCH, P. T. VAN DER SAAG, and A. J. DURSTON. 1993. The retinoid ligand 4-oxo-retinoic acid is a highly active modulator of positional specification. *Nature* 366: 340–344. Available at: <http://www.nature.com/nature/journal/v366/n6453/abs/366340a0.html> [Accessed October 11, 2016].
- PITT, H. A. 2007. Hepato-pancreato-biliary fat: the good, the bad and the ugly. *HPB* 9: 92–97. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1080/13651820701286177/abstract> [Accessed October 10, 2016].
- PITTLIK, S., S. DOMINGUES, A. MEYER, and G. BEGEMANN. 2008. Expression of zebrafish *aldh1a3*

- (*raldh3*) and absence of *aldh1a1* in teleosts. *Gene Expr. Patterns* 8: 141–147. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567133X07001470> [Accessed October 11, 2016].
- PODECHARD, N., E. L. FERREC, A. REBILLARD, O. FARDEL, and V. LECUREUR. 2009. NPC1 repression contributes to lipid accumulation in human macrophages exposed to environmental aryl hydrocarbons. *Cardiovasc. Res.* 82: 361–370. Available at: <http://cardiovascres.oxfordjournals.org/content/82/2/361> [Accessed October 11, 2016].
- PROETZEL, G., S. A. PAWLOWSKI, M. V. WILES, M. YIN, G. P. BOIVIN, P. N. HOWLES, J. DING, M. W. J. FERGUSON, and T. DOETSCHMAN. 1995. Transforming growth factor- $\beta$ 3 is required for secondary palate fusion. *Nat. Genet.* 11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3855390/> [Accessed October 11, 2016].
- PUGA, A., C. MA, and J. L. MARLOWE. 2009. The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways. *Biochem. Pharmacol.* 77: 713–722. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2657192/> [Accessed October 11, 2016].
- PUROHIT, V., B. GAO, and B.-J. SONG. 2009. Molecular mechanisms of alcoholic fatty liver. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 33: 191–205. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1530-0277.2008.00827.x/full> [Accessed October 11, 2016].
- QIN, H., and J. A. POWELL-COFFMAN. 2004. The *Caenorhabditis elegans* aryl hydrocarbon receptor, AHR-1, regulates neuronal development. *Dev. Biol.* 270: 64–75. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160604001198> [Accessed October 11, 2016].
- QIN, H., Z. ZHAI, and J. A. POWELL-COFFMAN. 2006. The *Caenorhabditis elegans* AHR-1 transcription complex controls expression of soluble guanylate cyclase genes in the URX neurons and regulates aggregation behavior. *Dev. Biol.* 298: 606–615. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160606010013> [Accessed October 11, 2016].
- QIN, J. ET AL. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464: 59–65.
- QUINTANA, F. J., A. S. BASSO, A. H. IGLESIAS, T. KORN, M. F. FAREZ, E. BETTELLI, M. CACCAMO, M. OUKKA, and H. L. WEINER. 2008. Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 453: 65–71.
- RAMACHANDRAN, P., and J. P. IREDALE. 2012. Liver fibrosis: a bidirectional model of fibrogenesis and resolution. *Qjm* 105: 813–817. Available at: <http://qjmed.oxfordjournals.org/content/105/9/813.short> [Accessed October 10, 2016].
- RAMADORI, G., and B. SAILE. 2004. Portal tract fibrogenesis in the liver. *Lab. Invest.* 84: 153–159. Available at: <http://www.nature.com/labinvest/journal/v84/n2/abs/3700030a.html> [Accessed October 10, 2016].
- RANGANATHAN, P., A. AGRAWAL, R. BHUSHAN, A. K. CHAVALMANE, R. K. R. KALATHUR, T. TAKAHASHI, and P. KONDAIAH. 2007. Expression profiling of genes regulated by TGF- $\beta$ : Differential regulation in normal and tumour cells. *BMC Genomics* 8: 98. Available at: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-8-98> [Accessed October 7, 2016].
- RANNUG, A., U. RANNUG, H. S. ROSENKRANZ, L. WINQVIST, R. WESTERHOLM, E. AGURELL, and A. K. GRAFSTRÖM. 1987. Certain photooxidized derivatives of tryptophan bind with very high affinity to the Ah receptor and are likely to be endogenous signal substances. *J. Biol. Chem.* 262: 15422–15427. Available at: <http://www.jbc.org/content/262/32/15422> [Accessed October 11, 2016].

- RAO, M. S., V. SUBBARAO, J. D. PRASAD, and D. G. SCARPELLI. 1988. Carcinogenicity of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the Syrian golden hamster. *Carcinogenesis* 9: 1677–1679. Available at: <http://carcin.oxfordjournals.org/content/9/9/1677.short> [Accessed October 11, 2016].
- REED, G. A., K. S. PETERSON, H. J. SMITH, J. C. GRAY, D. K. SULLIVAN, M. S. MAYO, J. A. CROWELL, and A. HURWITZ. 2005. A Phase I Study of Indole-3-Carbinol in Women: Tolerability and Effects. *Cancer Epidemiol. Prev. Biomark.* 14: 1953–1960. Available at: <http://cebp.aacrjournals.org/content/14/8/1953> [Accessed September 25, 2016].
- REID, A. E. 2001. Nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 121: 710–723. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001650850140151X> [Accessed October 10, 2016].
- REISS, A. 2001. TGF $\beta$  signaling and cancer. *Exp. Cell Res.* 264: 111–116. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014482700951401> [Accessed October 11, 2016].
- RIER, S., and W. G. FOSTER. 2002. Environmental Dioxins and Endometriosis. *Toxicol. Sci.* 70: 161–170. Available at: <http://toxsci.oxfordjournals.org/content/70/2/161> [Accessed October 9, 2016].
- ROMAN-BLAS, J. A., S. CASTAÑEDA, R. LARGO, and G. HERRERO-BEAUMONT. 2009. Osteoarthritis associated with estrogen deficiency. *Arthritis Res. Ther.* 11: 241.
- ROMANI, L., T. ZELANTE, A. D. LUCA, R. G. IANNITTI, S. MORETTI, A. BARTOLI, F. AVERSA, and P. PUCETTI. 2014. Microbiota control of a tryptophan–AhR pathway in disease tolerance to fungi. *Eur. J. Immunol.* 44: 3192–3200. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.201344406/abstract> [Accessed September 25, 2016].
- ROSSINI, G. P., G. M. BALDINI, E. VILLA, and F. MANENTI. 1989. Characterization of estrogen receptor from human liver. *Gastroenterology* 96: 1102–1109.
- ROSS, J. A., and C. M. KASUM. 2002. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu. Rev. Nutr.* 22: 19–34.
- RUAN, J.-Q., S. LI, Y.-P. LI, W.-J. WU, S. M.-Y. LEE, and R. YAN. 2015. The Presystemic Interplay between Gut Microbiota and Orally Administered Calycosin-7-O- $\beta$ -D-Glucoside. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 43: 1601–1611.
- SAFE, S., S.-O. LEE, and U.-H. JIN. 2013. Role of the aryl hydrocarbon receptor in carcinogenesis and potential as a drug target. *Toxicol. Sci.* 135: 1–16. Available at: <http://toxsci.oxfordjournals.org/content/135/1/1.short> [Accessed October 11, 2016].
- SAFE, S., and M. WORMKE. 2003. Inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor alpha cross-talk and mechanisms of action. *Chem. Res. Toxicol.* 16: 807–816.
- SAHARINEN, J., and J. KESKI-OJA. 2000a. Specific sequence motif of 8-Cys repeats of TGF- $\beta$  binding proteins, LTBP, creates a hydrophobic interaction surface for binding of small latent TGF- $\beta$ . *Mol. Biol. Cell* 11: 2691–2704.
- SAHARINEN, J., and J. KESKI-OJA. 2000b. Specific sequence motif of 8-Cys repeats of TGF- $\beta$  binding proteins, LTBP, creates a hydrophobic interaction surface for binding of small latent TGF- $\beta$ . *Mol. Biol. Cell* 11: 2691–2704.
- SAITO, S., K. NISHIKAWA, T. MORII, M. ENOMOTO, N. NARITA, K. MOTOYOSHI, and M. ICHIJO. 1993. Cytokine production by CD16–CD56bright natural killer cells in the human early pregnancy decidua. *Int. Immunol.* 5: 559–563. Available at: <http://intimm.oxfordjournals.org/content/5/5/559.short> [Accessed October 10, 2016].
- SAKURAI, K., H. FUKATA, E. TODAKA, Y. SAITO, H. BUJO, and C. MORI. 2006. Colestimide reduces

- blood polychlorinated biphenyl (PCB) levels. *Intern. Med.* 45: 327–328. Available at: <http://jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/internalmedicine/45.1478?from=Google> [Accessed October 10, 2016].
- SAMANEZ, C. H., S. CARON, O. BRIAND, H. DEHONDT, I. DUPLAN, F. KUIPERS, N. HENNUYER, V. CLAVEY, and B. STAELS. 2012. The human hepatocyte cell lines IHH and HepaRG: models to study glucose, lipid and lipoprotein metabolism. *Arch. Physiol. Biochem.* 118: 102–111. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/13813455.2012.683442> [Accessed October 11, 2016].
- SANDERMAN, W., H. STOCKMAN, and R. CASTON. 1957. Pyrolysis of pentachlorophenol. *Chem Ber* 90: 960.
- SANFORD, L. P., I. ORMSBY, A. C. G. GROOT, H. SARIOLA, R. FRIEDMAN, G. P. BOIVIN, E. L. CARDELL, and T. DOETSCHMAN. 1997. TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development* 124: 2659–2670. Available at: <http://dev.biologists.org/content/124/13/2659> [Accessed October 11, 2016].
- SANTIAGO-JOSEFAT, B., S. MULERO-NAVARRO, S. L. DALLAS, and P. M. FERNANDEZ-SALGUERO. 2004a. Overexpression of latent transforming growth factor- $\beta$  binding protein 1 (LTBP-1) in dioxin receptor-null mouse embryo fibroblasts. *J. Cell Sci.* 117: 849–859. Available at: <http://jcs.biologists.org/content/117/6/849.short> [Accessed October 11, 2016].
- SANTIAGO-JOSEFAT, B., S. MULERO-NAVARRO, S. L. DALLAS, and P. M. FERNANDEZ-SALGUERO. 2004b. Overexpression of latent transforming growth factor- $\beta$  binding protein 1 (LTBP-1) in dioxin receptor-null mouse embryo fibroblasts. *J. Cell Sci.* 117: 849–859. Available at: <http://jcs.biologists.org/content/117/6/849.short> [Accessed October 11, 2016].
- SATO, M., S. SUZUKI, and H. SENOO. 2003. Hepatic Stellate Cells: Unique Characteristics in Cell Biology and Phenotype. *Cell Struct. Funct.* 28: 105–112.
- SATO, S., H. SHIRAKAWA, S. TOMITA, Y. OHSAKI, K. HAKETA, O. TOOI, N. SANTO, M. TOHKIN, Y. FURUKAWA, F. J. GONZALEZ, and M. KOMAI. 2008. Low-dose dioxins alter gene expression related to cholesterol biosynthesis, lipogenesis, and glucose metabolism through the aryl hydrocarbon receptor-mediated pathway in mouse liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 229: 10–19. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X08000069> [Accessed October 31, 2012].
- SAVARY, C. C., R. JOSSE, A. BRUYERE, F. GUILLET, M.-A. ROBIN, and A. GUILLOUZO. 2014. Interactions of endosulfan and methoxychlor involving CYP3A4 and CYP2B6 in human HepaRG cells. *Drug Metab. Dispos.* 42: 1235–1240.
- SCARPELLINI, E., M. FORLINO, M. LUPO, C. RASETTI, G. FAVA, L. ABENAVOLI, and A. DE SANTIS. 2016. Gut Microbiota and Alcoholic Liver Disease. *Rev. Recent Clin. Trials* 11: 213–219.
- SCHMIDT, J. V., L. A. CARVER, and C. A. BRADFIELD. 1993. Molecular Characterization of the Murine Ahr Gene. Organization, Promoter Analysis, and Chromosomal Assignment. *J. Biol. Chem.* 268: 22203–22209. Available at: <http://www.jbc.org.gate2.inist.fr/content/268/29/22203> [Accessed June 5, 2012].
- SEITZ, H. K., and F. STICKEL. 2010. Acetaldehyde as an underestimated risk factor for cancer development: role of genetics in ethanol metabolism. *Genes Nutr.* 5: 121–128. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1007/s12263-009-0154-1> [Accessed October 11, 2016].
- SENGUPTA, S., I. OBIORAH, P. Y. MAXIMOV, R. CURPAN, and V. C. JORDAN. 2013. Molecular mechanism of action of bisphenol and bisphenol A mediated by oestrogen receptor alpha in growth and apoptosis of breast cancer cells. *Br. J. Pharmacol.* 169: 167–178. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bph.12122/full> [Accessed October 11, 2016].

- SHAH, P. K. 1997. New insights into the pathogenesis and prevention of acute coronary syndromes. *Am. J. Cardiol.* 79: 17–23. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002914997003810> [Accessed October 10, 2016].
- SHAN, Q., J. WANG, F. HUANG, X. LV, M. MA, and Y. DU. 2014. Augmented atherogenesis in ApoE-null mice co-exposed to polychlorinated biphenyls and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 276: 136–146. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X14000441> [Accessed October 10, 2016].
- SHARROW, S. D., J. L. VAUGHN, L. ZIDEK, M. V. NOVOTNY, and M. J. STONE. 2002. Pheromone binding by polymorphic mouse major urinary proteins. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 11: 2247–2256. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2373590/> [Accessed September 10, 2014].
- SHIN, S.-K., K.-S. KIM, J.-C. YOU, B.-J. SONG, and J.-G. KIM. 2006. Concentration and congener patterns of polychlorinated biphenyls in industrial and municipal waste incinerator flue gas, Korea. *J. Hazard. Mater.* 133: 53–59. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030438940500631X> [Accessed October 10, 2016].
- SHULL, M. M., I. ORMSBY, A. B. KIER, S. PAWLOWSKR, R. J. DIEBOLD, M. YIN, R. ALLEN, C. SIDMAN, G. PROETZEL, D. CALVINT, and OTHERS. 1992. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- $\beta$ 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359: 693. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3889166/> [Accessed October 11, 2016].
- SILVA, M. H., and S. L. BEAUVAIS. 2010. Human health risk assessment of endosulfan. I: Toxicology and hazard identification. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 56: 4–17. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0273230009001822> [Accessed June 11, 2014].
- SINGH, A., M. KAUR, S. SHARMA, R. BHATTI, P. SINGH, and OTHERS. 2014. Rational design, synthesis and evaluation of chromone-indole and chromone-pyrazole based conjugates: Identification of a lead for anti-inflammatory drug. *Eur. J. Med. Chem.* 77: 185–192. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523414002074> [Accessed October 11, 2016].
- SIRARD, C., S. KIM, C. MIRTSOS, P. TADICH, P. A. HOODLESS, A. ITIE, R. MAXSON, J. L. WRANA, and T. W. MAK. 2000. Targeted disruption in murine cells reveals variable requirement for Smad4 in transforming growth factor  $\beta$ -related signaling. *J. Biol. Chem.* 275: 2063–2070. Available at: <http://www.jbc.org/content/275/3/2063.short> [Accessed October 11, 2016].
- SIRARD, C., J. L. DE LA POMPA, A. ELIA, A. ITIE, C. MIRTSOS, A. CHEUNG, S. HAHN, A. WAKEHAM, L. SCHWARTZ, S. E. KERN, and OTHERS. 1998. The tumor suppressor gene Smad4/Dpc4 is required for gastrulation and later for anterior development of the mouse embryo. *Genes Dev.* 12: 107–119. Available at: <http://genesdev.cshlp.org/content/12/1/107.short> [Accessed October 11, 2016].
- SONG, Q., F. WANG, J. CAI, Y. WANG, J. ZHANG, W. YU, and J. XU. 2013. Lignin depolymerization (LDP) in alcohol over nickel-based catalysts via a fragmentation–hydrogenolysis process. *Energy Environ. Sci.* 6: 994–1007. Available at: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2013/ee/c2ee23741e> [Accessed October 11, 2016].
- SORG, O. 2014. AhR signalling and dioxin toxicity. *Toxicol. Lett.* 230: 225–233. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427413013921> [Accessed July 29, 2016].



- SPRUS, A., G. KANURI, K. UEBEL, S. C. BISCHOFF, and I. BERGHEIM. 2011. Role of the inducible nitric oxide synthase in the onset of fructose-induced steatosis in mice. *Antioxid. Redox Signal.* 14: 2121–2135. Available at: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ars.2010.3263> [Accessed October 11, 2016].
- STANLEY, K. A., L. R. CURTIS, S. L. M. SIMONICH, and R. L. TANGUAY. 2009. Endosulfan I and endosulfan sulfate disrupts zebrafish embryonic development. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 95: 355–361.
- STARLEY, B. Q., C. J. CALCAGNO, and S. A. HARRISON. 2010. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection. *Hepatology* 51: 1820–1832. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.23594/full> [Accessed October 10, 2016].
- STARSICHOVA, A., E. HRUBA, E. SLABAKOVA, Z. PERNICOVA, J. PROCHAZKOVA, K. PENCIKOVA, V. ŠEDA, M. KABATKOVA, J. VONDRACEK, A. KOZUBIK, M. MACHALA, and K. SOUCEK. 2012. TGF- $\beta$ 1 signaling plays a dominant role in the crosstalk between TGF- $\beta$ 1 and the aryl hydrocarbon receptor ligand in prostate epithelial cells. *Cell. Signal.* 24: 1665–1676. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0898656812001234> [Accessed April 23, 2015].
- STEENLAND, K., P. BERTAZZI, A. BACCARELLI, and M. KOGEVINAS. 2004. Dioxin revisited: developments since the 1997 IARC classification of dioxin as a human carcinogen. *Environ. Health Perspect.* 1265–1268. Available at: <http://www.jstor.org/stable/3435698> [Accessed October 11, 2016].
- STENVERS, K. L., M. L. TURSKY, K. W. HARDER, N. KOUNTOURI, S. AMATAYAKUL-CHANTLER, D. GRAIL, C. SMALL, R. A. WEINBERG, A. M. SIZELAND, and H.-J. ZHU. 2003. Heart and liver defects and reduced transforming growth factor  $\beta$ 2 sensitivity in transforming growth factor  $\beta$  type III receptor-deficient embryos. *Mol. Cell. Biol.* 23: 4371–4385. Available at: <http://mcb.asm.org/content/23/12/4371.short> [Accessed October 11, 2016].
- STRATE, I., T. H. MIN, D. ILIEV, and E. M. PERA. 2009. Retinol dehydrogenase 10 is a feedback regulator of retinoic acid signalling during axis formation and patterning of the central nervous system. *Development* 136: 461–472. Available at: <http://dev.biologists.org/content/136/3/461.short> [Accessed October 11, 2016].
- STREBA, L. A. M., D. CARSTEA, P. MITRUT, C. C. VERE, N. DRAGOMIR, and C. T. STREBA. 2008. Nonalcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome: a concise review. *Rom J Morphol Embryol* 49: 13–20. Available at: <http://www.rjme.ro/RJME/resources/files/490108013020.pdf> [Accessed October 10, 2016].
- SUINO, K., L. PENG, R. REYNOLDS, Y. LI, J.-Y. CHA, J. J. REPA, S. A. KLIEWER, and H. E. XU. 2004. The Nuclear Xenobiotic Receptor CAR: Structural Determinants of Constitutive Activation and Heterodimerization. *Mol. Cell* 16: 893–905. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276504007270> [Accessed October 3, 2016].
- SUTHERLAND, T. D., I. HOME, K. M. WEIR, R. J. RUSSELL, and J. G. OAKESHOTT. 2004. Toxicity and residues of endosulfan isomers. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 183: 99–113.
- SWANN, J., Y. WANG, L. ABECIA, A. COSTABILE, K. TUOHY, G. GIBSON, D. ROBERTS, J. SIDAWAY, H. JONES, I. D. WILSON, J. NICHOLSON, and E. HOLMES. 2009. Gut microbiome modulates the toxicity of hydrazine: a metabonomic study. *Mol. Biosyst.* 5: 351. Available at: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b811468d> [Accessed November 2, 2016].
- SWANSON, H. I., K. TULLIS, and M. S. DENISON. 1993. Binding of transformed Ah receptor complex to a dioxin responsive transcriptional enhancer: evidence for two distinct heteromeric DNA-binding forms. *Biochemistry (Mosc.)* 32: 12841–12849. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00210a037> [Accessed October 11, 2016].

- SWEDENBORG, E., J. RÜEGG, A. HILLENWECK, S. REHNMARK, M. H. FAULDS, D. ZALCO, I. PONGRATZ, and K. PETTERSSON. 2008. 3-Methylcholanthrene Displays Dual Effects on Estrogen Receptor (ER)  $\alpha$  and ER $\beta$  Signaling in a Cell-Type Specific Fashion. *Mol. Pharmacol.* 73: 575–586. Available at: <http://molpharm.aspetjournals.org/content/73/2/575> [Accessed October 9, 2016].
- SYCHEVA, L. P., N. V. UMNNOVA, M. A. KOVALENKO, V. S. ZHURKOV, A. A. SHELEPCHIKOV, and V. S. ROUMAK. 2016. Dioxins and cytogenetic status of villagers after 40 years of agent Orange application in Vietnam. *Chemosphere* 144: 1415–1420.
- ŠYC, M., J. HORAK, F. HOPAN, K. KRPEC, T. TOMSEJ, T. OCELKA, and V. PEKAREK. 2011. Effect of fuels and domestic heating appliance types on emission factors of selected organic pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 45: 9427–9434. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es2017945> [Accessed October 10, 2016].
- TERPSTRA, V., and T. J. VAN BERKEL. 2000. Scavenger receptors on liver Kupffer cells mediate the in vivo uptake of oxidatively damaged red blood cells in mice. *Blood* 95: 2157–2163. Available at: <http://www.bloodjournal.org/content/95/6/2157.short> [Accessed October 10, 2016].
- DE THE, H., C. LAVAU, A. MARCHIO, C. CHOMIENNE, L. DEGOS, and A. DEJEAN. 1991. The PML-RAR $\alpha$  fusion mRNA generated by the t(15; 17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* 66: 675–684. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/009286749190113D> [Accessed October 11, 2016].
- THOMAS, M., S. HALSALL, and T. J. PETERS. 1982. Role of hepatic acetaldehyde dehydrogenase in alcoholism: demonstration of persistent reduction of cytosolic activity in abstaining patients. *The Lancet* 320: 1057–1059. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673682900010> [Accessed October 8, 2016].
- TIEMANN, U. 2008. In vivo and in vitro effects of the organochlorine pesticides DDT, TCPM, methoxychlor, and lindane on the female reproductive tract of mammals: a review. *Reprod. Toxicol.* 25: 316–326. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0890623808000361> [Accessed October 11, 2016].
- TILG, H., P. D. CANI, and E. A. MAYER. 2016. Gut microbiome and liver diseases. *Gut*.
- TOGAWA, H., S. SHINKAI, and T. MIZUTANI. 2008. Induction of human UGT1A1 by bilirubin through AhR dependent pathway. *Drug Metab. Lett.* 2: 231–237. Available at: <http://www.ingentaconnect.com/content/ben/dml/2008/00000002/00000004/art00001> [Accessed October 11, 2016].
- TÖRRÖNEN, R., M. KORKALAINEN, and S. O. KÄRENLAMPI. 1992. Induction of class 3 aldehyde dehydrogenase in the mouse hepatoma cell line Hepa-1 by various chemicals. *Chem. Biol. Interact.* 83: 107–119.
- TOYOSHIBA, H., N. J. WALKER, A. J. BAILER, and C. J. PORTIER. 2004. Evaluation of toxic equivalency factors for induction of cytochromes P450 CYP1A1 and CYP1A2 enzyme activity by dioxin-like compounds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 194: 156–168. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X03004393> [Accessed October 11, 2016].
- TRIANO, E. A., L. B. SLUSHER, T. A. ATKINS, J. T. BENESKI, S. A. GESTL, R. ZOLFAGHARI, R. POLAVARAPU, E. FRAUENHOFFER, and J. WEISZ. 2003. Class I Alcohol Dehydrogenase Is Highly Expressed in Normal Human Mammary Epithelium but not in Invasive Breast Cancer Implications for Breast Carcinogenesis. *Cancer Res.* 63: 3092–3100. Available at: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/63/12/3092> [Accessed January 28, 2015].

- TRITSCHER, A. M., G. C. CLARK, C. SEWALL, R. C. SILLS, R. MARONPOT, and G. W. LUCIER. 1995. Persistence of TCDD-induced hepatic cell proliferation and growth of enzyme altered foci after chronic exposure followed by cessation of treatment in DEN initiated female rats. *Carcinogenesis* 16: 2807–2811. Available at: <http://carcin.oxfordjournals.org/content/16/11/2807.short> [Accessed October 11, 2016].
- TSUKAMOTO, H., K. MACHIDA, A. DYNNYK, and H. MKRTCHYAN. 2009. “Second hit” models of alcoholic liver disease. *In* *Seminars in liver disease*. pp. 178–187, \copyright Thieme Medical Publishers. Available at: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/s-0029-1214373> [Accessed October 11, 2016].
- ULASZEWSKA, M. M., E. ZUCCATO, and E. DAVOLI. 2011. PCDD/Fs and dioxin-like PCBs in human milk and estimation of infants’ daily intake: a review. *Chemosphere* 83: 774–782. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004565351100230X> [Accessed October 11, 2016].
- VAN DEN BERG, M., L. BIRNBAUM, A. T. BOSVELD, B. BRUNSTRÖM, P. COOK, M. FEELEY, J. P. GIESY, A. HANBERG, R. HASEGAWA, S. W. KENNEDY, and OTHERS. 1998. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ. Health Perspect.* 106: 775. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc1533232/> [Accessed October 11, 2016].
- VAN DEN BERG, M., L. S. BIRNBAUM, M. DENISON, M. DE VITO, W. FARLAND, M. FEELEY, H. FIEDLER, H. HAKANSSON, A. HANBERG, L. HAWS, M. ROSE, S. SAFE, D. SCHRENK, C. TOHYAMA, A. TRITSCHER, J. TUOMISTO, M. TYSKLIND, N. WALKER, and R. E. PETERSON. 2006. The 2005 World Health Organization reevaluation of human and Mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 93: 223–241.
- VAN DER HEIDEN, E., N. BECHOUX, M. MULLER, T. SERGENT, Y.-J. SCHNEIDER, Y. LARONDELLE, G. MAGHUIN-ROGISTER, and M.-L. SCIPPO. 2009. Food flavonoid aryl hydrocarbon receptor-mediated agonistic/antagonistic/synergic activities in human and rat reporter gene assays. *Anal. Chim. Acta* 637: 337–345. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267008017340> [Accessed October 11, 2016].
- VAN DE WIELE, T., L. VANHAECKE, C. BOECKAERT, K. PERU, J. HEADLEY, W. VERSTRAETE, and S. SICILIANO. 2005. Human colon microbiota transform polycyclic aromatic hydrocarbons to estrogenic metabolites. *Environ. Health Perspect.* 6–10. Available at: <http://www.jstor.org/stable/3435739> [Accessed November 2, 2016].
- VAN MILLER, J. P., J. J. LALICH, and J. R. ALLEN. 1977. Increased incidence of neoplasms in rats exposed to low levels of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Chemosphere* 6: 537–544. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0045653577901072> [Accessed October 9, 2016].
- VANNI, E., and E. BUGIANESI. 2014. Obesity and Liver Cancer. *Clin. Liver Dis.* 18: 191–203. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1089326113000627> [Accessed October 10, 2016].
- VASILIOU, V., K. VASILIOU, and D. W. NEBERT. 2009. Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum. Genomics* 3: 1. Available at: <http://humgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1479-7364-3-3-281> [Accessed October 10, 2016].
- VASIOS, G. W., J. D. GOLD, M. PETKOVICH, P. CHAMBON, and L. J. GUDAS. 1989. A retinoic acid-responsive element is present in the 5’ flanking region of the laminin B1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 9099–9103. Available at: <http://www.pnas.org/content/86/23/9099.short> [Accessed October 11, 2016].

- VASTO, S., G. CANDORE, C. R. BALISTRERI, M. CARUSO, G. COLONNA-ROMANO, M. P. GRIMALDI, F. LISTI, D. NUZZO, D. LIO, and C. CARUSO. 2007. Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. *Mech. Ageing Dev.* 128: 83–91. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004763740600248X> [Accessed October 10, 2016].
- VELDHOEN, M., C. UYTENHOVE, J. VAN SNICK, H. HELMBY, A. WESTENDORF, J. BUER, B. MARTIN, C. WILHELM, and B. STOCKINGER. 2008. Transforming growth factor- $\beta$ 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat. Immunol.* 9: 1341–1346. Available at: <http://www.nature.com/ni/journal/v9/n12/abs/ni.1659.html> [Accessed October 11, 2016].
- VERNON, G., A. BARANOVA, and Z. M. YOUNOSSI. 2011. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 34: 274–285.
- WAHLANG, B., M. SONG, J. I. BEIER, K. C. FALKNER, L. AL-ERYANI, H. B. CLAIR, R. A. PROUGH, T. S. OSBORNE, D. E. MALARKEY, J. C. STATES, and OTHERS. 2014. Evaluation of Aroclor 1260 exposure in a mouse model of diet-induced obesity and non-alcoholic fatty liver disease. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 279: 380–390. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X14002488> [Accessed October 11, 2016].
- WALDRIP, W. R., E. K. BIKOFF, P. A. HOODLESS, J. L. WRANA, and E. J. ROBERTSON. 1998. Smad2 signaling in extraembryonic tissues determines anterior-posterior polarity of the early mouse embryo. *Cell* 92: 797–808. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867400814075> [Accessed October 11, 2016].
- WANG, K., Y. LI, Y.-Z. JIANG, C.-F. DAI, M. S. PATANKAR, J.-S. SONG, and J. ZHENG. 2013. An endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand inhibits proliferation and migration of human ovarian cancer cells. *Cancer Lett.* 340: 63–71. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304383513004916> [Accessed October 11, 2016].
- WANG, Y., Q. WANG, B. WU, Y. LI, and G. LU. 2012. Correlation between TCDD acute toxicity and aryl hydrocarbon receptor structure for different mammals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*
- WASSENAAR, S., and B. C. KOCH. 2015. Direct biomarkers to determine alcohol consumption during pregnancy, which one to use? *J Appl Bioanal* 1: 76–79. Available at: <https://submissions.scholasticahq.com/api/v1/attachments/253/download> [Accessed October 11, 2016].
- WATANABE, M. X., T. KUNISUE, N. UEDA, M. NOSE, S. TANABE, and H. IWATA. 2013. Toxicokinetics of dioxins and other organochlorine compounds in Japanese people: Association with hepatic CYP1A2 expression levels. *Environ. Int.* 53: 53–61. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412012002553> [Accessed October 11, 2016].
- WATTENBERG, L. W., and W. D. LOUB. 1978. Inhibition of polycyclic aromatic hydrocarbon-induced neoplasia by naturally occurring indoles. *Cancer Res.* 38: 1410–1413. Available at: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/38/5/1410.short> [Accessed October 11, 2016].
- WEBER, J., C. J. HALSALL, D. MUIR, C. TEIXEIRA, J. SMALL, K. SOLOMON, M. HERMANSON, H. HUNG, and T. BIDLEMAN. 2010. Endosulfan, a global pesticide: A review of its fate in the environment and occurrence in the Arctic. *Sci. Total Environ.* 408: 2966–2984. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969709010882> [Accessed June 5, 2014].

- WEIHUA, Z., S. ANDERSSON, G. CHENG, E. R. SIMPSON, M. WARNER, and J. ÅAKE GUSTAFSSON. 2003. Update on estrogen signaling. *FEBS Lett.* 546: 17–24. Available at: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/S0014-5793\(03\)00436-8/full](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/S0014-5793(03)00436-8/full) [Accessed October 11, 2016].
- WEINSTEIN, M., X. YANG, C. LI, X. XU, J. GOTAY, and C.-X. DENG. 1998. Failure of egg cylinder elongation and mesoderm induction in mouse embryos lacking the tumor suppressor smad2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 9378–9383. Available at: <http://www.pnas.org/content/95/16/9378.short> [Accessed October 11, 2016].
- WEI, P., J. ZHANG, M. EGAN-HAFLEY, S. LIANG, and D. D. MOORE. 2000. The nuclear receptor CAR mediates specific xenobiotic induction of drug metabolism. *Nature* 407: 920–923. Available at: <http://www.nature.com/nature/journal/v407/n6806/abs/407920a0.html> [Accessed October 11, 2016].
- WEI, R.-R., M.-Y. ZHANG, H.-L. RAO, H.-Y. PU, H.-Z. ZHANG, and H.-Y. WANG. 2011. Identification of ADH4 as a novel and potential prognostic marker in hepatocellular carcinoma. *Med. Oncol.* 29: 2737–2743. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1007/s12032-011-0126-3> [Accessed January 28, 2015].
- WEISS, J., M. RAU, and A. GEIER. 2014. Non-alcoholic fatty liver disease: epidemiology, clinical course, investigation, and treatment. *Dtsch Arztebl Int* 111: 447–452. Available at: [https://www.researchgate.net/profile/Martin\\_Hofmeister2/publication/274011525\\_Mediterranean\\_diet/links/55642ca108ae8c0cab37009d.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Martin_Hofmeister2/publication/274011525_Mediterranean_diet/links/55642ca108ae8c0cab37009d.pdf) [Accessed October 10, 2016].
- WHITLOCK JR, J. P. 1999. Induction of cytochrome P4501A1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39: 103–125. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.pharmtox.39.1.103> [Accessed October 11, 2016].
- WILHELM, M., U. RANFT, U. KRÄMER, J. WITTSIEPE, F. LEMM, P. FÜRST, G. EBERWEIN, and G. WINNEKE. 2008. Lack of neurodevelopmental adversity by prenatal exposure of infants to current lowered PCB levels: comparison of two German birth cohort studies. *J. Toxicol. Environ. Health A* 71: 700–702. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15287390801984904> [Accessed October 11, 2016].
- WILLIAMS, C. E., R. B. CRAWFORD, M. P. HOLSAPPLE, and N. E. KAMINSKI. 1996. Identification of functional aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator in murine splenocytes. *Biochem. Pharmacol.* 52: 771–780. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295296003607> [Accessed October 11, 2016].
- WIPFF, P.-J., and B. HINZ. 2008. Integrins and the activation of latent transforming growth factor  $\beta$ 1—an intimate relationship. *Eur. J. Cell Biol.* 87: 601–615. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0171933508000289> [Accessed October 11, 2016].
- WONG, T. W., A. H. S. WONG, E. A. S. NELSON, H. QIU, and S. Y. K. KU. 2012. Levels of PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs in human milk among Hong Kong mothers. *Sci. Total Environ.* Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969712010625> [Accessed September 11, 2012].
- WU, H., P. CAI, D. L. CLEMENS, T. R. JERRELLS, G. S. ANSARI, and B. S. KAPHALIA. 2006. Metabolic basis of ethanol-induced cytotoxicity in recombinant HepG2 cells: role of nonoxidative metabolism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 216: 238–247. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X06001578> [Accessed October 11, 2016].

- YANG, Y.-M., D.-Y. HUANG, G.-F. LIU, J.-C. ZHONG, K. DU, Y.-F. LI, and X.-H. SONG. 2005. Inhibitory Effects of Vitamin A on TCDD-induced Cytochrome P-450 1A1 Enzyme Activity and Expression. *Toxicol. Sci.* 85: 727–734. Available at: <http://toxsci.oxfordjournals.org/content/85/1/727> [Accessed October 11, 2016].
- YAVUZ, Y., Y. YURUMUZ, H. KÜÇÜKER, Y. ELA, and S. YÜKSEL. 2007. Two cases of acute endosulfan toxicity. *Clin. Toxicol.* 45: 530–532. Available at: <http://informahealthcare.com.gate2.inist.fr/doi/abs/10.1080/15563650701365909> [Accessed May 20, 2014].
- YOSHINAGA, K., H. OBATA, V. JURUKOVSKI, R. MAZZIERI, Y. CHEN, L. ZILBERBERG, D. HUSO, J. MELAMED, P. PRIJATELJ, V. TODOROVIC, and OTHERS. 2008. Perturbation of transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1 association with latent TGF- $\beta$  binding protein yields inflammation and tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105: 18758–18763. Available at: <http://www.pnas.org/content/105/48/18758.short> [Accessed October 11, 2016].
- ZAHER, H., P. M. FERNANDEZ-SALGUERO, J. LETTERIO, M. S. SHEIKH, A. J. FORNACE, A. B. ROBERTS, and F. J. GONZALEZ. 1998. The involvement of aryl hydrocarbon receptor in the activation of transforming growth factor- $\beta$  and apoptosis. *Mol. Pharmacol.* 54: 313–321. Available at: <http://molpharm.aspetjournals.org/content/54/2/313.short> [Accessed October 11, 2016].
- ZHAO, Q.-W., Y.-W. ZHOU, W.-X. LI, B. KANG, X.-Q. ZHANG, Y. YANG, J. CHENG, S.-Y. YIN, Y. TONG, J.-Q. HE, and OTHERS. 2015. Akt-mediated phosphorylation of Oct4 is associated with the proliferation of stem-like cancer cells. *Oncol. Rep.* 33: 1621–1629. Available at: <https://www.spandidos-publications.com/or/33/4/1621?text=fulltext> [Accessed October 11, 2016].
- ZHOU, Y., S. MIRZA, T. XU, P. TRIPATHI, B. PLUNKETT, A. MYERS, and P. GAO. 2014. Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) Modulates Cockroach Allergen-Induced Immune Responses through Active TGF- $\beta$ 1 Release. *Mediators Inflamm.* 2014: e591479. Available at: <http://www.hindawi.com/journals/mi/2014/591479/abs/> [Accessed May 7, 2014].
- ZHU, Y., J. A. RICHARDSON, L. F. PARADA, and J. M. GRAFF. 1998. Smad3 mutant mice develop metastatic colorectal cancer. *Cell* 94: 703–714. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867400817304> [Accessed October 11, 2016].
- ZOELLER, R. T. 2001. Polychlorinated biphenyls as disruptors of thyroid hormone action. *PCBs Recent Adv. Environ. Toxicol. Health Eff.* Robertson LW Hansen LG Eds Lexington. Univ. Press Ky. 265–271. Available at: <https://books.google.fr/books?hl=fr&lr=&id=g9i7AiYR8GsC&oi=fnd&pg=PA265&dq=Zoeller+2000+AND+TCDD&ots=nJHNGtwZDw&sig=z7Z5OHOGQ2R0Yx75S2-ipYIKeXk> [Accessed October 11, 2016].